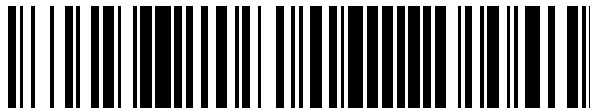


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 574 177**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/87** (2006.01)

**C12N 15/11** (2006.01)

**A61K 48/00** (2006.01)

**A61K 31/713** (2006.01)

**A61K 47/18** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.12.2011 E 11802425 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.04.2016 EP 2658982**

54 Título: **Conjugados de moléculas pequeñas para la dispensación intracelular de compuestos biológicamente activos**

30 Prioridad:

**29.12.2010 US 201061427845 P**

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

**15.06.2016**

73 Titular/es:

**F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)  
Grenzacherstrasse 124  
4070 Basel, CH**

72 Inventor/es:

**HADWIGER, PHILIPP;  
HOFFMANN, TORSTEN;  
JAHN-HOFMANN, KERSTIN;  
KITAS, ERIC A.;  
LEWIS, DAVID L.;  
MOHR, PETER;  
MUELLER, HANS MARTIN;  
OTT, GUENTHER;  
ROEHL, INGO y  
ROZEMA, DAVID B.**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

**ES 2 574 177 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

Conjugados de moléculas pequeñas para la dispensación intracelular de compuestos biológicamente activos

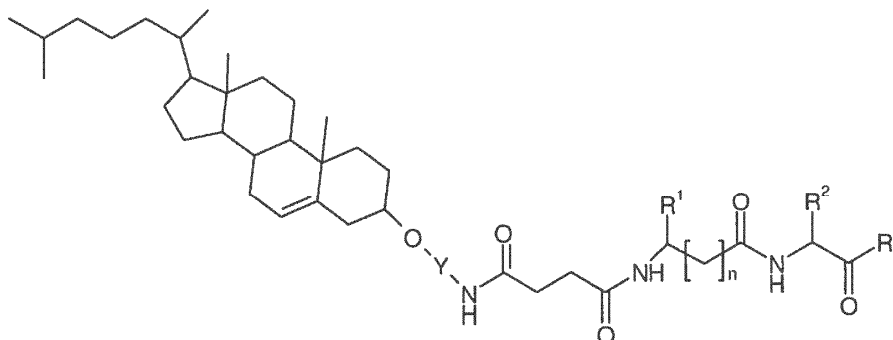
5 La presente invención se relaciona con nuevos conjugados de molécula pequeña útiles para la dispensación de sustancias biológicamente activas, tales como ácidos nucleicos, péptidos y proteínas. La dispensación de ácidos nucleicos y otros compuestos sustancialmente impermeables a la membrana celular al interior de una célula viva está muy restringida por el complejo sistema de membranas celulares de la célula.

10 La técnica previa incluye J. Controlled Release, 144, 2010, 227-232, desvelando ésta (página 229, figura 1) colesterol unido a una molécula de ARNip, con un enlace disulfuro escindible.

Un medio que se ha usado para dispensar una sustancia biológicamente activa tal como ácidos nucleicos *in vivo* ha sido unir la sustancia biológicamente activa, bien a una molécula de direccionamiento pequeña o bien a una molécula hidrófoba tal como un lípido o un esteroide. Aunque se ha observado cierta dispensación y actividad con estos conjugados, la dosis de sustancia biológicamente activa necesaria con estos métodos ha sido excesivamente grande, dando como resultado a menudo efectos tóxicos indeseables *in vivo*. En el presente documento se proporcionan compuestos de molécula pequeña que pueden conjugarse con una sustancia biológicamente activa y actuar como mediadores con éxito en la dispensación de dicha sustancia biológicamente activa dentro de una célula.

20 Sorprendentemente, se ha encontrado que ahora son suficientes dosis significativamente reducidas de la sustancia biológicamente activa para su dispensación con éxito cuando se usan los compuestos novedosos que se proporcionan en el presente documento. Por tanto, los nuevos compuestos proporcionan una poderosa herramienta para la dispensación de sustancias biológicamente activas con una toxicidad *in vivo* considerablemente limitada.

25 En una realización, la presente invención se dirige a los compuestos de fórmula



(I)

en la que,

30 Y es un grupo engarzador seleccionado entre  $-(\text{CH}_2)_3-$  o  $-\text{C}(\text{O})-\text{N}-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_p-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ ;

R<sup>1</sup> es -alquil(C<sub>1-6</sub>);  
naftil-(CH<sub>2</sub>)-; o  
35 fenil-(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-, cuyo fenilo está sin sustituir o está sustituido hasta cuatro veces con un sustituyente seleccionados de forma independiente entre  
-NO<sub>2</sub>,  
-CN,  
halógeno,  
40 fenil-(CH<sub>2</sub>)-O-, alquil(C1-6)-O-, o -C(O)-NH<sub>2</sub>;

R<sup>2</sup> es hidrógeno;  
-(CH<sub>2</sub>)<sub>k</sub>-N-C(Ph)<sub>3</sub>, cuyos anillos fenilo están sin sustituir o están sustituidos de forma independiente con  
alquil(C<sub>1-4</sub>)-O-;  
45 -(CH<sub>2</sub>)<sub>k</sub>-C(O)-NH<sub>2</sub>;  
fenil-(CH<sub>2</sub>)<sub>k</sub>-;  
alquil C1-6, que no está sustituido o está sustituido una vez con -S-CH<sub>3</sub>;

R<sup>3</sup> es fenil-NH-, cuyo grupo fenilo está sustituido adicionalmente con un sustituyente seleccionado de forma independiente entre  
50 -(CH<sub>2</sub>)-OH; o  
-(CH<sub>2</sub>)-O-C(O)-O-(4-nitro-fenil);  
k es 1, 2, 3, 4, 5, 6;

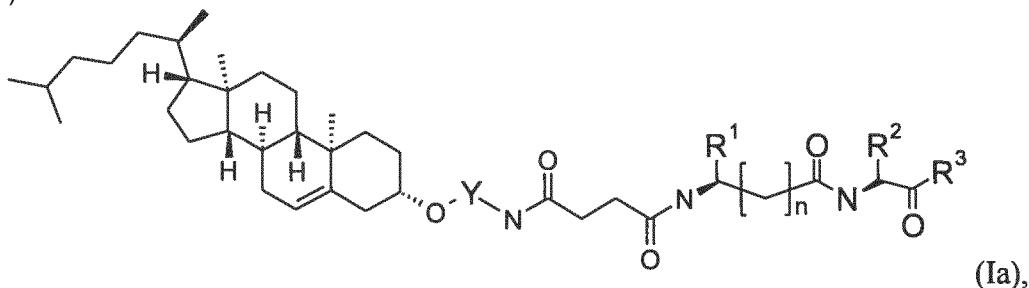
m es 1, 2, 3 o 4;

n es 0 1;

5 p es un entero de 1 a 20; y

en la que los grupos  $R^2$  y  $R^3$ , junto con los átomos a los que están unidos, forman un sustrato que puede escindirse con catepsina B.

10 En otra realización, los compuestos de fórmula (I) pueden tener la conformación específica que se muestra en la fórmula (Ia)



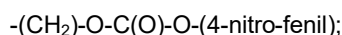
15 en la que todos los sustituyentes  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$  e Y, así como las variables k, m, n, y p tienen el significado dado anteriormente.

En otra realización más, la presente invención se dirige a compuestos de fórmula (I) o (Ia), en la que Y es,  $-(CH_2)_3-$ ; y todos los grupos sustituyentes restantes tienen el significado dado anteriormente.

20 En otra realización más, la presente invención se dirige a compuestos de fórmula (I) o (Ia), en la que Y es,  $-C(O)-N-(CH_2-CH_2-O)_p-CH_2-CH_2-$ ; y todos los grupos sustituyentes tienen el significado dado anteriormente.

En otra realización más, se proporcionan los compuestos de fórmulas (I) o (Ia), en las que Y es  $-(CH_2)_3-$ ;

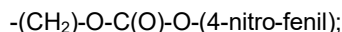
25  $R^2$  es  $-(CH_2)_k-N-C(Ph)_3$ , cuyos anillos fenilo están sin sustituir o están sustituidos de forma independiente con alquil( $C_{1-4}$ )-O-; y  $R^3$  es fenil-NH-, cuyo grupo fenilo está sustituido adicionalmente con



30 n es 0, y  $R^1$  y k tienen los significados dados anteriormente.

En otra realización más, se proporcionan los compuestos de fórmulas (I) o (Ia), en las que Y es  $-C(O)-N-(CH_2-CH_2-O)_p-CH_2-CH_2-$ ;

35  $R^2$  es  $-(CH_2)_k-N-C(Ph)_3$ , cuyos anillos fenilo están sin sustituir o están sustituidos de forma independiente con alquil( $C_{1-4}$ )-O-; y  $R^3$  es fenil-NH-, cuyo grupo fenilo está sustituido adicionalmente con

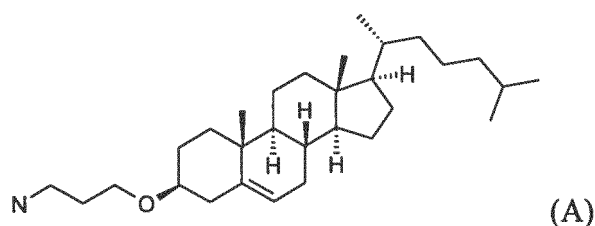


40 n es 0, y  $R^1$ , k y p tienen los significados dados anteriormente.

45 El término "alquil (C1-6)" tal como se usa en el presente documento significa un hidrocarburo saturado, lineal o ramificado que contiene de 1 a 6 átomos de carbono. Los grupos alquil (C1-6) preferidos incluyen metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, 2-butilo y similares.

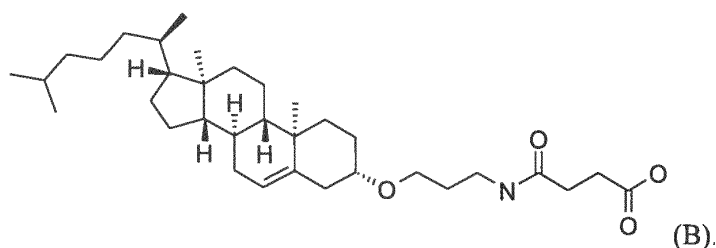
El término "halógeno", tal como se usa en el presente documento significa flúor, cloro, bromo, o yodo, siendo preferidos flúor y cloro.

50 Los compuestos de acuerdo con la presente invención pueden obtenerse de forma general usando métodos conocidos por la persona con experiencia habitual en la técnica de la química orgánica o medicinal. Más concretamente, los compuestos de fórmula (Ia), en la que Y es  $-(CH_2)_3-$  y n = 0, pueden obtenerse usando el compuesto (A) como material de partida.

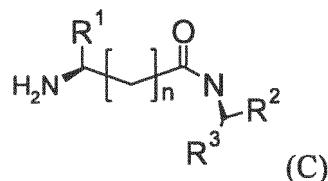


La síntesis de (A) se describe, entre otros, en el documento WO2001/070415.

- 5 El compuesto de fórmula (A) se hace reaccionar además en presencia de base de Hünig y acetato de etilo (AcOET), seguido de la adición de dihidrofuran-2,5-diona en THF, para dar los compuestos de fórmula (B).



- 10 Los compuestos de fórmula (B) se hacen reaccionar además con una amina de fórmula (C),



para dar los compuestos de fórmula (Ia).

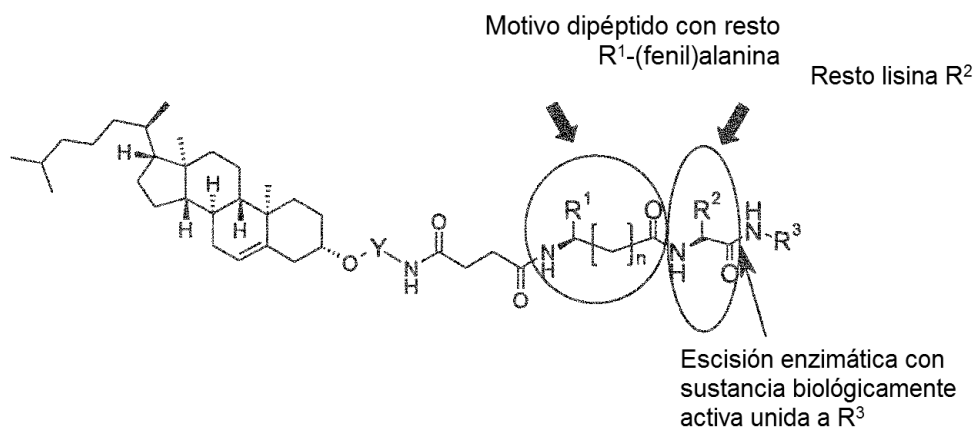
- 15 Los compuestos de fórmula (I) o (Ia) son útiles como ligandos en sustancias biológicamente activas, tales como ácidos nucleicos, péptidos o proteínas, a los que se unen de forma covalente. Preferentemente, el enlace covalente se crea mediante la reacción de un grupo funcional adecuado, tal como, es decir, un grupo de amina primaria, en la  
 20 sustancia biológicamente activa con el grupo carbonilo activado en el resto -O-C(O)-O- de R<sup>3</sup> tal como se ha definido anteriormente en el presente documento. Por lo tanto, en el presente documento se proporciona un conjugado que comprende los compuestos de fórmula (I) o (Ia) y una sustancia biológicamente activa.

- La expresión "sustancia biológicamente activa" tal como se usa en el presente documento se refiere a una molécula orgánica o inorgánica que incluye una molécula pequeña, péptido (p. ej., péptidos de penetración celular), proteína, carbohidrato (incluyendo monosacáridos, oligosacáridos, y polisacáridos), nucleoproteína, mucoproteína, lipoproteína, polipéptido o proteína sintéticos, o una molécula pequeña unida a una proteína, glucoproteína, esteroide, ácido nucleico (cualquier forma de ADN, incluyendo ADNc, o ARN, o un fragmento de los mismos), nucleótido, nucleósido, oligonucleótidos (incluyendo oligonucleótidos no codificantes, ANB, ARNip), gen, lípido, hormona, o combinaciones de los mismos, que causa un efecto biológico cuando se administra a un animal *in vivo*,  
 30 incluyendo pero sin limitación a aves y mamíferos, incluyendo seres humanos, Preferentemente, dicha sustancia biológicamente activa es un péptido o un ácido nucleico. Los ácidos nucleicos preferidos usados en el presente documento son ARNip.

- El conjugado que comprende los presentes compuestos unido covalentemente a una sustancia biológicamente activa presenta una capacidad mejorada para ser captado por las células en comparación con dicha sustancia biológicamente activa sola. Una vez que el conjugado se dispensa al interior de la célula y se desplaza al lisosoma, la sustancia biológicamente activa correspondiente se libera mediante escisión enzimática. Esta escisión tiene lugar preferentemente cuando un motivo dipéptido, que consiste preferentemente en la secuencia  $\alpha$ - o  $\beta$ -(fenil)alanina y lisina como presentes en los compuestos de fórmula (I) o (Ia) se incorpora en el conjugado (véase el esquema 1). Lo  
 40 más preferentemente, el conjugado contiene el motivo dipéptido y un espaciador tal como el espaciador *p*-aminobencil-carbamato (Bioconjugate Chem. 2002,13,855) que se fragmenta de forma espontánea una vez que se escinde el enlace de amida C-terminal del motivo dipéptido, tal como se ejemplifica para los ARNip en el esquema 2. Por lo tanto, los conjugados que comprenden los compuestos de fórmula (I) o (Ia) también se designan como conjugados de colesterol que contienen dipéptidos. La escisión enzimática de la sustancia biológicamente activa de los conjugados de colesterol que contienen dipéptidos de esta invención está catalizada por proteasas innatas de la  
 45 célula. Un ejemplo de una proteasa innata capaz de escindir el motivo dipéptido presente en los compuestos de

fórmula (I) o (Ia) es la catepsina B. La catepsina B es una conocida proteasa de cisteína ubicua situada en los lisosomas de las células de mamíferos (Bioconjugate Chem. 2002,13,855; J. Med. Chem. 2005,48,1344; Nat. Biotechnology 2003,21,778). Por tanto, el motivo dipéptido descrito anteriormente también se designa como motivo dipéptido escindible por catepsina.

5 La presente divulgación también proporciona, por tanto, un método para la dispensación de una sustancia biológicamente activa, al interior de células en las que dicha sustancia biológicamente activa puede escindirse posteriormente del conjugado para desplegar una actividad terapéutica.

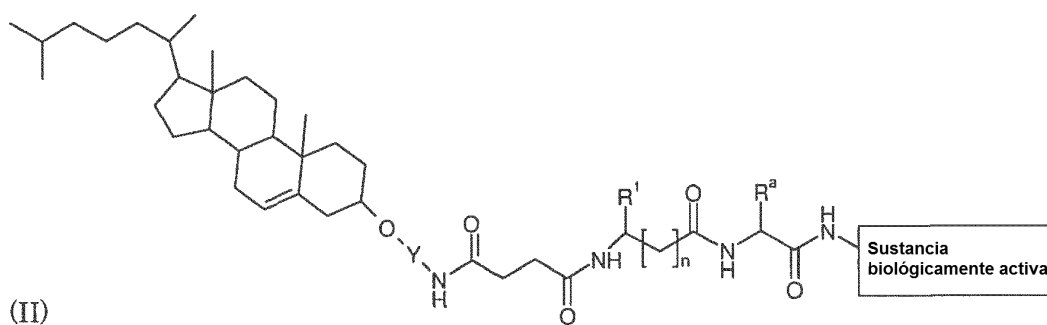


Esquema 1

10 En otras realizaciones de la presente invención, se proporciona un conjugado de los compuestos de fórmula (I) o (Ia) unido covalentemente a un compuesto biológicamente activo, preferentemente un ARNip o un resto de péptido. Preferentemente, dicho resto de péptido es un péptido que presenta propiedades que alteran la membrana, como los péptidos de penetración celular o los péptidos anfífilos.

15 Los conjugados de fórmula (I) o (Ia) unidos covalentemente a una sustancia biológicamente activa se designan en el presente documento como fórmula (II) o (IIa), respectivamente.

20 Por lo tanto, en una realización adicional, la presente invención proporciona un compuesto de fórmula



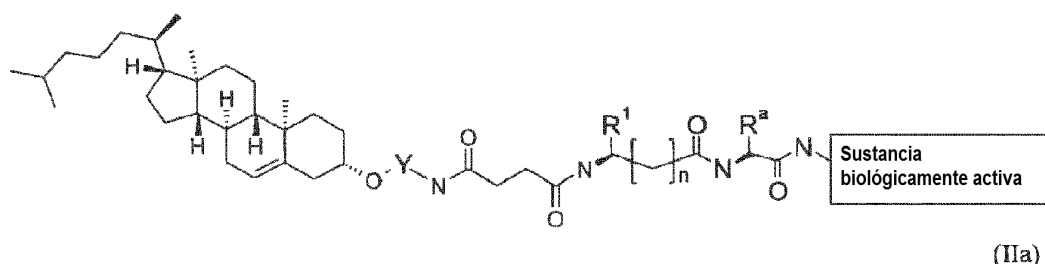
25 en la que

$R^a$  es  $-(CH_2)_k-NH_2$ ;

30  $R^1$  y  $k$  tienen los significados dados para la fórmula (I) anterior; y

la sustancia biológicamente activa es un ácido nucleico, una proteína o un péptido.

35 En una realización más específica, la presente invención proporciona compuestos de fórmula



en la que

$R^a$  es  $-(CH_2)_k-NH_2$ ;

$R^1$  y  $k$  tienen los significados dados para la fórmula (I) anterior; y

la sustancia biológicamente activa es un ácido nucleico, una proteína o un péptido.

En una realización preferida, la sustancia biológicamente activa en la fórmula (II) o (IIa) es un ácido nucleico, más preferentemente un ARNip.

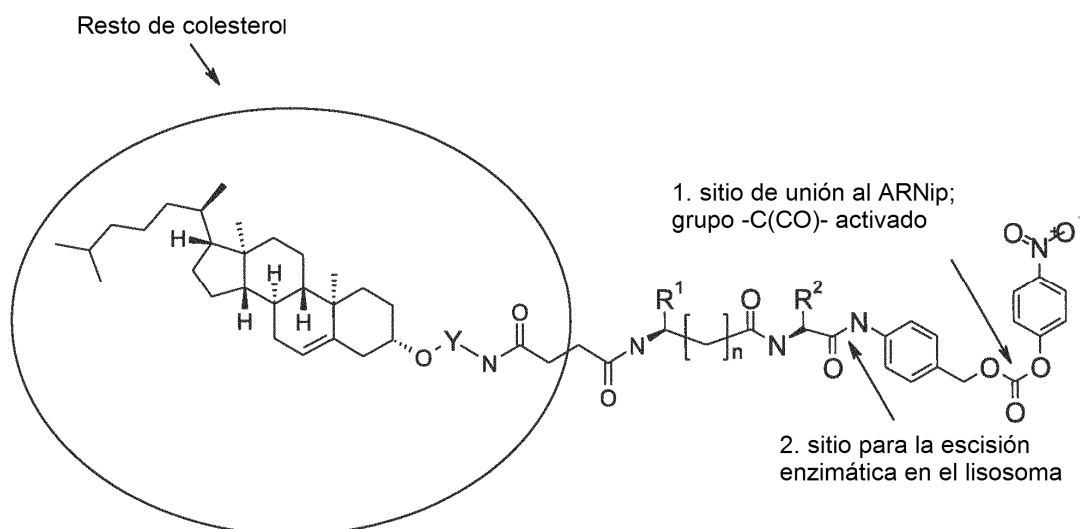
En otra realización preferida, la sustancia biológicamente activa en la fórmula (II) o (IIa) es una proteína o un péptido. Los compuestos de fórmula (II) o (IIa) pueden tener propiedades valiosas en terapia. Por lo tanto, en una realización adicional, se proporcionan compuestos de fórmula (II) o (IIa) para su uso como medicamentos.

Otra realización de la invención es una composición farmacéutica que comprende los conjugados de los compuestos de fórmula (I) o (Ia) unidos covalentemente a una sustancia biológicamente activa.

En otra realización más de la invención se proporciona una composición farmacéutica que comprende los compuestos de fórmula (IIa) junto con excipientes farmacéuticamente aceptables.

Las realizaciones de más adelante se ejemplifican para los conjugados de los compuestos de fórmula (I) o (Ia) unidos covalentemente a ARNip, por tanto, los compuestos de fórmula (II) o (IIa) en los que la sustancia biológicamente activa es ARNip. Se entiende que estas realizaciones también son aplicables para otras sustancias biológicamente activas tales como péptidos y proteínas.

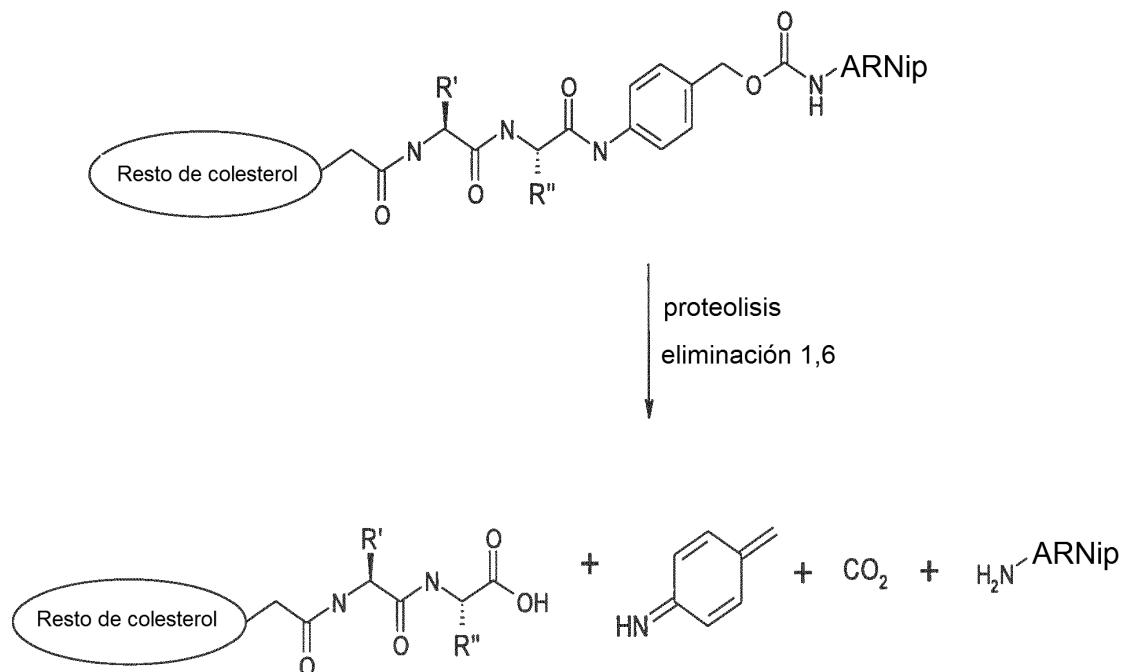
El enlace covalente del ARNip a los compuestos de fórmula (I) o (Ia) se logra por medio de la reacción de un grupo nucleofílico adecuado, es decir, un grupo de amina primaria al ARNip con el grupo  $-C(O)-$  activado en el  $R^3$  de dichos compuestos de fórmula (I) o (Ia). La activación de dicho grupo  $-C(O)-$  se obtiene mediante un *p*-nitrofenoxicarbonato, tal como se muestra en el esquema 2, más adelante.



(Esquema 2)

El carbonato activado con *p*-nitrofenilo puede hacerse reaccionar, por ejemplo, con el ARNip equipado con un hexilamino engarzador para generar una unión carbamato para dar el conjugado de ARNip. Una vez que el ARNip se capta intracelularmente y se transfecta al lisosoma, los compuestos de fórmula (II) o (IIa), en los que la sustancia

biológicamente activa es ARNip se escinden mediante la actividad proteasa liberando el ARNip, como también se muestra en el esquema 2. El resto de colesterol del conjugado de los compuestos de fórmula (II) o (IIa) modifica las propiedades de PK del ARNip de tal manera que la administración sistémica permite el silenciamiento genético *in vivo*.



5

Esquema 3

En una realización, los compuestos de fórmula (II) o (IIa) en los que la sustancia biológicamente activa es ARNip se coadministran con un polímero de dispensación. Los polímeros de dispensación proporcionan un medio para alterar las membranas celulares y actuar como mediadores en la liberación endosómica. En otra realización, dicho polímero de dispensación y el conjugado de ARNip de la invención no están unidos covalentemente y se sintetizan por separado y pueden suministrarse en envases separados o en un único envase. Los polímeros de dispensación para oligonucleótidos tales como el ARNip son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, Rozema et al., en la publicación de la patente de EE.UU. 20040162260 demostraron un medio para regular de forma reversible la actividad perturbadora de membrana de una poliamina activa de membrana. La regulación reversible proporcionó un medio para limitar la actividad de los endosomas de las células diana, limitando así la toxicidad. Su método residía en la reacción de las aminas de la poliamina con el anhídrido 2-propiónico-3-metilaléico. Esta modificación convertía el policatión en un polianión por medio de la conversión de las aminas primarias en grupos que contenían carboxilo e inhibía de forma reversible la actividad de membrana de la poliamina. Para permitir la liberación simultánea del ácido nucleico con el vehículo de dispensación, el ácido nucleico se unió de forma covalente con el polímero de dispensación. En la solicitud de patente provisional de EE.UU. 61/307490 se describe una nueva generación de polímeros de dispensación. En la cual, se proporcionan poliaminas activas de membrana que comprenden un terpolímero anfipático formado mediante polimerización aleatoria de monómeros que contienen amina, monómeros hidrófobos inferiores, y monómeros hidrófobos superiores. Esta nueva generación de polímeros de dispensación eliminó la necesidad de que el polinucleótido y el polímero se asocien, bien mediante unión covalente o bien mediante interacción carga-carga.

Ejemplos no limitantes de polímeros de dispensación usados para la coadministración con los conjugados de ARNip de la invención son las poliaminas activas de membrana y el éter polivinílico (PBAVE), Dynamic PolyConjugates - policonjugados dinámicos- (DPC; Rozema et al. 2007) y DPC mejorados tal como se desvela en la solicitud de patente provisional de EE.UU. provisional 61/307490.

Se proporciona un nuevo patrón de modificación química de ARNip para la dispensación funcional *in vivo*. Este nuevo patrón de modificación química de ARNip es especialmente útil con los vehículos de dispensación que presentan una retención endosómica/lisosómica relativamente fuerte.

Se encontró que la estabilización del ARNip contra la degradación mediante nucleasas con localización endosómica/lisosómica tales como la ADNasa II mejora notablemente la atenuación génica (*knockdown*) en la célula diana. Dicha estabilización puede afectar directamente a la cantidad de ARNip liberado en el interior del citoplasma en el que se sitúa la maquinaria celular del ARNi. Solo la porción de ARNip disponible en el citoplasma desencadenará el efecto de ARNi.

40

Además de sus deficientes características farmacocinéticas, los ARNip son sensibles a las nucleasas del entorno biológico cuando se administran como tales en la circulación sin un vehículo de dispensación protector. Por consiguiente, muchos ARNip se degradan rápidamente, bien intracelularmente en el tejido y el torrente circulatorio o bien tras la captación intracelular (endosoma).

Una nucleasa bien conocida en los compartimentos endosoma/lisosoma es la ADNasa II. Esta enzima es activa a un pH por encima de 6-6,5 con una actividad máxima en el intervalo de pH de 4,5-5, reflejando condiciones presentes en el entorno acidificado del compartimento endosoma/lisosoma. Las siguientes vías de degradación de ARN inducida por la ADNasa II se identificaron *in vitro* y se desvelan en esta memoria descriptiva:

A. Las cadenas de ARN que contienen al menos un nucleótido 2'-OH se degradan rápidamente por medio de un intermediario de fósforo pentavalente, que conduce a fosfatos cíclicos 2'-3' en el producto de escisión 5'. La formación del intermediario pentavalente puede inhibirse por nucleótidos que carecen de un grupo 2'-OH tal como 2'-desoxi, 2'-O-metil (2'-OMe) o 2'-desoxi-2'-fluoro (2'-F) -nucleótidos.

B. Además, el ARN se degrada en una vía exonucleolítica 5' independiente de la modificación 2' en los nucleótidos 5'-terminales. Esta vía de degradación puede inhibirse por restos no nucleótidos 5'-terminales, como p. ej., colesterol, engarzador aminoalquilo o un fosforotioato en el primer enlace internucleotídico.

C. Un 5'-fosfato también protege y retrasa la cinética de escisión exonucleolítica, pero no puede bloquear completamente esta vía. Esto se debe, muy probablemente a la escisión del 5'-fosfato por fosfatasa o a una actividad fosfatasa inherente de la preparación enzimática de ADNasa II usada en el ensayo de estabilidad.

D. La mejor protección se logró con oligonucleótidos que carecen de cualquier nucleótido 2'-OH dentro de la cadena, empezando con un nucleótido 2'-OMe en el extremo 5' conectado mediante un enlace fosforotioato (PTO) con el segundo nucleótido. Otros nucleótidos no 2'-OH también protegen contra la exodegradación 5', pero en un menor grado en comparación con la modificación 2'-OMe. Por lo tanto, los inventores de la presente invención encontraron que los ARNip pueden estabilizarse significativamente cuando se usa el siguiente diseño, en el que se proporciona un oligonucleótido con una cadena no codificante con el patrón de modificación: 5'-(w)-(Z1)-(Z2)-(Z3)<sub>n<sub>a</sub></sub>-3' y una cadena codificante con el patrón de modificación 5'-(Z3)<sub>n<sub>s</sub></sub>-3', en la que w es indistintamente un 5'-fosfato o 5'-fosfotioato o H,

Z1 es indistintamente un nucleósido 2' modificado.

Z2 es indistintamente un 2'-desoxinucleosido o un 2'-fluoro-nucleósido modificado,

Z3 es indistintamente un 2' modificado,

n<sub>a</sub> es 8-23 y n<sub>s</sub> es 8-25.

Se proporciona un oligonucleótido con una cadena no codificante con el patrón de modificación: 5'-(w)-(Z1)-(Z2)-(Z3)<sub>n<sub>a</sub></sub>-3' y una cadena codificante con el patrón de modificación 5'-(Z3)<sub>n<sub>s</sub></sub>-3', en la que Z1 es un 2'-fluoro-nucleósido modificado o un 2'-desoxinucleosido y todos los demás sustituyentes, así como las variables n<sub>a</sub> y n<sub>s</sub> tienen el significado dado anteriormente.

Se proporciona un oligonucleótido con una cadena no codificante con el patrón de modificación: 5'-(w)-(Z1)-(Z2)-(Z3)<sub>n<sub>a</sub></sub>-3' y una cadena codificante con el patrón de modificación 5'-(Z3)<sub>n<sub>s</sub></sub>-3', en la que Z3 es un 2'-O-metil nucleósido modificado, un 2'-fluoro-nucleósido modificado o un 2'-desoxinucleosido y todos los demás sustituyentes, así como las variables n<sub>a</sub> y n<sub>s</sub> tienen el significado dado anteriormente.

Se proporciona un oligonucleótido con una cadena no codificante con el patrón de modificación: 5'-(w)-(Z1)-(Z2)-(Z3)<sub>n<sub>a</sub></sub>-3' y una cadena codificante con el patrón de modificación 5'-(Z3)<sub>n<sub>s</sub></sub>-3', en la que Z1 es un 2'-fluoro-nucleósido modificado o un 2'-desoxinucleosido y Z3 es un 2'-O-metil nucleósido modificado, un 2'-fluoro-nucleósido modificado o un 2'-desoxinucleosido y todos los demás sustituyentes, así como las variables n<sub>a</sub> y n<sub>s</sub> tienen el significado dado anteriormente.

Los nucleótidos de la secuencia de ácido nucleico del oligonucleótido con el patrón de modificación novedoso pueden estar ligados, bien mediante enlaces 5'-3' fosfodiésteres o bien mediante 5'-3' fosforotioatos.

Tal como se usa en el presente documento, la cadena "no codificante" es la cadena del ARNip que es complementaria al ARNm diana y que se unirá al ARNm una vez que el ARNip esté desenrollado.

La cadena codificante de dicho ARNip que comprende el patrón de modificación novedoso es complementaria a la cadena no codificante.

Se demostró que dicho ARNip que comprende el patrón de modificación novedoso era particularmente ventajosa cuando se unía covalentemente a un polímero de dispensación, como ejemplifican Rozema et al. Dynamic PolyConjugates (DPC; Rozema et al. 2007). La potencia y duración del efecto pueden potenciarse significativamente empleando la estrategia de modificación de ARNip que se indica en esta invención.

Los ARNip que comprenden el patrón de modificación novedoso son especialmente útiles cuando se conjugan con moléculas pequeñas que alteran las propiedades farmacocinéticas del ARNip, tales como el colesterol o los compuestos de fórmula (I) y (Ia) proporcionados en el presente documento.



Se proporciona un conjugado de una molécula pequeña y un oligonucleótido en el que el oligonucleótido tiene el siguiente patrón de modificación: la cadena no codificante con el patrón de modificación: 5'-(w)-(Z1)-(Z2)-(Z3)<sub>n<sub>a</sub></sub>-3' y una cadena codificante con el patrón de modificación 5'-(Z3)<sub>n<sub>s</sub></sub>, en la que los sustituyentes, así como las variables n<sub>a</sub> y n<sub>s</sub> tienen el significado dado anteriormente. Dicha molécula pequeña puede ser colesterol. En la invención dicha molécula pequeña es un compuesto de fórmula (I) o (Ia), que da como resultado compuestos de fórmula (II) o (IIa).

Preferentemente, dichos conjugados de ARNip se coadministran con un polímero de dispensación. Anteriormente se describen polímeros de dispensación adecuados.

Los ARNip que comprenden el patrón de modificación novedoso son especialmente útiles cuando se conjugan con un ligando que se sabe que se une a un receptor específico que internaliza el conjugado al interior de una célula. En particular, el receptor de asialoglucoproteína (ASGPR) que se expresa en los hepatocitos es un receptor bien conocido que permite la eliminación de la circulación (endocitosis y degradación lisosómica) de proteínas desializadas. Se ha demostrado que la *N*-acetil-D-galactosamina tiene una alta afinidad por el receptor, especialmente cuando presenta múltiples valencias y cuando los restos de galactosa están espaciados adecuadamente (J Biol Chem, 2001, 276, 37577). Con el fin de utilizar este receptor de alta capacidad para la endocitosis mediada por receptor de la sustancia biológicamente activa, el ligando mostrado anteriormente se preparó para unirse covalentemente a los ARNip que comprenden el patrón de modificación novedoso. Dado que este tipo de endocitosis conduce a la degradación lisosómica del material internalizado, el ARNip ha de prepararse de tal manera que sea estable en el lisosoma, lo cual se resuelve ahora mediante el patrón de modificación novedoso indicado anteriormente.

Se encontró que para estos patrones de modificación, se demostraba que los engarzadores escindibles eran ventajosos en comparación con los ligandos de moléculas pequeñas unidos de forma estable. Los posibles engarzadores escindibles eran un motivo dipéptido, tal como se ejemplifica en el esquema 1 o un engarzador escindible de ARN que comprende nucleótidos que contienen 2'-OH. El engarzador escindible de ARN es especialmente útil junto con los ARNip que tienen el patrón novedoso de modificación (ARNip 2' completamente modificado) descrito anteriormente. En principio, puede introducirse un sitio de escisión de nucleasa mediante salientes 3' o 5' que contienen al menos un nucleótido 2'-OH, bien en la cadena codificante o bien en la no codificante. La especie activa final de ARNip se genera mediante procesamiento intracelular con nucleasa. Asimismo, es posible el uso de sitios de escisión definidos conseguido mediante nucleótidos 2'-OH dentro de la región de bases apareadas. Esto puede realizarse usando al menos un nucleótido 2'-OH complementario a la cadena opuesta o mediante la introducción, bien de al menos nucleótido 2'-OH desapareado o de una horquilla/abultamiento que contiene al menos un nucleótido 2'-OH. Al contrario que otras químicas de engarzadores escindibles, el uso de sitios de escisión definidos mediante la introducción de nucleótidos 2'-OH conduce a un planteamiento de conjugación más versátil. Es posible la conjugación múltiple mediante la introducción de sitios de escisión selectivos en una o en ambas cadenas del ARNip, bien en el extremo 3', y/o 5', o bien dentro de la estructura bicatenaria. El engarzador de nucleótido se escinde por nucleasas intracelulares tales como la ADNasa II tras la internalización del conjugado al interior del endosoma, liberando así el ARNip. Preferentemente, dichos conjugados se coadministra con un polímero de dispensación. Anteriormente se describen polímeros de dispensación adecuados.

#### Definiciones

La expresión "molécula pequeña" tal como se usa en el presente documento, se refiere a moléculas orgánicas o inorgánicas, bien sintetizadas, o bien de origen natural, que por lo general tienen un peso molecular de menos de 10.000 gramos por mol, opcionalmente menos de 5.000 gramos por mol, opcionalmente menos de 2.000 gramos por mol,

El término "péptido" tal como se usa en el presente documento se refiere a cualquier compuesto polimérico producido mediante la formación de un enlace amida entre un grupo alfa carboxilo de un aminoácido D o L y un grupo alfa amino de otro aminoácido D o L. El término "proteína" tal como se usa en el presente documento se refiere a polipéptidos de secuencia específica de más de 50 restos.

La expresión "motivo dipéptido" tal como se usa en el presente documento se refiere a cualquier motivo que comprende un enlace amida formado por el grupo amino alfa o beta D o L de un primer aminoácido con el grupo alfa carboxilo de un segundo aminoácido D o L.

Tal como se usa en el presente documento, el término "aminoácido" se refiere a cualquier molécula que contiene grupos funcionales tanto amino como carboxilo. Por tanto, el término "aminoácido" se refiere a aminoácidos tanto naturales como no naturales y sintéticos. Cualquiera de los aminoácidos naturales usados en la presente invención se designa en el presente documento mediante sus abreviaturas habituales.

El término "ligando" tal como se usa en el presente documento se refiere a un resto que es capaz de unirse químicamente de forma covalente o de otra forma a una sustancia biológicamente activa. El término "ligando" en el

contexto de la invención es preferentemente un compuesto de fórmula (I) o (Ia) unido covalentemente a una sustancia biológicamente activa.

La expresión "sustancia biológicamente activa" tal como se usa en el presente documento se refiere a una molécula orgánica o inorgánica que incluye una molécula pequeña, péptido (p. ej., péptidos de penetración celular), proteína, carbohidrato (incluyendo monosacáridos, oligosacáridos, y polisacáridos) nucleoproteína, mucoproteína, lipoproteína, polipéptido o proteína sintéticos, o una molécula pequeña unida a una proteína, glucoproteína, esteroide, ácido nucleico (cualquier forma de ADN, incluyendo ADNc, o ARN, o un fragmento de los mismos), nucleótido, nucleósido, oligonucleótidos (incluyendo oligonucleótidos no codificantes, ANB, ARNip), gen, lípido, hormona, o una combinación de las mismas, que causa un efecto biológico cuando se administra a un animal *in vivo*, incluyendo pero sin limitación a aves y mamíferos, incluyendo seres humanos. Preferentemente, dicha sustancia biológicamente activa es un péptido o un ácido nucleico. Los ácidos nucleicos preferidos usados en el presente documento son ARNip.

La expresión "ácido nucleico" tal como se usa en el presente documento significa un oligómero o polímero compuesto de nucleótidos, p. ej., desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos o compuestos producidos de forma sintética (p. ej., APN tal como se describe en la patente de EE.UU. n.º 5.948.902 y en las referencias citadas en el presente documento) que puede hibridar con ácidos nucleicos de origen natural de una manera específica de secuencia, análoga a la de dos ácidos nucleicos de origen natural, p. ej., puede participar en las interacciones de apareamiento de bases de Watson-Crick. Los ácidos nucleicos de origen no natural son oligómeros o polímeros que contienen secuencias de nucleobases que no aparecen en la naturaleza, o especies que contienen equivalentes funcionales de nucleobases, azúcares, o enlaces inter-azúcar de origen natural, como ácidos peptidónucleicos (APN), ácidos treosanucleicos (ATN), ácidos nucleicos bloqueado (ANB), ácidos gliceronucleicos (AGN). Esta expresión incluye oligómeros que contienen las nucleobases de origen natural adenina (A), guanina (G), timina (T), citosina (C) y uracilo (U), así como oligómeros que contienen análogos de base o nucleobases modificadas. Los ácidos nucleicos pueden proceder de una variedad de fuentes naturales tales como ADN y ARN virales, bacterianos y eucariotas. Otros ácidos nucleicos pueden obtenerse a partir de fuentes sintéticas, e incluir cualquiera de los múltiples oligonucleótidos que se están fabricando para su uso como reactivos para investigación, reactivos para diagnóstico o agentes terapéuticos potenciales y definitivos. La expresión incluye oligómeros constituidos por un ácido nucleico monocatenario o un ácido nucleico bicatenario.

La expresión "2' modificado" tal como se usa en el presente documento se refiere a un  $\beta$ -D-ribonucleósido o un  $\beta$ -D-ribonucleótido constituido por nucleobases de origen natural que tienen el grupo 2'-OH sustituido por H, F, O-CH<sub>3</sub> u otros sustituyentes conocidos en la técnica.

La expresión "nucleótido 2'-OH" tal como se usa en el presente documento se refiere a un  $\beta$ -D-ribonucleósido constituido por nucleobases de origen natural que tienen un grupo 2'-OH.

El término "5'-fosfato" tal como se usa en el presente documento se refiere a la fórmula -O-P(=O)(OH)OH. En otro aspecto, el fosfato se modifica de modo que uno de los grupos O u OH está sustituido por un S y se denomina en el presente documento como "5'-fosfotioato".

El término "fosfotioato" tal como se usa en el presente documento se refiere a un enlace internucleotídico en el cual uno de los oxígenos que no forma puente está sustituido por azufre.

La expresión "polímero de dispensación" tal como se usa en el presente documento se refiere a polímeros adecuados para la dispensación funcional de una sustancia biológicamente activa. En el contexto de la presente invención el polímero de dispensación se une covalentemente o bien se coadministra con la sustancia biológicamente activa conjugada con los compuestos descritos en el presente documento y actúa como mediador en el escape endosómico tras la internalización al interior de la célula y la captación al interior del endosoma. El término "polímero" en este contexto significa cualquier compuesto que está formado por dos o más unidades monoméricas unidas covalentemente entre sí, donde las unidades monoméricas pueden ser iguales o diferentes, de modo que el polímero puede ser un homopolímero o un heteropolímero. Los polímeros representativos incluyen péptidos, polisacáridos, ácidos nucleicos y similares, en los que los polímeros pueden ser de origen natural o sintéticos. Ejemplos no limitantes de polímeros de dispensación se revisan, por ejemplo en INTERNATIONAL JOURNAL OF PHARMACEUTICAL RESEARCH AND DEVELOPMENT, octubre - 2010 / volumen- 2 / número- 8 / artículo n.º -2. Ejemplos no limitantes de polímeros de dispensación útiles para dispensar ácidos nucleicos se desvelan en las solicitudes de patente europea EP10165502.5 y 10191030.5, la publicación PCT WO 2008/0022309 y la solicitud de patente provisional de EE.UU. 61/307490 y las referencias citadas en el presente documento; todas ellas incluidas mediante referencia.

Tal como se usa en el presente documento, "composición farmacéutica" incluye los conjugados de la invención, un vehículo o diluyente farmacéutico y cualquier otro medio o agente necesario para la formulación.

Tal como se usa en el presente documento, "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye a cualquiera y a todos los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y

de retraso de la absorción, y similares que son fisiológicamente compatibles. Preferentemente, el vehículo es adecuado para la administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, parenteral, raquídea o epidérmica (p. ej., mediante inyección o infusión).

5 Puede administrarse un conjugado de la presente invención mediante una variedad de métodos conocidos en la técnica. Como apreciarán los expertos en la materia, la vía y/o modo de administración variará dependiendo de los resultados deseados. Para administrar un conjugado de la invención mediante ciertas vías de administración, puede ser necesario recubrir el conjugado con, o coadministrar el conjugado con, un material para evitar su inactivación. Por ejemplo, el conjugado puede administrarse a un sujeto en un vehículo o diluyente apropiado. Los diluyentes farmacéuticamente aceptables incluyen soluciones tamponadas salinas y acuosas. Los vehículos farmacéuticos incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. El uso de dichos medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas se conoce en la técnica.

15 Las frases "administración parenteral" y "administrado por vía parenteral", tal como se usan en el presente documento, significan modos de administración distintos de la administración entérica y tópica, normalmente mediante inyección, e incluyen, sin limitación, la inyección e infusión intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intrarraquídea, epidural e intraesternal.

20 Estos vehículos también pueden contener adyuvantes, tales como conservantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes y agentes de dispersión. La prevención de la presencia de microorganismos puede garantizarse tanto mediante los procesos de esterilización, anteriormente citados, como mediante la inclusión de diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabeno, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, y similares. También puede ser deseable incluir agentes isotónicos, tales como azúcares, cloruro sódico, y similares en las composiciones. Además, puede provocarse la absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable mediante la inclusión de agentes que retrasan la absorción, tales como monoestearato de aluminio y gelatina.

30 Independientemente de la vía de administración seleccionada, los conjugados de la presente invención, que pueden usarse en una forma hidratada adecuada, y/o las composiciones farmacéuticas de la presente invención, se formulan en formas de dosificación farmacéuticamente aceptables mediante métodos convencionales conocidos por los expertos en la materia.

35 Los niveles de dosificación reales de los principios activos de las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden variarse para obtener una cantidad del principio activo que sea eficaz para lograr la respuesta terapéutica deseada para un paciente, composición, y modo de administración concretos, sin ser tóxicos para el paciente. El nivel de dosificación seleccionado dependerá de una variedad de factores farmacocinéticos incluyendo la actividad de las composiciones particulares empleadas de la presente invención, la vía de administración, el tiempo de administración, la velocidad de excreción del compuesto particular que se esté empleando, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos y/o materiales usados en combinación con las composiciones particulares empleadas, de la edad, sexo, peso, afección, salud general e historial médico previo del paciente que se esté tratando, y de factores similares bien conocidos en las técnicas médicas.

45 Las composiciones farmacéuticas han de ser estériles y fluidas hasta el grado de que la composición pueda dispensarse mediante jeringa. Además del agua, el vehículo es preferentemente una solución salina isotónica tamponada

50 Puede mantenerse la fluidez adecuada, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula necesario en el caso de las dispersiones y mediante el uso de tensioactivos. En muchos casos, es preferible incluir en la composición agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol o sorbitol, y cloruro sódico.

Descripción detallada de las figuras

55 La figura 1 muestra la coadministración de conjugados-ARNip que comprenden los compuestos de fórmula (I) o (Ia) y un polímero de dispensación *in vivo*.

La figura 2 muestra la coadministración de conjugados-ARNip que comprenden los compuestos de fórmula (I) o (Ia) y un polímero de dispensación *in vivo*.

60 La figura 3 muestra la coadministración de conjugados-ARNip que comprenden los compuestos de fórmula (I) o (Ia) y un polímero de dispensación *in vivo*.

La figura 4 muestra la coadministración de conjugados-ARNip que comprenden los compuestos de fórmula (I) o (Ia) y un polímero de dispensación *in vivo*.

65

La figura 5a muestra el silenciamiento génico con ARNip 2' completamente modificados mediado por la cadena no codificante. Se cotransfectaron células COS7 con ARNip dirigidos por EGFP a 3 nM y psiCHECK2-AT. La actividad de atenuación génica de los ARNip se evaluó midiendo la actividad luciferasa de *Renilla* frente a la de luciérnaga a partir de la construcción indicadora. Los ARNip se clasificaron según la actividad de atenuación de los ARNip de referencia no modificados (2-19-2).

La figura 5a muestra el silenciamiento génico con ARNip 2' completamente modificados mediado por la cadena codificante. Se cotransfectaron células COS7 con ARNip dirigidos por EGFP a 3 nM y psiCHECK2-ST. La actividad de atenuación génica de los ARNip se evaluó midiendo la actividad luciferasa a partir de la construcción indicadora. Los ARNip se clasificaron según la actividad de atenuación de los ARNip de referencia no modificados (2-19-2).

La figura 6 muestra la reducción de la actividad FVII sérico en primates no humanos tras la inyección intravenosa de diversos ARNip 2' modificados unidos covalentemente a un polímero de dispensación.

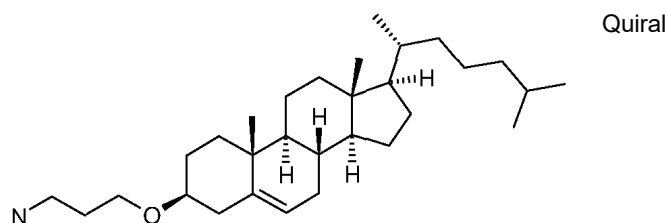
La figura 6b muestra el desarrollo del tiempo de protrombina en primates no humanos tras el tratamiento con ARNip 2' modificados conjugados covalentemente con un polímero de dispensación.

La invención se entenderá de forma más completa con referencia a los siguientes ejemplos. No deberían, sin embargo, interpretarse como limitantes del alcance de la invención.

## Ejemplos

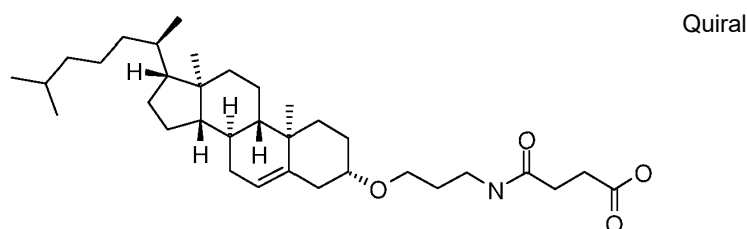
### Ejemplo 1

Etapa 1: 3-[(3S,8S,9S,10R,13R,14S,17R)-17-((R)-1,5-dimetil-hexil)-10,13-dimetil-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecahidro-1H-ciclopenta[a]fenantren-3-iloxi]-propilamina



La amina base se preparó a partir de su precursor nitrilo de acuerdo con un protocolo de la bibliografía [Lollo et al, documento WO2001/070415].

Etapa 2: Ácido N-{3-[(3S,8S,9S,10R,13R,14S,17R)-17-((R)-1,5-Dimetil-hexil)-10,13-dimetil-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecahidro-1H-ciclopenta[a]fenantren-3-iloxi]-propil}-succinámico

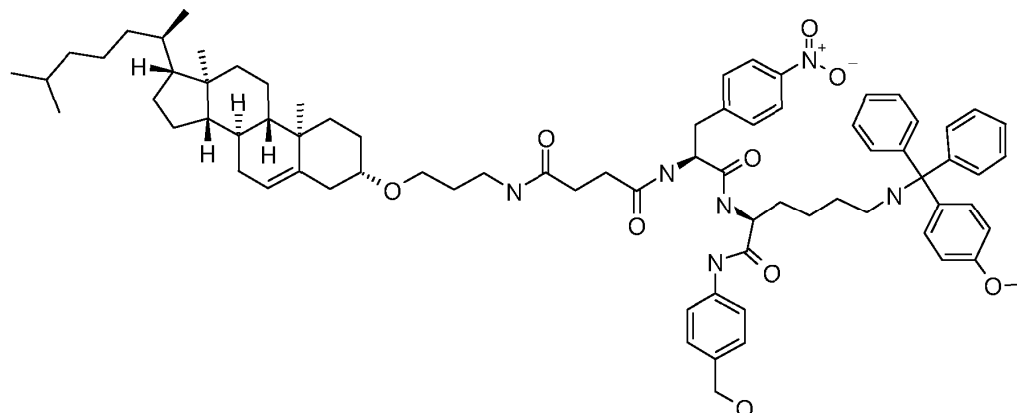


En un matraz de fondo redondo de 2 l, se combinaron en THF 3-[(3S,8S,9S,10R,13R,14S,17R)-10,13-dimetil-17-((R)-6-metilheptan-2-il)-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecahidro-1H-ciclopenta[a]fenantren-3-iloxi]propan-1-amina (21,15 g, 47,7 mmol, Equiv: 1,00) y base de Hünig (12,3 g, 16,6 ml, 95,3 mmol, Equiv: 2,00) con AcOEt (845 ml) para dar una solución incolora. Se añadió dihidrofuran-2,5-diona (4,77 g, 47,7 mmol, Equiv: 1,00) en THF (42 ml) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante toda la noche => suspensión de color blanco. Todos los elementos volátiles se eliminaron al vacío, el residuo se disolvió en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, la capa orgánica se lavó con NH<sub>4</sub>Cl y salmuera, se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, y se evaporó a sequedad. El producto bruto se disolvió en CH<sub>3</sub>CN / H<sub>2</sub>O y se liofilizó para dar 29,8 g del compuesto base en forma de polvo esponjoso.

EM (PI) (espectrometría de masas por pulverización de iones): (M-H) 542,5.

Etapa 3: N1-(3-[(3S,8S,9S,10R,13R,14S,17R)-10,13-dimetil-17-((R)-6-metilheptan-2-il)-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecahidro-1H-ciclopenta[a]fenantren-3-iloxi]propil)-N4-((S)-1-((S)-1-(4-

(hidroximetil)fenilamino)-6-((4-metoxifenil)difenilmetilamino)-1-oxohexan-2-ilamino)-3-(4-nitrofenil)-1-oxopropan-2-il)succinamida



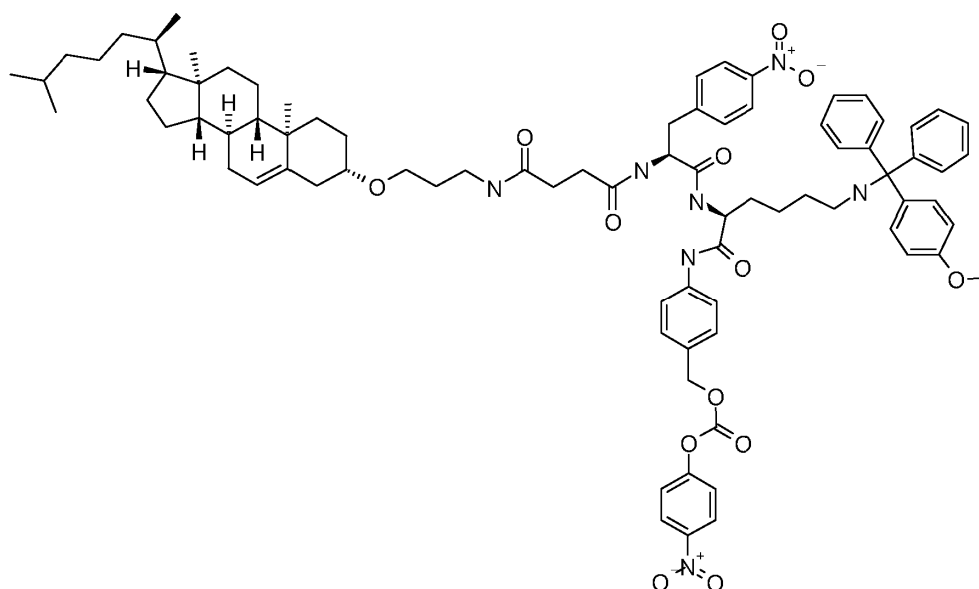
Quiral

- 5 En un matraz de fondo redondo de 10 ml, se mezclaron juntos el ácido 4-(3-((3S,8S,9S,10R,13R,14S,17R)-10,13-dimetil-17-((R)-6-metilheptan-2-il)-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecahidro-1H-ciclopenta[a]fenantren-3-iloxi)propilamino)-4-oxobutanóico preparado anteriormente (106 mg, 184  $\mu$ mol, Equiv: 1,00), (S)-2-((S)-2-amino-3-(4-nitrofenil)propanamido)-N-(4-(hidroximetil)fenil)-6-((4-metoxifenil)difenilmetilamino)hexanamida (132 mg, 184  $\mu$ mol, Equiv: 1,00), HOAt (25,0 mg, 184  $\mu$ mol, Equiv: 1,00) y clorhidrato de EDC (35,3 mg, 184  $\mu$ mol, Equiv: 1,00) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1,8 ml) para dar una solución de color amarillo. Se añadió base de Hünig (47,5 mg, 64,2  $\mu$ l, 368 mmol, Equiv: 2,00) y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante toda la noche. La CCF (cromatografía en capa fina) indicó el consumo del material de partida. Todos los elementos volátiles se eliminaron al vacío y el producto bruto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida en SiO<sub>2</sub>/MeOH 7 %/NET3 0,1 % en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> para producir 128 mg del compuesto base en forma de sólido de color amarillo

15

EM: Masa esperada: 1240,7552, masa hallada: 1240. 7518.

#### Etapa 4:



Quiral

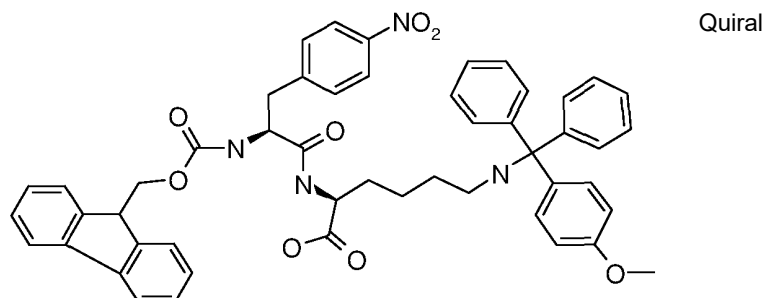
- 20 En un matraz de fondo redondo de 10 ml, la N1-(3-((3S,8S,9S,10R,13R,14S,17R)-10,13-dimetil-17-((R)-6-metilheptan-2-il)-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecahidro-1H-ciclopenta[a]fenantren-3-iloxi)propil)-N4-((S)-1-((S)-1-(4-(hidroximetil)fenilamino)-6-((4-metoxifenil)difenilmetilamino)-1-oxohexan-2-ilamino)-3-(4-nitrofenil)-1-oxopropan-2-il)succinamida preparada anteriormente (126 mg 101  $\mu$ mol, Equiv: 1,00) y base de Hünig (39,3 mg, 53,2  $\mu$ l, 304  $\mu$ mol, Equiv: 3,00) se combinaron con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1,4 ml) y DMF (1,0 ml) para dar una suspensión de color amarillo; se añadió bis(4-nitrofenil) carbonato (46,3 mg, 152  $\mu$ mol, Equiv: 1,50) y la reacción se dejó proseguir durante toda la noche. La mezcla se vertió sobre hielo picado, se extrajo a 2 x con AcOEt, se lavó con H<sub>2</sub>O, se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, y se evaporó a sequedad. Después de triturar con ~10 ml de éter dietílico, se obtuvieron 99 mg del producto base en forma de sólido de color blanquecino.

25

EM: Masa esperada: 1405,7614, masa hallada: 1405,7518.

El bloque de construcción de dipéptido necesario para la etapa 3 se preparó de la forma siguiente:

- 5 **Etapa a:** Ácido (S)-2-[(S)-2-(9H-fluoren-9-ilmetoxicarbonilamino)-3-(4-nitro-fenil)-propionilamino]-6-[[4-metoxi-fenil]-difenil-metil]-amino}-hexanóico

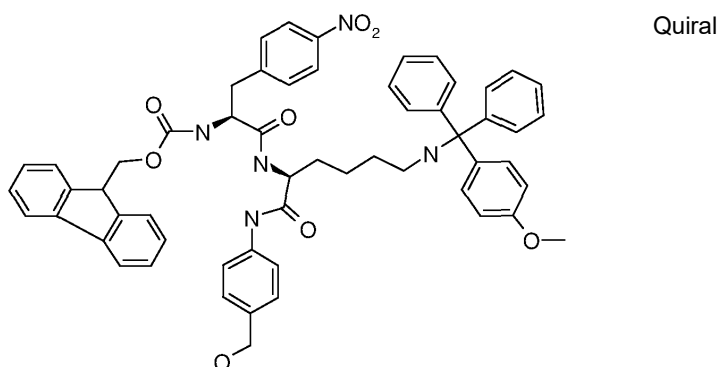


- 10 En un matraz de fondo redondo de 25 ml, Se disolvió ácido (S)-2-amino-6-((4-metoxifenil)difenilmetil-amino)hexanóico (Bio-conjugate Chem. 2002, 13, 855-869, 968 mg, 2,31 mmol. Equiv: 1,00) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (20 ml) para dar una solución de color amarillo claro. Se añadieron base de Hünig (897 mg, 1,21 ml, 6,94 mmol, Equiv: 3,00) y trimetilclorosilano (528 mg, 621 µl, 4,86 mmol, Equiv: 2,10) y la mezcla de reacción se agitó durante 15 min.

- 15 En un segundo matraz de fondo redondo de 50 ml se disolvió ácido (S)-2-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonilamino)-3-(4-nitrofenil)propanóico (1 g, 2,31 mmol, Equiv: 1,00) en DMF (20 ml) para dar una solución incolora. Se añadieron base de Hünig (359 mg, 485 µl, 2,78 mmol. Equiv: 1,20) y TPTU [125700-71-2] (687 mg, 2,31 mmol. Equiv: 1,00) y se agitó la mezcla de reacción durante 20 min. Se añadió la solución del primer matraz que contenía la correspondiente silil éster monosililamina y la reacción se agitó durante otras 3 horas. La mezcla se vertió sobre hielo picado/NH<sub>4</sub>Cl, se extrajo a 2 x con AcOEt, se lavó con H<sub>2</sub>O y salmuera, se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, y se evaporó a sequedad. La cromatografía ultrarrápida en SiO<sub>2</sub>/MeOH 10 %/NEt<sub>3</sub> 0,1 % en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> proporcionó 1,38 g del compuesto base en forma de espuma parduzca..

EM (PI): (M+H) 833,5. [M+Na+] = 855,4.

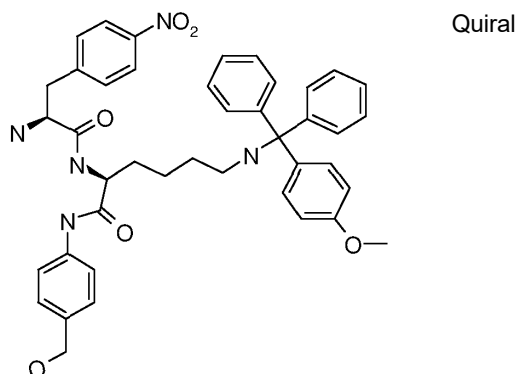
- 25 **Etapa B:** 9H-fluoren-9-ilmetil éster de ácido [(S)-1-((S)-1-(4-Hidroximetil-fenilcarbamoil)-5-[[4-metoxi-fenil]-difenil-metil]-amino)-pencilcar-bamoil]-2-(4-nitro-fenil)-etil]-carbámico.



- 30 En un matraz en forma de pera de 250 ml, se disolvieron el ácido (S)-2-((S)-2-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonilamino)-3-(4-nitrofenil)propanamido)-6-((4-metoxifenil)difenil-metilamino)hexanóico sintetizado anteriormente (1,38 g, 1,66 mmol. Equiv: 1,00), (4-aminofenil)metanol (204 mg, 1,66 mmol. Equiv: 1,00), HOAt (226 mg, 1,66 mmol. Equiv: 1,00) y clorhidrato de EDC (318 mg, 1,66 mmol. Equiv: 1,00) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1,8 ml) para dar una solución de color amarillo. Se añadió base de Hünig (428 mg, 579 µl, 3,31 mmol. Equiv: 2,00) y la reacción se dejó proseguir durante toda la noche. La mezcla se vertió sobre hielo picado/NH<sub>4</sub>Cl (pH ~7), se extrajo a 2 x con AcOEt, se lavó con H<sub>2</sub>O, se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, y se evaporó a sequedad. El producto bruto se trituró con éter dietílico (1 x 50 ml); el sólido resultante se eliminó por filtración y se secó para dar 1,214 gramos del compuesto base en forma de sólido de color pardo claro.

EM (PI): (M-H) 938,7.

- 40 **Etapa c:** (4-hidroximetil-fenil)-amida de ácido (S)-2-[(S)-2-Amino-3-(4-nitro-fenil)-propionilamino]-6-[[4-metoxi-fenil]-difenil-metil]-amino}-hexanóico

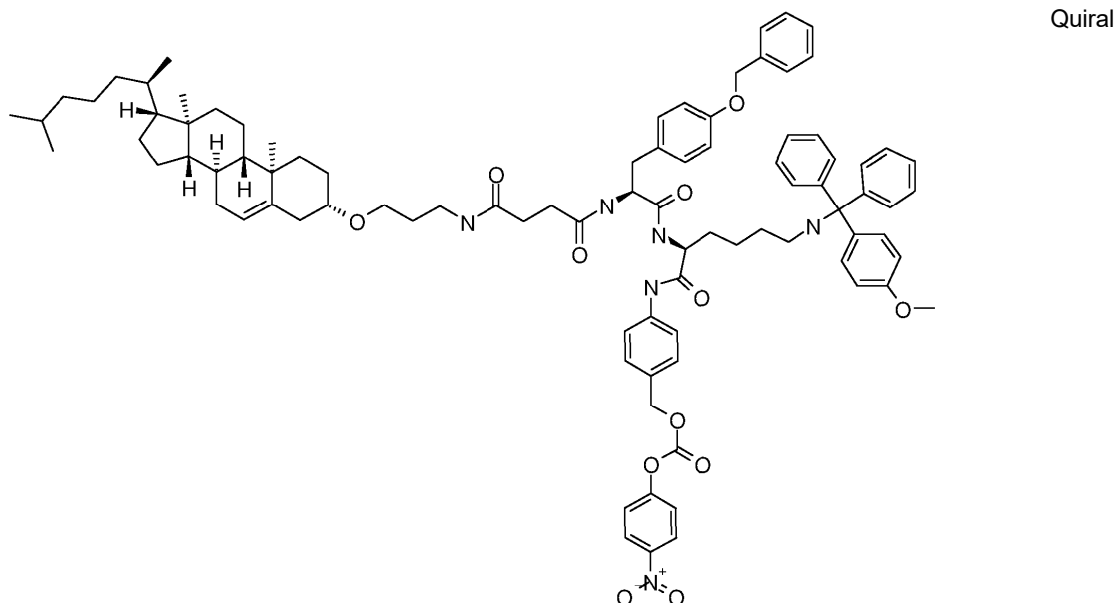


En un matraz de fondo redondo de 50 ml, El 9H-fluoren-9-ilmetil éster de ácido [(S)-1-((S)-1-(4-hidroxi-  
 5 fenilcarbamoil)-5-[[[(4-metoxi-fenil)-difenil-metil]-amino]-pentilcarbamoil]-2-(4-nitro-fenil)-etil]-carbámico preparado  
 anteriormente (1,214 g, 1,29 mmol. Equiv: 1,001) se combinó con THF (19 ml) para dar una solución de color pardo.  
 A 0 °C, se añadió dietilamina (1,77 g, 2,49 ml, 24,2 mmol. Equiv: 18,70). La reacción se agitó a temperatura  
 ambiente durante 3 horas cuando la EM indicó la desaparición del material de partida. Todos los elementos volátiles  
 se eliminaron al vacío; La subsiguiente cromatografía ultrarrápida de SiO<sub>2</sub>/0,1 % NEt<sub>3</sub> en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> => 10 %  
 10 MeOH/0,1 % NEt<sub>3</sub> en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, seguida de una segunda cromatografía ultrarrápida en SiO<sub>2</sub>/MeOH 5 %/NEt<sub>3</sub> 0,1 %  
 en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> proporcionó 502 mg del compuesto base en forma de espuma de color pardo claro.

EM: Masa esperada: 715,337, masa hallada: 715,3362.

#### Ejemplo 2

15 O-bencil-N-[4-({3-[(3 beta)-colest-5-en-3-ilo]propil}amino)-4-oxobutanoil]-L-tirosil-N-6-~[(4-metoxifenil)(difenil)metil]-  
 N-[4-({[(4-nitrofenoxi)carbonil]oxi}metil)fenil]-L-lisinamida



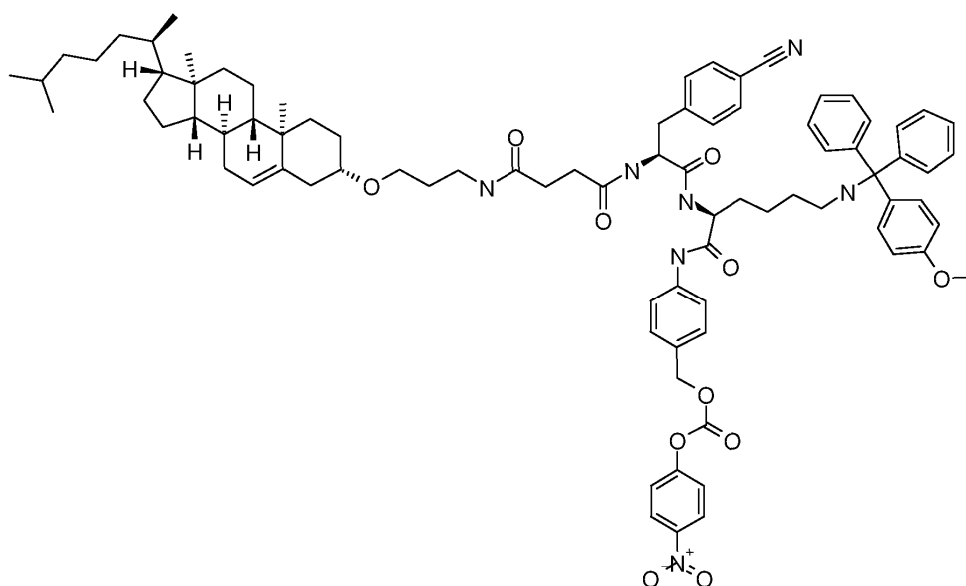
20 Se preparó en analogía al ejemplo 1, pero usando en la etapa 3 (4-hidroxi-  
 2-amino-3-(4-benziloxi-fenil)-propionilamino]-6-[[[(4-metoxi-fenil)-difenil-metil]-amino]-hexanóico en lugar de (S)-2-((S)-  
 2-amino-3-(4-nitrofenil)propanamido)-N-(4-(hidroximetil)fenil)-6-((4-metoxifenil)difenil-metilamino)hexanamida como  
 compañero de acoplamiento. El primero se preparó a partir del ácido (S)-2-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonilamino)-  
 3-(4-(benciloxi)fenil)propanóico, tal como se describe anteriormente en las etapas a) - c).

25 EM: Masa esperada: 1466,8182, masa hallada: 1466,8136.

#### Ejemplo 3

30 O-bencil-N-[4-({3-[(3 beta)-colest-5-en-3-ilo]propil}amino)-4-oxobutanoil]-4-ciano-L-fenilalanil-N-6-~[(4-  
 metoxifenil)(difenil)metil]-N-[4-({[(4-nitrofenoxi)carbonil]oxi}metil)fenil]-L-lisinamida

Quiral



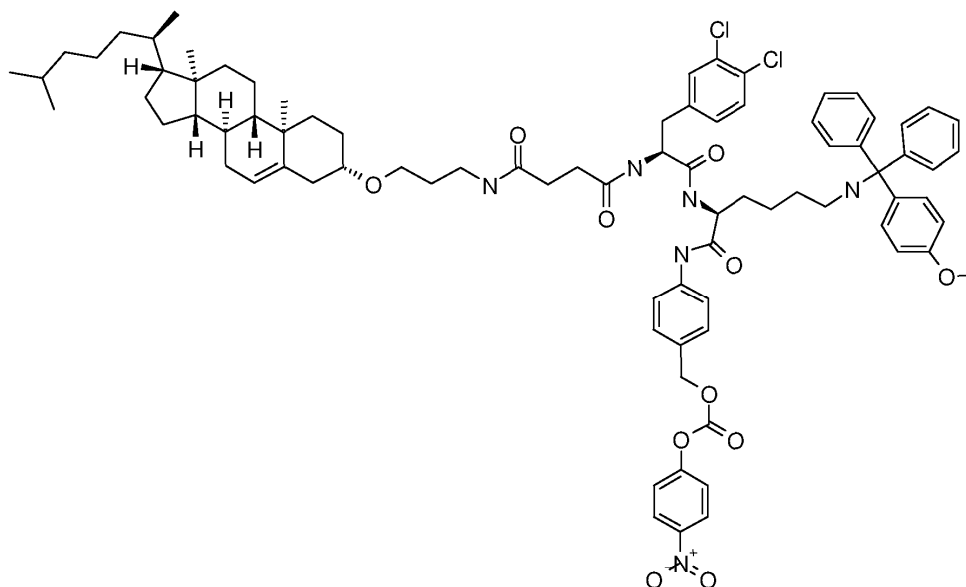
5 Se preparó en analogía al ejemplo 1, pero usando en la etapa 3 (4-hidroximetil-fenil)-amida de ácido (S)-2-[(S)-2-amino-3-(4-ciano-fenil)-propionilamino]-6-[[4-(4-metoxi-fenil)-difetil-metil]-amino]-hexanóico en lugar de (S)-2-[(S)-2-amino-3-(4-nitrofenil)propanamido)-N-(4-(hidroximetil)fenil)-6-((4-metoxifenil)difenil-metilamino)hexanamida como compañero de acoplamiento. El primero se preparó a partir del ácido (S)-2-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonilamino)-3-(4-(cianofenil)propanóico, tal como se describe anteriormente en las etapas a] - c].

EM: Masa esperada: 1385,7716, masa hallada: 1385,7696.

## 10 Ejemplo 4

3,4-dicloro-N-[4-({3-[(3 beta)-colest-5-en-3-ilo]propil}amino)-4-oxobutanoil]-L-fenilalanil-N-6-~-(4-metoxi-fenil)(difetil)metil]-N-[4-(((4-nitrofenoxi)carbonil)oxi)metil]fenil]-L-lisinamida

Quiral



15 Se preparó en analogía al ejemplo 1, pero usando en la etapa 3 (4-hidroximetil-fenil)-amida de ácido (S)-2-[(S)-2-amino-3-(3,4-dicloro-fenil)-propionilamino]-6-[[4-(4-metoxi-fenil)-difetil-metil]-amino]-hexanóico en lugar de (S)-2-[(S)-2-amino-3-(4-nitrofenil)-propanamido)-N-(4-(hidroximetil)fenil)-6-((4-metoxifenil)difenil-metilamino)hexanamida como compañero de acoplamiento. El primero se preparó a partir del ácido (S)-2-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonilamino)-3-(3,4-diclorofenil)propanóico, tal como se describe anteriormente en las etapas a] - c].

20

EM: Masa esperada: 1428,6984, masa hallada: 1428,695.

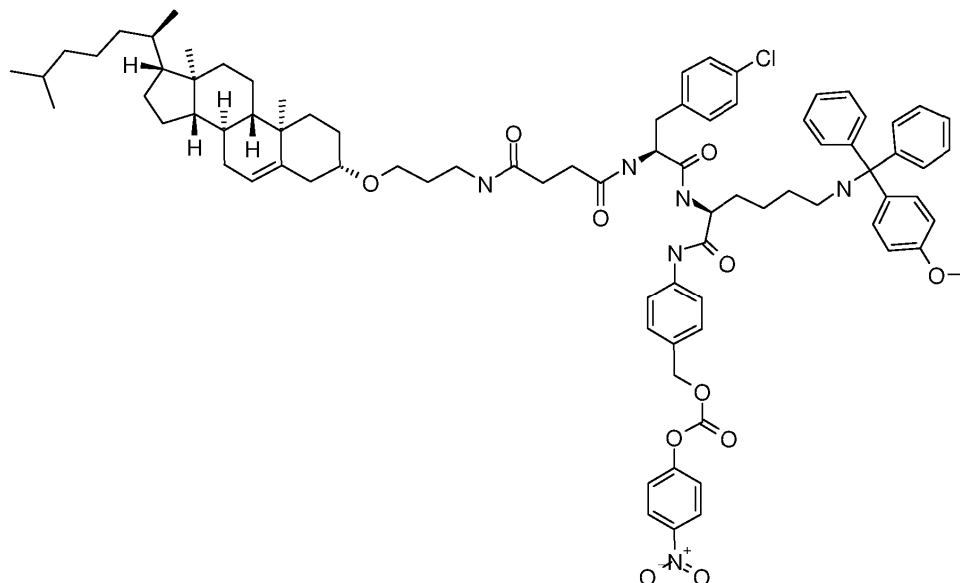


## Ejemplo 5

4-cloro-N-[4-((3 beta)-colest-5-en-3-iloxi)propil]amino]-4-oxobutanoil]-L-fenilalanil-N~6~-[(4-metoxifenil)(difenil)metil]-N-[4-((4-nitrofenoxi)carbonil)oxi]metil]fenil]-L-lisinamida

5

Quiral



Se preparó en analogía al ejemplo 1, pero usando en la etapa 3 (S)-2-((S)-2-amino-3-(4-clorofenil)propanamido)-N-(4-(hidroximetil)fenil)-6-((4-metoxifenil)difenil-metilamino)hexanamida en lugar de (S)-2-((S)-2-amino-3-(4-nitrofenil)propanamido)-N-(4-(hidroximetil)fenil)-6-((4-metoxifenil)difenil-metilamino)hexanamida como compañero de acoplamiento. El primero se preparó a partir del ácido (S)-2-((9H-fluoren-9-il)metoxi)-carbonilamino)-3-(4-clorofenil)propanoico tal como se describe anteriormente en las etapas a] - c].

10

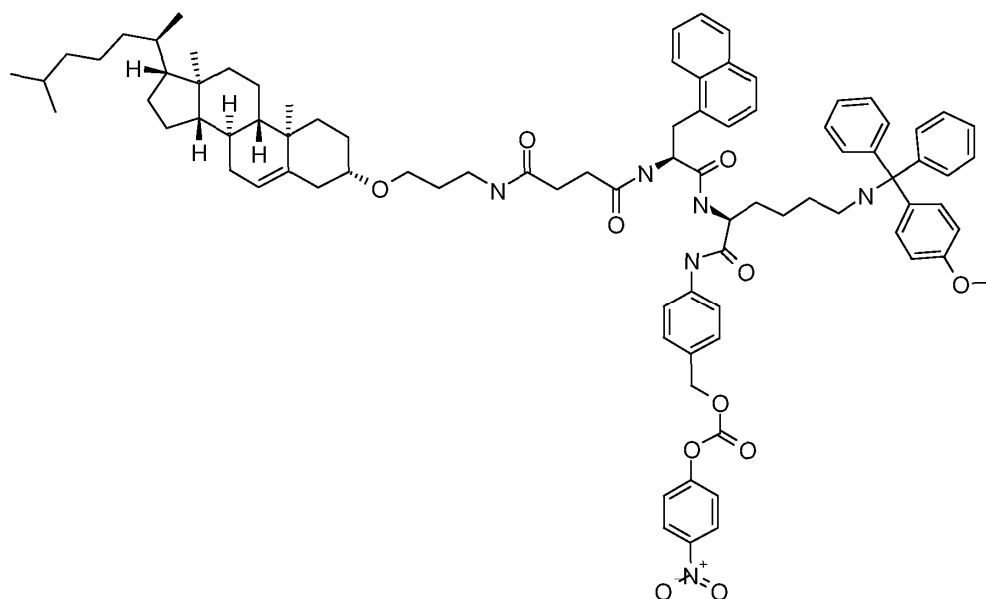
EM: Masa esperada: 1394,7373, masa hallada: 1394,7342.

## 15 Ejemplo 6

4-(((2S)-2-(((2S)-2-((4-((3S,8S,9S,10R,13R,14S,17R)-10,13-dimetil-17-((2R)-6-metilheptan-2-il)-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecahidro-1H-ciclopenta[a]fenantren-3-il)oxi)propil]amino)-4-oxobutanoil]amino)-3-(naftalen-1-il)propanoicil]amino)-6-(((4-metoxifenil)(difenil)metil]amino)hexanoicil]amino)encil 4-nitrofenil carbonato (nombre no preferido)

20

Quiral



5 Se preparó en analogía al ejemplo 1, pero usando en la etapa 3 (4-hidroximetil-fenil)-amida de ácido (S)-2-((S)-2-amino-3-naftalen-1-il-propionilamino)-6-[[4-metoxi-fenil]-difenil-metil]-amino}-hexanóico en lugar de (S)-2-((S)-2-amino-3-(4-nitrofenil)-propanamido)-N-(4-(hidroximetil)fenil)-6-((4-metoxifenil)difenil-metil-amino) hexanamida como compañero de acoplamiento. El primero se preparó a partir del ácido (S)-2-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonilamino)-3-(-1-naftalen-1-il)propanóico, tal como se describe anteriormente en las etapas a] - c].

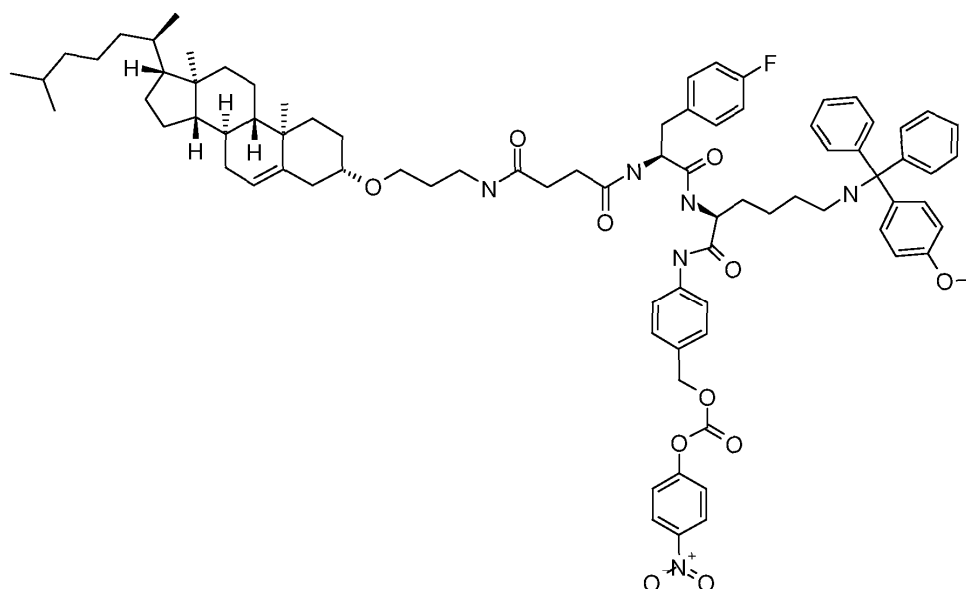
EM: Masa esperada: 1410,792, masa hallada: 1410,7918.

Ejemplo 7

10

N-[4-({3-[(3 beta)-colest-5-en-3-iloxi]propil}amino)-4-oxobutanoil]-4-fluoro-L-fenilalanil-N-6-~-(4-metoxifenil)(difenil)metil]-N-[4-({[(4-nitrofenoxi)carbonil]oxi}metil)fenil]-L-lisinamida

Quiral



15 Se preparó en analogía al ejemplo 1, pero usando en la etapa 3 (4-hidroximetil-fenil)-amida de ácido (S)-2-[(S)-2-amino-3-(4-fluoro-fenil)-propionilamino]-6-[[4-metoxi-fenil]-difenil-metil]-amino}-hexanóico en lugar de (S)-2-((S)-2-amino-3-(4-nitrofenil)propanamido)-N-(4-(hidroximetil)fenil)-6-((4-metoxifenil)difenil-metilamino)hexanamida como compañero de acoplamiento. El primero se preparó a partir del ácido (S)-2-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonilamino)-3-(4-fluorofenil)propanóico, tal como se describe anteriormente en las etapas a] - c].

20

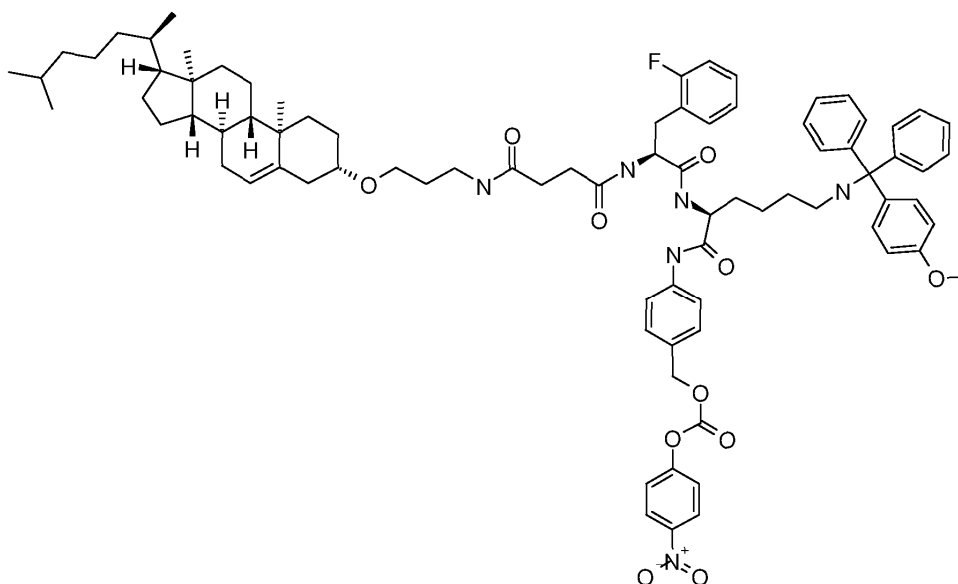
EM: Masa esperada: 1378,7669, masa hallada: 1378,7609.

Ejemplo 8

25

N-[4-({3-[(3 beta)-colest-5-en-3-iloxi]propil}amino)-4-oxobutanoil]-2-fluoro-L-fenilalanil-N-6-~-(4-metoxifenil)(difenil)metil]-N-[4-({[(4-nitrofenoxi)carbonil]oxi}metil)fenil]-L-lisinamida

Quiral



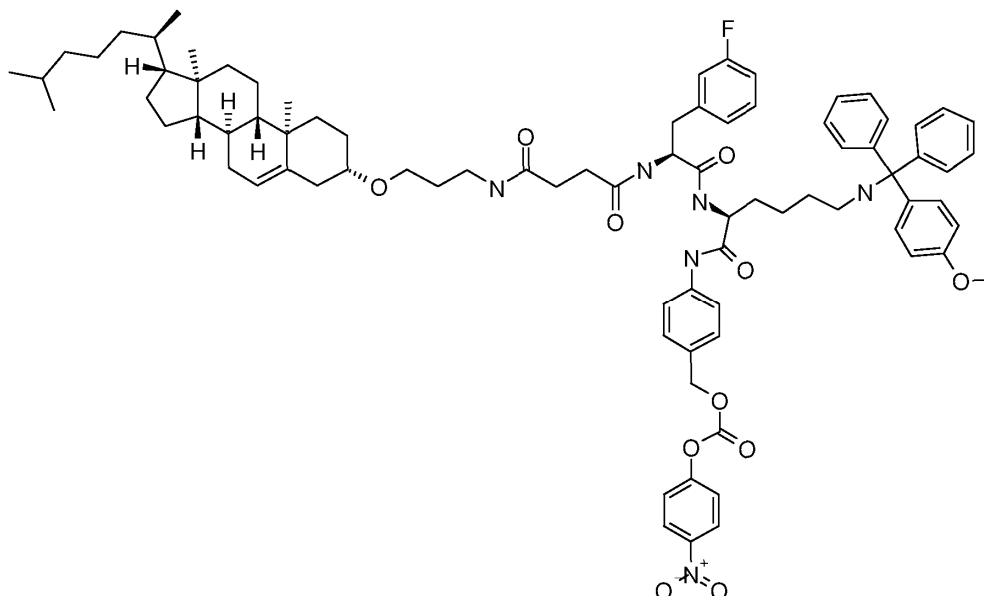
Se preparó en analogía al ejemplo 1, pero usando en la etapa 3 (4-hidroximetil-fenil)-amida de ácido (S)-2-[(S)-2-amino-3-(4-fluoro-fenil)-propionilamino]-6-[[4-(4-metoxi-fenil)-difenil-metil]-amino]-hexanóico en lugar de (S)-2-[(S)-2-amino-3-(4-nitrofenil)propanamido]-N-(4-(hidroximetil)fenil)-6-((4-metoxifenil)difenil-metilamino)hexanamida como compañero de acoplamiento. El primero se preparó a partir del ácido (S)-2-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonilamino)-3-(2-fluorofenil)propanóico, tal como se describe anteriormente en las etapas a) - c].

EM: Masa esperada: 1378,7669, masa hallada: 1378,7689.

#### 10 Ejemplo 9

N-[4-((3 beta)-colest-5-en-3-iloxi)propil]amino]-4-oxobutanóil]-3-fluoro-L-fenilalanil-N-6-[[4-(4-metoxifenil)(difenil)metil]-N-[4-((4-nitrofenoxi)carbonil)oxi]metil]fenil]-L-lisinamida

Quiral



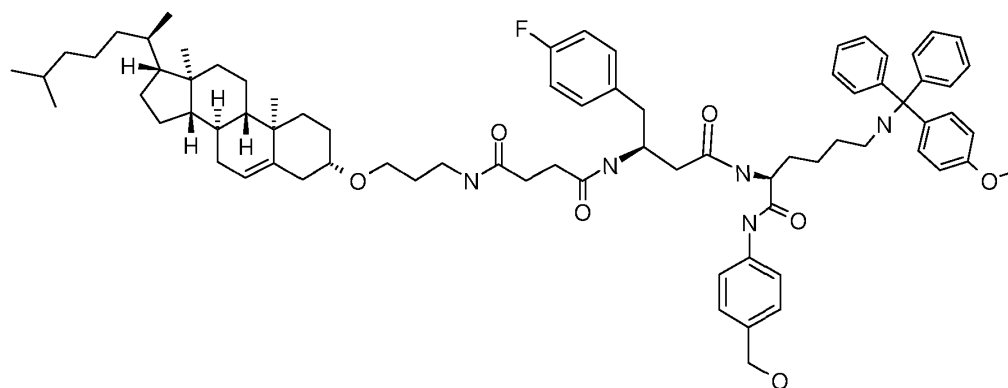
Se preparó en analogía al ejemplo 1, pero usando en la etapa 3 (4-hidroximetil-fenil)-amida de ácido (S)-2-[(S)-2-amino-3-(3-fluoro-fenil)-propionilamino]-6-[[4-(4-metoxi-fenil)-difenil-metil]-amino]-hexanóico en lugar de (S)-2-[(S)-2-amino-3-(4-nitrofenil)propanamido]-N-(4-(hidroximetil)fenil)-6-((4-metoxifenil)difenil-metilamino)hexanamida como compañero de acoplamiento. El primero se preparó a partir del ácido (S)-2-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonilamino)-3-(3-fluorofenil)propanóico, tal como se describe anteriormente en las etapas a) - c].

EM: Masa esperada: 1378,7669, masa hallada: 1378,7659.

#### Ejemplo 10

Etapa 1: N1-(3-((3S,8S,9S,10R,13R,14S,17R)-10,13-dimetil-17-((R)-6-metilheptan-2-il)-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecahidro-1H-ciclopenta[a]fenantren-3-iloxi)propil)-N4-((S)-1-(4-fluorofenil)-4-((S)-1-(4-(hidroximetil)fenilamino)-6-((4-metoxifenil)difenilmetilamino)-1-oxohexan-2-ilamino)-4-oxobutan-2-il)succinamida

5



Quiral

En un matraz de fondo redondo de 10 ml, se mezclaron juntos el ácido ((3S,8S,9S,10R,13R,14S,17R)-10,13-dimetil-17-((R)-6-metilheptan-2-il)-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecahidro-1H-ciclopenta[a]fenantren-3-iloxi)propilamino)-4-oxobutanóico preparado anteriormente (109 mg, 188  $\mu$ mol, Equiv: 1,00), (4-hidroximetil-fenil)-amida de ácido (S)-2-[(S)-3-amino-4-(4-fluoro-fenil)-butirilamino]-6-[[4-metoxi-fenil]-difenil-metil]-amino}-hexanóico (132 mg, 188  $\mu$ mol, Equiv: 1,00), HOAt (25,6 mg, 188  $\mu$ mol, Equiv: 1,00) y clorhidrato de EDC (36,1 mg, 188  $\mu$ mol, Equiv: 1,00) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1,8 ml) para dar una solución de color amarillo. Se añadió base de Hünig (48,7 mg, 64,1  $\mu$ l, 377 mmol, Equiv: 2,00) y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante toda la noche. La CCF (cromatografía en capa fina) indicó el consumo del material de partida. Todos los elementos volátiles se eliminaron al vacío y el producto bruto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida en SiO<sub>2</sub>/MeOH 5 %/NEt<sub>3</sub> 0,1 % en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> para dar 197 mg del compuesto base en forma de sólido amarillo.

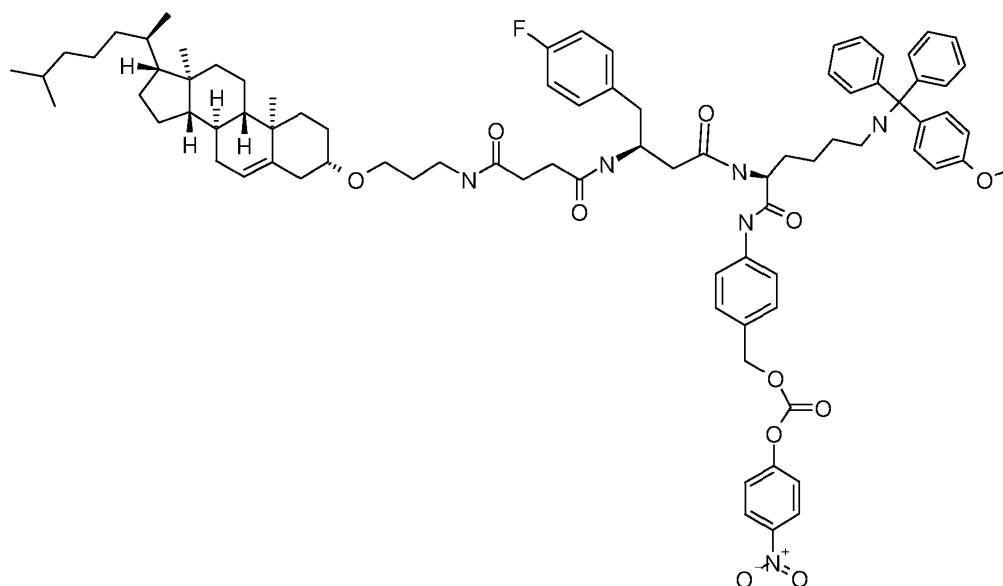
10

15

EM: Masa esperada: 1227,7763, masa hallada: 1227,7714.

Etapa 2: 4-((S)-2-((S)-3-(4-(3-((3S,8S,9S,10R,13R,14S,17R)-10,13-dimetil-17-((R)-6-metilheptan-2-il)-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecahidro-1H-ciclopenta[a]fenantren-3-iloxi)propilamino)-4-oxobutanamido)-4-(4-fluorofenil)butanamido)-6-((4-metoxifenil)difenilmetilamino)hexanamido)-bencil 4-nitrofenil carbonato

20



Quiral

En un matraz de fondo redondo de 10 ml, se combinaron la N1-(3-((3S,8S,9S,10R,13R,14S,17R)-10,13-dimetil-17-((R)-6-metilheptan-2-il)-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecahidro-1H-ciclopenta[a]fenantren-3-iloxi)propil)-N4-((S)-1-((S)-1-(4-(hidroximetil)fenilamino)-6-((4-metoxifenil)difenilmetilamino)-1-oxohexan-2-ilamino)-3-(4-nitrofenil)-4-oxopropan-2-il)succinamida preparada anteriormente (196 mg 160  $\mu$ mol, Equiv: 1,00) y base de Hünig (61,9 mg, 81,4, 479  $\mu$ mol, Equiv: 3,00) con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1,6 ml) y DMF (0,8 ml) para dar una suspensión de color amarillo; se añadió bis(4-nitrofenil) carbonato (72,8 mg, 239  $\mu$ mol, Equiv: 1,50) y la reacción se dejó proseguir durante toda la noche. La mezcla se vertió sobre hielo picado/NH<sub>4</sub>Cl (pH ~6), se extrajo a 2 x con AcOEt, se lavó

25

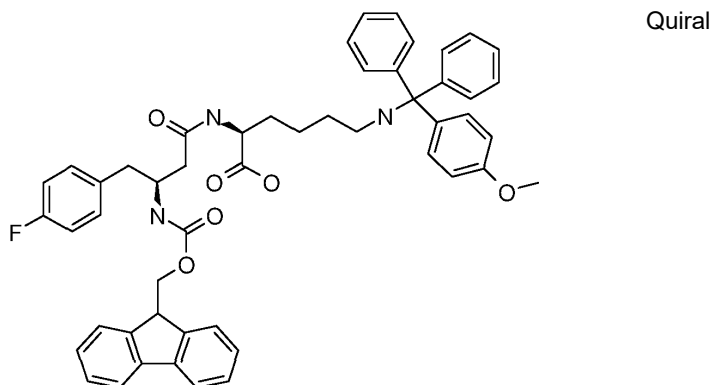
30

con H<sub>2</sub>O y salmuera, se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, y se evaporó a sequedad. Después de triturar con AcOEt /heptano se obtuvieron 123 mg del compuesto base en forma sólido de color amarillo claro.

EM: Masa esperada: 1392,7825, masa hallada: 1392,7819.

El bloque de construcción dipeptídico necesario para la etapa 1 se preparó de la forma siguiente:

Etapa a: Ácido (S)-2-[(S)-3-(9H-fluoren-9-ilmetoxicarbonilamino)-4-(4-fluoro-fenil)-butirilamino]-6-[(4-metoxi-fenil)-difeníl-metil]-amino}-hexanóico

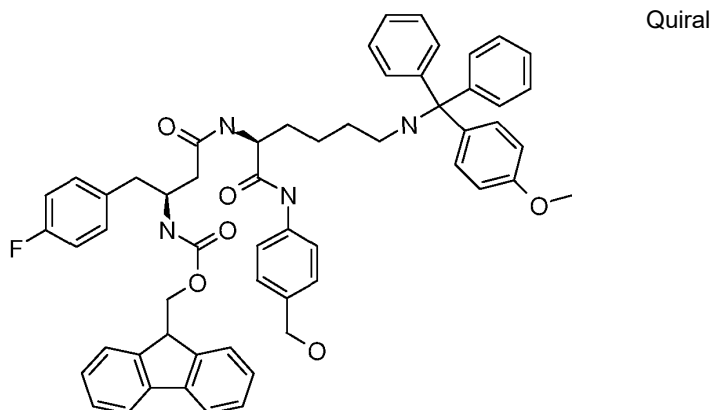


En un matraz de fondo redondo de 25 ml, se disolvió ácido (S)-2-amino-6-((4-metoxifenil)difenilmetil-amino)hexanóico (Bio-conjugate Chem. 2002, 13, 855-869, 1040 mg, 2,48 mmol, Equiv: 1,00) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (20 ml) para dar una solución de color amarillo claro. Se añadieron base de Hünig (961 mg, 1,27 ml, 7,44 mmol, Equiv: 3,00) y trimetilclorosilano (566 mg, 621 µl, 5,2 mmol, Equiv: 2,10) y la mezcla de reacción se agitó durante 20 min.

En un segundo matraz de fondo redondo de 50 ml, se disolvió ácido (S)-3-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonilamino)-4-(4-fluorofenil)butanóico (1040 mg, 2,48 mmol, Equiv: 1,00) en DMF (20 ml) para dar una solución incolora. Se añadieron base de Hünig (385 mg, 506 µl, 2,98 mmol, Equiv: 1,20) y TPTU [125700-71-2] (737 mg, 2,48 mmol, Equiv: 1,00) y se agitó la mezcla de reacción durante 15 min. Se añadió la solución del primer matraz que contenía la correspondiente silil éster monosililamina y la reacción se agitó durante otras 3 horas a temperatura ambiente. La mezcla se vertió sobre hielo picado/NH<sub>4</sub>Cl, se extrajo a 2 x con AcOEt, se lavó con H<sub>2</sub>O y salmuera, se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, y se evaporó a sequedad. La cromatografía ultrarrápida en SiO<sub>2</sub>/MeOH 5 %/NEt<sub>3</sub> 0,1 % en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> proporcionó 2,10 g del compuesto base en forma de espuma de color amarillo.

EM (PI): (M+H) 820,6.

Etapa b: 9H-fluoren-9-ilmetil éster de ácido {(S)-2-(4-fluoro-fenil)-1-(((S)-1-(4-hidroximetil-fenilcarbamoil)-5-[(4-metoxi-fenil)-difeníl-metil]-amino)-pentilcarbamoil)-metil]-etil}-carbámico.

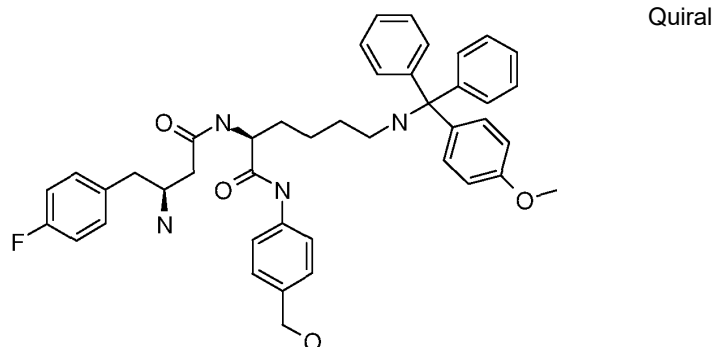


En un matraz en forma de pera de 250 ml, se disolvieron el 9H-fluoren-9-ilmetil éster de ácido {(S)-2-(4-fluoro-fenil)-1-(((S)-1-(4-hidroximetil-fenilcarbamoil)-5-[(4-metoxi-fenil)-difeníl-metil]-amino)-pentilcarbamoil)-metil]-etil}-carbámico sintetizado anteriormente (2,10 g 2,56 mmol, Equiv: 1,00), (4-aminofenil)metanol (315 mg, 2,55 mmol, Equiv: 1,00), HOAt (349 mg, 2,56 mmol, Equiv: 1,00) y clorhidrato de EDC (491 mg, 2,56 mmol, Equiv: 1,00) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (12.5 ml). Se añadió base de Hünig (662 mg, 871 µl, 5,21 mmol, Equiv: 2,00) y la reacción se dejó proseguir durante toda la noche. La mezcla se vertió sobre hielo picado/NH<sub>4</sub>Cl (pH ~7), se extrajo a 2 x con AcOEt, se lavó con H<sub>2</sub>O y

salmuera, se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, y se evaporó a sequedad. El producto bruto se trituró con éter dietílico (1 x 50 ml); el sólido resultante se eliminó por filtración y se secó para dar 0,796 g del compuesto base en forma de sólido de color pardo claro.

5 EM (PI): (M+H) 925,6.

Etapa c: (4-hidroximetil-fenil)-amida de ácido (S)-2-[(S)-3-amino-4-(4-fluoro-fenil)-butirilamino]-6-[[4-metoxi-fenil]-difenil-metil]-amino)-hexanóico

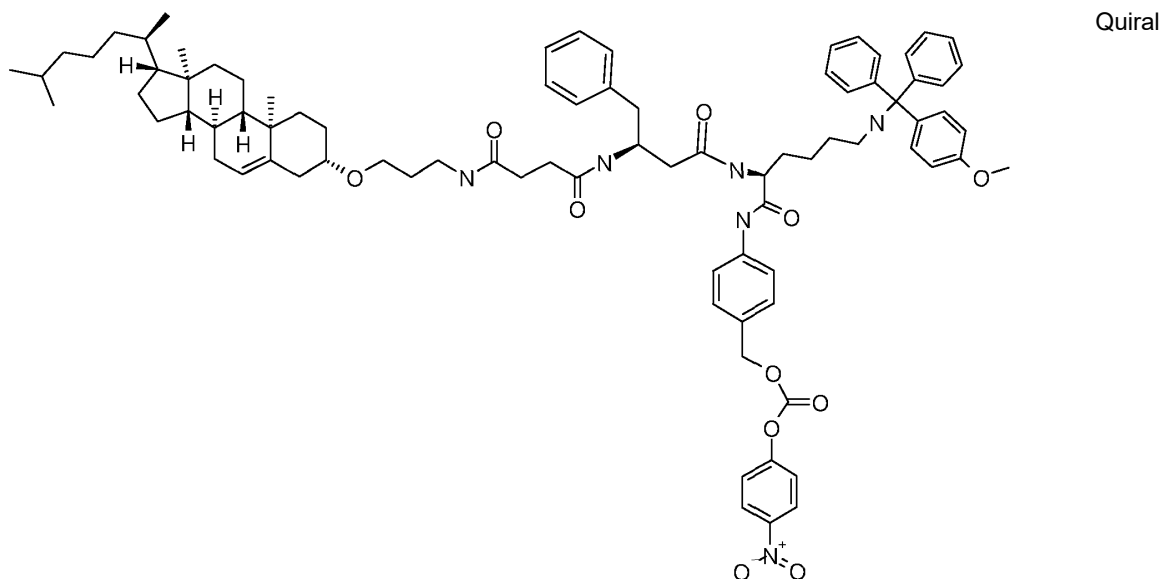


10 En un matraz de fondo redondo de 50 ml, el 9H-fluoren-9-ilmetil éster de ácido {(S)-2-(4-fluoro-fenil)-1-[(S)-1-(4-hidroximetil-fenilcarbamoil)-5-[[4-metoxi-fenil]-difenil-metil]-amino]-pentilcarbamoil)-metil]-etil}-carbámico preparado anteriormente (793 mg, 857 mol. Equiv: 1,001) se combinó con THF (19 ml) para dar una solución de color parduzco. A 0 °C, se añadió dietilamina (1,13 g, 1,59 ml, 15,4 mmol. Equiv: 18). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante toda la noche. La mezcla se vertió sobre hielo picado/NH<sub>4</sub>Cl (pH ~7), se extrajo a 2 x con AcOEt, se lavó con H<sub>2</sub>O y salmuera, se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, y se evaporó a sequedad. La cromatografía ultrarrápida en SiO<sub>2</sub>/MeOH 10 %/NEt<sub>3</sub> 0,1 % en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> dio 500 mg del compuesto base en forma de espuma de color blanquecino.

EM: Masa esperada: 702,3581, masa hallada: 702,3578.

20 Ejemplo 11

4-((S)-2-((S)-3-(4-(3-((3S,8S,9S,10R,13R,14S,17R)-10,13-dimetil-17-((R)-6-metilheptan-2-il)-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecahidro-1H-ciclopenta[a]fenantren-3-iloxi)propilamino)-4-oxobutanamido)-4-fenilbutanamido)-6-((4-metoxifenil)difenilmetilamino)hexanamido)benzil 4-nitrofenil carbonato

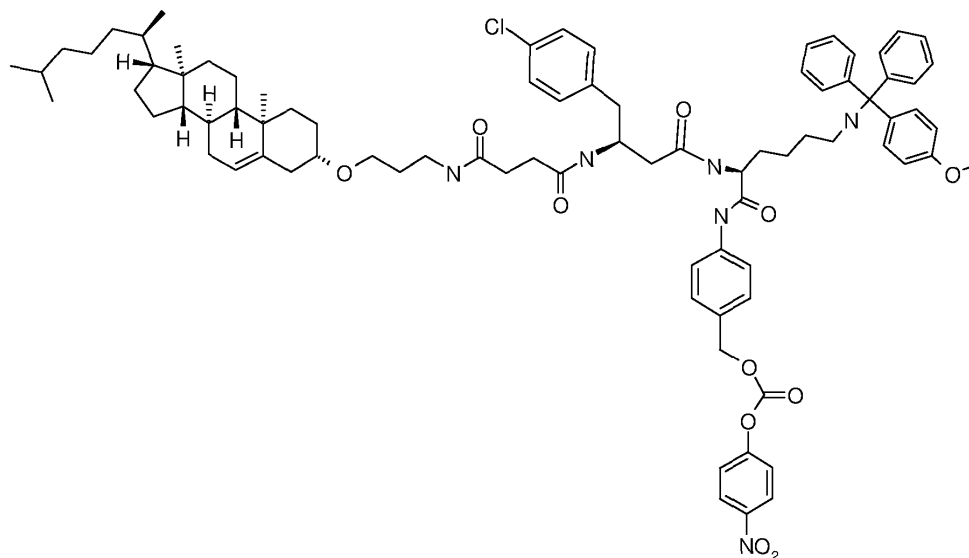


30 Se preparó en analogía al ejemplo 10, pero usando en la etapa 1 (S)-2-((S)-3-amino-4-fenilbutanamido)-N-(4-(hidroximetil)fenil)-6-((4-metoxifenil)difenil-metilamino)hexanamida en lugar de (4-hidroximetil-fenil)-amida de ácido (S)-2-[(S)-3-amino-4-(4-fluoro-fenil)-butirilamino]-6-[[4-metoxi-fenil]-difenil-metil]-amino)-hexanóico como compañero de acoplamiento. El primero se preparó a partir del ácido (S)-3-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)-carbonilamino)-4-fenilbutanóico tal como se describe anteriormente en las etapas a) - c].

EM: Masa esperada: 1374,792, masa hallada: 1374,7877.

## Ejemplo 12

- 5 4-({N~2~-[(3S)-4-(4-clorofenil)-3-{[4-({3-[(3 beta)-colest-5-en-3-ilo]propil)amino]-4-oxobutanoil}amino)butanoil]-N~6~-[(4-metoxifenil)(difenil)metil]-L-lisil}amino)encil 4-nitrofenil carbonato



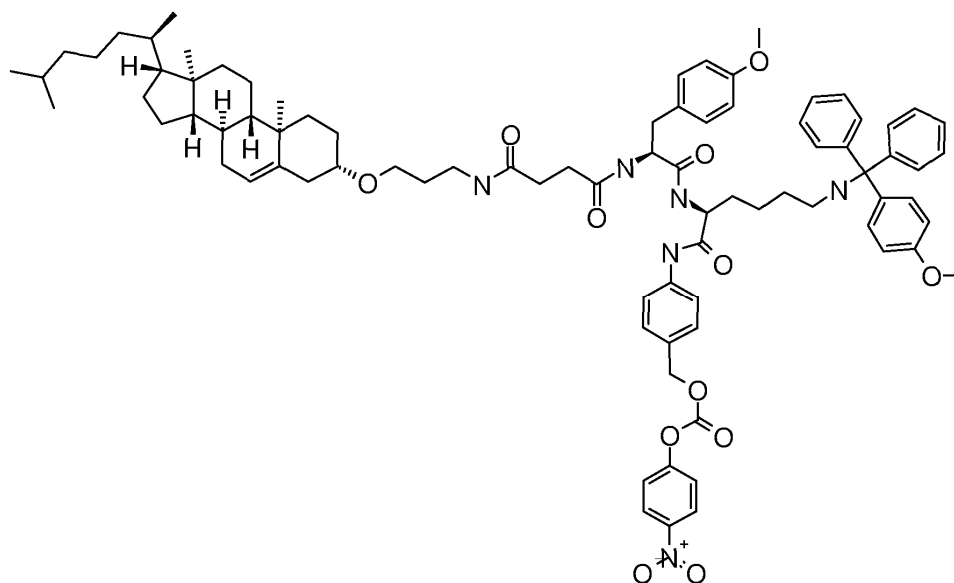
Quiral

- 10 Se preparó en analogía al ejemplo 10, pero usando en la etapa 1 (S)-2-((S)-3-amino-4-(4-clorofenil)butanamido)-N-(4-(hidroximetil)fenil)-6-((4-metoxifenil)difenilmetilamino)hexanamida en lugar de (4-hidroximetil-fenil)-amida de ácido (S)-2-((S)-3-amino-4-(4-fluoro-fenil)-butirilamino]-6-[[4-(4-metoxi-fenil)-difenil-metil]-amino]-hexanóico como compañero de acoplamiento. El primero se preparó a partir del ácido (S)-3-((9H-fluoren-9-il)metoxi)-carbonilamino)-4-clorofenil-butanóico tal como se describe anteriormente en las etapas a] - c].

- 15 EM (PI): (M+H) 1409,9.

## Ejemplo 13

- 20 N-[4-({3-[(3 beta)-colest-5-en-3-ilo]propil)amino]-4-oxobutanoil]-O-metil-L-tirosil-N~6~-[(4-metoxifenil)(difenil)metil]-N-[4-({[(4-nitrofenoxi)carbonil]oxi}metil)fenil]-L-lisinamida



Quiral

- 25 Se preparó en analogía al ejemplo 1, pero usando en la etapa 3 (S)-2-((S)-2-amino-3-(4-metoxifenil)propanamido)-N-(4-(hidroximetil)fenil)-6-((4-metoxifenil)difenilmetilamino)hexanamida en lugar de (S)-2-((S)-2-amino-3-(4-nitrofenil)-propanamido)-N-(4-(hidroximetil)fenil)-6-((4-metoxifenil)difenil-metilamino)hexanamida como compañero de

acoplamiento. El primero se preparó a partir del ácido (S)-2-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)-carbonilamino)-3-(4-metoxifenil)propanoico tal como se describe anteriormente en las etapas a] - c] del ejemplo 1.

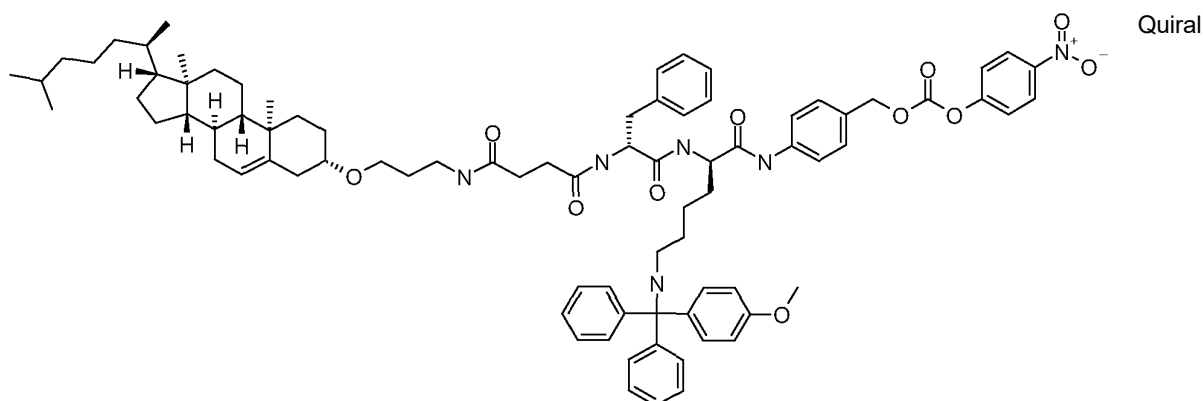
EM (PI): (M+H) 1391,9.

5

Ejemplo 14

N-[4-({3-[(3 beta)-colest-5-en-3-ilo]propil}amino)-4-oxobutanoil]-D-fenilalanil-N~6~-[(4-metoxifenil)(difenil)metil]-N-[4-({[(4-nitrofenoxi)carbonil]oxi}metil)fenil]-D-lisnamida

10



Se preparó en analogía al ejemplo 1, pero usando en la etapa 3 (R)-2-((R)-2-amino-3-fenil-propanamido)-N-(4-(hidroximetil)fenil)-6-((4-metoxifenil)difenilmetilamino)-hexanamida en lugar de (S)-2-((S)-2-amino-3-(4-nitrofenil)-propanamido)-N-(4-(hidroximetil)fenil)-6-((4-metoxifenil)difenil-metilamino)hexanamida como compañero de acoplamiento. Este bloque de construcción se sintetizó a partir de ácido (R)-2-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonilamino)-6-aminohexanoico y ácido (R)-2-amino-6-((4-metoxifenil)-difenilmetilamino)hexanoico (véase Bioconjugate Chem. 2002, 13, 885-869) tal como se describe anteriormente en las etapas a] - c].

15

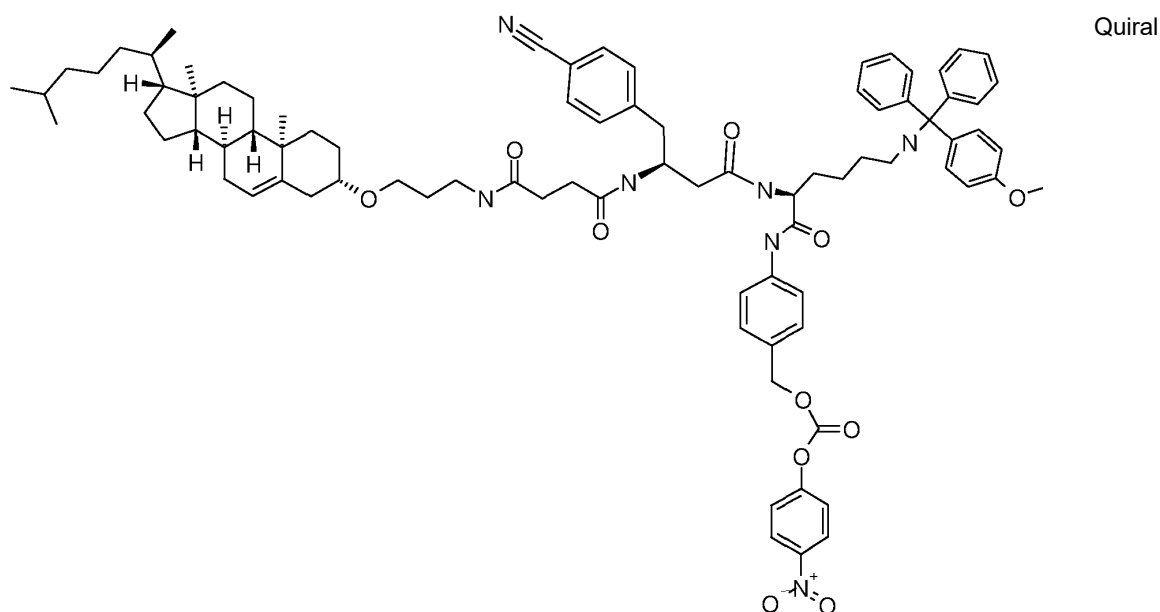
EM: Masa esperada: 1360,7763, masa hallada: 1360,7774.

20

Ejemplo 15

4-((N~2~-[(3S)-3-[[4-({3-[(3 beta)-colest-5-en-3-ilo]propil}amino)-4-oxobutanoil]amino]-4-(4-cianofenil)butanoil]-N~6~-[(4-metoxifenil)(difenil)metil]-L-lisil]amino)bencil 4-nitrofenil carbonato

25



Se preparó en analogía al ejemplo 10, pero usando en la etapa 1 (S)-2-((S)-3-amino-4-(4-cianofenil)butanamido)-N-(4-(hidroximetil)fenil)-6-((4-metoxifenil)difenil-metilamino)hexanamida en lugar de (4-hidroximetil-fenil)-amida de

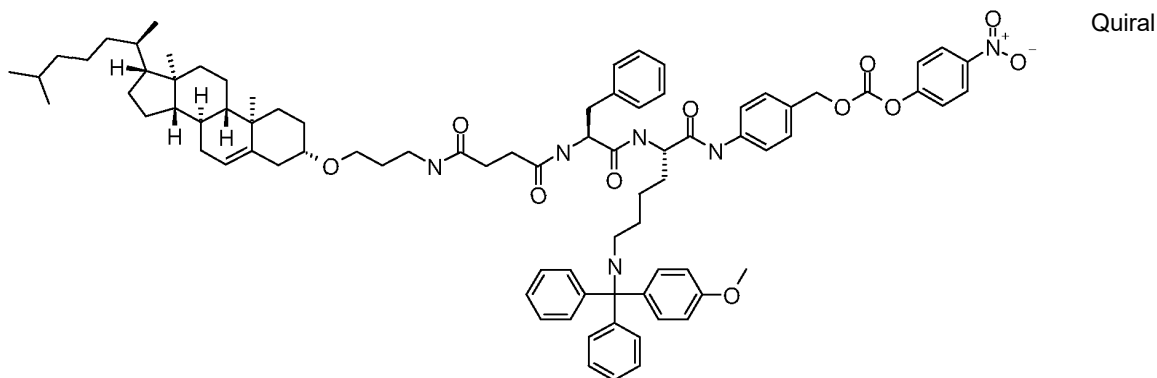


ácido (S)-2-[(S)-3-amino-4-(4-fluoro-fenil)-butirilamino]-6-[[4-(4-metoxi-fenil)-difenil-metil]-amino]-hexanóico como compañero de acoplamiento. El primero se preparó a partir del ácido (S)-3-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)-carbonilamino)-4-cianofenil-butanóico tal como se describe anteriormente en las etapas a] - c].

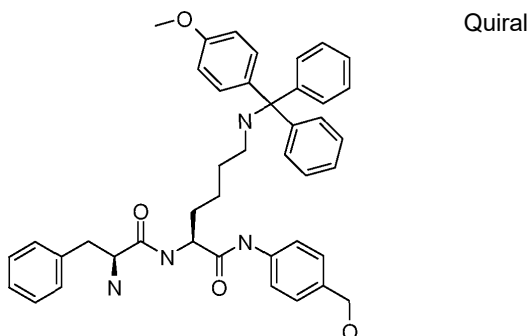
5 EM: Masa esperada: 1399,7872, masa hallada: 1399,7857.

Ejemplo 16

10 N-[4-({3-[(3 beta)-colest-5-en-3-ilo]propil}amino)-4-oxobutanoil]-L-fenilalanil-N-6-~-[4-(4-metoxifenil)(difenil)metil]-N-[4-({[(4-nitrofenoxi)carbonil]oxi}metil)fenil]-L-lisinamida



15 Etapa 1: (4-hidroximetil-fenil)-amida de ácido (S)-2-((S)-2-amino-3-fenil-propionilamino)-6-[[4-(4-metoxi-fenil)-difenil-metil]-amino]-hexanóico



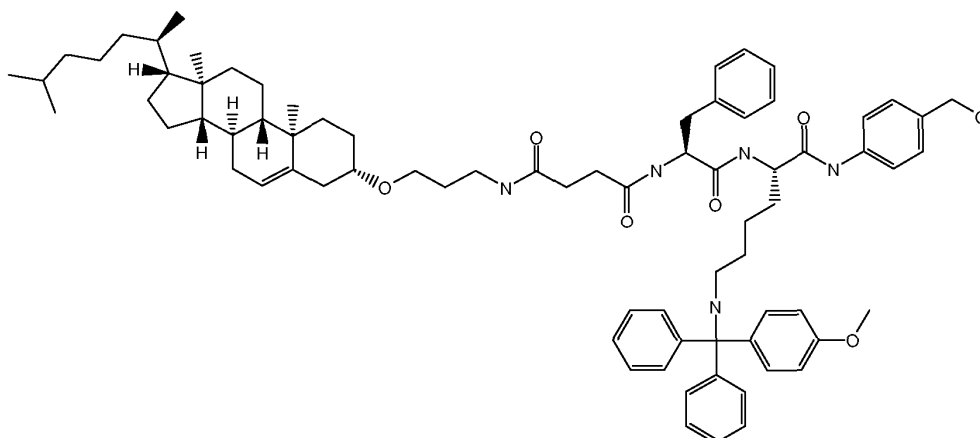
20 El bloque de construcción (4-hidroximetil-fenil)-amida de ácido (S)-2-((S)-2-amino-3-fenil-propionilamino)-6-[[4-(4-metoxi-fenil)-difenil-metil]-amino]-hexanóico se preparó de acuerdo con el procedimiento descrito en Bioconjugate Chem., vol. 13, nº. 4, 2002, 855-869.

EM (PI): (M+H) 671,5.

Etapa 2:

25 N1-(3-((3S,8S,9S,10R,13R,14S,17R)-10,13-dimetil-17-((R)-6-metilheptan-2-il)-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecahidro-1H-ciclopenta[a]fenantren-3-ilo)propil)-N4-((S)-1-((S)-1-(4-(hidroximetil)fenilamino)-6-((4-metoxifenil)difenilmetilamino)-1-oxohexan-2-ilamino)-1-oxo-3-fenilpropan-2-il)succinamida

Quiral



5 Se añadió TPTU [125700-71-2](233 mg, 784  $\mu$ mol, Equiv: 1,00) a una solución de ácido N-{3-  
 [(3S,8S,9S,10R,13R,14S,17R)-17-((R)-1,5-dimetil-hexil)-10,13-dimetil-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-  
 10 tetradecahidro-1H-ciclopenta[a]fenantren-3-ilo]xipropil}-succinámico (véase el ejemplo 1, etapa 2) (426 mg, 0,784  
 mmol, Equiv: 1,00) y base de Hünig (304 mg, 411  $\mu$ l, 2,35 mmol, Equiv: 3) en DMF (10 ml). Después de 3 minutos se  
 añadió (4-hidroximetil-fenil)-amida de ácido (S)-2-((S)-2-amino-3-fenil-propionilamino)-6-[[[(4-metoxi-fenil)-difenil-  
 metil]-amino]-hexanóico (etapa 1). La CCF a t = 1 h mostró que la reacción era completa. El disolvente se eliminó a  
 presión reducida. El residuo restante se recogió en acetato de etilo y se extrajo con solución semisaturada de  
 NaHCO<sub>3</sub> (1 X), solución de hidrogenofalato de potasio 0,05 M (2 X), agua (1 X) y salmuera (1 X). El extracto  
 orgánico se secó sobre MgSO<sub>4</sub> y se concentró a presión reducida. El material bruto se purificó mediante  
 cromatografía ultrarrápida para obtener el compuesto base (682 mg, 513  $\mu$ mol) en forma de sólido de color pardo  
 claro.

15 EM (PI): (M+H) 1196,8.

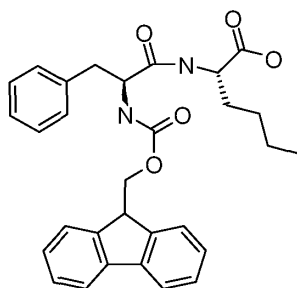
Etapa 3:

20 Se añadió base de Hünig (485 mg, 629  $\mu$ l, 3,6 mmol, Equiv: 6) a una solución del alcohol previo (718 mg, 600  $\mu$ mol,  
 Equiv: 1,00) y bis bis(4-nitrofenil) carbonato (548 mg, 1,8 mmol, Equiv: 3) en THF (20 ml). La solución de color  
 amarillo se agitó durante toda la noche a temperatura ambiente. El disolvente se eliminó a presión reducida. El  
 residuo restante se trituró con éter dietílico. El sólido se recogió mediante filtración, se lavó con éter y se secó a  
 presión reducida para obtener el compuesto base (800 mg, 529  $\mu$ mol) en forma de sólido de color pardo claro.

25 EM (PI): (M+H) 1361,9.

Ejemplo 17

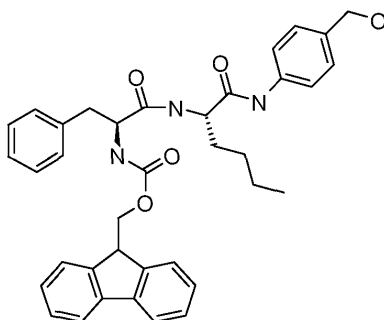
Etapa 1: Ácido (S)-2-[(S)-2-(9H-fluoren-9-ilmetoxicarbonilamino)-3-fenil-propionilamino]-hexanóico



30 Se suspendió L-Fmoc-Phe-OSu comercial (0,969 g 2,00 mmol, Equiv: 1,00) en una mezcla 1:1 v/v de 1,2-  
 dimetoxietano y agua (17 ml) y se trató a 0°C con L-norleucina (0,275 g, 2,10 mmol, Equiv: 1,05) y NaHCO<sub>3</sub> (0,185 g,  
 2,20 mmol, Equiv: 1,10). El baño de refrigeración se retiró y la reacción se dejó proseguir a temperatura ambiente  
 durante 14 h. La mezcla de reacción se vertió sobre hielo picado/ácido cítrico (pH ~3), se extrajo con acetato de etilo  
 2 x se lavó con H<sub>2</sub>O y salmuera, se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, y se evaporó a sequedad. La cromatografía ultrarrápida en  
 SiO<sub>2</sub>/ AcOEt dio 0,870 mg del compuesto base en forma de sólido de color blanco.

40 EM (PI): (M+H) 501,2.

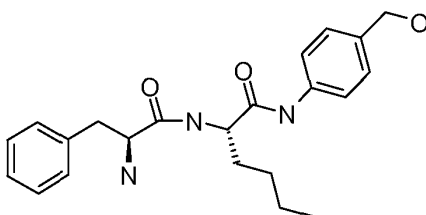
Etapa 2: 9H-fluoren-9-ilmetil éster de ácido {(S)-1-[(S)-1-(4-Hidroximetil-fenilcarbamoil)-pentilcarbamoil]-2-fenil-etil}-carbámico



5 En un matraz en forma de pera de 250 ml, se disolvieron el ácido (S)-2-[(S)-2-(9H-fluoren-9-ilmetoxicarbonilamino)-3-fenil-propionilamino]-hexanóico sintetizado anteriormente 21 mmol. Equiv: 1,00), (4-aminofenil)metanol (2,717 g, 22 mmol. Equiv: 1,03), y 2-etoxi-1-etoxicarbonil-1,2-dihidroquinolina (EEDQ) (7,994 g, 32 mmol. Equiv: 1,50) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (320 ml) y se agitaron durante toda la noche bajo un globo de Ar. La mezcla se vertió sobre hielo picado/NH<sub>4</sub>Cl, se extrajo a 2 x con AcOEt, se lavó con H<sub>2</sub>O, se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, y el volumen se redujo hasta ~ 300 ml. El precipitado se eliminó por filtración y se secó para dar 5,25 g del compuesto base en forma de sólido de color pardo claro.

EM (PI): (M+H) 606,3.

15 Etapa 3: (4-hidroximetil-fenil)-amida de ácido (S)-2-((S)-2-amino-3-fenil-propionilamino)-hexanóico

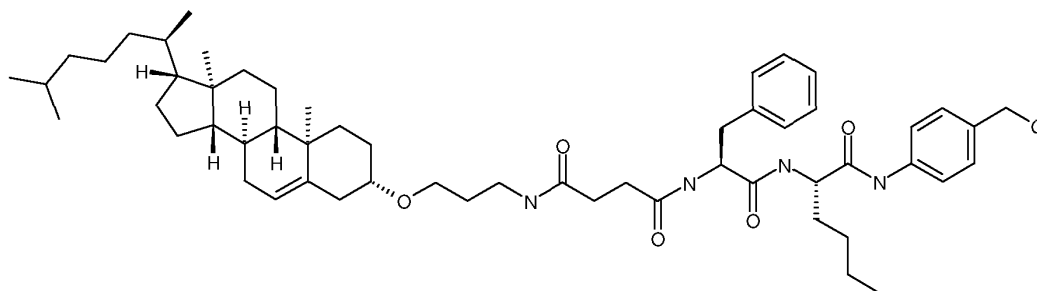


20 En un matraz de fondo redondo, se disolvió el 9H-fluoren-9-ilmetil éster de ácido {(S)-1-[(S)-1-(4-hidroximetil-fenilcarbamoil)-pentilcarbamoil]-2-fenil-etil}-carbámico preparado anteriormente (4,738 g, 7,822 mmol. Equiv: 1,0) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (28 ml). A 0° C, se añadió dietilamina (28 ml, 19,80 g, 271 mmol, Eqiv: 35) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante toda la noche. Todos los elementos volátiles se eliminaron al vacío; la subsiguiente cromatografía ultrarrápida de SiO<sub>2</sub>/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH 10 %, seguida de cristalización a partir de AcOEt, dio 2,116 g del compuesto base en forma de cristales de color pardo claro.

EM (PI): (M+H) 384,2.

Etapa 4:

30 N1-(3-((3S,8S,9S,10R,13R,14S,17R)-10,13-dimetil-17-((R)-6-metilheptan-2-il)-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecahidro-1H-ciclopenta[a]fenantren-3-iloxi)propil)-N4-((S)-1-((S)-1-(4-(hidroximetil)fenilamino)-1-oxohexan-2-ilamino)-1-oxo-3-fenilpropan-2-il)succinamida

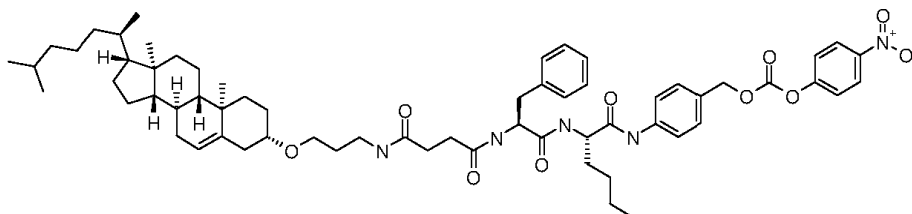


35 se preparó la misma en analogía con la etapa 2 del ejemplo 16

EM (PI): (M+H) 909,7 (M+Na) 931,8.

Etapa 5:

5 N-[4-({3-[(3 beta)-colest-5-en-3-iloxi]propil}amino)-4-oxobutanoil]-L-fenilalanil-N-[4-({[(4-nitrofenoxi)carbonil]oxi}metil)fenil]-L-norleucinamida



Quiral

se preparó la misma en analogía con la etapa 3 del ejemplo 16.

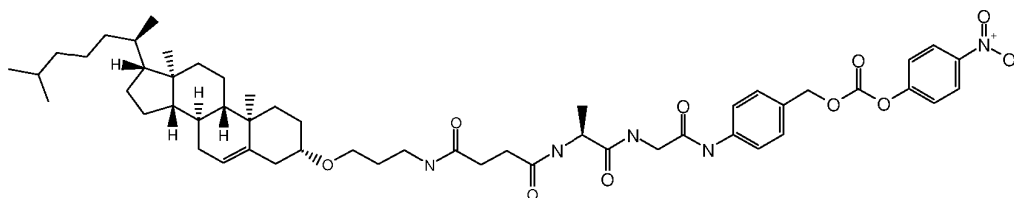
EM: Masa esperada: 1073,6453, masa encontrada: 1073,642

10

Ejemplo 18

15

N-[4-({3-[(3 beta)-colest-5-en-3-iloxi]propil}amino)-4-oxobutanoil]-L-alanil-N-[4-({[(4-nitrofenoxi)carbonil]oxi}metil)fenil]glicinamida

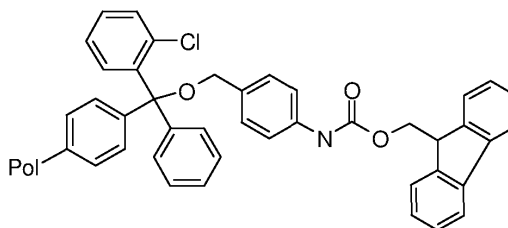


Quiral

Etapa 1:

20

Adición de alcohol FMOC-4-aminobencílico a la resina de 2-clorotritilo



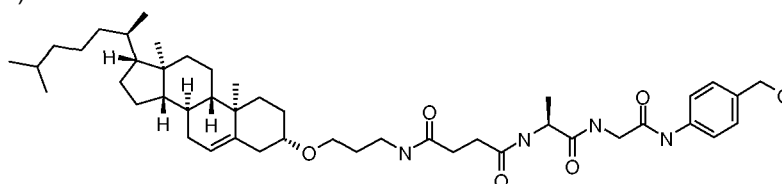
25

La resina de cloruro de 2-clorotritilo (Novabiochem 01-64-0114, malla de 100-200, DVB 1 % (18 g, 21,6 mmol. Equiv: 1,00) se hinchó en DCM/DMF=1/1 (300 ml) durante 10 minutos. La resina se extrajo y se añadió una solución de alcohol FMOC-4-aminobencílico (14,9 g, 43,2 mmol. Equiv: 2) y piridina (6,83 g, 6,99 ml, 86,4 mmol. Equiv: 4) en DCM/DMF=1/1 (300 ml). La mezcla se agitó durante toda la noche. La mezcla se cubrió con una solución de base de Hünig al 10 % en metanol (300 ml). La resina se lavó con DMF y DCM y se secó durante toda la noche con alto vacío para obtener 21,7 g de resina. La determinación de la carga dio como resultado 0,41 mmol/g.

30

Etapa 2:

N1-(3-((3S,8S,9S,10R,13R,14S,17R)-10,13-dimetil-17-((R)-6-metilheptan-2-il)-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecahidro-1H-ciclopenta[a]fenantren-3-iloxi)propil)-N4-((S)-1-(2-(4-(hidroximetil)fenilamino)-2-oxoetilamino)-1-oxopropan-2-il)succinamida



Quiral

La resina de la etapa 1 (1 g, 410  $\mu$ mol, Equiv: 1,00) se prelavó con DMF (2 X) y se trató con piperidina/DMF=1/4 (10 ml) durante 5 y 10 minutos. La resina se lavó alternativamente con DMF e IPA (3 X 10 ml). Se agitó durante 5 minutos una solución de Fmoc-Gly-OH (488 mg, 1,64 mmol, Equiv: 4), TPTU (487 mg, 1,64 mmol, Equiv: 4) y base de Hünig (636 mg, 859  $\mu$ l, 4,92 mmol, Equiv: 12) in DMF (10 ml) y después se agitó con la resina durante una hora. La resina se lavó alternativamente con DMF y alcohol isopropílico (3 X).

Las siguientes escisiones de Fmoc y los posteriores acoplamiento de Fmoc-Ala-OH (511 mg, 1,64 mmol, Equiv: 4) y ácido N-{3-[(3S,8S,9S,10R,13R,14S,17R)-17-((R)-1,5-dimetil-hexil)-10,13-dimetil-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecahidro-1H-ciclopenta[a]fenantren-3-iloxi]-propil}-succinámico (ejemplo 1, etapa 2) (892 mg, 1,64 mmol, Equiv: 4) se llevaron a cabo de forma consecutiva. La resina de péptido desecada se agitó durante alrededor de 2 X 30 min en TFA 1 %/DCM (2 X 20 ml). La mezcla de reacción se filtró y el filtrado se lavó con DCM. Los filtrados se agruparon y los disolventes se evaporaron al vacío. El material bruto se trituró con éter dietílico (2 x). Tras purificación mediante cromatografía ultrarrápida, se obtuvo el producto (84 mg, 97,3  $\mu$ mol) en forma de sólido de color blanco.

EM: Masa esperada: 776,5452, masa encontrada: 776,5455

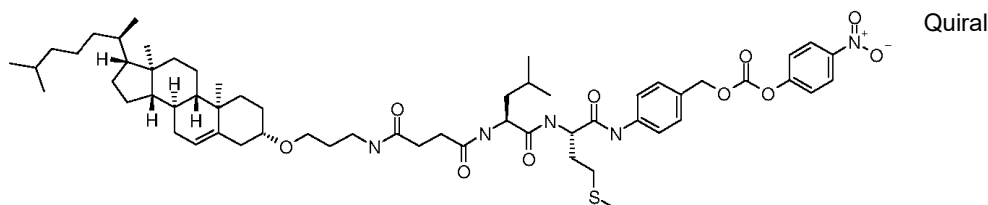
Etapa 3:

La alcohol N1-(3-((3S,8S,9S,10R,13R,14S,17R)-10,13-dimetil-17-((R)-6-metilheptan-2-il)-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecahidro-1H-ciclopenta[a]fenantren-3-iloxi)propil)-N4-((S)-1-(2-(4-(hidroximetil)fenilamino)-2-oxoetilamino)-1-oxopropan-2-il)succinamida preparada anteriormente [RO5545270] (70 mg, 90,1  $\mu$ mol, Equiv: 1,00) y bis(4-nitrofenil) carbonato (137 mg, 450  $\mu$ mol, Equiv: 5) se disolvieron en DMF (4 ml) bajo argón a temperatura ambiente y se trataron con base de Hünig (34,9 mg, 47,2 ml, 270  $\mu$ mol, Equiv: 3) y la mezcla se dejó reaccionar durante toda la noche. El disolvente se eliminó al vacío. El sólido resultante se trituró con éter dietílico, El sólido se recogió mediante filtración y se lavó con éter dietílico. El filtrado se secó al vacío para obtener el compuesto base (84 mg, 80,2  $\mu$ mol) en forma de sólido de color pardo.

EM: Masa esperada: 941,5514, masa encontrada: 941,5518

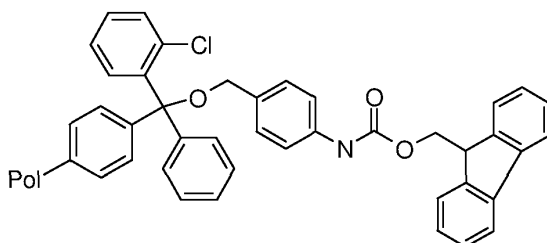
Ejemplo 19

N-[4-({3-[(3 beta)-colest-5-en-3-iloxi]propil}amino)-4-oxobutanoil]-L-leucil-N-[4-({(4-nitrofenoxi)carbonil}oxi)metil]fenil]-L-metioninamida



Etapa 1:

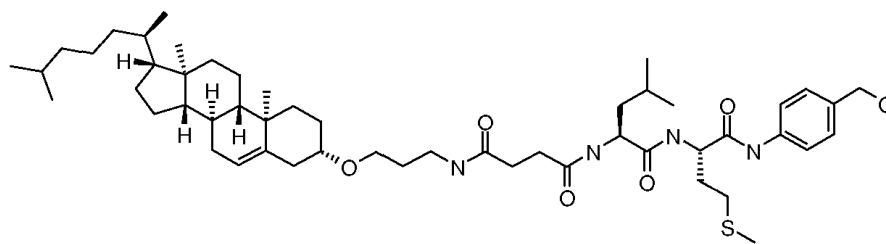
Adición de alcohol Fmoc-4-aminobencílico a la resina de 2-clorotritilo



se preparó en analogía al ejemplo 18, etapa 1,

Etapa 2:

N1-(3-((3S,8S,9S,10R,13R,14S,17R)-10,13-dimetil-17-((R)-6-metilheptan-2-il)-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecahidro-1H-ciclopenta[a]fenantren-3-iloxi)propil)-N4-((S)-1-((S)-1-(4-(hidroximetil)fenilamino)-4-(metilitio)-1-oxobutan-2-ilamino)-4-metil-1-oxopentan-2-il)succinamida



Quiral

se preparó en analogía al ejemplo 18, etapa 2, usando Fmoc-Met-OH (609 mg, 1,64 mmol. Equiv: 4) y Fmoc-Leu-OH (580 mg, 1,64 mmol. Equiv: 4) como aminoácidos.

5 El producto (208 mg, 210 μmol) se obtuvo como un sólido de color amarillo claro.

EM (PI): (M+H) 893,6183.

Etapa 3:

10

Se preparó en analogía al ejemplo 18, etapa 3. Tras purificación sobre gel de sílice, el compuesto base (161 mg, 137 μmol) se obtuvo en forma de sólido de color pardo claro.

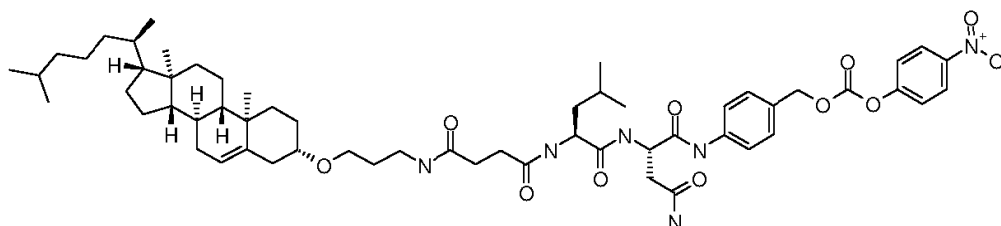
EM: Masa esperada: 1057,6174, masa encontrada: 1057,6184

15

Ejemplo 20

N-[4-({3-[(3 beta)-colest-5-en-3-ilo]propil}amino)-4-oxobutanoil]-L-leucil-N-1-[4-({[(4-nitrofenoxi)carbonil]oxi}metil)fenil]-L-aspartamida

20

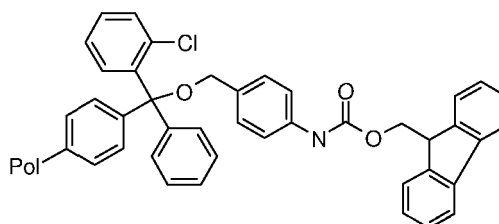


Quiral

Etapa 1:

Adición de alcohol FMOC-4-aminobencílico a la resina de 2-clorotritilo

25

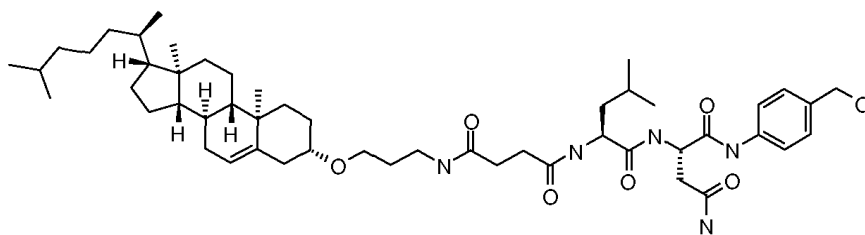


se realizó en analogía al ejemplo 18, etapa 1.

30 Etapa 2:

(S)-2-((S)-2-(4-(3-((3S,8S,9S,10R,13R,14S,17R)-10,13-dimetil-17-((R)-6-metilheptan-2-il)-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecahidro-1H-ciclopenta[a]fenantren-3-ilo)propilamino)-4-oxobutanamido)-4-metilpentanamido)-N1-(4-(hidroximetil)fenil)succinamida

35



Quiral

Se preparó en analogía al ejemplo 18, etapa 2, usando Fmoc-Asn-OH (581 mg, 1,64 mmol. Equiv: 4) y Fmoc-Leu-OH (580 mg, 1,64 mmol. Equiv: 4) como aminoácidos.

5 El producto (87 mg, 89,4 mmol) se obtuvo como un sólido de color amarillo claro.

EM: Masa esperada: 875,6136, masa encontrada: 875,6133

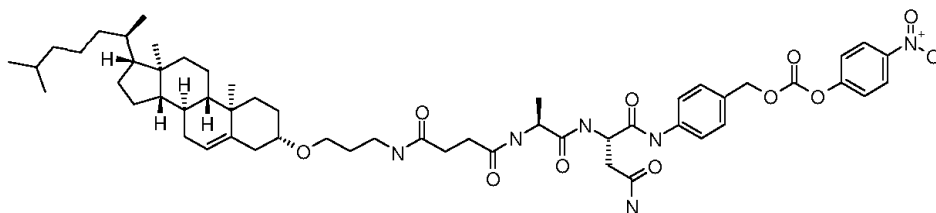
Etapa 3:

10 El compuesto base se preparó en analogía al ejemplo 18, etapa 3. Tras purificación sobre gel de sílice (87 mg, 89,4 mmol) el compuesto base se obtuvo en forma de sólido de color pardo claro.

EM: Masa esperada: masa encontrada: 1040,6188

15 Ejemplo 21

N-[4-({3-[(3 beta)-colest-5-en-3-iloxi]propil}amino)-4-oxobutanil]-L-alanil-N~1~-[4-(((4-nitrofenoxi)carbonil]oxi)metil)fenil]-L-aspartamida

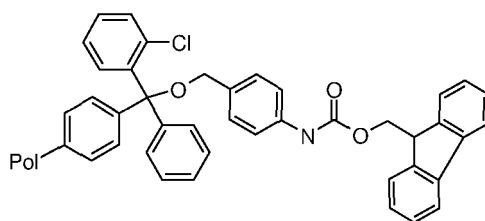


Quiral

20

Etapa 1:

Adición de alcohol FMOC-4-aminobencílico a la resina de 2-clorotritilo



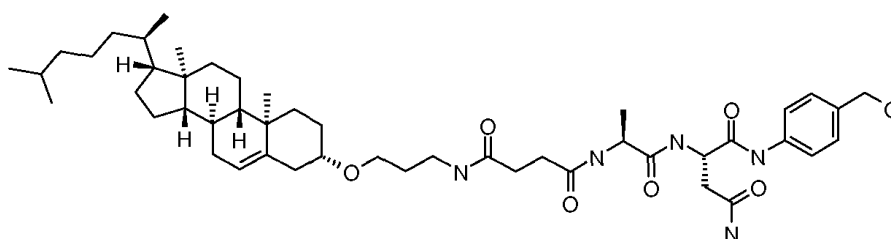
25

se realizó en analogía al ejemplo 18, etapa 1.

Etapa 2:

30

(S)-2-((S)-2-(4-(3-((3S,8S,9S,10R,13R,14S,17R)-10,13-dimetil-17-((R)-6-metilheptan-2-il)-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecahidro-1H-ciclopenta[a]fenantren-3-iloxi)propilamino)-4-oxobutanamido)propanamido)-N1-(4-(hidroximetil)fenil)succinamida



Quiral

Se preparó en analogía al ejemplo 18, etapa 2, usando Fmoc-Asn-OH (581 mg, 1,64 mmol. Equiv: 4) y Fmoc-Leu-OH (511 mg, 1,64 mmol. Equiv: 4) como aminoácidos.

5 El producto (140 mg, 159  $\mu$ mol) se obtuvo en forma de sólido de color amarillo claro.

EM (PI): (M+H) 834,8 (M+Na) 856,7.

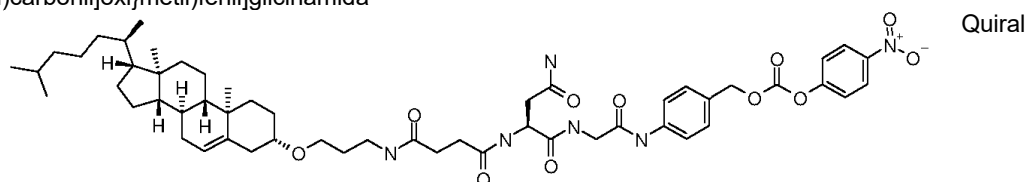
Etapa 3:

10 El compuesto base se preparó en analogía al ejemplo 18, etapa 3. Tras purificación sobre gel de sílice (169 mg, 152  $\mu$ mol) se obtuvo en forma de sólido de color pardo claro.

EM: Masa esperada: 998,5729, masa encontrada: 998,5739

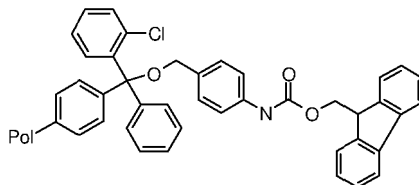
15 Ejemplo 22

N-[4-({3-[(3 beta)-colest-5-en-3-iloxi]propil)amino)-4-oxobutanoil]-L-asparaginil-N-[4-({[(4-nitrofenoxi)carbonil]oxi}metil)fenil]glicinamida



20 Etapa 1:

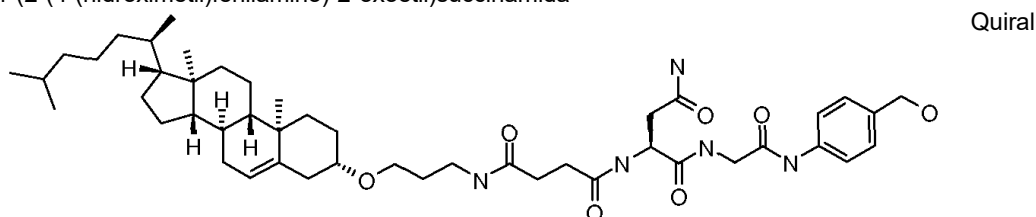
Adición de alcohol FMOC-4-aminobencílico a la resina de 2-clorotritilo



25 Se realizó en analogía al ejemplo 18, etapa 1.

Etapa 2:

30 (S)-2-(4-(3-((3S,8S,9S,10R,13R,14S,17R)-10,13-dimetil-17-((R)-6-metilheptan-2-il)-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecahidro-1H-ciclopenta[a]fenantren-3-iloxi)propilamino)-4-oxobutanamido)-N1-(2-(4-(hidroximetil)fenilamino)-2-oxoetil)succinamida



Se preparó en analogía al ejemplo 18, etapa 2, usando Fmoc-Asn-OH (488 mg, 1,64 mmol. Equiv: 4) y Fmoc-Leu-OH (581 mg, 1,64 mmol. Equiv: 4) como aminoácidos.

35 El producto (140 mg, 162  $\mu$ mol) se obtuvo en forma de sólido de color blanco.

EM: Masa esperada: 819,551, masa encontrada: 819,5503

40 Etapa 3: El compuesto base se obtuvo en analogía al ejemplo 18, etapa 3 (176 mg, 161  $\mu$ mol) en forma de sólido de color pardo claro.

EM: Masa esperada: 984.5572, masa encontrada: 984,5489

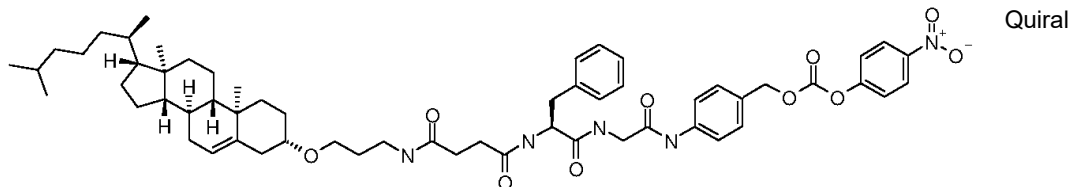
45



## Ejemplo 23

N-[4-((3-((3- $\beta$ -colest-5-en-3-iloxi)propil)amino)-4-oxobutanoil)-L-fenilalanil-N-[4-(((4-nitrofenoxi)carbonil)oxi)metil)fenil]glicinamida

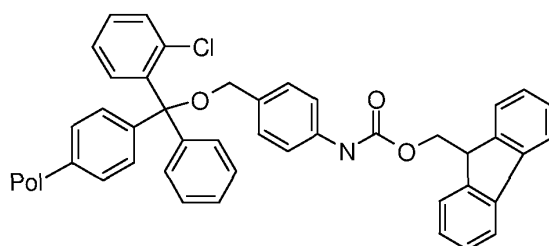
5



## Etapa 1:

Adición de alcohol Fmoc-4-aminobencílico a la resina de 2-clorotritilo

10

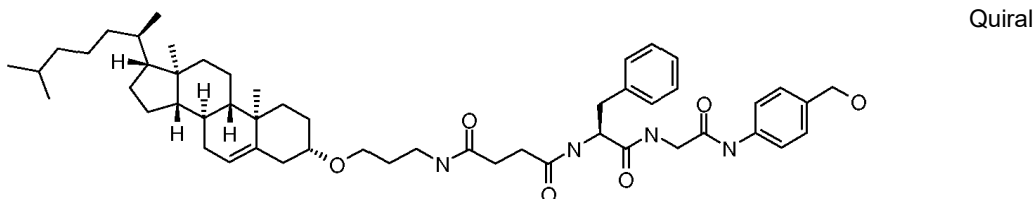


Se realizó en analogía al ejemplo 18, etapa 1,

## Etapa 2:

N1-(3-((3S,8S,9S,10R,13R,14S,17R)-10,13-dimetil-17-((R)-6-metilheptan-2-il)-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecahidro-1H-ciclopenta[a]fenantren-3-iloxi)propil)-N4-((S)-1-(2-(4-(hidroximetil)fenilamino)-2-oxoetilamino)-1-oxo-3-fenilpropan-2-il)succinamida

20



Se preparó en analogía al ejemplo 18, etapa 2, usando Fmoc-Asn-OH (488 mg, 1,64 mmol. Equiv: 4) y Fmoc-Leu-OH (635 mg, 1,64 mmol. Equiv: 4) como aminoácidos.

El producto (259 mg, 288  $\mu$ mol) se obtuvo en forma de sólido de color blanco.

EM: Masa esperada: 852,5765, masa encontrada: 852,5754

## Etapa 3:

30

El compuesto base se obtuvo en analogía al ejemplo 18, etapa 3. (280 mg, 247  $\mu$ mol) en forma de sólido de color pardo claro.

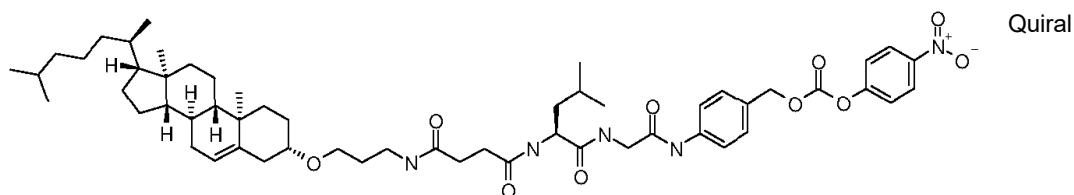
EM: Masa esperada: 1017,5827, masa encontrada: 1017,5775

35

## Ejemplo 24

N-[4-((3-((3- $\beta$ -colest-5-en-3-iloxi)propil)amino)-4-oxobutanoil)-L-leucil-N-[4-(((4-nitrofenoxi)carbonil)oxi)metil)fenil]glicinamida

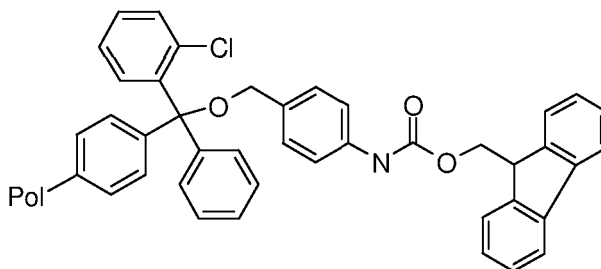
40



Etapa 1:

Adición de alcohol Fmoc-4-aminobencílico a la resina de 2-clorotritilo

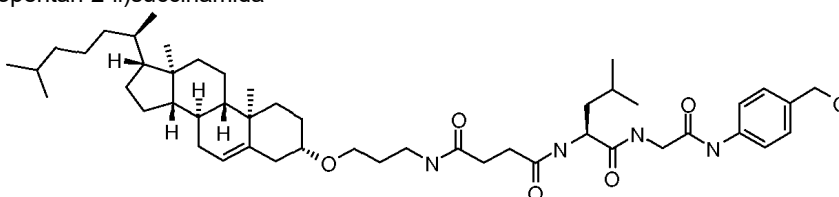
5



Se realizó en analogía al ejemplo 18, etapa 1.

10 Etapa 2:

N1-(3-((3S,8S,9S,10R,13R,14S,17R)-10,13-dimetil-17-((R)-6-metilheptan-2-il)-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecahidro-1H-ciclopenta[a]fenantren-3-iloxi)propil)-N4-((S)-1-(2-(4-(hidroximetil)fenilamino)-2-oxoetilamino)-4-metil-1-oxopentan-2-il)succinamida



Quiral

15

Se preparó en analogía al ejemplo 18, etapa 2, usando Fmoc-Asn-OH (488 mg, 1,64 mmol. Equiv: 4) y Fmoc-Leu-OH (580 mg, 1,64 mmol. Equiv: 4) como aminoácidos.

20

El producto (240 mg, 278 mmol) se obtuvo en forma de sólido de color amarillo claro.

EM: Masa esperada: 818,5921, masa encontrada: 818,5921

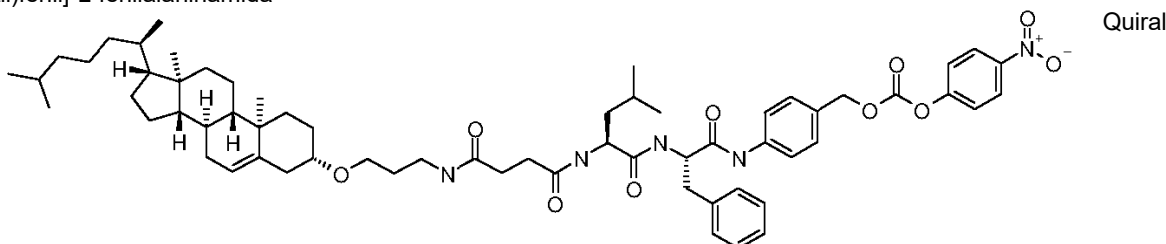
Etapa 3:

25 El compuesto base se preparó en analogía al ejemplo 18, etapa 3. Tras purificación sobre gel de sílice (194 mg, 177 μmol) se obtuvo en forma de sólido de color amarillo claro.

EM: Masa esperada: 983,5983, masa encontrada: 983,6004

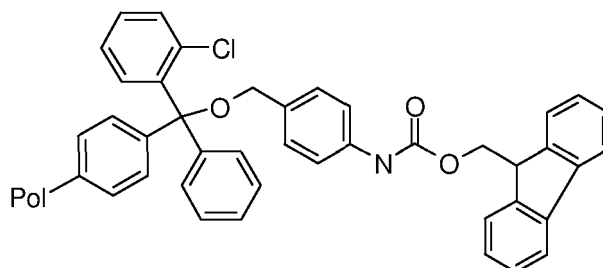
30 Ejemplo 25

N-[4-({3-[(3 beta)-colest-5-en-3-iloxi]propil}amino)-4-oxobutanoil]-L-leucil-N-[4-({[(4-nitrofenoxi)carbonil] oxi}metil)fenil]-L-fenilalaninamida



Etapa 1:

Adición de alcohol FMOC-4-aminobencílico a la resina de 2-clorotritilo



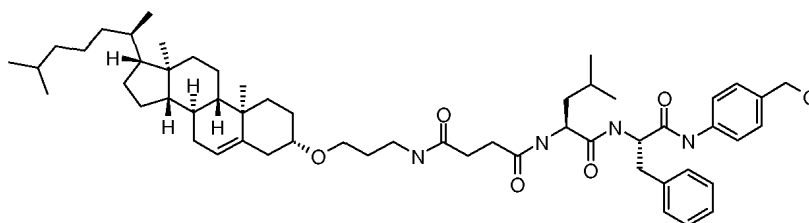
5

Se realizó en analogía al ejemplo 18, etapa 1.

Etapa 2:

10

N1-(3-((3S,8S,9S,10R,13R,14S,17R)-10,13-dimetil-17-((R)-6-metilheptan-2-il)-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecahidro-1H-ciclopenta[a]fenantren-3-iloxi)propil)-N4-((S)-1-((S)-1-(4-(hidroximetil)fenilamino)-1-oxo-3-fenilpropan-2-ilamino)-4-metil-1-oxopentan-2-il)succinamida



Quiral

15

Se preparó en analogía al ejemplo 18, etapa 2, usando Fmoc-Asn-OH (635 mg, 1,64 mmol. Equiv: 4) y Fmoc-Leu-OH (580 mg, 1,64 mmol. Equiv: 4) como aminoácidos.

El producto (153 mg, 151  $\mu$ mol) se obtuvo en forma de sólido de color amarillo claro.

20

EM: Masa esperada: 908,6391, masa encontrada: 908,637

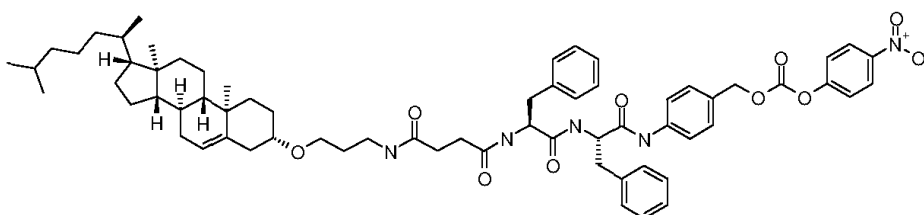
Etapa 3:

25 El compuesto base se preparó en analogía al ejemplo 18, etapa 3. Tras purificación sobre gel de sílice (117 mg, 98  $\mu$ mol) se obtuvo en forma de sólido de color blanco.

EM: Masa esperada: 1073,6453, masa encontrada: 1073,646

30 Ejemplo 26

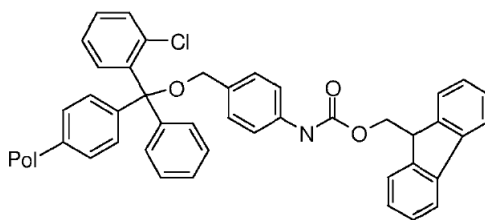
N-[4-((3-((3 beta)-colest-5-en-3-iloxi)propil)amino)-4-oxobutanoil]-L-fenilalanil-N-[4-(((4-nitrofenoxi)carbonil)oxi)metil]fenil]-L-fenilalaninamida



Quiral

35 Etapa 1:

Adición de alcohol FMOC-4-aminobencílico a la resina de 2-clorotritilo

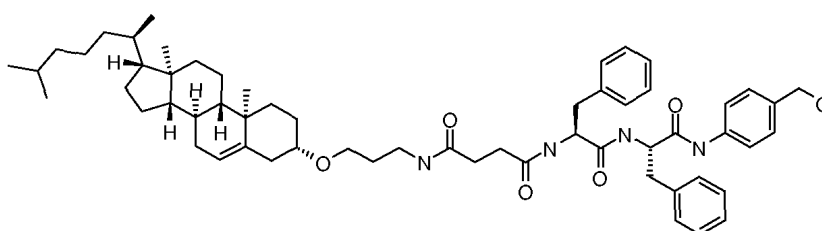


Se realizó en analogía al ejemplo 18, etapa 1.

5 Etapa 2:

N1-(3-((3S,8S,9S,10R,13R,14S,17R)-10,13-dimetil-17-((R)-6-metilheptan-2-il)-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecahidro-1H-ciclopenta[a]fenantren-3-iloxi)propil)-N4-((S)-1-((S)-1-(4-(hidroximetil)fenilamino)-1-oxo-3-fenilpropan-2-ilamino)-1-oxo-3-fenilpropan-2-il)succinamida

10



Quiral

Se preparó en analogía al ejemplo 18, etapa 2, con Fmoc-Asn-OH (635 mg, 1,64 mmol. Equiv: 4) como aminoácido.

El producto (240 mg, 204 μmol) se obtuvo en forma de sólido de color amarillo claro.

15

EM: Masa esperada: 942,6234, masa encontrada: 942,6218

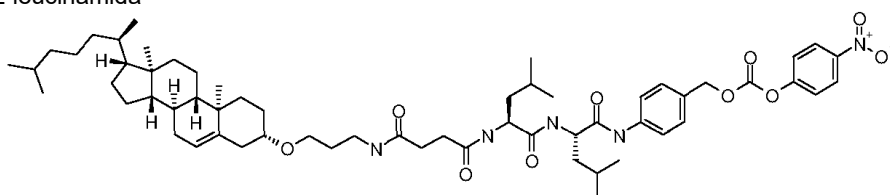
Etapa 3:

20 El compuesto base se preparó en analogía al ejemplo 18, etapa 3. Tras purificación sobre gel de sílice (190 mg, 154 μmol) se obtuvo en forma de sólido de color blanco.

EM: Masa esperada: 1107,6296 masa encontrada: 1107,6287

25 Ejemplo 27

N-[4-((3-((3 beta)-colest-5-en-3-iloxi)propil)amino)-4-oxobutanoil]-L-leucil-N-[4-(((4-nitrofenoxi)carbonil)oxi)metil]fenil]-L-leucinamida

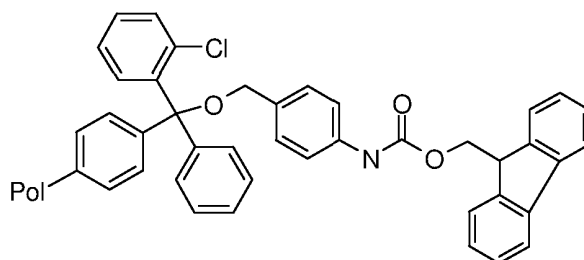


Quiral

Etapa 1:

30

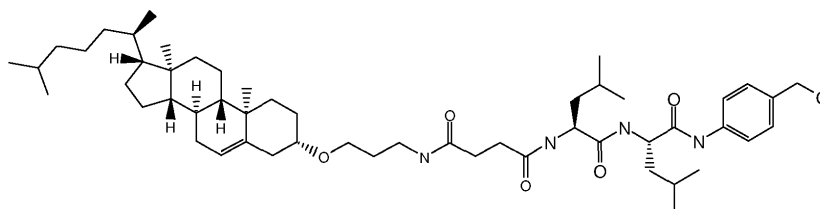
Adición de alcohol FMOC-4-aminobencílico a la resina de 2-clorotritilo



Se realizó en analogía al ejemplo 18, etapa 1.

Etapa 2:

- 5 N1-(3-((3S,8S,9S,10R,13R,14S,17R)-10,13-dimetil-17-((R)-6-metilheptan-2-il)-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecahidro-1H-ciclopenta[a]fenantren-3-iloxi)propil)-N4-((S)-1-((S)-1-(4-(hidroximetil)fenilamino)-4-metil-1-oxopentan-2-ilamino)-4-metil-1-oxopentan-2-il)succinamida



- 10 Se preparó en analogía al ejemplo 18, etapa 2, con Fmoc-Asn-OH (1,59 g, 4,5 mmol. Equiv: 3) como aminoácido.

El producto (254 mg, 284 μmol) se obtuvo en forma de sólido de color blanco.

EM: Masa esperada: 874,6547, masa encontrada: 874,6527

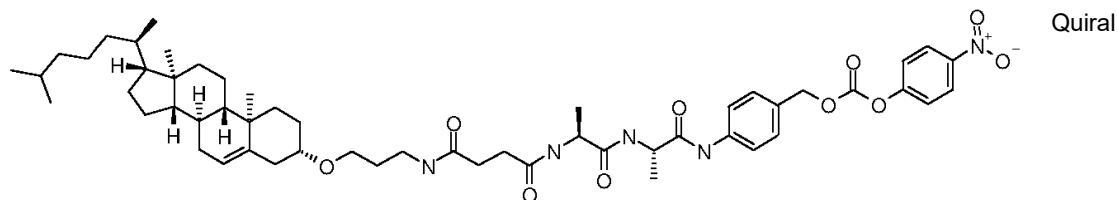
- 15 Etapa 3:

El compuesto base se preparó en analogía al ejemplo 18, etapa 3. Tras purificación sobre gel de sílice en forma de sólido de color blanco (178 mg, 168 μmol),

- 20 EM: Masa esperada: 1039,6609 masa encontrada: 1039,6588

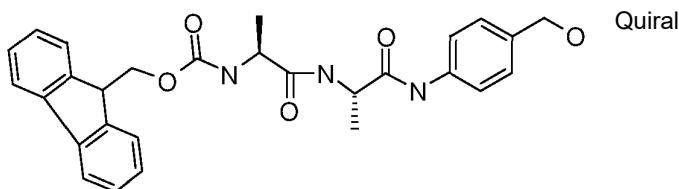
Ejemplo 28

- 25 N-[4-((3-((3 beta)-colest-5-en-3-iloxi)propil)amino)-4-oxobutanoil]-L-alanil-N-[4-(((4-nitrofenoxi)carbonil] metil)fenil]-L-alaninamida



- 30 Etapa 1:

9H-fluoren-9-metil éster de ácido {(S)-1-[(S)-1-(4-hidroximetil-fenilcarbamoil)-etilcarbamoil]-etil}-carbámico

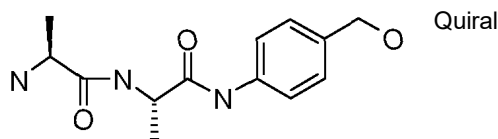


- 35 Se trató una solución de Fmoc-Ala-Ala-OH (1 g, 2,61 mmol. Equiv: 1,0) y (4-aminofenil)metanol (483 mg, 3,92 mmol. Equiv: 1,5) en THF (20 ml) con EEDQ (970 mg, 3,92 mmol. Equiv: 1,5). La solución se agitó durante toda la noche a temperatura ambiente. La mezcla se diluyó con 2-propanol 10 %/acetato de etilo (100 ml) y la solución se lavó con KHSO4 5 %/K2SO4 10 % (2 X), agua (1X) y salmuera (1X), se secó sobre MgSO4 y se evaporó al vacío. El residuo se sometió a ultrasonido en éter dietílico durante varios minutos y el sólido se recogió mediante filtración para obtener el producto (1,27 g, 1,2 mmol) en forma de sólido de color pardo claro.

- 40 EM (PI): (M+H) 488,3.

Etapa 2:

(S)-2-Amino-N-[(S)-1-(4-hidroximetil-fenilcarbamoil)-etil]-propionamida

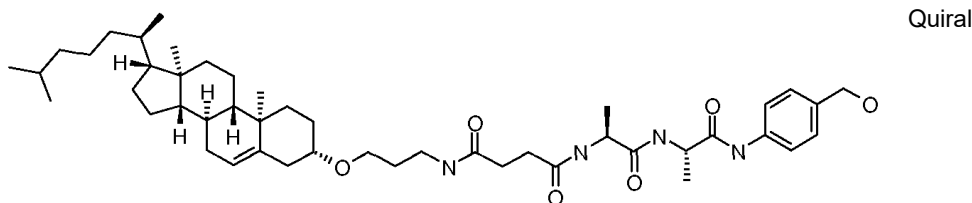


5 El compuesto se preparó en analogía a la etapa c del ejemplo 1 para obtener el producto (245 mg, 877 μmol) en forma de sólido de color amarillo.

EM (PI): (M+H) 266,3. (M+Na) 288,2 (2M+H) 531,3

10 Etapa 3:

15 N1-(3-((3S,8S,9S,10R,13R,14S,17R)-10,13-dimetil-17-((R)-6-metilheptan-2-il)-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecahidro-1H-ciclopenta[*a*]fenantren-3-iloxi)propil)-N4-((S)-1-((S)-1-(4-(hidroximetil)fenilamino)-1-oxopropan-2-ilamino)-1-oxopropan-2-il)succinamida



20 El compuesto se preparó en analogía a la etapa 2 del ejemplo 16 (165 mg, 198 μmol) en forma de sólido de color pardo claro.

EM: Masa esperada: 790,5608, masa encontrada: 790,5587

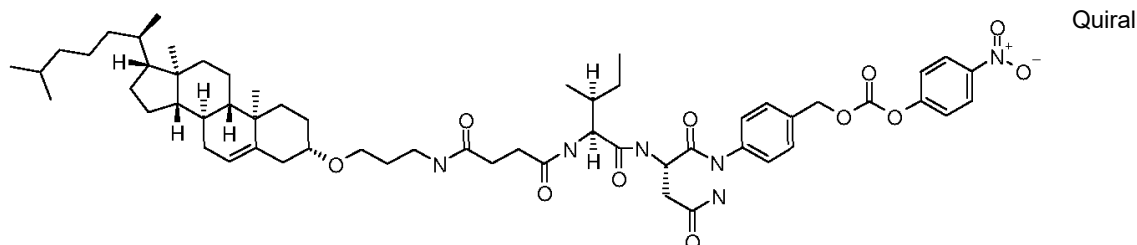
Etapa 4:

25 El compuesto base se preparó en analogía al ejemplo 18, etapa 3. Tras purificación sobre gel de sílice se obtuvo en forma de sólido de color blanco (99 mg, 98,4 μmol),

EM: Masa esperada: 955,567, masa encontrada: 955,5651

30 Ejemplo 29

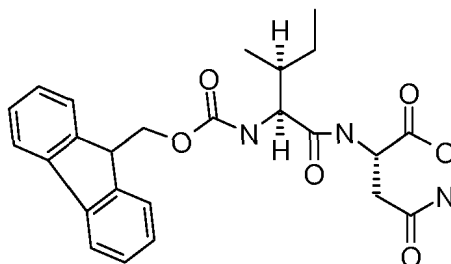
N-[4-({3-[(3 beta)-colest-5-en-3-iloxi]propil}amino)-4-oxobutanil]-L-isoleucil-N~1~-[4-({[(4-nitrofenoxi)carbonil]oxi}metil)fenil]-L-aspartamida



35 Etapa 1:

Ácido (S)-2-[(2S,3S)-2-(9H-fluoren-9-ylmetoxicarbonilamino)-3-metil-pentanoilamino]-succinámico

Quiral



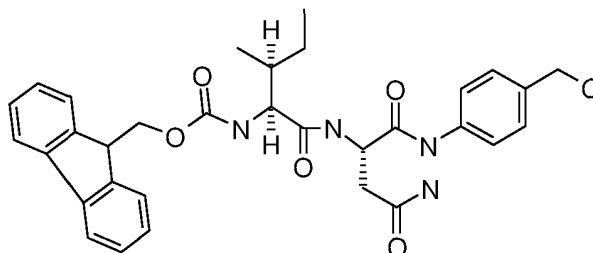
La resina de cloruro de 2-clorotritilo (5 g, 7,5 mmol. Equiv: 1,00) se hinchó en DCM y después se trató con una solución de Fmoc-Asn(Trt)-OH (8,95 g, 15,0 mmol. Equiv: 2) y base de Hünig (3,88 g, 5,1 ml, 30,0 mmol. Equiv: 4) en DCM durante toda la noche. La resina se lavó con DCM y se cubrió con una solución de base de Hünig al 10 % en metanol. Acoplamiento de Fmoc-Ile-OH (5,3 g, 15,0 mmol. Equiv: 2) con TPTU (4,46 g, 15,0 mmol. Equiv: 2) y base de Hünig (3,88 g, 5,1 ml, 30,0 mmol. Equiv: 4) de acuerdo con la síntesis convencional de péptido en fase sólida. El producto se escindió de la resina con un cóctel de TFA/agua/triisopropilsilano (95/2.5/2.5 v/v/v) durante dos horas a temperatura ambiente. La resina se filtró y el filtrado se concentró a presión reducida hasta un volumen pequeño. Después de triturar con éter dietílico, el producto se filtró y se secó al vacío para obtener el producto (2,85 g, 5,79 mg) en forma de sólido de color blanco.

EM: Masa esperada: 467,2056, masa encontrada: 467,2056

Etapa 2:

9H-fluoren-9-ilmetil éster de ácido{(1S,2S)-1-[2-carbamoil-1-((S)-4-hidroximetil-fenilcarbamoil)-etilcarbamoil]-2-metil-butil}-carbámico

Quiral

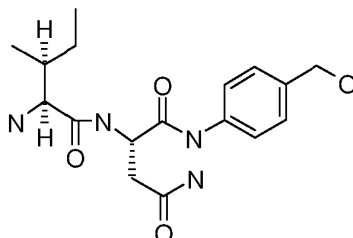


El compuesto se preparó en analogía a la etapa 1 del ejemplo 28 (620 mg, 336  $\mu$ mol) en forma de sólido de color amarillo.

Etapa 3:

(S)-2-((2S,3S)-2-amino-3-metil-pentanoilamino)-N\*1\*-(4-hidroximetil-fenil)-succinamida

Quiral



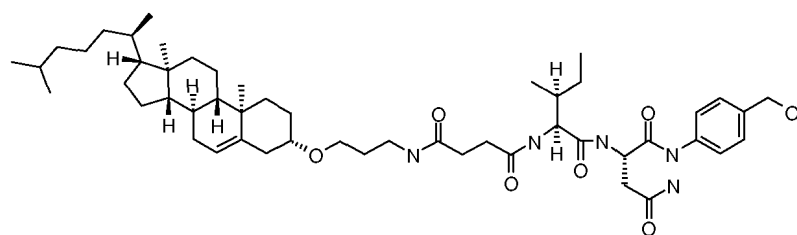
El compuesto se preparó en analogía a la etapa c del ejemplo 1 (100 mg, 228  $\mu$ mol) en forma de sólido de color amarillo claro.

30

Etapa 4:

(S)-2-((2S,3S)-2-(4-(3-((3S,8S,9S,10R,13R,14S,17R)-10,13-dimetil-17-((R)-6-metilheptan-2-il)-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecahidro-1H-ciclopenta[a]fenantren-3-iloxi)propilamino)-4-oxobutanamido)-3-metilpentanamido)-N1-(4-(hidroximetil)fenil)succinamida

35



Quiral

El compuesto se preparó en analogía a la etapa 2 del ejemplo 16 (89 mg, 91,4  $\mu$ mol) en forma de sólido de color amarillo claro.

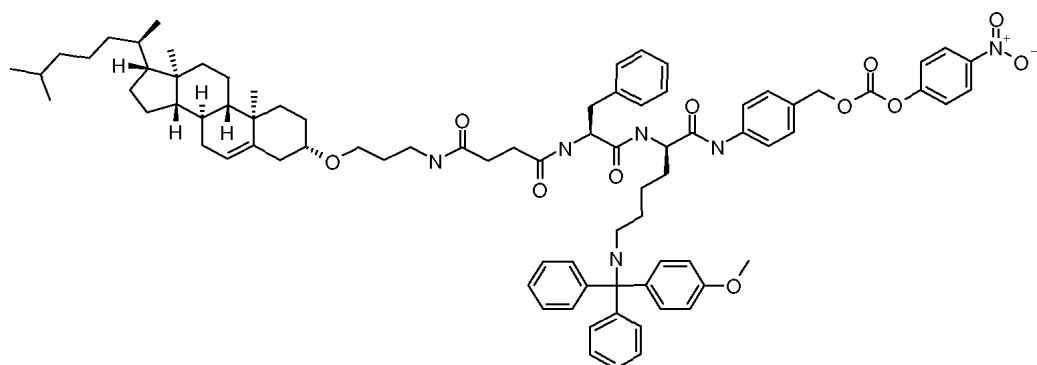
5 Etapa 5:

el compuesto de la etapa previa se hizo reaccionar con el compuesto base en analogía con el ejemplo 18, etapa 3. Tras purificación sobre gel de sílice (42 mg, 36,3  $\mu$ mol) se obtuvo en forma de sólido de color pardo claro.

10 EM: Masa esperada: 1040,6198, masa encontrada: 1040,6177

Ejemplo 30

15 N-[4-({3-[(3  $\beta$ -colest-5-en-3-ilo]propil)amino]-4-oxobutanoil)-L-fenilalanil-N~6~ [(4-metoxifenil)(difenil)metil]-N-[4-({[(4-nitrofenoxi)carbonil]oxi}metil)fenil]-D-lisnamida



Quiral

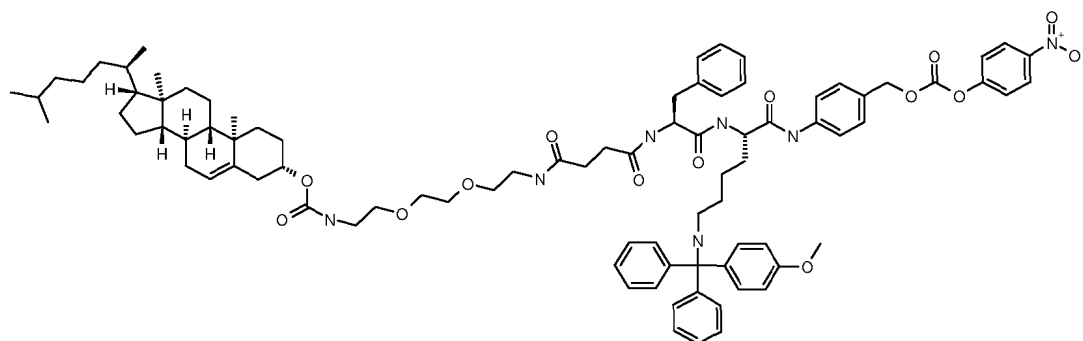
El compuesto se preparó en analogía a la etapa 1 del ejemplo 16 empezando con Fmoc-D-Lys(Boc)-OH, (158 mg, 116  $\mu$ mol) en forma de sólido de color pardo claro.

20

EM (PI): (M+H) 1362,8 (M+Na) 1383,8.

Ejemplo 31

25 N-{15-[(3  $\beta$ -colest-5-en-3-ilo]4,15-dioxo-8,11-dioxa-5,14-diazapentadecan-1-ol]-L-fenilalanil-N~6~}-[(4-metoxifenil)(difenil)metil]-N-[4-({[(4-nitrofenoxi)carbonil]oxi}metil)fenil]-L-lisnamida



Quiral

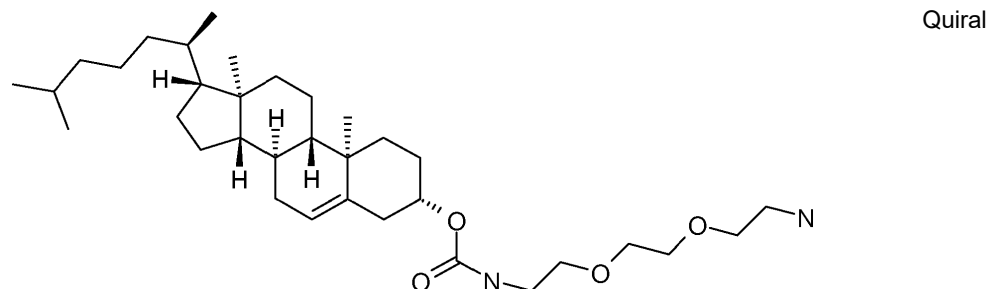
30 El compuesto base se preparó en analogía al ejemplo 16, usando un derivado PEG-oligo-colesterol en la etapa 2 de la síntesis.

EM (PI): (M+H) 1479,8.



El ácido N-[2-(2-[2-[(3S,8S,9S,10R,13R,14S,17R)-17-((R)-1,5-dimetil-hexil)-10,13-dimetil-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecahidro-1H-ciclopenta[a]fenantren-3-ilo]carb-onilamino]-etoxi)-etoxi)-etil]-succinámico colesterol-PEG intermediario necesario para la etapa 2 se preparó de la forma siguiente:

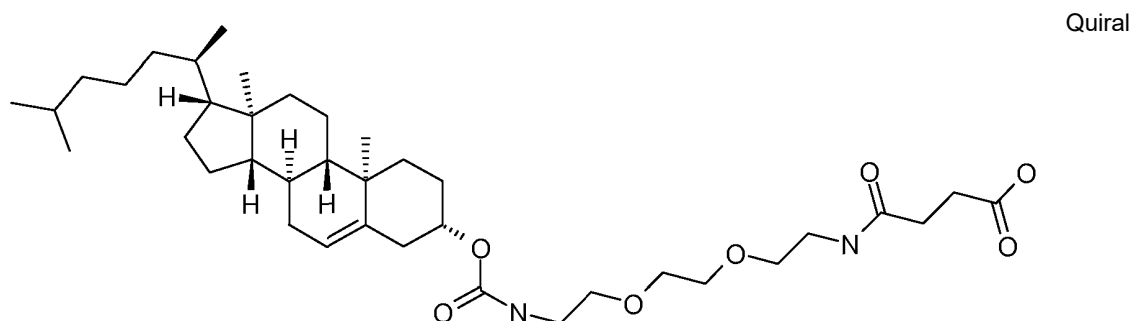
5 Etapa a: (3S,8S,9S,10R,13R,14S,17R)-17-((R)-1,5-dimetil-hexil)-10,13-dimetil-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecahidro-1H-ciclopenta[a]fenantren-3-il éster de ácido {2-[2-(2-Amino-etoxi)-etoxi]-etil]-carbámico



10 Se añadió una solución de cloroformiato de colesterolo (1g, 2,23 mmol) en 25 ml de diclorometano gota a gota en agitación a una solución de 2,2'-(etilendioxo)bis-(etilamina) (495 mg, 3,34 mmol) en 75 ml de diclorometano. La reacción se agitó durante toda la noche a temperatura ambiente. La reacción se diluyó con diclorometano y se extrajo con agua. El extracto orgánico se secó sobre MgSO<sub>4</sub> dihidrato anhidro, se filtró y se evaporó. Tras purificación sobre gel de sílice (eluyente: MeCl<sub>2</sub> -> MeCl<sub>2</sub>/MeOH=975:25 v/v) el producto (615 mg) se obtuvo en forma de un sólido céreo de color blanco.

15 EM (PI): (M+H) 561,5.

20 Etapa b: Ácido N-[2-(2-[2-[(3S,8S,9S,10R,13R,14S,17R)-17-((R)-1,5-dimetil-hexil)-10,13-dimetil-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecahidro-1H-ciclopenta[a]fenantren-3-ilo]carbonilami-no]-etoxi)-etoxi)-etil]-succinámico

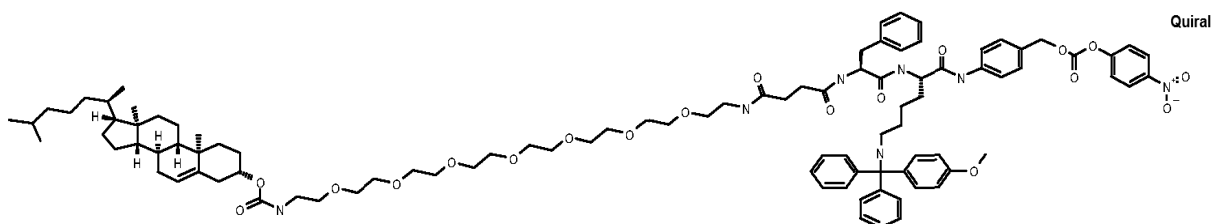


25 La amina de la etapa a (480 mg, 0,856 mmol) y trietilamina (0,13 ml, 0,94 mmol) se disolvieron en 5 ml de diclorometano. Tras añadir anhídrido succínico (90 mg, 0,9 mmol) la solución se agitó durante toda la noche a temperatura ambiente. La verificación con CCF mostró aún algo de material de partida. Se añadió más anhídrido succínico (20 mg, 0,2 mmol). Tras agitar la reacción durante otras 3 horas a temperatura ambiente, se diluyó con diclorometano y se lavó con una mezcla de KHSO<sub>4</sub> 5 %/K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10 %. El extracto orgánico se secó sobre MgSO<sub>4</sub> dihidrato anhidro, se filtró y se evaporó al vacío para obtener el ácido deseado (490 mg, 0,667 mmol).

30 EM (PI): (M+H) 661,5.

30 Ejemplo 32

35 N-{30-[(3 beta)-colest-5-en-3-ilo]i-4,30-dioxo-8,11,14,17,20,23,26-heptaoxa-5,29-diazatriacontan-1-oi]-L-fenilalanil-N~6~-[(4-metoxifenil)(difenil)metil]-N-[4-({[(4-nitrofenoxi)carbonil] oxi} metil)fenil]-L-lisinamida

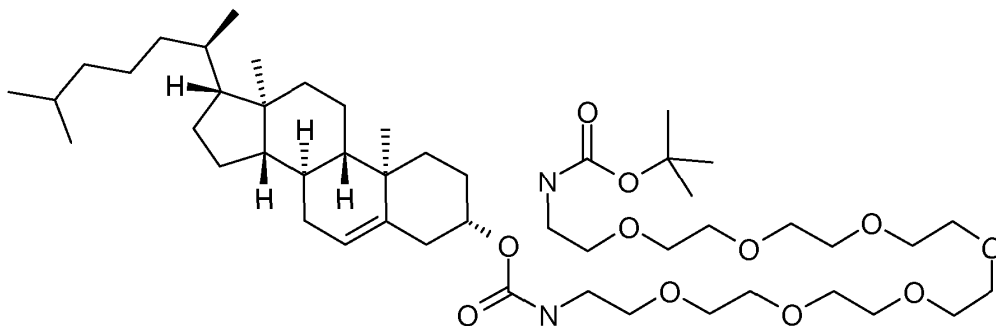


El compuesto base se preparó en analogía al ejemplo 16, usando un derivado colesterol-PEG en la etapa 2 de la síntesis.

EM (PI): (M+H) 1699,9.

El ácido 1-[(3 beta)-colest-5-en-3-iloxi]-1,27-dioxo-5,8,11,14,17,20,23-heptaoxa-2,26-diazatriacontan-30-óico colesterol-PEG intermediario necesario para la etapa 2 de la síntesis se preparó de la forma siguiente:

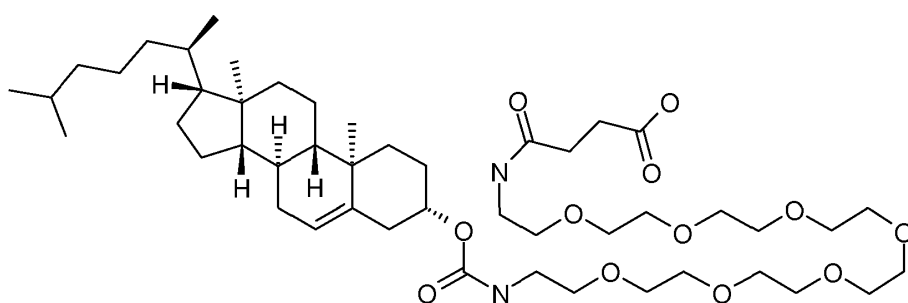
Etapa a: *tert*-butil [25-((3S,8S,9S,10R,13R,14S,17R)-10,13-dimetil-17-[(2R)-6-metilheptan-2-il]-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecahidro-1H-ciclopenta[a]fenantren-3-il)oxi)-25-oxo-3,6,9,12,15,18,21-heptaoxa-24-azapentacos-1-il]carbamato



Se disolvieron clorofornato de colesterilo (476 mg, 1,06 mmol) y trietilamina (155  $\mu$ l, en 5 ml de diclorometano). Después se añadió una disolución de alfa-amino-omega-boc-amino-octa(etilenglicol) (497 mg, 1,06 mmol) disuelta en 1 ml de diclorometano. La solución se agitó durante toda la noche a temperatura ambiente y se diluyó con diclorometano y se extrajo con una mezcla acuosa de KHSO<sub>4</sub> 5 %/K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10 %. El extracto orgánico se secó sobre MgSO<sub>4</sub> anhidro, se filtró y se evaporó al vacío. Tras purificación sobre gel de sílice (eluyente: MeCl<sub>2</sub>/MeOH=975:25 -> 95:5 v/v) el producto (530 mg, 0,571 mmol) se obtuvo en forma de un aceite incoloro.

EM (PI): (M+H) 898,7.

Etapa b: Ácido 1-[(3 beta)-colest-5-en-3-iloxi]-1,27-dioxo-5,8,11,14,17,20,23-heptaoxa-2,26-diazatriacontan-30-óico



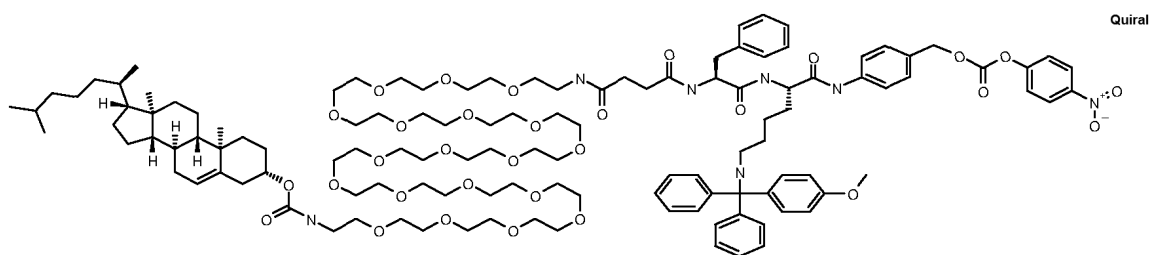
Quiral

El derivado Boc previo (450 mg, 0,511 mmol) se disolvió en HCl 4M en dioxano (10,2 ml, 40,9 mmol). La disolución se agitó a temperatura ambiente durante 40 min, el disolvente se eliminó al vacío y el sólido de color blanco restante se disolvió en 5 ml de diclorometano y se trató con trietilamina (32  $\mu$ l, 0,229 mmol) y anhídrido succínico (11,5 mg, 0,114 mmol) durante toda la noche. Se añadió más anhídrido succínico (11 mg, 0,11 mmol, 0,2 equiv.) y tras 60 min la reacción se diluyó con diclorometano y se lavó con tampón KHSO<sub>4</sub> 5 %/K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10 %. El extracto orgánico se secó sobre MgSO<sub>4</sub> anhidro, se filtró y se evaporó para obtener 390 mg del producto deseado.

EM (PI): (M+H) 881,7.

Ejemplo 33

N-[66-[(3 beta)-colest-5-en-3-iloxi]-4,66-dioxo-8,11,14,17,20,23,26,29,32,35,38,41,44,47,50,53,56,59,62-nonadecaoca-5,65-diazahexahexacontan-1-oi]-L-fenilalanil-N-6-~[(4-metoxifenil)(difenil)metil]-N-[4-(((4-nitrofenoxi)carbonil)oxi)metil]fenil]-L-lisinamida

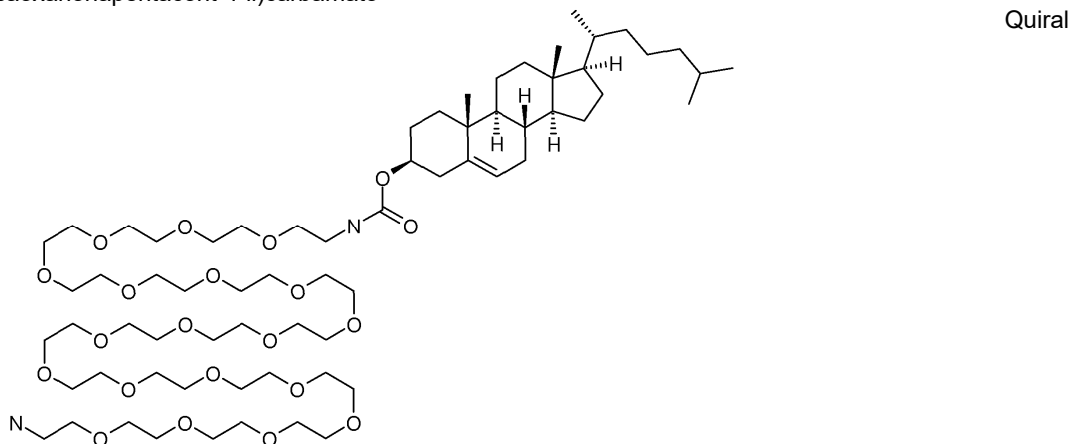


El compuesto base se preparó en analogía al ejemplo 16, usando un derivado colesterol-PEG en la etapa 2 de la síntesis.

5 EM (PI): (M+H) 2228,1.

10 El ácido 1-[(3 beta)-colest-5-en-3-iloxi]-1,63-dioxo-5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35,38,41,44,47,50,53,56,59-nonadecaosa-2,62-diazahexahexacontan-66-óico colesterol-PEG intermediario necesario para la etapa 2 de la síntesis se preparó de la forma siguiente:

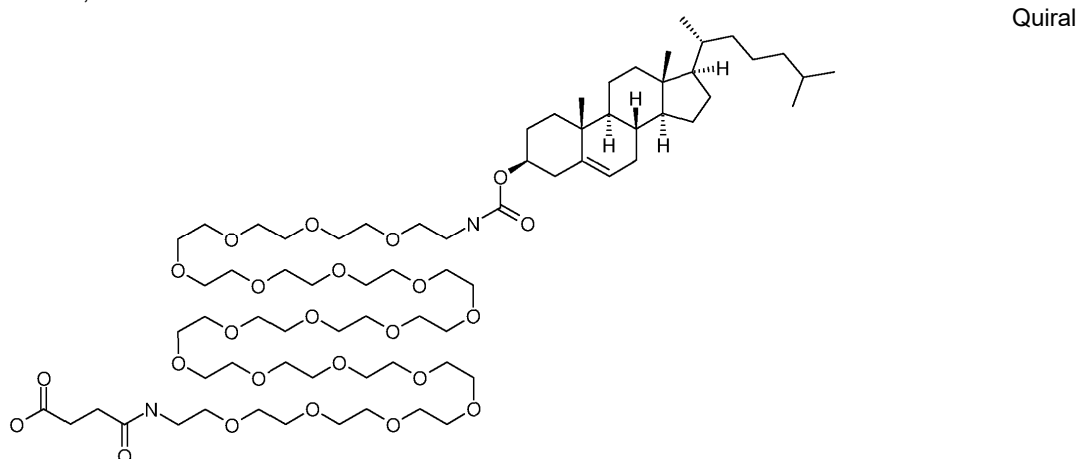
Etapa a: (3 beta)-colest-5-en-3-il (59-amino-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,33,36,39,42,45,48,51,54,57 nonadecaonanapentacont-1-il)carbamato



15 Se disolvieron alfa, omega-bis-amino 20(etilenglicol) (538 mg, 0,6 mmol) y trietilamina (92 µl, 0,66 mmol) en 15 ml de diclorometano seco. Se añadió una solución de cloroformato de colestirilo (270 mg, 0,6 mmol) en 2 ml de diclorometano seco gota a gota a temperatura ambiente. La solución se agitó durante toda la noche, después se concentró al vacío hasta un volumen pequeño y se purificó directamente sobre gel de sílice (eluyente: MeCl2/MeOH=95:5 -> 9:4 -> 4:1 v/v) para obtener el producto (350 mg, 0,254 mmol) en forma de un sólido céreo.

20 EM (PI): (M+H) 1309,9.

Etapa b: Ácido 1-[(3 beta)-colest-5-en-3-iloxi]-1,63-dioxo-5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35,38,41,44,47,50,53,56,59-nonadecaosa-2,62-diazahexahexacontan-66-óico



25

La amina de la etapa a (329 mg, 0,251 mmol), ácido succínico (26,4 mg, 0,264 mmol) y trietilamina (40 µl, 0,286 mmol) se disolvieron en 5 ml de diclorometano seco. Después de añadir más trietilamina (40 µl, 0,286 mmol), La solución (pH>8) se agitó durante toda la noche a temperatura ambiente. La reacción se diluyó con diclorometano y se lavó dos veces con una mezcla acuosa de KHSO<sub>4</sub> 5 %/K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10 %. El extracto orgánico se secó sobre MgSO<sub>4</sub> anhidro, se filtró y se evaporó al vacío para obtener el ácido (260 mg, 0,175 mmol) en forma de un sólido céreo incoloro.

EM (PI): (M+H) 1408,9.

10 Ejemplo 34: Procedimiento general para la preparación de conjugados de ARN

#### Materiales

15 El dimetil sulfóxido (DMSO), la *N,N*-Diisopropiletilamina (DIPEA) y la solución de acetato sódico (3 M, pH 5,2) se adquirieron de Sigma Aldrich Chemie GmbH (Traufkirchen, Alemania).

El acetato de trietilamonio (TEAA, por sus siglas en inglés) (2,0 M, pH 7,0) y el acetonitrilo (ACN, calidad de HPLC) para el HPLC-FI se adquirieron de Biosolve (Valkenswaard, Países Bajos).

20 El etanol (EtOH, p.a.) se adquirió de Merck (Darmstadt, Alemania). Se usó agua purificada de un sistema Optilab HF (Membra Pure, Alemania).

La columna Resource RPC de 3 ml (10 x 0,64 cm; tamaño de partícula de 15 µm) se adquirió de GE Healthcare (Friburgo, Alemania).

25 La purificación por HPLC se completó usando un sistema ÄKTA Explorer 100 (GE Healthcare).

#### Síntesis de ARN amino modificado

30 Se produjo ARN equipado con un hexilamino engarzador en el extremo 5' de la cadena codificante mediante química de fosoramidito convencional sobre fase sólida a una escala de 1215 µmol usando un Oligopilot 100 (GE Healthcare, Friburgo, Alemania) y vidrio de poro controlado como soporte sólido (Prime Synthesis, Aston, PA, EE.UU.). Los ARN que contenían 2'-O-metilnucleótidos se generaron empleando los correspondientes fosoramiditos, 2'-O-metilfosoramiditos y amidito TFA-hexilamino engarzador (Sigma-Aldrich, SAFC, Hamburgo, Alemania). La escisión y desprotección, así como la purificación se consiguieron mediante métodos conocidos en el campo (Wincott F., et al, NAR 1995, 23, 14, 2677-84).

40 El ARN amino modificado se caracterizó mediante HPLC de intercambio aniónico (pureza: 96,1 %) y la identidad se confirmó mediante IEN-EM ([M+H]<sup>1+</sup> calculada: 6937,4; [M+H]<sup>1+</sup> medida: 6939,0).

Secuencia: 5'-(NH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>)GGAAUCuuAuAuuuGAUCcAsA-3'; u, c: 2'-O-metilnucleótidos de los correspondientes nucleótidos de ARN, s: fosforotioato.

#### Procedimiento experimental general de conjugación

45 Los compuestos base de los ejemplos 1-33 se acoplaron por medio del ARN amino modificado de acuerdo con el siguiente procedimiento:

50 El ARN equipado con un amino engarzador C-6 en el extremo 5' (16,5 mg, 1 equivalente) se disuelve en 500 µl de DMSO y 150 µl de agua. Se añade el derivado p-nitrofenilcarbonato (10 equivalentes) disuelto en 1 ml de DMSO, seguido de 8 µl de DIPEA. La mezcla de reacción se agita a 35 °C en oscuridad y se comprueba usando HPLC-FI (Resource RPC 3 ml, tampón: A: TEAA 0,1M en agua, B: TEAA 0,1 M en ACN al 95 %, gradiente: desde B al 3 % hasta B al 100 % en 20 VC). Una vez que la reacción ha llegado a completarse, el conjugado de ARN se precipita usando acetato sódico (3 M) en EtOH a -20 °C. Para los ejemplos que carecen de un grupo protector MMT en el motivo dipéptido, los conjugados correspondientes se purifican usando las condiciones descritas anteriormente. Las fracciones puras se agrupan y el material se precipita usando acetato sódico/EtOH para dar el conjugado deseado de ARN.

60 Los conjugados de ARN que contienen grupo protector MMT en la secuencia de dipéptido se procesan adicionalmente de acuerdo con el procedimiento dado más adelante.

#### Procedimiento general para la escisión de MMT

65 El sedimento de conjugado bruto de ARN se disuelve en 500 µl de agua y 1,5 ml de tampón acetato sódico (3 M, pH 5,2 o 0,1M, pH 4,0). La solución se agita durante 2 días a 30 °C. La mezcla de reacción se comprueba usando HPLC-FI (Resource RPC 3 ml, tampón: A: TEAA 0,1 M en agua, B: TEAA 0,1 M en ACN al 95 %, gradiente: desde B al 3 % hasta B al 100 % en 20 VC). Tras la escisión completa del grupo protector MMT, el conjugado de ARN se

purifica directamente usando las condiciones que se acaban de mencionar anteriormente. Las fracciones puras se agrupan y el conjugado deseado se precipita usando acetato sódico/EtOH.

5 Como control, se sintetizó un conjugado de ARN que carecía del motivo dipéptido. Para este fin, se unió colesterol al extremo 5' por medio de un engarzador descrito en la bibliografía (Nature Biotech, 2007, 25, 1149). Este conjugado se designa como "no escindible".

10 La pureza de todos los conjugados de ARN se analizó mediante HPLC-FI y su identidad se confirmó mediante IEN-EM (modo negativo). Brevemente, el HPLC-FI se realizó sobre un sistema Dionex Ultimate (Dionex, Idstein, Alemania) equipado con una columna XBridge C<sub>18</sub> (2.5 x 50 mm, tamaño de partícula de 2,5 mm), Waters, Eschborn, Alemania) a una temperatura de columna de 65 °C. La elución en gradiente se realizó usando hexafluoroisopropanol (HFIP) 100 mM y trietilamina 16 mM en metanol al 1 % como eluyente A y en metanol al 95 % como eluyente B (desde B al 1 % hasta B al 18 % en 30 minutos). La detección UV se registró a 260 nm. Para el análisis por espectrometría de masas se acopló en línea al sistema de HPLC un sistema de IEN-EM ThermoFinnigan LCQ DecaXP con fuente de micropulverización y detector de trampa iónica.

15 En la tabla 1 se desvelan ejemplos de compuestos específicos de fórmula (IIa). Los compuestos resultantes se designan como "conjugados de ARNip-colesterol que contienen dipéptido", en los que los conjugados de ARNip-colesterol que contienen dipéptido se designan además como "Compuesto base del ejemplo X- (NHC6)-(secuencia del ARNip)" y "ARNip con el compuesto base del ejemplo X".

Preparación del ARNip

25 Secuencia no codificante: 5'-uuGGAUCAAAuAuAAGAuUCcscsU-3'

u, c: 2'-O-metilnucleótidos de los correspondientes nucleótidos de ARN, s: fosforotioato.

30 Los conjugados de ARNip-colesterol que contienen dipéptido dirigidos contra el ARNm de apolipoproteína B se generaron mezclando una solución equimolar de cadenas complementarias en tampón de hibridación (fosfato sódico 20 mM, pH 6,8; cloruro sódico 100 mM), calentada en un baño de agua a 80-85 °C durante 3 minutos y enfriada a temperatura ambiente a lo largo de un período de 3-4 horas. La formación de cadenas dobles se confirmó mediante electroforesis nativa en gel.

35 Todos los conjugados de ARNip-colesterol que contienen dipéptido se enumeran en la tabla 2.

Tabla 1: Conjugados de ARNip-colesterol que contienen dipéptido (5'-3') y datos analíticos. Clave: las letras minúsculas a, c, g, u, son 2'-O-metilnucleótidos; La "s" minúscula simboliza un enlace fosforotioato. (NHC6) es el aminohexilo engarzador incorporado al extremo 5' de la cadena codificante.

Compuesto base del ejemplo nº		masa mol. calc.	masa mol. esp.	pureza (%) (RF)
16	(Compuesto base 16)(NHC6)GGAUCuuAuAuuuGAUCcAsA ej.	7885,7	7887,5	94,4
31	(Compuesto base 31)(NHC6)GGAUCuuAuAuuuGAUCcAsA ej.	8003,8	8003,3	97,3
33	(Compuesto base 33)(NHC6)GGAUCuuAuAuuuGAUCcAsA ej.	8752,7	8752,4	97,6
33	(Compuesto base 33)(NHC6)GGAUCuuAuAuuuGAUCcAsA ej.	8223,1	8226,5	97,3
17	(Compuesto base 17)(NHC6)GGAUCuuAuAuuuGAUCcAsA ej.	7870,7	7873,5	90,6
30	(Compuesto base 30)(NHC6)GGAUCuuAuAuuuGAUCcAsA ej.	7884,8	7888,8	95,2
27	(Compuesto base 27)(NHC6)GGAUCuuAuAuuuGAUCcAsA ej.	7840,0	7840,0	94,8

## ES 2 574 177 T3

Compuesto base del ejemplo nº		masa mol. calc.	masa mol. esp.	pureza (%) (RF)
28	(Compuesto base 28)(NHC6)GGAAUCuuAuAuuuGAUCcAsA ej.	7755,4	7754,9	93,2
29	(Compuesto base 29)(NHC6)GGAAUCuuAuAuuuGAUCcAsA ej.	7840,4	7839,9	87,2
1	(Compuesto base 1)(NHC6)GGAAUCuuAuAuuuGAUCcAsA ej.	7931,1	7935,2	98,2
2	(Compuesto base 2)(NHC6)GGAAUCuuAuAuuuGAUCcAsA ej.	7992,2	7995,0	96,7
J	(Compuesto base 3)(NHC6)GGAAUCuuAuAuuuGAUCcAsA ej.	7911,1	7913,8	98,2
4	(Compuesto base 4)(NHC6)GGAAUCuuAuAuuuGAUCcAsA ej.	7955,1	7958,5	98,0
5	(Compuesto base 5)(NHC6)GGAAUCuuAuAuuuGAUCcAsA ej.	7920,5	7923,9	97,2
6	(Compuesto base 6)(NHC6)GGAAUCuuAuAuuuGAUCcAsA ej.	7936,1	7939,6	98,5
71	(Compuesto base 7)(NHC6)GGAAUCuuAuAuuuGAUCcAsA ej.	7904,2	7905,5	95,1
8	(Compuesto base 8)(NHC6)GGAAUCuuAuAuuuGAUCcAsA ej.	7904,1	7908,7	98,8
9	(Compuesto base 9)(NHC6)GGAAUCuuAuAuuuGAUCcAsA ej.	7904,2	7906,7	98,7
10	(Compuesto base 10)(NHC6)GGAAUCuuAuAuuuGAUCcAsA ej.	7918,2	7921,0	95,4
11	(Compuesto base 11)(NHC6)GGAAUCuuAuAuuuGAUCcAsA ej.	7902,0	7901,5	98,7
12	(Compuesto base 12)(NHC6)GGAAUCuuAuAuuuGAUCcAsA ej.	7934,54	7936,5	94,4
13	(Compuesto base 13)(NHC6)GGAAUCuuAuAuuuGAUCcAsA ej.	7916,09	7917,9	96,5
14	(Compuesto base 14)(NHC6)GGAAUCuuAuAuuuGAUCcAsA ej.	7896,07	7888,3	94,9
24	(Compuesto base 24)(NHC6)GGAAUCuuAuAuuuGAUCcAsA ej.	7781,8	7783,4	97,2
23	(Compuesto base 23)(NHC6)GGAAUCuuAuAuuuGAUCcAsA ej.	7815,8	7817,3	95,2
22	(Compuesto base 22)(NHC6)GGAAUCuuAuAuuuGAUCcAsA ej.	7781,8	7783,9	90,5
26	(Compuesto base 26)(NHC6)GGAAUCuuAuAuuuGAUCcAsA ej.	7905,9	7907,0	96,4
25	(Compuesto base 25)(NHC6)GGAAUCuuAuAuuuGAUCcAsA ej.	7871,9	7873,2	96,1

Compuesto base del ejemplo nº		masa mol. calc.	masa mol. esp.	pureza (%) (RF)
20	(Compuesto base ej. 20)(NHC6)GGAAUCuuAuAuuuGAUCcAsA	7840,7	7840,0	95,9
19	(Compuesto base ej. 19)(NHC6)GGAAUCuuAuAuuuGAUCcAsA	7857,8	7856,6	97,3
18	(Compuesto base ej. 18)(NHC6)GGAAUCuuAuAuuuGAUCcAsA	7741,6	7741,1	93,9
21	(Compuesto base ej. 21)(NHC6)GGAAUCuuAuAuuuGAUCcAsA	7798,6	7797,8	87,6
15	(Compuesto base ej. 15)(NHC6)GGAAUCuuAuAuuuGAUCcAsA	7927,1	7926,8	97,2

Tabla 2: Conjugados de ARNip-colesterol que contienen dipéptido. La última entrada (par de SEQ ID NO 266/154) representa un conjugado de ARNip que carece del motivo dipéptido. Clave: las letras minúsculas a, c, g, u, son 2'-O-metilnucleótidos; La "s" minúscula simboliza un enlace fosforotioato. (NHC6) es el aminohexilo engarzador incorporado al extremo 5' de la cadena codificante.

5

SEQ ID NO	Secuencia codificante (5'-3')	SEQ ID NO	Secuencia no codificante (5'-3')
-	(Compuesto base ej. 16)(NHC6)GGAAUCuuAuAuuuGAUCcAsA	154	uuGGAUcAAAuAuAAGAuUCcsc sU
-	(Compuesto base ej. 31)(NHC6)GGAAUCuuAuAuuuGAUCcAsA	154	uuGGAUcAAAuAuAAGAuUCcsc sU
-	(Compuesto base ej. 33)(NHC6)GGAAUCuuAuAuuuGAUCcAsA	154	uuGGAUcAAAuAuAAGAuUCcsc sU
-	(Compuesto base ej. 32)(NHC6)GGAAUCuuAuAuuuGAUCcAsA	154	uuGGAUcAAAuAuAAGAuUCcsc sU
-	(Compuesto base ej. 17)(NHC6)GGAAUCuuAuAuuuGAUCcAsA	154	uuGGAUcAAAuAuAAGAuUCcscsU
-	(Compuesto base ej. 30)(NHC6)GGAAUCuuAuAuuuGAUCcAsA	154	uuGGAUcAAAuAuAAGAuUCcscsU
-	(Compuesto base ej. 27)(NHC6)GGAAUCuuAuAuuuGAUCcAsA	154	uuGGAUcAAAuAuAAGAuUCcscsU
-	(Compuesto base ej. 28)(NHC6)GGAAUCuuAuAuuuGAUCcAsA	154	uuGGAUcAAAuAuAAGAuUCcscsU
-	(Compuesto base ej. 29)(NHC6)GGAAUCuuAuAuuuGAUCcAsA	154	uuGGAUcAAAuAuAAGAuUCcscsU
-	(Compuesto base ej. 1)(NHC6)GGAAUCuuAuAuuuGAUCcAsA	154	uuGGAUcAAAuAuAAGAuUCcscsU
-	(Compuesto base ej. 2)(NHC6)GGAAUCuuAuAuuuGAUCcAsA	154	uuGGAUcAAAuAuAAGAuUCcscsU
-	(Compuesto base ej. 3)(NHC6)GGAAUCuuAuAuuuGAUCcAsA	154	uuGGAUcAAAuAuAAGAuUCcscsU

ES 2 574 177 T3

SEQ ID NO	Secuencia codificante (5'-3')	SEQ ID NO	Secuencia no codificante (5'-3')
-	(Compuesto base ej. 4)(NHC6)GGAAUCuuAuAuuuGAUCcAsA	154	uuGGAUcAAAUuAAGAUUCcscsU
-	(Compuesto base ej. 5)(NHC6)GGAAUCuuAuAuuuGAUCcAsA	154	uuGGAUcAAAUuAAGAUUCcscsU
-	(Compuesto base ej. 6)(NHC6)GGAAUCuuAuAuuuGAUCcAsA	154	uuGGAUcAAAUuAAGAUUCcscsU
-	(Compuesto base ej. 7)(NHC6)GGAAUCuuAuAuuuGAUCcAsA	154	uuGGAUcAAAUuAAGAUUCcscsU
-	(Compuesto base ej. 8)(NHC6)GGAAUCuuAuAuuuGAUCcAsA	154	uuGGAUcAAAUuAAGAUUCcscsU
-	(Compuesto base ej. 9)(NHC6)GGAAUCuuAuAuuuGAUCcAsA	154	uuGGAUcAAAUuAAGAUUCcscsU
-	(Compuesto base ej. 10)(NHC6)GGAAUCuuAuAuuuGAUCcAsA	154	uuGGAUcAAAUuAAGAUUCcscsU
-	(Compuesto base ej. 11)(NHC6)GGAAUCuuAuAuuuGAUCcAsA	154	uuGGAUcAAAUuAAGAUUCcscsU
-	(Compuesto base ej. 12)(NHC6)GGAAUCuuAuAuuuGAUCcAsA	154	uuGGAUcAAAUuAAGAUUCcscsU
-	(Compuesto base ej. 13)(NHC6)GGAAUCuuAuAuuuGAUCcAsA	154	uuGGAUcAAAUuAAGAUUCcscsU
-	(Compuesto base ej. 14)(NHC6)GGAAUCuuAuAuuuGAUCcAsA	154	uuGGAUcAAAUuAAGAUUCcscsU
-	(Compuesto base ej. 24)(NHC6)GGAAUCuuAuAuuuGAUCcAsA	154	uuGGAUcAAAUuAAGAUUCcscsU
-	(Compuesto base ej. 23)(NHC6)GGAAUCuuAuAuuuGAUCcAsA	154	uuGGAUcAAAUuAAGAUUCcscsU
-	(Compuesto base ej. 22)(NHC6)GGAAUCuuAuAuuuGAUCcAsA	154	uuGGAUcAAAUuAAGAUUCcscsU
-	(Compuesto base ej. 26)(NHC6)GGAAUCuuAuAuuuGAUCcAsA	154	uuGGAUcAAAUuAAGAUUCcsc sU
-	(Compuesto base ej. 25)(NHC6)GGAAUCuuAuAuuuGAUCcAsA	154	uuGGAUcAAAUuAAGAUUCcsc sU
-	(Compuesto base ej. 20)(NHC6)GGAAUCuuAuAuuuGAUCcAsA	154	uuGGAUcAAAUuAAGAUUCcscsU
-	(Compuesto base ej. 19)(NHC6)GGAAUCuuAuAuuuGAUCcAsA	154	uuGGAUcAAAUuAAGAUUCcscsU
-	(Compuesto base ej. 18)(NHC6)GGAAUCuuAuAuuuGAUCcAsA	154	uuGGAUcAAAUuAAGAUUCcscsU
-	(Compuesto base ej. 21)(NHC6)GGAAUCuuAuAuuuGAUCcAsA	154	uuGGAUcAAAUuAAGAUUCcscsU
-	(Compuesto base ej. 15)(NHC6)GGAAUCuuAuAuuuGAUCcAsA	154	uuGGAUcAAAUuAAGAUUCcscsU



SEQ ID NO	Secuencia codificante (5'-3')	SEQ ID NO	Secuencia no codificante (5'-3')
266	(Col)GGAAUCuuAuAuuuGAUC cAsA	154	uuGGAUcAAAUuAAGAuUCcscsU

Ejemplo 35: Experimentos *in vivo*Coadministración *in vivo* de conjugados de ARNip-colesterol que contienen dipéptido y polímero de dispensación

5 Se obtuvieron ratones de seis a ocho semanas de edad (cepas C57BL/6 o ICR, ~18-20 g cada uno) de Harlan Sprague Dawley (Indianapolis IN). Los ratones se alojaron al menos 2 días antes de la inyección. La alimentación se realizó mediante acceso libre con dieta para roedores Harlan Teklad (Harlan, Madison WI).

10 Se inyectó a los ratones (n=3 por grupo) una mezcla de 0,2 ml de solución de polímero de dispensación y 0,2 ml de conjugados de ARNip-colesterol que contienen dipéptido. A menos que se indicase otra cosa, la dosis inyectada fue de 15 mg/kg para el polímero de dispensación y de 0,1 mg/kg con respecto a los conjugados de ARNip-colesterol que contienen dipéptido. Las soluciones se inyectaron mediante infusión en la vena caudal. A las 48 horas de la inyección se midieron los niveles de ApoB relativos a los animales tratados con glucosa isotónica de acuerdo con el  
15 protocolo de más adelante.

Determinación de los niveles de ApoB sérica

20 Se hizo ayunar a los ratones durante 4 h antes de la recolección del suero mediante sangrado submandibular. Los niveles de ApoB sérica se determinaron mediante métodos convencionales de ELISA de *sandwich*. Brevemente, como anticuerpos de captura y de detección se usaron respectivamente un anticuerpo policlonal de cabra anti ApoB de ratón y un anticuerpo de conejo anti ApoB de ratón (Biodesign International). Después se aplicó un anticuerpo IgG de cabra anticonejo conjugado con HRP (Sigma) para unirse al complejo ApoB/anticuerpo. La absorbancia del desarrollo colorimétrico de la tetrametilbencidina (TMB, Sigma) se midió mediante un lector de microplacas Tecan Saffire2 (Austria, Europa) a 450 nm.

30 En la figura 1 se compararon varios conjugados de ARNip-colesterol que contienen dipéptido con el mismo ARNip conjugado con colesterol pero que carece del motivo escindible elaborado anteriormente en esta sección. El efecto de este conjugado de ARNip (par de SEQ ID NO 266/154, "control no escindible") sobre los niveles de ApoB sérica se ajustó a 1 a fin de evaluar la influencia de los conjugados que contienen dipéptido en relación con el control no escindible. La sustitución del motivo Phe-Lys usado inicialmente (ARNip con el compuesto base del ejemplo 16) con los correspondientes D-aminoácidos (ARNip con el compuesto base del ejemplo 14) o el simple reemplazo de la Lys con el enantiómero no natural (ARNip con el compuesto base del ejemplo 30) dio lugar a una reducción de la ApoB menos pronunciada o equivalente al control no escindible de ARNip. La sustitución de Lys por Gly (ARNip con el compuesto base del ejemplo 23) o Phe por p-metoxifenilalanina (ARNip con el compuesto base del ejemplo 23))  
35 redujo la potencia en comparación con el ARNip con el compuesto base del ejemplo 16. Se demostró que otros conjugados de ARNip que contienen motivos dipéptido eran tan eficaces como el conjugado original que contiene Phe-Lys.

40 La figura 2 resume los conjugados de ARNip-colesterol que contienen dipéptido que fueron eficaces o tuvieron eficacia mejorada en comparación con el ARNip con el compuesto base del ejemplo 16 que consistía en el motivo Phe-Lys. Todos estos conjugados fueron significativamente más activos en comparación con el conjugado "no escindible" de ARNip-colesterol de par de SEQ ID NO 266/154. Los conjugados de ARNip-colesterol que contienen dipéptido que funcionaron mejor tenían un anillo fenilo modificado con flúor en el motivo Phy-Lys (ARNip con el compuesto base del ejemplo 8, ARNip con el compuesto base del ejemplo 9) o tenían la fenilalanina sustituida con beta-fenilalanina (ARNip con el compuesto base del ejemplo 11) o un derivado de los mismos (ARNip con el compuesto base del ejemplo 10).

50 Como los conjugados de ARNip-colesterol que contienen dipéptido con motivos dipéptido que consisten en D-aminoácidos funcionan igual que el conjugado de control no escindible, es concebible que las otras secuencias de dipéptido se escindan, de hecho, mediante una actividad proteasa *in vivo*. Sin embargo, dada la amplia aceptación de diferentes aminoácidos y derivados de los mismos es probable que esté participando más de una enzima en la reacción de escisión, tal como se sugiere en la bibliografía (Bioconjugate Chem. 2002,13,855).

55 Tal como se muestra en la figura 3, la incorporación de un motivo dipéptido escindible por catepsina (en este caso Phe-Lys, ARNip con el compuesto base del ejemplo 16) entre el ARNip y el ligando de colesterol de molécula pequeña refuerza la potencia del conjugado de ARNip en comparación con el conjugado lineal de ARNip-colesterol (par de SEQ ID NO 266/154). El espaciado posterior del ligando de colesterol del motivo dipéptido por medio de engarzadores a base de PEG disminuye la potencia de forma proporcional a la longitud del engarzador de PEG.  
60

En la figura 4 la dosis de polímero se mantuvo constante a 15 mg/kg. La dosis de ARNip se tituló y se midió el efecto sobre el contenido de ApoB sérica. Los conjugados de ARNip-colesterol que contienen dipéptido, que contienen el motivo Phe-Lys (F-K) fueron significativamente más potentes en comparación con el conjugado de control que carecía de la secuencia de dipéptido.

5

#### Ejemplo 36: Síntesis de oligorribonucleótido 2' modificado

Los oligorribonucleótidos se sintetizaron de acuerdo con la tecnología de fosforamidito sobre fase sólida. Dependiendo de la escala se usó, bien un sintetizador ABI 394 (Applied Biosystems) o un AKTA oligopilot 100 (GE Healthcare, Friburgo, Alemania). Las síntesis se realizaron sobre un soporte sólido hecho de vidrio de poro controlado (VPC, 520 Å, con una carga de 75 µmol/g, obtenido de Prime Synthesis, Aston, PA, EE.UU.). Todos los fosforamiditos de ARN 2' modificados, así como los reactivos complementarios se adquirieron de SAFC (Hamburgo, Alemania). De forma específica, se usaron los siguientes 2'-O-metilfosforamiditos: (5'-O-dimetoxitritil-*N*<sup>6</sup>-(benzoi)-2'-O-metil-adenosin-3'-O-(2-cianoetil-*N,N*-diisopropilamino) fosforamidito, 5'-O-dimetoxitritil-*N*<sup>4</sup>-(acetil)-2'-O-metil-citidin-3'-O-(2-cianoetil-*N,N*-diisopropilamino) fosforamidito, (5'-O-dimetoxitritil-*N*<sup>2</sup>-(isobutiril)-2'-O-metil-guanosin-3'-O-(2-cianoetil-*N,N*-diisopropilamino) fosforamidito, y 5'-O-dimetoxitritil-2'-O-metil-uridin-3'-O-(2-cianoetil-*N,N*-diisopropilamino) fosforamidito. Los 2'-desoxi-2'-fluoro-fosforamiditos portaban los mismos grupos protectores que los 2'-O-metil amiditos de ARN. Todos los amiditos se disolvieron en acetonitrilo anhidro (100 mM) y se añadieron tamices moleculares (3 Å). Para generar el 5'-fosfato se usó el 2-[2-(4,4'-dimetoxitritiloxi)etilsulfonil]etil-(2-cianoetil)-(N,N-diisopropil)-fosforamidito de Glen Research (Sterling, Virginia, EE.UU.). Con el fin de introducir el amino engarzador C-6 en el extremo 5' de los oligómeros, se empleó el 6-(trifluoroacetilamino)-hexil-(2-cianoetil)-(N,N-diisopropil)-fosforamidito de Thermo Fisher Scientific (Milwaukee, Wisconsin, EE.UU. Las modificaciones en 5' se introdujeron sin ninguna modificación del ciclo de síntesis. Se usó 5-etiltiotetrazol (ETT, 500 mM en acetonitrilo) como solución activadora. Los tiempos de acoplamiento fueron de 6 minutos. Con el fin de introducir enlaces fosforotioato se empleó una solución 50 mM de 3-((dimetilamino-metilideno)amino)-3H-1,2,4-ditiazol-3-tiona (DDTT, obtenida de AM Chemicals, Oceanside, CA, EE.UU.) en acetonitrilo anhidro/piridina (1:1 v/v).

10

15

20

25

30

35

40

45

#### Ejemplo 37: Escisión y desprotección de oligómero unido a soporte

Tras la finalización de síntesis en fase sólida, el soporte sólido desecado se transfirió a un tubo de 15 ml y se trató con amoniaco acuoso concentrado (Aldrich) durante 18 horas a 40 °C. Después de la centrifugación, el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo y el VPC se lavó con amoniaco acuoso. Las soluciones combinadas se evaporaron y el residuo sólido se reconstituyó en tampón A (véase más adelante).

#### Ejemplo 38: Purificación de oligorribonucleótidos

Los oligómeros brutos se purificaron mediante HPLC de intercambio aniónico usando una columna empaquetada con Source Q15 (GE Helthcare) y un sistema AKTA Explorer (GE Helthcare). El tampón A era perclorato sódico 10 mM, Tris 20 mM, EDTA 1 mM, pH 7,4 (Fluka, Buchs, Suiza) y contenía acetonitrilo al 20 %, y el tampón B era el mismo que el tampón A salvo por el perclorato sódico a 500 mM. Se empleó un gradiente de B al 22 % hasta B al 42 % en 32 volúmenes de columna (VC). Se registraron las trazas a 280 nm. Las fracciones apropiadas se agruparon y se precipitaron con NaOAc 3M, pH=5,2 y etanol al 70 %. Finalmente, el sedimento se lavó con etanol al 70 %.

40

45

50

55

60

65

#### Ejemplo 39: Hibridación de oligorribonucleótidos para generar ARNip

Las cadenas complementarias se mezclaron combinando soluciones equimoleculares de ARN. La mezcla se liofilizó y se reconstituyó con un volumen apropiado de tampón de hibridación (NaCl 100 mM, fosfato sódico 20 mM, pH=6,8) para conseguir la concentración deseada. Esta solución se colocó en un baño de agua a 95 °C, que se enfrió a TA en un plazo de 3 h.

70

75

#### Ejemplo 40: Actividad *in vitro* de ARNip desprovistos de restos 2'-OH

Con el fin de investigar si los ARNip que carecen de cualquier resto 2'-OH muestran una actividad de atenuación génica potente *in vitro*, analizamos un panel de ARNip dirigidos hacia ARNm de EGFP con diferentes químicas de modificación de 2' (pares de SEQ ID del 31/32 al 149/150, y véase la tabla para los ejemplos). Se exploró la actividad codificante y no codificante de los ARNip con el sistema Dual-Glo® Luciferase Assay System (Promega) usando el vector psiCHECK2 (Promega) en células COS7 (DSMZ, Braunschweig, Alemania, n.º de cat. ACC-60). Para abordar la actividad silenciadora conferida por las cadenas codificante y no codificante clonamos cada secuencia del sitio diana del 19mero correspondiente como una construcción psiCHECK2 separada (psiCHECK2-AT para la actividad no codificante, psiCHECK2-ST para la actividad no codificante) dentro de la región de clonación múltiple situada en 3' con respecto al codón de terminación de la traducción de la luciferasa sintética de *Renilla*. Usando Lipofectamine 2000 (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Alemania, n.º de cat. 11668-019) se cotransfectaron células COS7 con la construcción del vector y 3 nM del ARNip correspondiente complementario al sitio diana clonado. El silenciamiento con éxito mediado por ARNip se determinó 24 horas después de la transfección por medio de la actividad de luciferasa de *Renilla* normalizada con respecto a los niveles de luciferasa de luciérnaga para tener

55

60

65

70

75

80

en cuenta la eficiencia de la transfección (véase la figura 5a para la actividad no codificante y la figura 5b para la actividad codificante).

5 Tabla 3: Secuencias de ARNip y modificaciones químicas de ejemplo usadas para la determinación de la actividad de atenuación génica *in vitro* dependiente de modificaciones de 2'. ARN bicatenarios y ejemplos seleccionados de referencia de las variantes de modificaciones correspondientes usadas en este estudio. Xf indica una modificación 2'-fluoro del nucleótido X, las letras pequeñas indican una modificación 2'-O-metilo, las letras subrayadas indican un nucleótido de ADN, todas las demás letras mayúsculas indican ribonucleótidos. La letra "p" indica un 5'-fosfato.

ARN bicatenarios	
no mod.	5'- UGCCCAUCCUGGUCGAGCUTT -3' 3'- <u>TT</u> ACGGGUAGGACCAGCUCGAp -5'
F/OMe	5'- <u>U</u> fgCfcCfaUfcCfuGfgUfcGfaGfcUfTsT -3' 3'- TsTaCfcGfgUfaGfgAfcCfaGfcUfcGfap -5'
F/ADN	5'- <u>U</u> gCfCCfAUfCCfUGfGUfCGfAGfCUfTsT -3' 3'- <u>TsT</u> ACfGfGfUfAGfGfAfcCfAGfCUfCGfAp -5'
ADN/OMe	5'- <u>U</u> gCcCaUcCuGgUcGaGcUTsT -3' 3'- <u>TsTaCgGgUaGgAcCaGcUcGap</u> -5'

10 Se encontró que los 5 ARNip modificados más potentes (atenuación génica  $\geq 60\%$ ) se diseñaron en un patrón alternante 2'-fluoro/2'-O-metilos (2'F/2'-OMe). Aunque confería actividad no codificante, esta química eliminaba totalmente la actividad de las cadenas codificantes correspondientes, tal como se muestra mediante una actividad luciferasa de *Renilla* nula o mínima para todas las variantes 2'F/2'-OMe analizadas.

15 Concluimos que dicho patrón 2'F/2'-OMe está promoviendo la actividad planeada de la cadena no codificante del ARNip, al tiempo que se suprimen totalmente los efectos colaterales indeseables procedentes de la cadena codificante. Este diseño es preferente de forma específica para los ARNip, que vienen con la necesidad de protección contra la escisión nucleolítica dirigida contra el 2'O.

20 Ejemplo 41: Detección de sitios sensibles a ADNasa II mediante ensayo *in vitro*

25 Para analizar la estabilidad *in vitro* de los ARN monocatenarios y bicatenarios seleccionados se estableció un método basado en cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, por sus siglas en inglés) de apareamiento iónico (AI) y fase inversa (FI) acoplada a una espectrometría de masas (EM) de ionización por electronebulización (IEN) o a HPLC de intercambio aniónico (AEX-HPLC por sus siglas en inglés).

30 Descripción del método: Para el análisis de la estabilidad se incubó una solución 10 mM de ARN, bien monocatenario o bien bicatenario a 37 °C en solución tampón de acetato sódico 5 mM (ph 4,5) que contenía 0,8 u 8 unidades de ADNasa II de bazo bovino, tipo V, Sigma Aldrich). La reacción de incubación se frenó mediante la adición de una solución de acetato de trietilamonio (TEAA), cambiando el pH a 7 e inactivando la enzima ADNasa II. El análisis se hizo, bien mediante CL/EM combinada con detección UV, o bien mediante AEX-HPLC con detección UV. La detección UV de trazas a 260 nm se usó para el análisis cuantitativo, los datos de EM sirvieron para la identificación del sitio de escisión dentro d la secuencia de ARN.

35 A. La HPLC-AI se hizo empleando una columna Waters XBridge C<sub>18</sub> (2,5 x 50 mm, tamaño de partícula de 2,5 mm) a una temperatura de columna de 65 °C. La elución en gradiente se realizó usando hexafluoroisopropanol (HFIP) 100 mM y trietilamina 16 mM en metanol al 1 % como eluyente A y la composición A en metanol al 95 % como eluyente B. Se empleó un gradiente desde B al 1 % hasta B al 18 % en 30 minutos.

40 B. La AEX-HPLC se realizó en una columna Dionex DNA Pac200 (4 x 250 mm) a 50°C usando un tampón fosfato 20 mM que contenía ACN al 10 % a pH=11. El eluyente B contenía NaBr en eluyente A. Se empleó un gradiente de B desde 25 a 62 % en 18 minutos.

45

Tabla 4: Evaluación de la estabilidad frente a ADNasa II en cadenas dobles y resto de cadenas intactas. Clave: las letras minúsculas a, c, g, u, son 2'-O-metilnucleótidos; las letras mayúsculas A, C, G, U seguidas por "r" indican un 2'-fluoronucleótido. La letra "p" minúscula indica un 5'-fosfato. (invdT) representa una desoxitimidina invertida (con enlace 3',3'). El enlace fosforitoato se simboliza con una "s" minúscula. dT es desoxitimidina. (NHC6) es el aminohexilo engarzador incorporado al extremo 5' de la cadena codificante.

SEQ ID NO	Secuencia de la cadena codificante (5'-3')	% de cadena intacta después de 6 horas	SEQ ID NO	Secuencia de la cadena no codificante (5'-3')	% de cadena intacta después de 6 horas
157	GGAAUGuGGAGAuuAGud TsdT	0	158	ACuAAUCUCcACUUCaUCCd TsdT	0,1
160	(NH2C6)GfgAfuGfaAfgUfgGfaGfaUfuAfgUf(invDT)	101	159	pasCfuAfaUfcUfcCfaCfuUfcAf uCfc(invDT)	97
165	(NH2C6)GfcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcA(invDT)	103	166	puGfaGfuUfgGfcAfcGfcCfuUfu Gfc(invDT)	103
167	(NH2C6)GcAAAAGGcGuGccAA cucAdTsdT	56	168	UGAGUUGGcACGCCUUUGC dTsdT	49
169	(NH2C6)GGAUfCfAUfCfUfCfAAGUfCfUfACfdTsdT	64	170	GUfAAGAcfUfUGAGAUfGA UfCfcfdTsdT	54
153	GGAAUCuuAuAuuuGAUCcAs A	0,1	154	uuGGAUcAAAuAuAAGAUUC cscsU	0,1
173	(NH2C6)UfgAfcCfaCfaGfuCfGfaUfuAfaA(invDT)	102	174	pusUfaAfaUfcCfGfAfcUfgUfgGf uCfa(invDT)	102
175	(NH2C6)uGAccAcAGucGGAu uAAAdTsdT	0,4	176	puUuAAUCCGACUGUGGucA dTsdT	0,3
175	(NH2C6)uGAccAcAGucGGAu uAAAdTsdT	6	177	UUuAAUCCGACUGUGGucA dTsdT	3

Conclusiones

5 A. Las cadenas de ARN que contienen al menos un nucleótido 2'-OH (p. ej., las dos cadenas del par de SEQ ID NO 157/158) se degradan rápidamente por medio de un intermediario pentavalente cíclico, que conduce a fosfatos cíclicos 2',3' en el producto de escisión 5'. La formación del intermediario pentavalente puede inhibirse usando nucleótidos que carecen de un grupo 2'-OH, tal como, p. ej., 2'-desoxi, 2'-OMe o 2'-F.

10 B. Además, El ARN se degrada por medio de una vía exonucleolítica 5', que es independiente de la modificación 2' en los nucleótidos 5'-terminales. Esta vía de degradación puede inhibirse usando restos no nucleótidos 5'-terminales, como p. ej., un amino engarzador C6 (p. ej., SEQ ID NO 160 en el par de SEQ ID NO 160/159 o SEQ ID NO 165 en el par de SEQ ID NO 165/166) o un fosforotioato en el primer enlace internucleotídico (p. ej., SEQ ID NO 160 en el par de SEQ ID NO 160/159).

15 C. Un grupo 5'-fosfato retrasa la cinética de escisión exonucleolítica, pero no puede bloquear completamente la degradación que empieza en este extremo (p. ej., SEQ ID NO 160 en el par de SEQ ID NO 160/159). Esto se debe, muy probablemente a la escisión del 5'-fosfato, bien por fosfatasas o bien por una actividad fosfatasa inherente de la enzima ADNasa II.

20 D. La mejor protección para las cadenas de ARN se logró con oligonucleótidos que no contenían ningún nucleótido 2'-OH dentro de la cadena, empezando con un 2'-OMe nucleótido en el extremo 5' conectado mediante un enlace fosforotioato con el segundo nucleótido (p. ej., SEQ ID NO 173 en el par de SEQ ID NO 173/174). Otros nucleótidos terminales no 2'-OH también protegen contra la exodegradación 5', pero en un menor grado en comparación con la modificación 2'-OMe (remitirse a la tabla 9).

25 Ejemplo 42: Actividad de atenuación génica *in vivo* de los ARNip desprovistos de restos 2'-OH

Se llevaron a cabo experimentos *in vivo* con ratones a los que se inyectaron ARNip dirigidos contra el factor VII (FVII) (pares de SEQ ID NO 179/166 y 180/168, véase la tabla 5) coadministrados con DPC-GalNac.

30 Tabla 5 a: Secuencias de ARNip para el experimento *in vivo*. Clave: las letras minúsculas a, c, g, u, son 2'-O-metilnucleótidos; Las letras mayúsculas A, C, G, U seguidas por "f" indican un 2'-fluronucleótido. La letra "p" minúscula indica un 5'-fosfato. (invdT) representa una desoxitimidina invertida (con enlace 3',3'). La "s" minúscula simboliza un enlace fosforotioato. dT es desoxitimidina. (NHC6) es el aminohexilo engarzador incorporado al extremo 5' de la cadena codificante. GalNac se refiere a la estructura de la fórmula (IV).

Par de SEQ ID NO	SEQ ID NO	Secuencia 5'->3'
179/166	179	GalNac-(NHC6)- GfcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf(invdT)
	166	puGfaGfuUfgGfcAfcGfcCfuUfuGfc(invdT)
180/168	180	GalNac-(NHC6)-GcAAAGGcGuGccAAcucAdTsdT
	168	UGAGUUGGcACGCCUUUGCdTsdT

40 Se generó un ARNip de FVII con un patrón alternante 2'-OMe/2'-F en las cadenas codificante y no codificante con un 2'-OMe nucleótido 5'-terminal en la no codificante y una cadena 2'F 5'-terminal en la cadena codificante. Ambas cadenas están protegidas por un inv(dT) en el saliente 3'-terminal. La cadena no codificante portaba un grupo 5'-fosfato para mantener la actividad del ARNip. La cadena codificante se conjugó con una construcción GalNac-palmitoilo en su extremo 5' para dirigirla contra los hepatocitos mediante el receptor de asialoglucoproteína. El ARNip (2,5 mg/kg) se coadministró en ratones con PBAVE dirigido contra GalNac (15 mg/kg).

45 Las mediciones de ARNm de VII se efectuaron a partir de homogeneizados de hígado usando el *kit* para ADN ramificado (ADNr, o bDNA, por sus siglas en inglés) QuantiGene 1.0 branched DNA (bDNA) Assay Kit (Panomics, Fremont, Calif., EE.UU., n° cat.: QG0004).

50 Una necropsia de 1-2 g de tejido hepático se congeló de forma instantánea en nitrógeno líquido. El tejido congelado se pulverizó con mortero y pilón sobre hielo seco. Se transfirieron 15-25 mg de tejido a un tubo de reacción frío de 1,5 ml, se añadieron 1 ml de mezcla de lisis prediluida 1:3 en agua MilliQ y 3,3 ml de proteinasa K (50 mg/ml) y el tejido se lisó mediante ultrasonido durante varios segundos a una potencia de 30-50 % (HD2070, Bandelin, Berlín, Alemania). Los lisados se almacenaron a -80 °C hasta su análisis. Para el análisis de ARNm, el lisado se descongeló y se digirió con proteinasa K durante 15 min a 1000 rpm en un mezclador térmico a 65 °C (Thermomixer comfort, Eppendorf, Hamburgo, Alemania). Los niveles de ARNm de FVII y GAPDH se determinaron usando los reactivos del QuantiGene 1.0 bDNA Assay Kit de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. La expresión de ARNm de FVII se analizó usando 20 ml de lisado y un conjunto de sondas de FVII de ratón. La expresión de ARNm de GAPDH se analizó usando 40 ml de lisado y un conjunto de sondas de *Rattus norvegicus* que se ha demostrado que

reaccionan de forma cruzada con ratones (véase más atrás). Como lectura del ensayo, se midió la señal de quimioluminiscencia al final del ensayo en un lector Victor 2 Light luminescence counter (Perkin Elmer, Wiesbaden, Alemania) en forma de unidades relativas de luz (URL). La señal para el ARNm de FVII se dividió por la señal para el ARNm de GAPDH para el mismo lisado. Los valores se publican como expresión de ARNm de FVII normalizada con respecto a GAPDH.

Los resultados demuestran una atenuación génica del ARNm de FVII del 79 % a las 48 h de la dosificación tras la administración del par de SEQ ID NO 179/166. Por el contrario, el nucleótido 2'-OH que porta el par de SEQ ID NO 180/168 no mostró ninguna atenuación significativa (< 25 %), tal como se muestra en la figura 5.

Tabla 5b: Resultados de los estudios de la atenuación génica *in vivo*

	Par de SEQ ID NO 179/166	Par de SEQ ID NO 180/168
Tiempo [hora]	ARNm restante [%]	ARNm restante [%]
1	84	92
6	83	88
24	53	100
48	21	76

Ejemplo 43: Distribución tisular de ARNip desprovistos de restos 2'-OH

La concentración de ARNip en las muestras de tejido hepático se determinó usando un método de detección patentado, tal como se describe en el documento WO2010043512. Brevemente, la cuantificación del ARNip se basa en la hibridación de una sonda de APN marcada con fluorescencia (Atto-425) (Atto425-OO-GCAAAGCGTGCCAACT, obtenida de Panagene Inc, Corea) complementaria a la cadena no codificante del ARNip bicatenario, seguida de una separación basada en AEX-HPLC. La cuantificación se efectuó mediante detección de fluorescencia frente a una curva de calibración externa que se generó a partir de una serie de diluciones de los dos ARNip de FVII usados en el experimento *in vivo* (véase el ejemplo 42). Se inyectaron en el sistema HPLC alícuotas entre 0,2 y 2 µl para muestras de plasma y ~ 1 mg para tejido.

El análisis de tejido hepático del ARNip estabilizado que carece de nucleótidos 2'-OH mostró altas concentraciones de cadena no codificante intacta en el hígado, en el rango de µg/g. pero ~ 95 % estaba presente en la forma desfosforilada 5' inactiva (véase la tabla IR.04). El ARN resultante con un 2'-OMe nucleótido terminal no está predispuesto a la refosforilación en el citoplasma por la fosfocinasa hClp1 (véase más adelante). Por el contrario, la cadena no codificante del ARNip que contiene 2'-OH se degradó completamente en el tejido en un plazo de 6 h después de la dosificación.

Tabla 6: Análisis en tejido hepático de ARNip estabilizado que no contiene ningún nucleótido 2'-OH

Tiempo [hora]	Par de SEQ ID NO 181/186 en hígado [ng/g]		Par de SEQ ID NO 181/185 en hígado [ng/g]	
	- 5'-fosfato	+ 5'-fosfato	- 5'-fosfato	+ 5'-fosfato
1	873	171	9	BLD
6	1351	106	BLD*	BLD
24	1043	65	BLD	BLD
48	1062	66	BLD	BLD

\* BLD= bajo el límite de detección

Ejemplo 44: Actividad de atenuación génica *in vitro* de ARNip con extremos 5' optimizados

Se llevó a cabo una exploración adicional *in vitro* para los ARNip de FVII a fin de identificar los ARNip que podrían (re)fosforilarse intracelularmente en el extremo 5' no codificante para dar lugar a las especies de ARNi competente. Todos los ARNip de esta exploración se muestran en la tabla 7. El patrón de modificación alternante 2'-OMe/2'-F fue idéntico al diseño de la 1ª generación (sin ningún resto 2'-OH) a excepción de varias modificaciones en los primeros dos nucleótidos en el extremo 5' de la cadena no codificante. Los dos nucleótidos 5'-terminales de la cadena no codificante se generaron como nucleótidos modificados 2'-F o 2'-desoxi en diversas combinaciones con o sin 5'-fosfato 5'-fosfotioato adicional. Se exploró la dosis respuesta en todos los ARNip (de 24 nM a 0,00037 nM en



Ejemplo 45: Fosforilación 5' *in vitro* de ARNip con extremos 5' optimizados

La fosforilación por hClp1 de todos los ARNip sin 5'-fosfato o 5'-fosforotioato enumerados en la tabla 7 se evaluó en un extracto de células HeLa S100.

5 La fosforilación en 5' se analizó a partir de extractos HeLa S100, tal como describen Weitzer y Martínez (S. Weitzer y J. Martínez. hClp1: a novel kinase revitalizes RNA metabolism. *Cell Cycle* 6 (17):2133-2137, 2007). La solución se analizó, bien mediante HPLC-AI-FI o bien mediante AEX-HPLC en condiciones desnaturizantes mediante inyección de 5 µl de solución de muestra directamente tras la incubación de ARNip 1 mM en el extracto HeLa S100 que contenía ATP 5mM:

15 A. La HPLC-AI-FI se hizo empleando una columna Waters XBridge C<sub>18</sub> (2,5 x 50 mm, tamaño de partícula de 2,5 mm) a una temperatura de columna de 65 °C. La elución en gradiente se realizó usando hexafluoroisopropanol (HFIP) 100 mM y trietilamina 16 mM en metanol al 1 % como eluyente A y la composición A en metanol al 95 % como eluyente B. Se empleó un gradiente desde B al 1 % hasta B al 18 % en 30 minutos.

B. La AEX-HPLC se realizó en una columna Dionex DNA Pac200 (4 x 250 mm) a 50°C usando un tampón fosfato 20 mM que contenía ACN al 10 % a pH=11. El eluyente B contenía NaBr en eluyente A. Se empleó un gradiente de B desde 25 a 62 % en 18 minutos.

20 La proporción de fosforilación 5' se calcula para cada cadena de ARNip a partir de la traza UV a 260 nm usando la siguiente ecuación (AP es el área del pico)

$$\%_{(\text{fosforilación } 5')} = 100 * AP_{[\text{cadena fosforilada en } 5']} / (AP_{[\text{cadena fosforilada en } 5']} + AP_{[\text{cadena precursora}]})$$

25 En la tabla 8 se muestra que la cadena no codificante de un ARNip no puede fosforilarse en 5', cuando se localiza un 2'-OMe nucleótido en el extremo 5' (par de SEQ ID NO 181/196 y par de SEQ ID NO 181/195). Por el contrario, la cadena no codificante es sensible a la fosforilación 5' cuando se incorpora un nucleótido 2'F, 2' desoxi o 2'-OH en el extremo 5' (par SEQ ID NO 181/195, par de SEQ ID NO 181/192, par de SEQ ID NO 181/197, par de SEQ ID NO 181/199 y par de SEQ ID NO 182/168). Los dos ARNip, que el ensayo *in vitro* fueron activos comparables al par de SEQ ID NO 182/168 precursor (pares de SEQ ID NO 181/186 y 181/185), son sensibles a la fosforilación 5' una vez que el grupo 5'-fosfato/5'-PTO introducido de forma sintética se escinde *in vivo*. p. ej., por fosfatasas.

30



Tabla 8: Porcentaje de cadena fosforilada en 5' tras 4 horas de incubación en extracto HeLa S100. Clave: las letras minúsculas a, c, g, u, son 2'-O-metilnucleótidos; las letras mayúsculas A, C, G, U seguidas por "f" indican un 2'-fluronucleótido. (invdT) representa una desoxitimidina invertida (con enlace 3',3'). La "s" minúscula simboliza un enlace fosforitoato. dT es desoxitimidina.

SEQ ID NO	Secuencia de la cadena codificante (5'-3')	F en 5'; codificante [%]	SEQ ID NO	Secuencia de la cadena no codificante (5'-3')	F en 5'; no codificante [%]
181	GfcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfc Af(invdt)	52	196	uGfaGfuUfgGfcAfcGfcCfuUfuGfc (invdT)	0
181	GfcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfc Af(invdt)	53	195	usGfaGfuUfgGfcAfcGfcCfuUfuGf c(invdt)	0
181	GfcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfc Af(invdt)	44	192	UfsGfaGfuUfgGfcAfcGfcCfuUfuG fc(invdt)	22
181	GfcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfc Af(invdt)	42	197	dTsGfaGfuUfgGfcAfcGfcCfuUfuG fc(invdt)	22
181	GfcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfc Af(invdt)	47	199	dTsdGaGfuUfgGfcAfcGfcCfuUfu Gfc(invdt)	13
182	GcAAA GgcGuGccAAcucAdTsd T	31	168	UGAGUUGGcACGCCUUUGCdt sdT	42
184	GfcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfc A	22	168	UGAGUUGGcACGCCUUUGCdt sdT	100

Ejemplo 46: Estabilidad frente a ADNasa II *in vitro* de ARNip con extremos 5' optimizados

5 Se exploró la estabilidad frente a ADNasa II en todas las cadenas no codificantes, tal como se describe en el ejemplo 41. Las dos cadenas no codificantes presentes en los ARNip que fueron activos comparables al precursor bicatenario (SEQ ID NO 186 y par de SEQ ID NO 185, uno con un 2'-F 5'-terminal y un grupo fosfato y uno con dos 2'-desoxinucleótidos 5'-terminales y un 5'-fosforotioato) son estables frente a la escisión por ADNasa II (> 70 % cadena intacta tras 20 h de incubación).

Tabla 9: Estabilidad *in vitro* de los ARNip frente a la escisión por ADNasaII tras 20 h de incubación

SEQ ID NO codificante	SEQ ID NO no codificante	Secuencia (5'-3')	% de cadena intacta
181	192	UfsGfaGfuUfgGfcAfcGfcCfuUfuGfc(invdt)	11
181	197	dTsGfaGfuUfgGfcAfcGfcCfuUfuGfc(invdt)	0
181	199	dTsdGaGfuUfgGfcAfcGfcCfuUfuGfc(invdt)	0
181	193	psUfsGfaGfuUfgGfcAfcGfcCfuUfuGfc(invdt)	106
181	187	psdTsgfaGfuUfgGfcAfcGfcCfuUfuGfc(invdt)	96
181	194	psdTsdGaGfuUfgGfcAfcGfcCfuUfuGfc(invdt)	101
181	191	psUfGfaGfuUfgGfcAfcGfcCfuUfuGfc(invdt)	100
181	198	psdTGfaGfuUfgGfcAfcGfcCfuUfuGfc(invdt)	95
181	186	psdTdGaGfuUfgGfcAfcGfcCfuUfuGfc(invdt)	99
181	185	pUfsGfaGfuUfgGfcAfcGfcCfuUfuGfc(invdt)	71
181	189	pdTsGfaGfuUfgGfcAfcGfcCfuUfuGfc(invdt)	74
181	188	pdTsdGaGfuUfgGfcAfcGfcCfuUfuGfc(invdt)	64

10

Ejemplo 47: Actividad de atenuación génica *in vivo* de ARNip con extremos 5' optimizados

15 A fin de comprobar si la mejora *in vitro* por extremos 5' optimizados se transfiere a la situación *in vivo*, llevamos a cabo experimentos adicionales en ratones con conjugados GalNac-palmitoilo de ARNip seleccionados (véase la tabla 10). Los ARNip se administraron en idénticas condiciones a las descritas para el primer experimento con ratones (ejemplo 42, en esta solicitud de patente).

20 Para la medición de los niveles de FVII, se prepararon muestras de plasma de los ratones recogiendo la sangre (9 volúmenes) mediante sangrado submandibular en tubos de centrifuga que contenían 0,109 mol/l de anticoagulante citrato sódico (1 volumen), siguiendo procedimientos convencionales. La actividad de FVII en plasma se midió con un método cromogénico usando BIOPHEN VII kit (Hyphen BioMed/Aniara, Mason, OH) siguiendo las recomendaciones del fabricante. La absorbancia del desarrollo colorimétrico se midió usando un lector de microplacas Tecan Safire2 a 405 nm.

25 Los ARNip en investigación mostraron una actividad *in vivo* mejorada, que se correlacionaba totalmente con los resultados de la exploración *in vitro*. La actividad de FVII en suero se redujo en más de un 80 % para ambos ARNip a las 48 h después de la dosificación, en comparación con el 49 % usando el diseño de ARNip estable frente a ADNasa II de primera generación (véase la tabla 10). Este resultado subraya claramente la importancia de un nucleótido 5'-terminal en la hebra no codificante que pueda fosforilarse de forma eficaz, en caso de que las fosfatasa escindan *in vivo* el grupo 5'-fosfato o 5'-fosfotioato generado de forma sintética. En caso de un 2'-OMe nucleótido 5'-terminal tal como se usa en el primer diseño o se describe en la bibliografía como un diseño de ARNip más potente basado en la comparación *in vitro* con ARNip canónicos (Allerson et al. J. Med Chem. 2005, 48, 901-904), la escisión del fosfato sintético *in vivo* conduciría a una fuerte reducción de la potencia del ARNip correspondiente.

35

Tabla 10: Actividad de atenuación génica *in vivo* de ARNip con extremos 5' optimizados. Clave: las letras minúsculas a, c, g, u, son 2'-O-metilnucleótidos; las letras mayúsculas A, C, G, U seguidas por "r" indican un 2'-fluoronucleótido. La letra "p" minúscula indica un 5'-fosfato. (invdT) representa una desoxitimidina invertida (con enlace 3',3'). La "s" minúscula simboliza un enlace fosforotioato. (NHC6) es el aminohexilo engarzador incorporado al extremo 5' de la cadena codificante. GAINAc se refiere a la estructura de la fórmula (IV).

SEQ ID NO	Secuencia de la cadena codificante (5'-3')	SEQ ID NO	Secuencia de la cadena no codificante (5'-3')	% FVII restante en suero
179	GAINAc-(NH2C6)- GfcAfaAfgGfcGfuGfcCfaaAfcUfc Af(invDT)	166	puGfaGfuUfgGfcAfcGfcCfullfuGfc(invDT)	27
179	GAINAc-(NH2C6)- GfcAfaAfgGfcGfuGfcCfaaAfcUfc Af(invDT)	190	pusGfaGfuUfgGfcAfcGfcCfuUfuGfc(invDT)	51
179	GAINAc-(NH2C6)- GfcAfaAfgGfcGfuGfcCfaaAfcUfc Af(invDT)	185	pUfsGfaGfuUfgGfcAfcGfcCfuUfuGfc(invDT)	17
179	GAINAc-(NH2C6)- GfcAfaAfgGfcGfuGfcCfaaAfcUfc Af(invDT)	186	psdTdGfaGfuUfgGfcAfcGfcCfaUfuGfc(invDT)	13

Ejemplo 48: Actividad de atenuación génica *in vitro* de ARNip con extremos 3' optimizados

Para aumentar más la actividad de los ARNip estables frente a ADNasa II se realizó un estudio de REA del saliente 3'. Se aplicaron diversas combinaciones de invdT, dTinvdT o dTsdT en el saliente 3', bien de la cadena codificante o bien de la no codificante en ARNip dirigidos contra Aha1y EGFP (véanse las tablas 11 y 12, respectivamente) y las composiciones de ambos extremos 3' se compararon por parejas en los ARNip más potentes. Se exploró la dosis respuesta en todos los ARNip (de 24 nM a 0,00037 nM en diluciones al cuádruple) para determinar la actividad de atenuación génica después de la transfección de hepatocitos primarios de ratón (30000 células por pocillo; formato de placa de 96 pocillos) usando Lipofectamine 2000 de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Tabla 11: Actividad de atenuación génica *in vitro* de ARNip dirigidos contra EGFP con diferentes extremos 3'

SEQ ID NO	Secuencia de la cadena codificante (5'-3')	SEQ ID NO	Secuencia de la cadena no codificante (5'-3')	C50 [nM]
45	GCUGGAGUUCGUGACCGCCdTdT	46	GGGGUACACGAAACUCCAGCdTdT	1,0490
212	GcuGGAguucGuGAccGcodTsdT	225	GGGGUcACGAACUCcAGCdTsdT	Nº N/A
201	gcUfgGfaGfullfcGfuGfaCfcGfcCf(invdt)	221	dGsGfcGfgUfcAfcGfaAfcUfcCfaGfc(invdt)	0,4377
201	gcUfgGfaGfullfcGfuGfaCfcGfcCf(invdt)	214	dGsGfcGfgUfcAfcGfaAfcUfcCfaGfcTsdT	0,1479
211	gcUfgGfaGfullfcGfuGfaCfcGfcCfdT(invdt)	223	dGsGfcGfgUfcAfcGfaAfcUfcCfaGfcT(invdt)	0,5833
203	acllfaGfaGfullfcGfuGfaCfcGfcGfdTsdT	214	dGsGfcGfgUfcAfcGfaAfcUfcCfaGfcTsdT	0,2166
204	GfcUfgGfaGfullfcGfuGfaCfcGfcCf(invdt)	224	pGfsGfcGfgUfcAfcGfaAfcUfcCfaGfc(invdt)	0,9100
204	GfcUfaGfaGfullfcGfuGfaCfcGfcCf(invdt)	215	pGfsGfcGfaUfcAfcGfaAfcUfcCfaGfcTsdT	0,2241
207	GfcUfgGfaGfuUfcGfuGfaCfcGfcCfdT(invdt)	218	pGfsGfcGfgUfcAfcGfaAfcUfcCfaGfcT(invdt)	0,3474
206	GfcUfgGfaGfuUfcGfuGfaCfcGfcCfdTsdT	215	pGfsGfcGfaUfcAfcGfaAfcUfcCfaGfcTsdT	0,2392
205	GfscUfgGfaGfuUfcGfuGfaCfcGfcCf(invdt)	220	GfsGfcGfgUfcAfcGfaAfcUfcCfaGfc(invdt)	0,4251
205	GfscUfgGfaGfuUfcGfuGfaCfcGfcCf(invdt)	216	GfsGfcGfgUfcAfcGfaAfcUfcCfaGfcTsdT	0,2349
210	GfscUfgGfaGfullfcGfuGfaCfcGfcCfdT(invdt)	222	GfsGfcGfgUfcAfcGfaAfcUfcCfaGfcT(invdt)	0,5230
209	GfscUfgGfaGfuUfcGfuGfaCfcGfcCfdTsdT	216	GfsGfcGfgUfcAfcGfaAfcUfcCfaGfcTsdT	0,4937
200	gscUfgGfaGfuUfcGfuGfaCfcGfcCf(invdt)	217	pdGsGfcGfgUfcAfcGfaAfcUfcCfaGfc(invdt)	0,2643
200	gscUfgGfaGfuUfcGfuGfaCfcGfcCf(invdt)	213	pdGsGfcGfgUfcAfcGfaAfcUfcCfaGfcTsdT	0,0936
208	gscUfgGfaGfuUfcGfuGfaCfcGfcCfdT(invdt)	219	pdGsGfcGfgUfcAfcGfaAfcUfcCfaGfcT(invdt)	0,3776
202	gscUfgGfaGfullfcGfuGfaCfcGfcCfdTsdT	213	pdGsGfcGfgUfcAfcGfaAfcUfcCfaGfcTsdT	0,1569

Tabla 12: Actividad de atenuación génica *in vitro* de ARNip dirigidos contra Aha 1 con diferentes extremos 3'

SEQ ID NO	Secuencia de la cadena codificante (5'-3')	SEQ ID NO	Secuencia de la cadena no codificante (5'-3')	C150 [nM]
157	GGAuGAAGGuGGAGAuUAGudTsdT	158	ACuAAUCUCcACUUCcAUCCcdTsdT	0,094
234	GfGfAfuGfaAfgUfgGfaGfaUfuAfgUf(invdT)	246	AfsCfuAfaUfcUfcCfaCfuUfcAfuCfc(invdT)	0,081
234	GfGfAfuGfaAfgUfgGfaGfaUfuAfgUf(invdT)	240	AfsCfuAfaUfcUfcCfaCfuUfcAfuCfcTsdT	0,036
233	GfGfAfuGfaAfgUfgGfaGfaUfuAfgUfdT(invdT)	239	AfsCfuAfaUfcUfcCfaCfuUfcAfuCfdT(invdT)	0,034
236	GfGfAfuGfaAfgUfgGfaGfaUfuAfgUfdTsdT	240	AfsCfuAfaUfcUfcCfaCfuUfcAfuCfdTsdT	0,040
231	GFsgAfuGfaAfgUfgGfaGfaUfuAfgUf(invdT)	241	pAfsCfuAfaUfcUfcCfaCfuUfcAfuCfc(invdT)	0,037
231	GfsgAfuGfaAfaUfgGfaGfaUfuAfgUf(invdT)	267	pAfsCfuAfaUfcUfcCfaCfuUfcAfuCfdTsdT	0,030
229	GFsgAfuGfaAfgUfgGfaGfaUfuAfgUfdT(invdT)	268	pAfsCfuAfaUfcUfcCfaCfuUfcAfuCfdT(invdT)	0,024
228	GFsgAfuGfaAfaUfaGfaUfuAfgUfdTsdT	267	pAfsCfuAfaUfcUfcCfaCfuUfcAfuCfdTsdT	0,021
232	ggAfuGfaAfgUfgGfaGfaUfuAfgUf(invdT)	245	dAsCfuAfaUfcUfcCfaCfuUfcAfuCfc(invdT)	0,060
232	ggAfuGfaAfgUfgGfaGfaUfuAfgUf(invdT)	238	dAsCfuAfaUfcUfcCfaCfuUfcAfuCfdTsdT	0,030
237	ggAfuGfaAfgUfgGfaGfaUfuAfgUfdT(invdT)	244	dAsCfuAfaUfcUfcCfaCfuUfcAfuCfdT(invdT)	0,045
230	ggAfuGfaAfgUfgGfaGfaUfuAfgUfdTsdT	238	dAsCfuAfaUfcUfcCfaCfuUfcAfuCfdTsdT	0,025
227	gsgAfuGfaAfgUfgGfaGfaUfuAfgUf(invdT)	243	pdAsCfuAfaUfcUfcCfaCfuUfcAfuCfc(invdT)	0,045
227	gsgAfuGfaAfgUfgGfaGfaUfuAfgUf(invdT)	266	pdAsCfuAfaUfcUfcCfaCfuUfcAfuCfdTsdT	0,015
235	gsgAfuGfaAfgUfgGfaGfaUfuAfgUfdT(invdT)	242	pdAsCfuAfaUfcUfcCfaCfuUfcAfuCfdT(invdT)	0,039
226	gsgAfuGfaAfgUfgGfaGfaUfuAfgUfdTsdT	266	pdAsCfuAfaUfcUfcCfaCfuUfcAfuCfdTsdT	0,014

5 Se encontró que los ARNip con salientes de 2 nucleótidos dTsdT en la cadena no codificante funcionaban siempre mejor que aquellos con un saliente de una sola invdT en el extremo 3' de la cadena no codificante (mientras que en las cadenas codificantes eran igual). Más beneficiosa fue la combinación con una cadena codificante modificada con un saliente de una sola invdT como saliente 3'.

10 Ejemplo 49: Actividad de atenuación génica *in vivo* de ARNip en primate no humanos

Preparación de DPC y dosificación

Se prepararon DPC uniendo covalentemente el polímero 149 RAFT" al ARNip indicado dirigido contra el factor VII de coagulación (F7ip) en una proporción 4:1 p:p (polímero:ARNip) a través de un enlace disulfuro y después modificando el conjugado polímero ARNip con una mezcla a 2:1 p:p de CDM-PEG:CDM-NAG en una proporción 7x p:p (CDM:polímero). Se administró a monos cinomolgos una dosis de 1 mg/kg de DPC (peso de polímero) y 0,25 mg/kg el ARNip indicado. Un animal recibió DPC que contenía el par de SEQ ID NO 151/152 de F7ip, dos animales recibieron DPC que contenía el par de SEQ ID NO 253/254 de F7ip, N°. 1 y 2), y dos animales recibieron DPC que contenía el par de SEQ ID NO 251/255 de F7ip, N°. 1 y 2), Los valores de F7 se normalizaron con respecto a la media de los dos valores anteriores a la dosis. Los animales que recibieron DPC que contenían el par de SEQ ID NO 253/254 o el par de SEQ ID NO 251/255 tuvieron niveles mayores de atenuación génica y TP más largo que los animales que recibieron el par de SEQ ID NO 251/252.

Procedimiento de inyección de DPC

Para cada procedimiento de inyección, se dió a los animales una inyección IM que contenía una combinación de ketamina (hasta 7 mg/kg) y dexmedetomidina (hasta 0,03 mg/kg) y se trasladaron a una sala de procedimientos. En la sala de procedimientos, los animales se colocaron sobre una almohadilla térmica con camisa de agua y el sitio de la inyección se rasuró y se preparó con antiséptico. Se insertó un catéter intravenoso (calibre de 20 a 22) en una vena sistémica (cefálica o safena menor) y la solución de DPC se infundió (2 ml/kg) lentamente durante 1 o 2 minutos. Se usó un oxímetro de pulso para comprobar la frecuencia cardiaca y la saturación de oxígeno durante e inmediatamente después del procedimiento de inyección. Cada procedimiento de inyección tardó en realizarse alrededor de 20 min. Tras la inyección, el catéter se retiró y se aplicó una presión suave en el lugar de la venopunción. Los animales se devolvieron a sus jaulas y se les dió una inyección IM del antídoto atipamezol (Antisedan) (0,10 a 0,15 mg/kg). Los animales se vigilaron hasta que recobraron su actividad normal.

Procedimiento de recolección de sangre

Se obtuvieron muestras de sangre (1-5 ml) para la medición de la inhibición génica (actividad F7, tiempo de coagulación), análisis bioquímicos de sangre, y marcadores de daño hepático (hemograma, panel de bioquímica, ALT, citocinas, complemento). Para estos procedimientos de recolección de sangre, se dió a los animales una inyección IM que contenía una combinación de ketamina (hasta 7 mg/kg) y dexmedetomidina (hasta 0,03 mg/kg). Una vez sedados, los animales se trasladaron a una mesa de operaciones y se usó una aguja del calibre 22 y una jeringa para recoger la sangre de la vena femoral. Inmediatamente después de la recolección de sangre, se aplicó presión en el lugar de la venopunción y la sangre se dividió en los tubos de muestra apropiados para cada análisis de sangre. Después, se dió a los animales una inyección IM del antídoto atipamezol (Antisedan) (0,10 a 0,15 mg/kg) y volvieron a su jaula. No se extrajo más de un 20 % del volumen total de sangre en un periodo de 30 días (volumen de sangre estimado= 60 ml/kg). Cada procedimiento de recolección de sangre tardó en realizarse alrededor de 20 min.

Mediciones de la actividad del factor VII (F7)

Las muestras de sangre de primates no humanos se prepararon rellenando tubos separadores de suero con sangre total y dejando coagular la sangre a temperatura ambiente durante al menos 20 minutos. Después de coagular, los tubos de sangre se centrifugaron durante 3 minutos a 9000 rpm, se dividieron en partes alícuotas en tubos eppendorf, y se almacenaron a -20 °C hasta su ensayo. La actividad de F7 en suero se midió con un método cromogénico usando BIOPHEN VII kit (Hyphen BioMed/Aniara, Mason, OH) siguiendo las recomendaciones del fabricante. La absorbancia del desarrollo colorimétrico se midió usando un lector de microplacas Tecan Safire2 a 405 nm.

Análisis de coagulación (tiempo de protrombina, tiempo de protrombina parcial y fibrinógeno)

Las muestras de sangre de primates no humanos se prepararon rellenando completamente tubos de citrato sódico (BD Vacutainer) con sangre total y mezclando suavemente para evitar la formación de coágulo. Los tubos se transportaron a un laboratorio de análisis clínicos en el plazo de una hora y los ensayos de coagulación se realizaron en el plazo de 4 horas desde el momento de la recolección.

Tabla 13ARNip de FVII usado para el experimento con PNH: Clave: las letras minúsculas a, c, g, u, son 2'-O-metilnucleótidos; Las letras mayúsculas A, C, G, U seguidas por "f" indican un 2'-fluoronucleótido. La letra "p" minúscula indica un 5'-fosfato. (invdT) representa una desoxitimidina invertida (con enlace 3',3'). La "s" minúscula simboliza un enlace fosforotioato. dT es desoxitimidina.

SEQ ID NO	Secuencia de la cadena codificante (5'-3')	SEQ ID NO	Secuencia de la cadena no codificante (5'-3')
251	(NH2C6)GfuUfgGfuGfaAfuGfgAfgCfuCfaGf(invdT)	252	pCfsUfgAfgCfuCfcAfuUfcAfcCfaAfc(invdT)

253	(NH2C6)GfgUfcCfuGfuUfgUfuGfgUfgAf aUf(invdt)	254	pAfsUfuCfaCfcAfaCfaAfcAfgGfaCfcd TsdT
251	(NH2C6)GfuUfgGfuGfaAfuGfgAfgCfuCf aGf(invdt)	255	pCfsUfgAfgCfuCfcAfuUfcAfcCfaAfc TsdT

El cambio de un saliente 3' de un solo nucleótido de invdT en ambas cadenas a un diseño asimétrico de ARNip con un saliente 3' de invdT en la cadena codificante y un saliente de dTSdT en la cadena no codificante, pero, por otra parte, un patrón de modificación constante condujo a una reducción de FVII sérico más pronunciada y a una duración de este efecto significativamente más prolongada en primates no humanos (véase la figura 6a). Esta observación está respaldada por una consecuencia biológica esperada, a saber, un efecto más pronunciado sobre el tiempo de protrombina correspondiente al grado de reducción del factor 7 (véase la figura 6b).

Ejemplo 50: Actividad de atenuación génica *in vivo* de ARNip con engarzadores de ARN escindibles

En la tabla 14, la eficacia *in vivo* basada en la inhibición de la proteína en suero se comparó usando colesterol o el conjugado GalNAc-palmitoilo de ARNip en el mismo contexto de secuencia en ratones. El experimento *in vivo* se llevó a cabo tal como se describe en el ejemplo 42. La inhibición de FVII descendió de forma marcada para los conjugados de colesterol de ARNip que no contienen ningún nucleótido 2'-OH en comparación con los conjugados GalNAc-palmitoilo equivalentes (par de SEQ ID NO 179/166 frente a 179/190, par de SEQ ID NO 257/264 y par de SEQ ID NO 179/262, par de SEQ ID NO 257/263 frente a par de SEQ ID NO 179/163 y par de SEQ ID NO 257/166 frente a par de SEQ ID NO 179/166). Por el contrario, para un ARNip que contiene 2'-OH, el conjugado de colesterol condujo a una inhibición mayor comparada con el derivado GalNAc-palmitoilo (par de SEQ ID NO 180/168 frente a par de SEQ ID NO 258/168).

Los ligandos de molécula pequeña GalNAc-palmitoilo y colesterol usados en el experimento *in vivo* descrito están conectados con el ARNip al extremo 5' de la cadena codificante por medio de un engarzador no escindible. En caso de que la cadena codificante presente nucleótidos 2'-OH, el ligando aún es escindible mediante nucleasas (p. ej., ADNasa II en el compartimento endosómico o lisosómico). La reacción de escisión libera el ARNip libre que se libera después al citoplasma por la actividad perturbadora del endosoma del polímero de dispensación.

Para los ARNip que carecen de un nucleótido 2'-OH en la cadena codificante, los ligandos están conectados de forma estable con la cadena doble, ya que ningún mecanismo enzimático (nucleasa/proteasa/esterasa, etc.) ni químico desencadena la escisión del ligando. Por lo tanto, en las membranas celulares pueden estar atrapados conjugados de colesterol de ARNip totalmente estables debido a la interacción con la membrana del ligando lipófilo de colesterol. Incluso concentraciones altas de los ARNip en los tejidos no son suficientes para la liberación eficaz del ARNip en el citoplasma. Por el contrario, el conjugado de GalNAc-palmitoilo de ARNip puede liberarse en el citoplasma, debido a una interacción menos pronunciada con las membranas celulares. Por esta razón, un conjugado estable no escindible de GalNAc-palmitoilo de ARNip es más eficaz en comparación con un conjugado de colesterol del mismo ARNip.

El desarrollo de construcciones de engarzadores escindibles ayudaría a evitar la cuestión del atrapamiento en la membrana para los ARNip conjugados de forma estable con colesterol. El uso de química de engarce disulfuro se describe como una posibilidad atractiva para introducir un sitio de escisión definido, pero lo más probable es que la escisión esté restringida al entorno reductor de orgánulos específicos del interior de la célula (PNAS 2006, 103, 13872). Como se espera que la escisión sea lenta en el compartimento endosómico/lisosómico, la mayor parte del conjugado de colesterol-disulfuro de ARNip aún estará atrapado en las membranas, tal como se ha descrito para los conjugados de colesterol no escindibles.

Tabla 14

Conjugado,	Par de SEQ ID NO	SEQ ID NO	Secuencia (5'-3')	% de actividad de FVII en suero
GalNAc	179/166	179	GalNAc-NH2C6-GfcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf(invdt)	27
		166	puGfaGfuUfgGfcAfcGfcCfuUfuGfc(invdt)	
	179/190	179	GalNAc-NH2C6-GfcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf(invdt)	51
		190	pusGfaGfuUfgGfcAfcGfcCfuUfuGfc(invdt)	
	179/262	179	GalNAc-NH2C6-GfcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf(invdt)	17
		262	pUfsGfaGfuUfgGfcAfcGfcCfuUfuGfc(invdt)	
179/263	179	GalNAc-NH2C6-GfcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf(invdt)	13	

		263	psdTdGfaGfuUfgGfcAfcGfcCfuUfuGfc(invdt)	
	180/168	180	GaINAc-NH2C6-GcAAAGGcGuGccAAcucAdTsdT	86
		168	UGAGUUGGcACGCCUUUGCdTsdT	
Colesterol,	257/166	257	Colesterol-NH2C6-GfcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf(invdt)	48
		166	puGfaGfuUfgGfcAfcGfcCfuUfuGfc(invdt)	
	257/190	257	Colesterol-NH2C6-GfcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf(invdt)	93
		190	pus GfaGfuUfgGfcAfcGfcCfuUfuGfc(invdt)	
	257/264	257	Colesterol-NH2C6-GfcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf(invdt)	63
		264	pUfsGfaGfuUfgGfcAfcGfcCfuUfuGfc(invdt)	
	257/263	257	Colesterol-NH2C6-GfcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf(invdt)	41
		263	psdTdGfaGfuUfgGfcAfcGfcCfuUfuGfc(invdt)	
	253/163	258	Colesterol-NH2C6-GcAAAGGcGuGccAAcucAdTsdT	50
		168	UGAGUUGGcACGCCUUUGCdTsdT	

Además de la química de engarce disulfuro escindible bien establecida, otra posibilidad es la generación de sitios de escisión definidos usando nucleótidos 2'-OH en ciertas posiciones. La introducción de nucleótidos 2'-OH en posiciones selectivas es un nuevo planteamiento para conseguir la escisión de los conjugados de las cadenas de ARN. Los nucleótidos 2'-OH pueden aplicarse, bien añadiendo salientes monocatenarios con al menos un nucleótido 2'-OH en el extremo 3' o 5' de la cadena de ARN o bien usando nucleótidos 2'-OH dentro de la región bicatenaria de un ARNip. La actividad enzimática de las nucleasas presente en el endosoma/lisosoma escinde de forma selectiva en estas posiciones. En un primer diseño, el colesterol se conectó a la cadena codificante por medio de un saliente monocatenario que contiene 3 nucleótidos 2'-OH (AUC) en el extremo 5'.

En la tabla 15 se muestran ARNip conjugados con colesterol que comparan diversas químicas de engarzadores escindibles. Todos los ARNip tienen idéntico contexto de secuencia, solo se alteró la química del engarzador. El colesterol se conectó con la cadena codificante al extremo 5' por medio de un saliente monocatenario constituido por tres nucleótidos 2'-OH (AUC). Al coadministrarlo con un polímero de dispensación, este ARNip (par de SEQ ID NO 260/263) condujo a una modulación negativa de un 77 % FVII en el suero de los ratones, en comparación con solo un 60 % al usar el ARNip idéntico con un colesterol unido de forma estable (par de SEQ ID NO 257/263). El mismo ARNip con un colesterol conjugado por medio de un engarzador de acuerdo con la fórmula la al extremo 5' de la cadena codificante (par de SEQ ID NO 261/263) condujo a una reducción de la actividad del FVII en suero del 93 %. Todos los resultados se lograron mediante la coadministración de 15 mg/kg de un polímero de dispensación con 2,5 mg/kg del ARNip conjugado con colesterol en los ratones.



Tabla 15. Comparación *in vivo* de diversas químicas de engarce para ARNip conjugados con colesterol

SEQ ID NO	Secuencia de la cadena codificante (5'-3')	SEQ ID NO	Secuencia de la cadena no codificante (5'-3')	% de actividad de FVII en suero
257	Col-(NH <sub>2</sub> C6)- GfcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf(invdT)	263	psdTdGfaGfuUfgGfcAfcGfcCfuUfuGfc (invdT)	40
259	Col-C6SSC6- GfcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf(invdT)	263	psdTdGfaGfuUfgGfcAfcGfcCfaUfuGfc (invdT)	22
260	Col-AUC- GfcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf(invdT)	263	psdTdGfaGfuUfgGfcAfcGfcCfaUfuGfc (invdT)	23
261	Col-catepsina- GfcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf(invdT)	263	psdTdGfaGfuUfgGfcAfcGfcCfuUfuGfc (invdT)	7

Estos resultados indican que el uso de un engarzador escindible mejora la potencia *in vivo* de los ARNip que no contienen ningún nucleótido 2'-OH. El engarzador escindible puede estar constituido, bien por nucleótidos que contienen 2'-OH, un motivo de escisión dipéptido o una química de engarce disulfuro. Todas las construcciones de engarzador escindible mejoran la potencia *in vivo* en una organización de coadministración usando ARNip conjugados con colesterol con un polímero de dispensación endosómica lenta.

Ejemplo 51: Estabilidad *in vitro* de ARNip con engarzadores escindibles

La estabilidad de los engarzadores escindibles se evaluó en un ensayo de estabilidad *in vitro*. Las cadenas codificantes conjugadas con colesterol se incubaron en suero de ratón al 90 % a 37 °C para diferentes momentos. La reacción de incubación se frenó mediante la adición de proteinasa K en un tampón que contenía dodecil sulfato sódico (SDS, por sus siglas en inglés)- el tratamiento degrada todas las proteínas y enzimas sin interferir con la integridad de la cadena de ARN. Se inyectaron 25 µl de esta solución directamente en un sistema de AEX-HPLC conectado a un detector UV a 260 nm. B. La AEX-HPLC se realizó en una columna Dionex DNA Pac200 (4 x 250 mm) a 75°C usando un tampón Tris 20 mM que contenía ACN al 50 % a pH=8. Como sal eluyente, sirve NaBr 800 mM en eluyente B. Se empleó un gradiente de B desde 25 a 62 % en 18 minutos.

El ARN monocatenario que contiene colesterol eluye desde la columna de HPLC en forma de pico ancho a 260 nm. Tras la escisión del colesterol se observan picos agudos simétricos a menor tiempo de retención. La tasa de escisión del colesterol se determinó mediante la siguiente ecuación (AP= área del pico):

$$\% \text{ (ARN libre)} = 100 * AP \text{ [ARN libre]} / (AP \text{ [ARN libre]} + AP \text{ [ARN conjugado con colesterol]})$$

*In vitro*, se demostró que el saliente de tres nucleótidos (AUC) se escinde cuantitativamente en suero de ratón al 90 % en menos de 1 h. La escisión se produce en 3' con respecto a los dos nucleótidos de pirimidina del saliente, lo que conduce a dos metabolitos de escisión diferentes (las áreas de los picos de los metabolitos se resumieron para la evaluación de los datos). Por el contrario, el engarzador que contiene dipéptido de acuerdo con la fórmula 1a, el disulfuro y el colesterol unido de forma estable son totalmente estables en suero de ratón.

Ejemplo 52: Distribución tisular de los ARNip con engarzadores escindibles

La concentración de ARNip en las muestras de tejido hepático se determinó usando un método de detección patentado, tal como se describe en el documento WO2010043512. Brevemente, la cuantificación del ARNip se basa en la hibridación de una sonda de APN marcada con fluorescencia (Atto-425) (Atto425-OO-TGAGTTGGCACGCCTTT obtenidos de Panagene Inc, Corea) complementaria a la cadena codificante del ARNip bicatenario, seguida de una separación basada en AEX-HPLC. La cuantificación se efectuó mediante detección de fluorescencia frente a una curva de calibración externa que se generó a partir de una serie de diluciones de los dos ARNip de FVII usados en el experimento *in vivo* (véase el ejemplo 42). Se inyectaron en el sistema HPLC alícuotas entre 0,2 y 2 µl para muestras de plasma y ~ 1 mg para tejido.

En la tabla 16 se muestran los resultados del análisis del tejido hepático. Al analizar el contenido en ARNip se encontró que la cadena codificante que está presente en el tejido hepático se escinde cuantitativamente del colesterol cuando se usa, bien el motivo engarzador dipéptido o bien el saliente 5' de 3 nucleótidos de la secuencia engarzadora AUC no modificada. Por el contrario, sólo el 15 % del ARNip unido por disulfuro que está presente en el hígado se escinde del colesterol en un plazo de 48 horas tras la dosificación y no se escinde nada de colesterol unido de forma estable del ARNip.

Al comparar las cantidades absolutas de ARNip libre de colesterol en el tejido hepático se encontraron cantidades similares para el engarzador disulfuro y para el engarzador AUC de ARN, correlacionándose bien con una actividad sérica de FVII equivalente a las 48 horas de la dosificación. La menor actividad de FVII conseguida con el ARNip con colesterol unido mediante dipéptido se correlaciona totalmente con la mayor cantidad absoluta del ARNip escindido libre de colesterol.

La cantidad total de ARNip conjugado con colesterol equipado con un engarzador AUC en la cadena codificante dispensado en el hígado es ~ 6 veces menor en comparación con el colesterol unido de forma estable o mediante disulfuro y ~ 3 veces menor en comparación con el ARNip con colesterol unido mediante dipéptido. La reducida presencia en tejido puede atribuirse al hecho de que el engarzador AUC no solo es un sustrato para las nucleasas intracelulares, sino también para las nucleasas presentes en la circulación, como se muestra en la incubación *in vitro* con suero de ratón. Cuando el ligando de colesterol se escinde del ARNip ya en la circulación, el ARNip resultante está predispuesto a la eliminación renal y se excreta rápidamente en la orina sin dispensarse en el tejido.

Tabla 16:

SEQID NO	Secuencia de la cadena codificante (5'-3')	SEQID NO	Secuencia de la cadena no codificante (5'-3')	ARNip total en hígado [ng/g]	% ligando escindido en hígado
257	Col-(NH <sub>2</sub> C6)- GfcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAï(invdt)	263	psdTdGfaGfuUfgGfcAfcGfcCfuUfuGfc(invdt)	5837	0
259	Col-C6SSC6- GfcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAï(invdt)	263	psdTdGfaGfuUfgGfcAfcGfcCfuUfuGfc(invdt)	4357	14,8
260	Col-AUC- GfcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAï(invdt)	263	psdTdGfaGfuUfgGfcAfcGfcCfuUfuGfc(invdt)	912	96,1
261	Col-catepsina- GfcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAï(invdt)	263	psdTdGfaGfuUfgGfcAfcGfcCfuUfuGfc(invdt)	2760	99,8

## ES 2 574 177 T3

En las siguientes tablas se resumen los ARNip usados en los ejemplos:

Tabla 17: Secuencias principales

SEQ ID NO	Secuencia de la cadena codificante (5'-3')	SEQ ID NO	Secuencia de la cadena no codificante (5'-3')
1	ACAUGAAGCAGCACGACUU	2	AAGUCGUGCUGCUUCAUGU
3	GCCCCACAACCACUACCUG	4	CAGGUAGUGGUUGUCGGGC
5	CGAGAAGCGCGAUCACAUG	6	CAUGUGAUCGCGCUUCUCG
7	AUAUCAUGGCCGACAAGCA	8	UGCUUGUCGGCCAUGAUAU
9	ACAAGCUGGAGUACAACUA	10	UAGUUGUACUCCAGCUUGU
11	GCAGCUCGCCGACCACUAC	12	GUAGUGGUCGGCAGCUGC
13	CGUCCAGGAGCGCACCAUC	14	GAUGGUGCGCUCCUGGACG
15	GCUGGAGUUCGUGACCGCC	16	GGCGGUCACGAACUCCAGC
17	CCACCCUGACCUACGGCGU	18	ACGCCGUAGGUCAGGGUGG
19	CGACUUCAAGGAGGACGGC	20	GCCGUCCUCCUUGAAGUCG
21	UUCAAGAUCGCCACAACA	22	UGUUGUGGGCGGAUCUUGAA
23	GGCAACUACAAGACCCGCG	24	CGCGGGUCUUGUAGUUGCC
25	CCGGCAAGCUGCCCGUGCC	26	GGCACGGGCAGCUUGCCGG
27	UGCCCAUCCUGGUCGAGCU	28	AGCUCGACCAGGAUGGGCA
29	CAAGUUCAGCGUGUCCGGC	30	GCCGGACACGCUGAACUUG
151	GGAUUCUUAUAUUUGAUCCAA	152	UUGGAUCAAUAUAAGAUUCCCU
155	GGAUGAAGUGGAGAUUAGU	156	ACUAAUCUCCACUUCAUCC
161	GCAAAGGCGUGCCAACUCA	162	UGAGUUGGCACGCCUUUGC
161	GCAAAGGCGUGCCAACUCA	178	TGAGUUGGCACGCCUUUGC
161	GCAAAGGCGUGCCAACUCA	256	TGAGUUGGCACGCCUUUGC
163	GGAUCAUCUCAAGUCUUAC	164	GUAAGACUUGAGAUGAUCC
171	UGACCACAGUCGGAUUAAA	172	UUUAAUCCGACUGUGGUCA
247	GUUGGUGAAUGGAGCUCAG	248	CUGAGCUCCAUUCACCAAC
249	GGUCCUGUUGUUGGUGAAU	250	AUUCACCAACAACAGGACC

Tabla 18: Cartografía de las secuencias principales y de la secuencia modificada

Secuencias principales				Secuencias modificadas			
SEQ NO	Secuencia de la cadena codificante (5'-3')	SEQ ID NO	Secuencia de la cadena codificante (5'-3')	SEQ ID NO	Secuencia de la cadena codificante (5'-3')	SEQ ID NO	Secuencia de la cadena codificante (5'-3')
1	ACAUGAAGC AGCACGACUU	2	AAGUCGUGC UGCUUCAUGU	31	ACAUGAAGCAG CACGACUUdTdT	32	AAGUCGUGCUGCU UCAUGUdTdT
1	ACAUGAAGC AGCACGACUU	2	AAGUCGUGC UGCUUCAUGU	61	AfcAfuGfaAfgCfa GfcAfcGfaCfuUfdTsdT	62	paAfgUfcGfuGfcUfg CfuUfcAfuGfudTsdT
1	ACAUGAAGC AGCACGACUU	2	AAGUCGUGC UGCUUCAUGU	91	dAccAudGadAgdCadGcd AccGadCudTdTsdT	92	padAgtTcdGudGcdTg 'dCudTcdAudGudTsdT
1	ACAUGAAGC AGCACGACUU	2	AAGUCGUGC UGCUUCAUGU	121	AfdCAfdTgfdAAf dGCfdAGfdCAfdC GfdACfdTUfdTsdT	122	pdAAfdGUfdCGfdTG fdCUfdGCfdTUfdCAf dTGfdTsdT
3	GCCCCACAA CCACUACCU G	4	CAGGUAGUG GUUGUCGGG C	33	GCCCCACAACC ACUACCUdTdT	34	CAGGUAGUGGUU GUCGGCdTdT
3	GCCCCACAA CCACUACCU G	4	CAGGUAGUG GUUGUCGGG C	63	GfcCfcGfaCfaAfcC faCfuAfcCfuGfdTs dT	64	pcAfgGfuAfgUfgGfu UfgUfcGfgGfdTsdT
3	GCCCCACAA CCACUACCU G	4	CAGGUAGUG GUUGUCGGG C	93	dGcdCcdGadCadA cdCadCudAccCud GdTsdT	94	pcdAgtGudAgtTgdG udTgdTcdGgdGcdTsdT
3	GCCCCACAA CCACUACCU G	4	CAGGUAGUG GUUGUCGGG C	123	GfdCCfdCGfdACf dAAfdCCfdACfdT AfdCCfdTgfdTsdT	124	pdCAfdGGfdTafdGU fdGGfdTUfdGUfdCG fdGGfdCdTsdT
5	CGAGAAGCG CGAUCACAU G	6	CAUGUGAUC GCGCUUCUC G	35	CGAGAAGCGCG AUCACAUJdTdT	36	CAUGUGAUCGCGC UUCUCgdTdT
5	CGAGAAGCG CGAUCACAU G	6	CAUGUGAUC GCGCUUCUC G	65	CfgAfgAfaGfcGfc GfaUfcAfcAfuGfdTsdT	66	pcAfuGfuGfaUfcGfc GfcUfuCfuCfgdTsdT
5	CGAGAAGCG CGAUCACAU G	6	CAUGUGAUC GCGCUUCUC G	95	dCgdAggAadGcdGcdGad TcdAccdAudGdTsdT	96	pcdAudGudGadTcdG cdGcdTudCudCgdTsdT
5	CGAGAAGCG CGAUCACAU G	6	CAUGUGAUC GCGCUUCUC G	125	CfdGAdfAfaAfaGf dCGfdCGfdAUfdC AfdCAfdTgfdTsdT	126	pdCAfdTgfdTgfdAU fdCGfdCGfdCUfdTcf dTcfGdTsdT
7	AUAUCAUGG CCGACAAGCA	8	UGCUUGUCGGCCAUGA UAU	37	AUAUCAUGGCC GACAAGCAdTdT	38	UGCUUGUCGGCCAUGAU AudTdT
7	AUAUCAUGG CCGACAAGCA	8	UGCUUGUCGGCCAUGA UAU	67	AfuAfuCfaUfgGfc CfgAfcAfaGfaAfdTsdT	68	puGfcUfuGfaCfgGfc CfaUfgAfuAfuTsdT
7	AUAUCAUGG CCGACAAGCA	8	UGCUUGUCGGCCAUGA UAU	97	dAudAudCadTgdGcdCgd AccAadGcdAdTsdT	98	puGcdTudGudCgdG cdCadTgdAudAudTsdT
7	AUAUCAUGG CCGACAAGCA	8	UGCUUGUCGGCCAUGA UAU	127	AfdTafdTcfAUf dGGfdCCfdGArfC AfdAGfdCAfdTsdT	128	pdTgfdCUfdTgfdTcf dGGfdCfdAUfdGaf dTafdTsdT



Secuencias principales		Secuencias modificadas				
SEQ NO	SEQ ID	Secuencia de la cadena codificante (5'-3')	SEQ ID NO	Secuencia de la cadena codificante (5'-3')	SEQ ID NO	Secuencia de la cadena codificante (5'-3')
15	15	GCUGGAGUU CGUGACCCG C	201	gcUfgGfaGfuUfcG fuGfaCfcGfcCf(invdT)	214	dGsGfcGfgUfcAfcGfa AfcUfcCfaGfcdTsdT
15	15	CGUGGAGUU CGUGACCCG C	202	gscUfgGfaGfuUfc GfuGfaCfcGfcCfd TsdT	213	pdGsGfcGfgUfcAfcGf aAfcUfcCfaGfcdTsdT
15	15	GCUGGAGUU CGUGACCCG C	203	gcUfgGfaGfuUfcG fuGfaCfcGfcCfdTsdT	214	dGsGfcGfgUfcAfcGfa AfcUfcCfaGfcdTsdT
15	15	GCUGGAGUU CGUGACCCG C	204	GfuGfaCfcGfcCf(invdT)	215	pGfsGfcGfgUfcAfcGf aAfcUfcCfaGfcdTsdT
15	15	GCUGGAGUU CGUGACCCG C	205	GfscUfgGfaGfuUfcGfuGfa CfcGfcCf(invdT)	216	GfsGfcGfgUfcAfcGfa AfcUfcCfaGfcdTsdT
15	15	GCUGGAGUU CGUGACCCG C	206	GfuUfgGfaGfuUfc GfuGfaCfcGfcCfd TsdT	215	pGfsGfcGfgUfcAfcGf aAfcUfcCfaGfcdTsdT
15	15	GCUGGAGUU CGUGACCCG C	200	gscUfgGfaGfuUfc GfuGfaCfcGfcCf(invdT)	217	pdGsGfcGfgUfcAfcGf aAfcUfcCfaGfcdTsdT
15	15	GCUGGAGUU CGUGACCCG C	207	GfuUfgGfaGfuUfc GfuGfaCfcGfcCfd T(invdT)	218	pGfsGfcGfgUfcAfcGf aAfcUfcCfaGfcdT(invdT)
15	15	GCUGGAGUU CGUGACCCG C	208	gscUfgGfaGfuUfc GfuGfaCfcGfcCfd T(invdT)	219	pdGsGfcGfgUfcAfcGf aAfcUfcCfaGfcdT(invdT)
15	15	GCUGGAGUU CGUGACCCG C	205	GfscUfgGfaGfuUfcGfuGfa CfcGfcCf(invdT)	220	GfsGfcGfgUfcAfcGfa AfcUfcCfaGfcdTsdT
15	15	GCUGGAGUU CGUGACCCG C	201	gcUfgGfaGfuUfcG fuGfaCfcGfcCf(invdT)	221	dGsGfcGfgUfcAfcGfa AfcUfcCfaGfcdTsdT
15	15	GCUGGAGUU CGUGACCCG C	209	GfscUfgGfaGfuUfcGfuGfa CfcGfcCfdTsdT	216	GfsGfcGfgUfcAfcGfa AfcUfcCfaGfcdTsdT
15	15	GCUGGAGUU CGUGACCCG C	210	GfscUfgGfaGfuUfcGfuGfa CfcGfcCfdT(invdT)	222	GfsGfcGfgUfcAfcGfa AfcUfcCfaGfcdT(invdT)
15	15	GCUGGAGUU CGUGACCCG C	211	gcUfgGfaGfuUfcG fuGfaCfcGfcCfdT(invdT)	223	dGsGfcGfgUfcAfcGfa AfcUfcCfaGfcdT(invdT)
15	15	GCUGGAGUU CGUGACCCG C	204	GfuUfgGfaGfuUfc GfuGfaCfcGfcCf(invdT)	224	pGfsGfcGfgUfcAfcGf aAfcUfcCfaGfcdTsdT
15	15	GCUGGAGUU CGUGACCCG C	45	GCUGGAGUUCG UGACCCG C	46	GGCGGUACCGAAC UCCAGCcdTsdT
15	15	GCUGGAGUU CGUGACCCG C	212	GcuGGAGUucGuG AccGocdTsdT	225	GGCGGUACCGAAC UCcAGCcdTsdT
17	17	CCACCCUGA CCUACGGCGU	47	CCACCCUGACC UACGGCGUdTsdT	48	ACGCCGUAGGUACA GGGUGGdTsdT
17	17	CCACCCUGA CCUACGGCGU	77	CfcAfcCfcUfgAfc CfuAfcGfgCfdTsdT	78	paCfgCfcGfuAfcGfuC faGfgGfuGfcdTsdT
17	17	CCACCCUGA CCUACGGCGU	107	dCcdAcCdCcdTgdA cdCudAcCdGgdCgd TsdT	108	padCgdCcdGudAgdG udCadGgdGudGgdTs dT

Secuencias principales			Secuencias modificadas				
SEQ NO	Secuencia de la cadena codificante (5'-3')	SEQ ID NO	Secuencia de la cadena codificante (5'-3')	SEQ ID NO	Secuencia de la cadena codificante (5'-3')	SEQ ID NO	
17	CCACCCUGA CCUACGGCGU	18	ACGCCGUAG GUCAGGGUG G	137	CfdCfdCCfdCUf dGAfdCCfdTfdC GfdGCfdGUfdTsd T	138	pdACfdGCfdCCfdTA fdGGfdTCfdAGfdGG fdTGfdGdTsdT
19	CGACUUCAA GGAGGACGG C	20	GCCGUCCUCCUUGAAGU CG	49	CGACUUCAAAGG AGGACGGCdTdT	50	GCCGUCCUCCUUGAAGU CGdTdT
19	CGACUUCAA GGAGGACGG C	20	GCCGUCCUCCUUGAAGU CG	79	CfgAfcUfuCfaAfg GfaGfgAfcGfgCfd TsdT	80	pgCfcGfuCfcUfcCfuU fgAfaGfuCfgdTsdT
19	CGACUUCAA GGAGGACGG C	20	GCCGUCCUCCUUGAAGU CG	109	dCgdAcdTudCadA gdGadGgdAcdGgd CdTsdT	110	pgdCcdGudCcdTcdCudTgd AadGudCgdTsdT
19	CGACUUCAA GGAGGACGG C	20	GCCGUCCUCCUUGAAGU CG	139	CfdGAfdCUfdTCf dAAfdGGfdAGfdG AfdCCfdGCfdTsd T	140	pdGCfdCCfdTCfdCUfdCCfd TUfdGAfdAGfdTCfdGdTsdT
21	UUCAAGAUC CGCCACAAC A	22	UGUUGGGCGGAUCUU GA A	51	UUCAAAGAUCCG CCACAACAdTdT	52	UGUUGGGCGGA UCUUGAAAdTdT
21	UUCAAGAUC CGCCACAAC A	22	UGUUGGGCGGAUCUU GAA	81	UfuCfaAfgAfuCfcGfcCfaCf aAfcAfdTsdT	82	puGfuUfgUfgGfgGfg AfuCfuUfgAfdTsdT
21	UUCAAGAUC CGCCACAAC A	22	UGUUGGGCGGAUCUU GA A	111	dTudCadAgdAudCcdGcd CadCadAcAdAdTsdT	112	puGudTgdTgdGcdGgdAud CudTgdAadTsdT
21	UUCAAGAUC CGCCACAAC A	22	UGUUGGGCGGAUCUU GA A	141	UfdTcdAAfdGAf dTCfdCGfdCCfdA CfdAAfdCAfdTsd T	142	pdTGfdTUfdGUfdGG fdCCfdGAfdTCfdTuf dGAfdAdTsdT
23	GGCAACUAC AAGACCCGC G	24	CGCGGUCUUGUAGUU GC C	53	GGCAACUACAA GACCCGCgdTdT	54	CGCGGUCUUGUA GUJGCCdTdT
23	GGCAACUAC AAGACCCGC G	24	CGCGGUCUUGUAGUU GC C	83	GfgCfaAfcUfaCfa AfgAfcCfcGfcGfd TsdT	84	pcGfcGfgGfuCfuUfg UfaGfuUfgCfdTsdT
23	GGCAACUAC AAGACCCGC G	24	CGCGGUCUUGUAGUU GC C	113	dGgdCadAcdTadC adAgdAcCdCcdGcd GdTsdT	114	pcdGcdGgdGudCudT gdTadGudTgdCcdTsd T
23	GGCAACUAC AAGACCCGC G	24	CGCGGUCUUGUAGUU GC C	143	GfdGCfdAAfdCUf dACfdAAfdGAfdC CfdCGfdCGfdTsdT	144	pdCGfdCCfdGGfdTCfdTUfd GUfdAGfdTUfdGCfdCdTsdT
25	CGGCAAGC UGCCCGUGC C	26	GGCACGGC AGCUJGCCG G	55	CCGGCAAGCUG CCCGUGCCdTdT	56	GGCACGGGACGU UGCCGGdTdT
25	CGGCAAGC UGCCCGUGC C	26	GGCACGGC AGCUJGCCG G	85	CfcGfgCfaAfgCfu GfcCfcGfuGfcCfd TsdT	86	pgGfcAfcGfgGfcAfg CfuUfgCfcGfgdTsdT
25	CGGCAAGC UGCCCGUGC C	26	GGCACGGC AGCUJGCCG G	115	dCcdGgdCadAgdC udGcdCcdGudGcd CdTsdT	116	pgdGcdAcCdGgdGcdA gdCudTgdCcdGgdTsd T



Secuencias principales				Secuencias modificadas				
SEQ NO	SEQ ID	Secuencia de la cadena codificante (5'-3')	SEQ ID NO	SEQ NO	SEQ ID	Secuencia de la cadena codificante (5'-3')	SEQ ID NO	Secuencia de la cadena codificante (5'-3')
25		CCGGCAAGC UGCCCGUGC C	26	145	CfdCGdGcfdAAF dGcfdTgfdCCfdC GfdTgfdCCfdTsdT	146	pdGGfdCAfdCGfdGG fdCAfdGcfdTUfdGCf dCGfdGdTsdT	
27		UGCCCAUCC UGGUCGAGCU	28	57	UGCCCAUCCUG GUCGAGCUdTdT	58	AGCUCGACCCAGGA UGGGCAdTdT	
27		UGCCCAUCC UGGUCGAGCU	28	87	UfgCfcCfaUfcCfu GfgUfcGfaGfcUfd TsdT	88	paGfcUfcGfaCfcAfgG faUfgGfgCfadTsdT	
27		UGCCCAUCC UGGUCGAGCU	28	117	dTgdCcdCadTcdCudGgdT cdGadGcdTdTsdT	118	padGcdTcdGadCcdAg dGadTgdGgdCadTsdT	
27		UGCCCAUCC UGGUCGAGCU	28	147	UfdGcfdCCfdAUf dCCfdTgfdGUfdC GfdAGfdCUfdTsd T	148	pdAGfdCUfdCGfdAC fdCAfdGGfdAUfdGG fdGCfdAdTsdT	
29		CAAGUUCAG CGUUCGGG C	30	59	CAAGUUCAGCG UGUCCGGCdTdT	60	GCCGGACACGCUG AACUUGdTdT	
29		CAAGUUCAG CGUUCGGG C	30	89	CfaAfgUfuCfaGfc GfuGfuCfcfcGfd TsdT	90	pgCfcGfgAfcAfcGfcU fgAfaCfaUfgdTsdT	
29		CAAGUUCAG CGUUCGGG C	30	119	dCadAgdTudCadG cdGudGudCcdGgd CdTsdT	120	pgdCcdGgdAcdAcCdG cdTgdAadCudTgdTsd T	
29		CAAGUUCAG CGUUCGGG C	30	149	CfdAAfdGUfdTcf dAGfdCGfdTgfdT CfdCGfdGcfdTsdT	150	pdGCfdCGfdGfdCA fdCGfdCUfdGfdAC fdTUfdGdTsdT	
151		GGAUCUUA UAUUUGAUC CAA	152	153	GGAUCuuAuAu uuGAUCcAsA	154	uuGGAUcAAuAuA AGAUUCcscsU	
151		GGAUCUUA UAUUUGAUC CAA	152	265	(Col)GGAUCuuAuAuuuG AUCcAs A	154	uuGGAUcAAuAuA AGAUUCcscsU	
155		GGAUGAAGU GGAGAUUAGU	156	157	GGAUGAAGUGG AGAUUAGudTsdT	158	ACuAAUCUCcACU UcAUCCdTsdT	
155		GGAUGAAGU GGAGAUUAG	156	160	(NH2C6)GfgAtuGf aAfgUfgGfaGfaUf uAfgUf(invdT)	159	pasCfuAfaUfcUfcCfa CfuUfcAfuCfc(invdT)	
155		GGAUGAAGU GGAGAUUAGU	156	226	gsgAfuGfaAfgUfg GfaGfaUfuAfgUfd TsdT	266	pdAsCfuAfaUfcUfcCf aCfuUfcAfuCfcdTsdT	
155		GGAUGAAGU GGAGAUUAGU	156	227	gsgAfuGfaAfgUfg GfaGfaUfuAfgUf(invdT)	266	pdAsCfuAfaUfcUfcCf aCfuUfcAfuCfcdTsdT	
155		GGAUGAAGU GGAGAUUAGU	156	228	GfsgAfuGfaAfgUf gGfaGfaUfuAfgUf dTsdT	267	pAfsCfuAfaUfcUfcCf aCfuUfcAfuCfcdTsdT	
155		GGAUGAAGU GGAGAUUAGU	156	229	GfsgAfuGfaAfgUf gGfaGfaUfuAfgUf dT(invdT)	268	pAfsCfuAfaUfcUfcCf aCfuUfcAfuCfcdT(invdT)	

Secuencias principales					Secuencias modificadas				
SEQ NO	ID	Secuencia de la cadena codificante (5'-3')	SEQ ID NO	Secuencia de la cadena codificante (5'-3')	SEQ NO	ID	Secuencia de la cadena codificante (5'-3')	SEQ ID NO	Secuencia de la cadena codificante (5'-3')
155		GGAUGAAGU	156	ACUAAUCUC	230		ggAfuGfaAfgUfgG	238	dAsCfuAfaUfcUfcCfa
155		GGAGAUUAGU	156	CACUUAUC C	231		faGfaUfuAfgUfdTs dT	267	CfuUfcAfuCfcdTsdT
155		GGAUGAAGU	156	ACUAAUCUC	232		GfgAfuGfaAfgUfgGfaGfa		pAfsCfuAfaUfcUfcCf
155		GGAGAUUAGU	156	CACUUAUC C	233		UfuAfgUfInvdT		aCfuUfcAfuCfcdTsdT
155		GGAUGAAGU	156	ACUAAUCUC	234		ggAfuGfaAfgUfgG	238	dAsCfuAfaUfcUfcCfa
155		GGAGAUUAGU	156	CACUUAUC C	235		faGfaUfuAfgUfInvdT		CfuUfcAfuCfcdTsdT
155		GGAUGAAGU	156	ACUAAUCUC	236		GfgAfuGfaAfgUfg	239	AfsCfuAfaUfcUfcCfa
155		GGAGAUUAGU	156	CACUUAUC C	237		GfaGfaUfuAfgUfInvdT		CfuUfcAfuCfcdTsdT
155		GGAUGAAGU	156	ACUAAUCUC	238		GfgAfuGfaAfgUfg	240	AfsCfuAfaUfcUfcCfa
155		GGAGAUUAGU	156	CACUUAUC C	239		GfaGfaUfuAfgUfInvdT		CfuUfcAfuCfcdTsdT
155		GGAUGAAGU	156	ACUAAUCUC	240		GfgAfuGfaAfgUfg	241	pAfsCfuAfaUfcUfcCf
155		GGAGAUUAGU	156	CACUUAUC C	241		GfaGfaUfuAfgUfInvdT		aCfuUfcAfuCfcdTsdT
155		GGAUGAAGU	156	ACUAAUCUC	242		GfgAfuGfaAfgUfg	159	pasCfuAfaUfcUfcCfa
155		GGAGAUUAGU	156	CACUUAUC C	243		GfaGfaUfuAfgUfInvdT		CfuUfcAfuCfcdTsdT
155		GGAUGAAGU	156	ACUAAUCUC	244		GfgAfuGfaAfgUfg	242	pdAsCfuAfaUfcUfcCf
155		GGAGAUUAGU	156	CACUUAUC C	245		GfaGfaUfuAfgUfInvdT		aCfuUfcAfuCfcdTsdT
155		GGAUGAAGU	156	ACUAAUCUC	246		GfgAfuGfaAfgUfg	240	AfsCfuAfaUfcUfcCfa
155		GGAGAUUAGU	156	CACUUAUC C	247		GfaGfaUfuAfgUfInvdT		CfuUfcAfuCfcdTsdT
155		GGAUGAAGU	156	ACUAAUCUC	248		GfgAfuGfaAfgUfg	243	pdAsCfuAfaUfcUfcCf
155		GGAGAUUAGU	156	CACUUAUC C	249		GfaGfaUfuAfgUfInvdT		aCfuUfcAfuCfcdTsdT
155		GGAUGAAGU	156	ACUAAUCUC	250		GfgAfuGfaAfgUfg	244	dAsCfuAfaUfcUfcCfa
155		GGAGAUUAGU	156	CACUUAUC C	251		GfaGfaUfuAfgUfInvdT		CfuUfcAfuCfcdTsdT
155		GGAUGAAGU	156	ACUAAUCUC	252		GfgAfuGfaAfgUfg	245	dAsCfuAfaUfcUfcCfa
155		GGAGAUUAGU	156	CACUUAUC C	253		GfaGfaUfuAfgUfInvdT		CfuUfcAfuCfcdTsdT
155		GGAUGAAGU	156	ACUAAUCUC	254		GfgAfuGfaAfgUfg	246	AfsCfuAfaUfcUfcCfa
155		GGAGAUUAGU	156	CACUUAUC C	255		GfaGfaUfuAfgUfInvdT		CfuUfcAfuCfcdTsdT
155		GGAUGAAGU	156	ACUAAUCUC	256		GfgAfuGfaAfgUfg	158	ACuAAUcUcAcU
155		GGAGAUUAGU	156	CACUUAUC C	257		GfaGfaUfuAfgUfInvdT		UcAUCCdTsdT
161		GCAAAGGOG	162	UGAGUUUGC	165		(NH2C6)GfcAfaAf	166	puGfaGfuUfgGfcAfc
161		UGCCAAACUC A	162	ACGCCUUUG C	166		gGfcGfuGfcCfaAfc		GfcCfuUfuGfcInvdT
161		GCAAAGGOG	162	UGAGUUUGC	167		UfcAfInvdT	168	UGAGUUGGcACGC
161		UGCCAAACUC A	162	ACGCCUUUG C	168		(NH2C6)GcAAAAG		CUUUGCdTsdT
161		GCAAAGGOG	162	UGAGUUUGC	169		GcGuGccAAcucAd TsdT	166	puGfaGfuUfgGfcAfc
161		UGCCAAACUC A	162	ACGCCUUUG C	170		GalNac-(NH2C6)-		GfcCfuUfuGfcInvdT
161		GCAAAGGOG	162	UGAGUUUGC	171		GfcAfaAfgGfcGfu	168	UGAGUUGGcACGC
161		UGCCAAACUC A	162	ACGCCUUUG C	172		GfcCfaAfcUfcAfInvdT		CUUUGCdTsdT
161		GCAAAGGOG	162	UGAGUUUGC	173		GcAAAGGcGuGccAAcuc	185	pUfsGfaGfuUfgGfcAf
161		UGCCAAACUC A	162	ACGCCUUUG C	174		AdTsdT		cGfcCfuUfuGfcInvdT

Secuencias principales			Secuencias modificadas		
SEQ NO	SEQ ID	Secuencia de la cadena codificante (5'-3')	SEQ NO	SEQ ID	Secuencia de la cadena codificante (5'-3')
161	178	GCAAAGGCG UGCCAACUC A	181	186	psdTsdGaGfuUfgGfcA foGfcCfuUfuGfc(invdT)
161	178	GCAAAGGCG UGCCAACUC A	181	187	psdTsdGaGfuUfgGfcA foGfcCfuUfuGfc(invdT)
161	178	GCAAAGGCG UGCCAACUC A	181	188	psdTsdGaGfuUfgGfcA foGfcCfuUfuGfc(invdT)
161	178	GCAAAGGCG UGCCAACUC A	181	189	psdTsdGaGfuUfgGfcA foGfcCfuUfuGfc(invdT)
161	162	GCAAAGGCG UGCCAACUC A	181	190	psdTsdGaGfuUfgGfcA foGfcCfuUfuGfc(invdT)
161	162	GCAAAGGCG UGCCAACUC A	181	166	puGfaGfuUfgGfcAfc GfcCfuUfuGfc(invdT)
161	162	GCAAAGGCG UGCCAACUC A	181	191	psUfGfaGfuUfgGfcAfc cGfcCfuUfuGfc(invdT)
161	162	GCAAAGGCG UGCCAACUC A	181	192	UfsGfaGfuUfgGfcAfc GfcCfuUfuGfc(invdT)
161	162	GCAAAGGCG UGCCAACUC A	181	193	psUfsGfaGfuUfgGfcAfc cGfcCfuUfuGfc(invdT)
161	178	GCAAAGGCG UGCCAACUC A	181	194	psdTsdGaGfuUfgGfcAfcGfc CfuUfuGfc(invdT)
161	162	GCAAAGGCG UGCCAACUC A	181	195	usGfaGfuUfgGfcAfcG foCfuUfuGfc(invdT)
161	162	GCAAAGGCG UGCCAACUC A	181	196	uGfaGfuUfgGfcAfcGf cCfuUfuGfc(invdT)
161	178	GCAAAGGCG UGCCAACUC A	181	197	dTsGfaGfuUfgGfcAfc GfcCfuUfuGfc(invdT)
161	178	GCAAAGGCG UGCCAACUC A	181	198	psdTsdGaGfuUfgGfcAfc cGfcCfuUfuGfc(invdT)
161	178	GCAAAGGCG UGCCAACUC A	181	199	dTsGfaGfuUfgGfcAfc cGfcCfuUfuGfc(invdT)
161	162	GCAAAGGCG UGCCAACUC A	183	190	pusGfaGfuUfgGfcAfc GfcCfuUfuGfc(invdT)
161	162	GCAAAGGCG UGCCAACUC A	181	196	uGfaGfuUfgGfcAfcGf cCfuUfuGfc(invdT)
161	162	GCAAAGGCG UGCCAACUC A	181	195	usGfaGfuUfgGfcAfcG foCfuUfuGfc(invdT)
161	162	GCAAAGGCG UGCCAACUC A	181	192	UfsGfaGfuUfgGfcAfc GfcCfuUfuGfc(invdT)
161	178	GCAAAGGCG UGCCAACUC A	181	197	dTsGfaGfuUfgGfcAfc GfcCfuUfuGfc(invdT)

Secuencias principales				Secuencias modificadas			
SEQ NO	ID	Secuencia de la cadena codificante (5'-3')	SEQ ID NO	Secuencia de la cadena codificante (5'-3')	SEQ ID NO	Secuencia de la cadena codificante (5'-3')	
161		GCAAAGGCG UGCCAACUC A	178	TGAGUUGGC ACGCCUUUG C	181	GfcAfaAfgGfcGfu GfcCfaAfcUfcAf(invdt)	
161		GCAAAGGCG UGCCAACUC A	162	UGAGUUGGC ACGCCUUUG C	182	GcAAAGGcGuGcc AAcucAdTsdT	
161		GCAAAGGCG UGCCAACUC A	162	UGAGUUGGC ACGCCUUUG C	184	GfcAfaAfgGfcGfu GfcCfaAfcUfcA	
161		GCAAAGGCG UGCCAACUC A	162	UGAGUUGGC ACGCCUUUG C	179	GalNac-(NH2C6)- GfcAfaAfgGfcGfu GfcCfaAfcUfcAf(invdt)	
161		GCAAAGGCG UGCCAACUC A	162	UGAGUUGGC ACGCCUUUG C	179	GalNac-(NH2C6)- GfcAfaAfgGfcGfu GfcCfaAfcUfcAf(invdt)	
161		GCAAAGGCG UGCCAACUC A	178	TGAGUUGGC ACGCCUUUG C	179	GalNac-(NH2C6)- GfcAfaAfgGfcGfu GfcCfaAfcUfcAf(invdt)	
161		GCAAAGGCG UGCCAACUC A	162	UGAGUUGGC ACGCCUUUG C	179	GalNac-(NH2C6)- GfcAfaAfgGfcGfu GfcCfaAfcUfcAf(invdt)	
161		GCAAAGGCG UGCCAACUC A	162	UGAGUUGGC ACGCCUUUG C	179	GalNac-(NH2C6)- GfcAfaAfgGfcGfu GfcCfaAfcUfcAf(invdt)	
161		GCAAAGGCG UGCCAACUC A	256	TGAGUUGGC ACGCCUUUG C	179	GalNac-(NH2C6)- GfcAfaAfgGfcGfu GfcCfaAfcUfcAf(invdt)	
161		GCAAAGGCG UGCCAACUC A	162	UGAGUUGGC ACGCCUUUG C	257	Col-(NH2C6)- GfcAfaAfgGfcGfu GfcCfaAfcUfcAf(invdt)	
161		GCAAAGGCG UGCCAACUC A	162	UGAGUUGGC ACGCCUUUG C	257	Col-(NH2C6)- GfcAfaAfgGfcGfu GfcCfaAfcUfcAf(invdt)	
161		GCAAAGGCG UGCCAACUC A	162	UGAGUUGGC ACGCCUUUG C	257	Col-(NH2C6)- GfcAfaAfgGfcGfu GfcCfaAfcUfcAf(invdt)	

Secuencias principales			Secuencias modificadas				
SEQ ID NO	Secuencia de la cadena codificante (5'-3')	SEQ ID NO	Secuencia de la cadena codificante (5'-3')	SEQ ID NO	Secuencia de la cadena codificante (5'-3')		
161	GCAAAGGCG UGCCAACUC A	256	TGAGUUGGC ACGCCUUUG C	257	Col-(NH2C6)- GfcAfaAfgGfcGfu GfcCfaAfcUfcAf(invdT)	263	psdTdGfaGfuUfgGfcAfcGfcC fuUfuGfc(invdT)
161	GCAAAGGCG UGCCAACUC A	162	UGAGUUGGC ACGCCUUUG C	258	Col-(NH2C6)- GcAAAGGcGuGccAAcuc AdTsdT	168	UGAGUUGGcACGC CUUUUGcdTsdT
161	GCAAAGGCG UGCCAACUC A	256	TGAGUUGGC ACGCCUUUG C	257	Col-(NH2C6)- GfcAfaAfgGfcGfu GfcCfaAfcUfcAf(invdT)	263	psdTdGfaGfuUfgGfcAfcGfcC fuUfuGfc(invdT)
161	GCAAAGGCG UGCCAACUC A	256	TGAGUUGGC ACGCCUUUG C	259	Col-C6SSC6- GfcAfaAfgGfcGfu GfcCfaAfcUfcAf(invdT)	263	psdTdGfaGfuUfgGfcAfcGfcC fuUfuGfc(invdT)
161	GCAAAGGCG UGCCAACUC A	256	TGAGUUGGC ACGCCUUUG C	260	Col-AUC- GfcAfaAfgGfcGfu GfcCfaAfcUfcAf(invdT)	263	psdTdGfaGfuUfgGfcAfcGfcC fuUfuGfc(invdT)
161	GCAAAGGCG UGCCAACUC A	256	TGAGUUGGC ACGCCUUUG C	261	Col-catepsina- GfcAfaAfgGfcGfu GfcCfaAfcUfcAf(invdT)	263	psdTdGfaGfuUfgGfcAfcGfcC fuUfuGfc(invdT)
161	GCAAAGGCG UGCCAACUC A	256	TGAGUUGGC ACGCCUUUG C	257	Col-(NH2C6)- GfcAfaAfgGfcGfu GfcCfaAfcUfcAf(invdT)	263	psdTdGfaGfuUfgGfcAfcGfcC fuUfuGfc(invdT)
161	GCAAAGGCG UGCCAACUC A	256	TGAGUUGGC ACGCCUUUG C	259	Col-C6SSC6- GfcAfaAfgGfcGfu GfcCfaAfcUfcAf(invdT)	263	psdTdGfaGfuUfgGfcAfcGfcC fuUfuGfc(invdT)
161	GCAAAGGCG UGCCAACUC A	256	TGAGUUGGC ACGCCUUUG C	260	Col-AUC- GfcAfaAfgGfcGfu GfcCfaAfcUfcAf(invdT)	263	psdTdGfaGfuUfgGfcAfcGfcC fuUfuGfc(invdT)
161	GCAAAGGCG UGCCAACUC A	256	TGAGUUGGC ACGCCUUUG C	261	Col-catepsina- GfcAfaAfgGfcGfu GfcCfaAfcUfcAf(invdT)	263	psdTdGfaGfuUfgGfcAfcGfcC fuUfuGfc(invdT)
163	GGAUCAUCU CAAGUCUUA C	164	GUAAGACUU GAGAUUAUC C	169	(NH2C6)GGAUFCf AUFCtUFCrAAGUf CfUfUfACfcdTsdT	170	GUfAAGACTUfUfGA GAUfGAUfCfCfcdTsd T
171	UGACCACAG UCGGAUUA A	172	UUUAUCCG ACUGUGGUC A	173	(NH2C6)UfgAfcCf aCfaGfuCfGfaUfu AfaAf(invdT)	174	pusUfuAfaUfcCfGfcAfc UfgUfgGfuCfa(invdT)
171	UGACCACAG UCGGAUUA A	172	UUUAUCCG ACUGUGGUC A	175	(NH2C6)uGAccAc AGucGGAUuuAAA dTsdT	176	puUuuAAUCCGACU GUGGucAdTsdT
171	UGACCACAG UCGGAUUA A	172	UUUAUCCG ACUGUGGUC A	175	(NH2C6)uGAccAc AGucGGAUuuAAA dTsdT	177	UUuuAAUCCGACUG UGGUcAdTsdT

Secuencias principales				Secuencias modificadas			
SEQ NO	ID	Secuencia de la cadena codificante (5'-3')	SEQ ID NO	Secuencia de la cadena codificante (5'-3')	SEQ ID NO	Secuencia de la cadena codificante (5'-3')	
247		GUUGGUGAA UGGAGCUCA G	248	CUGAGCUCCA A C	251	(NH2C6)GfuUfgGf uGfaAfuGfgAfgCf uCfaGf(invdt)	
247		GUUGGUGAA UGGAGCUCA G	248	CUGAGCUCCA A C	251	(NH2C6)GfuUfgGf uGfaAfuGfgAfgCf uCfaGf(invdt)	
249		GGUCCUGUUGGUG AAU	250	AUUCACCAA CAACAGGAC C	253	(NH2C6)GfuUfgGf uGfaAfuGfgAfgCf gAfaUf(invdt)	
					252	pCfsUfgAfgCfuCfcAf uUfcAfcCfaAfc(invdt)	
					255	pCfsUfgAfgCfuCfcAf uUfcAfcCfaAfcTsdT	
					254	pAfsUfuCfaCfcAfaCf aAfcAfgGfaCfcdTsdT	

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> F. Hoffmann-La Roche AG

- 5 <120> Conjugados de moléculas pequeñas para la dispensación intracelular de compuestos biológicamente activos  
 <130> 27175 WO1  
 <150> US 61/427845  
 10 <151> 29-12-2010  
 <160> 282  
 <210> 1  
 15 <211> 19  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 20 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena codificante de ARNbc  
 <400> 1  
 acaugaagca gcacgacuu 19  
 25 <210> 2  
 <211> 19  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
 30 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena no codificante de ARNbc  
 <400> 2  
 35 aagucgugcu gcuucaugu 19  
 <210> 3  
 <211> 19  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
 40 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena codificante de ARNbc  
 <400> 3  
 45 gcccgacaac cacuaccug 19  
 <210> 4  
 <211> 19  
 <212> ARN  
 50 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena no codificante de ARNbc  
 55 <400> 4  
 cagguagugg uugucgggc 19  
 <210> 5  
 <211> 19  
 60 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 65 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena codificante de ARNbc

# ES 2 574 177 T3

<400> 5  
 cgagaagcgcgaucaucaug                    19

5    <210> 6  
      <211> 19  
      <212> ARN  
      <213> Secuencia artificial

10   <220>  
      <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena no codificante de ARNbc

     <400> 6  
      caugugaucg cgcuucucg                    19

15   <210> 7  
      <211> 19  
      <212> ARN  
      <213> Secuencia artificial

20   <220>  
      <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena codificante de ARNbc

     <400> 7  
      auaucauggc cgacaagca                    19

25   <210> 8  
      <211> 19  
      <212> ARN  
      <213> Secuencia artificial

30   <220>  
      <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena no codificante de ARNbc

     <400> 8  
      ugcuugucgg ccaugauau                    19

35   <210> 9  
      <211> 19  
      <212> ARN  
      <213> Secuencia artificial

40   <220>  
      <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena codificante de ARNbc

45   <400> 9  
      acaagcugga guacaacua                    19

     <210> 10  
      <211> 19  
      <212> ARN  
      <213> Secuencia artificial

50   <220>  
      <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena no codificante de ARNbc

55   <400> 10  
      uaguuguacuccagcuugu                    19

60   <210> 11  
      <211> 19  
      <212> ARN  
      <213> Secuencia artificial

65   <220>  
      <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena codificante de ARNbc



# ES 2 574 177 T3

<400> 11  
gcagcucgcc gaccacuac 19

5 <210> 12  
<211> 19  
<212> ARN  
<213> Secuencia artificial

10 <220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: cadena no codificante de ARNbc

<400> 12  
guaguggucg gcgagcugc 19

15 <210> 13  
<211> 19  
<212> ARN  
<213> Secuencia artificial

20 <220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: cadena codificante de ARNbc

<400> 13  
cguccaggag cgcaccauc 19

25 <210> 14  
<211> 19  
<212> ARN  
<213> Secuencia artificial

30 <220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: cadena no codificante de ARNbc

<400> 14  
gauggugcgc uccuggacg 19

35 <210> 15  
<211> 19  
<212> ARN  
<213> Secuencia artificial

40 <220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: cadena codificante de ARNbc

45 <400> 15  
gcuggaguucgugaccgcc 19

50 <210> 16  
<211> 19  
<212> ARN  
<213> Secuencia artificial

55 <220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: cadena no codificante de ARNbc

<400> 16  
ggcggucacg aacuccagc 19

60 <210> 17  
<211> 19  
<212> ARN  
<213> Secuencia artificial

65 <220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: cadena codificante de ARNbc

ES 2 574 177 T3

<400> 17  
 ccacccugac cuacggcgu 19

5 <210> 18  
 <211> 19  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena no codificante de ARNbc

<400> 18  
 acgccguagg ucagggugg 19

15 <210> 19  
 <211> 19  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena codificante de ARNbc

<400> 19  
 cgacuucaag gaggacggc 19

25 <210> 20  
 <211> 19  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena no codificante de ARNbc

<400> 20  
 gccguccuccuugaagucg 19

35 <210> 21  
 <211> 19  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

40 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena codificante de ARNbc

45 <400> 21  
 uucaagaucgccacaaca 19

<210> 22  
 <211> 19  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

50 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena no codificante de ARNbc

<400> 22  
 uguuguggcg gaucuugaa 19

55 <210> 23  
 <211> 19  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

60 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena codificante de ARNbc

65 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena codificante de ARNbc

# ES 2 574 177 T3

<400> 23  
ggcaacuaca agaccgcg 19

5 <210> 24  
<211> 19  
<212> ARN  
<213> Secuencia artificial

10 <220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: cadena no codificante de ARNbc

<400> 24  
cgcgggucuu guaguugcc 19

15 <210> 25  
<211> 19  
<212> ARN  
<213> Secuencia artificial

20 <220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: cadena codificante de ARNbc

<400> 25  
ccggcaagcu gcccgugcc 19

25 <210> 26  
<211> 19  
<212> ARN  
<213> Secuencia artificial

30 <220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: cadena no codificante de ARNbc

35 <400> 26  
ggcacgggca gcuugccgg 19

40 <210> 27  
<211> 19  
<212> ARN  
<213> Secuencia artificial

45 <220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: cadena codificante de ARNbc

<400> 27  
ugcccauccu ggucgagcu 19

50 <210> 28  
<211> 19  
<212> ARN  
<213> Secuencia artificial

55 <220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: cadena no codificante de ARNbc

<400> 28  
agcucgacca ggaugggca 19

60 <210> 29  
<211> 19  
<212> ARN  
<213> Secuencia artificial

65 <220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: cadena codificante de ARNbc

## ES 2 574 177 T3

<400> 29  
 caaguucagc guguccggc 19

5 <210> 30  
 <211> 19  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena no codificante de ARNbc

<400> 30  
 gccggacacg cugaacuug 19

15 <210>31  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena codificante de ARNbc

25 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1  
 <223> /mod\_base = "nucleósido: carece de grupo 5'-fosfato"

30 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1..19  
 <223> /mod\_base = "2'-hidroxi-nucleósido correspondiente"

35 <400> 31  
 acaugaagca gcacgacuut t 21

40 <210> 32  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena no codificante de ARNbc

45 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1  
 <223> /mod\_base = "nucleósido: carece de grupo 5'-fosfato"

50 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1..19  
 <223> /mod\_base = "2'-hidroxi-nucleósido correspondiente"

55 <400> 32  
 aagucgugcu gcuucaugut t 21

60 <210> 33  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena codificante de ARNbc

65 <220>

<221> base\_modificada  
 <222> 1  
 <223> /mod\_base = "nucleósido: carece de grupo 5'-fosfato"

5

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1..19  
 <223> /mod\_base = "2'-hidroxi-nucleósido correspondiente"

10

<400> 33  
 gcccgacaac cacuaccugt t                    21

<210> 34  
 <211> 21

15

<212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena no codificante de ARNbc

20

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1  
 <223> /mod\_base = "nucleósido: carece de grupo 5'-fosfato"

25

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1..19  
 <223> /mod\_base = "2'-hidroxi-nucleósido correspondiente"

30

<400> 34  
 cagguagugg uugucgggctt                    21

<210> 35  
 <211> 21

35

<212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena codificante de ARNbc

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1  
 <223> /mod\_base = "nucleósido: carece de grupo 5'-fosfato"

45

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1..19  
 <223> /mod\_base = "2'-hidroxi-nucleósido correspondiente"

50

<400> 35  
 cgagaagcgc gaucacaugt t                    21

55

<210> 36  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

60

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena no codificante de ARNbc

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1  
 <223> /mod\_base = "nucleósido: carece de grupo 5'-fosfato"

65

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1..19  
 <223> /mod\_base = "2'-hidroxi-nucleósido correspondiente"  
 5  
 <400> 36  
 caugugaucg cgcucucgt t 21  
 <210> 37  
 10 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 15 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena codificante de ARNbc  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1  
 20 <223> /mod\_base = "nucleósido: carece de grupo 5'-fosfato"  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1..19  
 25 <223> /mod\_base = "2'-hidroxi-nucleósido correspondiente"  
 <400> 37  
 auaucauggc cgacaagcat t 21  
 30 <210> 38  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 35 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena no codificante de ARNbc  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 40 <222> 1  
 <223> /mod\_base = "nucleósido: carece de grupo 5'-fosfato"  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 45 <222> 1..19  
 <223> /mod\_base = "2'-hidroxi-nucleósido correspondiente"  
 <400> 38  
 50 ugcugucgg ccaugauaut t 21  
 <210> 39  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 55 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena codificante de ARNbc  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 60 <222> 1  
 <223> /mod\_base = "nucleósido: carece de grupo 5'-fosfato"  
 <220>  
 65 <221> base\_modificada  
 <222> 1..19

<223> /mod\_base = "2'-hidroxi-nucleósido correspondiente"

5 <400> 39  
acaagcugga guacaacuatt 21

<210> 40  
<211> 21  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

10 <220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: cadena no codificante de ARNbc

15 <220>  
<221> base\_modificada  
<222> 1  
<223> /mod\_base = "nucleósido: carece de grupo 5'-fosfato"

20 <220>  
<221> base\_modificada  
<222> 1..19  
<223> /mod\_base = "2'-hidroxi-nucleósido correspondiente"

25 <400> 40  
uaguuguacu ccagcuugut t 21

<210> 41  
<211> 21  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

30 <220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: cadena codificante de ARNbc

35 <220>  
<221> base\_modificada  
<222> 1  
<223> /mod\_base = "nucleósido: carece de grupo 5'-fosfato"

40 <220>  
<221> base\_modificada  
<222> 1..19  
<223> /mod\_base = "2'-hidroxi-nucleósido correspondiente"

45 <400> 41  
gcagcucgcc gaccacuact t 21

<210> 42  
<211> 21  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

50 <220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: cadena no codificante de ARNbc

55 <220>  
<221> base\_modificada  
<222> 1  
<223> /mod\_base = "nucleósido: carece de grupo 5'-fosfato"

60 <220>  
<221> base\_modificada  
<222> 1..19  
<223> /mod\_base = "2'-hidroxi-nucleósido correspondiente"

65 <400> 42  
guaguggucg gcgagcugct t 21

<210> 43  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 5  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena codificante de ARNbc  
 <220>  
 10 <221> base\_modificada  
 <222> 1  
 <223> /mod\_base = "nucleósido: carece de grupo 5'-fosfato"  
 <220>  
 15 <221> base\_modificada  
 <222> 1..19  
 <223> /mod\_base = "2'-hidroxi-nucleósido correspondiente"  
 <400> 43  
 20 cguccaggag cgcaccauct t 21  
 <210> 44  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 25 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena no codificante de ARNbc  
 <220>  
 30 <221> base\_modificada  
 <222> 1  
 <223> /mod\_base = "nucleósido: carece de grupo 5'-fosfato"  
 <220>  
 35 <221> base\_modificada  
 <222> 1..19  
 <223> /mod\_base = "2'-hidroxi-nucleósido correspondiente"  
 <400> 44  
 40 gauggugcgc uccuggacgt t 21  
 <210> 45  
 <211> 21  
 45 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena codificante de ARNbc  
 50 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1  
 <223> /mod\_base = "nucleósido: carece de grupo 5'-fosfato"  
 55 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1..19  
 <223> /mod\_base = "2'-hidroxi-nucleósido correspondiente"  
 60 <400> 45  
 gcuggaguuc gugaccgcct t 21  
 <210> 46  
 65 <211> 21  
 <212> ADN



<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena no codificante de ARNbc

<220>

<221> base\_modificada

<222> 1

<223> /mod\_base = "nucleósido: carece de grupo 5'-fosfato"

10 <220>

<221> base\_modificada

<222> 1..19

<223> /mod\_base = "2'-hidroxi-nucleósido correspondiente"

15 <400> 46

ggcggucacg aacuccagct t 21

<210> 47

20 <211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena codificante de ARNbc

<220>

<221> base\_modificada

<222> 1

30 <223> /mod\_base = "nucleósido: carece de grupo 5'-fosfato"

<220>

<221> base\_modificada

<222> 1..19

35 <223> /mod\_base = "2'-hidroxi-nucleósido correspondiente"

<400> 47

ccaccugac cuacggcgut t 21

40 <210> 48

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

45 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: cadena no codificante de ARNbc

<220>

<221> base\_modificada

50 <222> 1

<223> /mod\_base = "nucleósido: carece de grupo 5'-fosfato"

<220>

<221> base\_modificada

55 <222> 1..19

<223> /mod\_base = "2'-hidroxi-nucleósido correspondiente"

<400> 48

60 acgccguagg ucaggguggt t 21

<210> 49

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

65 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: cadena codificante de ARNbc

<220>  
 <221> base\_modificada  
 5 <222> 1  
 <223> /mod\_base = "nucleósido: carece de grupo 5'-fosfato"

<220>  
 <221> base\_modificada  
 10 <222> 1..19  
 <223> /mod\_base = "2'-hidroxi-nucleósido correspondiente"

<400> 49  
 15 cgacuucaag gaggacggct t 21

<210> 50  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 20

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena no codificante de ARNbc

<220>  
 25 <221> base\_modificada  
 <222> 1  
 <223> /mod\_base = "nucleósido: carece de grupo 5'-fosfato"

<220>  
 30 <221> base\_modificada  
 <222> 1..19  
 <223> /mod\_base = "2'-hidroxi-nucleósido correspondiente"

<400> 50  
 35 gccguccucc uugaagucgt t 21

<210> 51  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 40

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena codificante de ARNbc

<220>  
 45 <221> base\_modificada  
 <222> 1  
 <223> /mod\_base = "nucleósido: carece de grupo 5'-fosfato"

<220>  
 50 <221> base\_modificada  
 <222> 1..19  
 <223> /mod\_base = "2'-hidroxi-nucleósido correspondiente"

<400> 51  
 55 uucaagaucc gccacaacat t 21

<210> 52  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 60

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena no codificante de ARNbc  
 65

<220>

<221> base\_modificada  
 <222> 1  
 <223> /mod\_base = "nucleósido: carece de grupo 5'-fosfato"

5

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1..19  
 <223> /mod\_base = "2'-hidroxi-nucleósido correspondiente"

10

<400> 52  
 uguugggcg gaucuugaat t                    21

<210> 53  
 <211> 21

15

<212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena codificante de ARNbc

20

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1  
 <223> /mod\_base = "nucleósido: carece de grupo 5'-fosfato"

25

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1..19  
 <223> /mod\_base = "2'-hidroxi-nucleósido correspondiente"

30

<400> 53  
 ggcaacuaca agaccgcgt t                    21

<210> 54  
 <211>  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

35

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena no codificante de ARNbc

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1  
 <223> /mod\_base = "nucleósido: carece de grupo 5'-fosfato"

45

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1..19  
 <223> /mod\_base = "2'-hidroxi-nucleósido correspondiente"

50

<400> 54  
 cgcgggucuu guaugcct t                    21

55

<210> 55  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

60

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena codificante de ARNbc

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1  
 <223> /mod\_base = "nucleósido: carece de grupo 5'-fosfato"

65

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1..19  
 <223> /mod\_base = "2'-hidroxi-nucleósido correspondiente"  
 5  
 <400> 55  
 ccggcaagcu gcccgucct t 21  
 <210> 56  
 10 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 15 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena no codificante de ARNbc  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1  
 20 <223> /mod\_base = "nucleósido: carece de grupo 5'-fosfato"  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1..19  
 25 <223> /mod\_base = "2'-hidroxi-nucleósido correspondiente"  
 <400> 56  
 ggcacgggca gcuugccgt t 21  
 30 <210> 57  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 35 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena codificante de ARNbc  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 40 <222> 1  
 <223> /mod\_base = "nucleósido: carece de grupo 5'-fosfato"  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 45 <222> 1..19  
 <223> /mod\_base = "2'-hidroxi-nucleósido correspondiente"  
 <400> 57  
 ugcccauccu ggucgagcut t 21  
 50 <210> 58  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 55 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena no codificante de ARNbc  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 60 <222> 1  
 <223> /mod\_base = "nucleósido: carece de grupo 5'-fosfato"  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 65 <222> 1..19  
 <223> /mod\_base = "2'-hidroxi-nucleósido correspondiente"

<400> 58  
 agcucgacca ggaugggcat t            21

5    <210> 59  
      <211> 21  
      <212> ADN  
      <213> Secuencia artificial

10   <220>  
      <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena codificante de ARNbc

15   <220>  
      <221> base\_modificada  
      <222> 1  
      <223> /mod\_base = "nucleósido: carece de grupo 5'-fosfato"

20   <220>  
      <221> base\_modificada  
      <222> 1..19  
      <223> /mod\_base = "2'-hidroxi-nucleósido correspondiente"

25   <400> 59  
      caaguucagc guguccggct t            21

30   <210> 60  
      <211> 21  
      <212> ADN  
      <213> Secuencia artificial

35   <220>  
      <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena no codificante de ARNbc

40   <220>  
      <221> base\_modificada  
      <222> 1  
      <223> /mod\_base = "nucleósido: carece de grupo 5'-fosfato"

45   <220>  
      <221> base\_modificada  
      <222> 1..19  
      <223> /mod\_base = "2'-hidroxi-nucleósido correspondiente"

50   <400> 60  
      gccggacacg cugaacuugt t            21

55   <210> 61  
      <211> 21  
      <212> ADN  
      <213> Secuencia artificial

60   <220>  
      <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena codificante de ARNbc

65   <220>  
      <221> base\_modificada  
      <222> 1  
      <223> /mod\_base = "nucleósido: carece de grupo 5'-fosfato"

70   <220>  
      <221> base\_modificada  
      <222> 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18  
      <223> /mod\_base = "2'-O-metilnucleósido correspondiente"

75   <220>  
      <221> base\_modificada  
      <222> 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19

<223> /mod\_base = "2'-desoxi-2'-fluoro-nucleósido correspondiente"

<220>  
 <221> base\_modificada  
 5 <222> 21  
 <223> /mod\_base = "timidina 5'-fosforotioato"

<400> 61  
 10 acaugaagca gcacgacuut t 21

<210> 62  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

15 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena no codificante de ARNbc

<220>  
 20 <221> base\_modificada  
 <222> 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19  
 <223> /mod\_base = "2'-O-metilnucleósido correspondiente"

<220>  
 25 <221> base\_modificada  
 <222> 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "2'-desoxi-2'-fluoro-nucleósido correspondiente"

<220>  
 30 <221> base\_modificada  
 <222> 21  
 <223> /mod\_base = "timidina 5'-fosforotioato"

<400> 62  
 35 aagucgugcu gcuucaugut t 21

<210> 63  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 40 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena codificante de ARNbc

45 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1  
 <223> /mod\_base = "nucleósido: carece de grupo 5'-fosfato"

50 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "2'-O-metilnucleósido correspondiente"

55 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19  
 <223> /mod\_base = "2'-desoxi-2'-fluoro-nucleósido correspondiente"

60 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 21  
 <223> /mod\_base = "timidina 5'-fosforotioato"

65 <400> 63  
 gcccgacaac cacuaccugt t 21

## ES 2 574 177 T3

<210> 64  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 5  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena no codificante de ARNbc  
 <220>  
 10 <221> base\_modificada  
 <222> 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19  
 <223> /mod\_base = "2'-O-metilnucleósido correspondiente"  
 <220>  
 15 <221> base\_modificada  
 <222> 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "2'-desoxi-2'-fluoro-nucleósido correspondiente"  
 <220>  
 20 <221> base\_modificada  
 <222> 21  
 <223> /mod\_base = "timidina 5'-fosforotioato"  
 <400> 64  
 25 cagguagugg uugucgggctt                    21  
 <210> 65  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 30 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena codificante de ARNbc  
 35 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1  
 <223> /mod\_base = "nucleósido: carece de grupo 5'-fosfato"  
 40 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "2'-O-metilnucleósido correspondiente"  
 45 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19  
 <223> /mod\_base = "2'-desoxi-2'-fluoro-nucleósido correspondiente"  
 50 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 21  
 <223> /mod\_base = "timidina 5'-fosforotioato"  
 55 <400> 65  
 cgagaagcgc gaucacaugt t                    21  
 <210> 66  
 <211> 21  
 60 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena no codificante de ARNbc  
 65 <220>

<221> base\_modificada  
 <222> 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19  
 <223> /mod\_base = "2'-O-metilnucleósido correspondiente"

5 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "2'-desoxi-2'-fluoro-nucleósido correspondiente"

10 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 21  
 <223> /mod\_base = "timidina 5'-fosforotioato"

15 <400> 66  
 caugugaucg cgcuucucgt t 21

<210> 67  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena codificante de ARNbc

25 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1  
 <223> /mod\_base = "nucleósido: carece de grupo 5'-fosfato"

30 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "2'-O-metilnucleósido correspondiente"

35 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19  
 <223> /mod\_base = "2'-desoxi-2'-fluoro-nucleósido correspondiente"

40 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 21  
 <223> /mod\_base = "timidina 5'-fosforotioato"

45 <400> 67  
 auaucauggc cgacaagcat t 21

<210> 68  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena no codificante de ARNbc

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19  
 <223> /mod\_base = "2'-O-metilnucleósido correspondiente"

60 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "2'-desoxi-2'-fluoro-nucleósido correspondiente"

65 <220>



<221> base\_modificada  
 <222> 21  
 <223> /mod\_base = "timidina 5'-fosforotioato"

5 <400> 68  
 ugcugucg ccaugauaut t 21

<210> 69  
 <211> 21  
 10 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena codificante de ARNbc

15 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1  
 <223> /mod\_base = "nucleósido: carece de grupo 5'-fosfato"

20 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "2'-O-metilnucleósido correspondiente"

25 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19  
 <223> /mod\_base = "2'-desoxi-2'-fluoro-nucleósido correspondiente"

30 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 21  
 <223> /mod\_base = "timidina 5'-fosforotioato"

35 <400> 69  
 acaagcugga guacaacuatt 21

<210> 70  
 40 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 45 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena no codificante de ARNbc

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19  
 50 <223> /mod\_base = "2'-O-metilnucleósido correspondiente"

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18  
 55 <223> /mod\_base = "2'-desoxi-2'-fluoro-nucleósido correspondiente"

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 21  
 60 <223> /mod\_base = "timidina 5'-fosforotioato"

<400> 70  
 uaguuguacu ccagcuugut t 21

<210>71  
 65 <211> 21  
 <212> ADN

<213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena codificante de ARNbc  
 5  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1  
 <223> /mod\_base = "nucleósido: carece de grupo 5'-fosfato"  
 10  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "2'-O-metilnucleósido correspondiente"  
 15  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19  
 <223> /mod\_base = "2'-desoxi-2'-fluoro-nucleósido correspondiente"  
 20  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 21  
 <223> /mod\_base = "timidina 5'-fosforotioato"  
 25  
 <400> 71  
 gcagcugcc gaccacuact t                    21  
 30  
 <210> 72  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 35  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena no codificante de ARNbc  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19  
 40  
 <223> /mod\_base = "2'-O-metilnucleósido correspondiente"  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18  
 45  
 <223> /mod\_base = "2'-desoxi-2'-fluoro-nucleósido correspondiente"  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 21  
 50  
 <223> /mod\_base = "timidina 5'-fosforotioato"  
 <400> 72  
 guaguggucg gcgagcugct t                    21  
 55  
 <210> 73  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 60  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena codificante de ARNbc  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 65  
 <222> 1  
 <223> /mod\_base = "nucleósido: carece de grupo 5'-fosfato"

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "2'-O-metilnucleósido correspondiente"  
 5

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19  
 <223> /mod\_base = "2'-desoxi-2'-fluoro-nucleósido correspondiente"  
 10

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 21  
 <223> /mod\_base = "timidina 5'-fosforotioato"  
 15

<400> 73  
 cguccaggag cgcaccauct t                    21

<210> 74  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena no codificante de ARNbc

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19  
 <223> /mod\_base = "2'-O-metilnucleósido correspondiente"  
 30

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "2'-desoxi-2'-fluoro-nucleósido correspondiente"  
 35

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 21  
 <223> /mod\_base = "timidina 5'-fosforotioato"  
 40

<400> 74  
 gauggugcgc uccuggacgt t 21

<210> 75  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena codificante de ARNbc

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1  
 <223> /mod\_base = "nucleósido: carece de grupo 5'-fosfato"  
 55

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "2'-O-metilnucleósido correspondiente"  
 60

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19  
 <223> /mod\_base = "2'-desoxi-2'-fluoro-nucleósido correspondiente"  
 65

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 21  
 <223> /mod\_base = "timidina 5'-fosforotioato"  
 5  
 <400> 75  
 gcuggaguuc gugaccgct t 21  
 <210> 76  
 10 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 15 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena no codificante de ARNbc  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19  
 20 <223> /mod\_base = "2'-O-metilnucleósido correspondiente"  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18  
 25 <223> /mod\_base = "2'-desoxi-2'-fluoro-nucleósido correspondiente"  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 21  
 30 <223> /mod\_base = "timidina 5'-fosforotioato"  
 <400> 76  
 ggcgguacg aacuccagct t 21  
 35 <210> 77  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 40 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena codificante de ARNbc  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 45 <222> 1  
 <223> /mod\_base = "nucleósido: carece de grupo 5'-fosfato"  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 50 <222> 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "2'-O-metilnucleósido correspondiente"  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 55 <222> 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19  
 <223> /mod\_base = "2'-desoxi-2'-fluoro-nucleósido correspondiente"  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 60 <222> 21  
 <223> /mod\_base = "timidina 5'-fosforotioato"  
 <400> 77  
 ccaccugac cuacggcgut t 21  
 65 <210> 78

# ES 2 574 177 T3

<211> 21  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

5 <220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: cadena no codificante de ARNbc

<220>  
<221> base\_modificada  
10 <222> 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19  
<223> /mod\_base = "2'-O-metilnucleósido correspondiente"

<220>  
<221> base\_modificada  
15 <222> 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18  
<223> /mod\_base = "2'-desoxi-2'-fluoro-nucleósido correspondiente"

<220>  
<221> base\_modificada  
20 <222> 21  
<223> /mod\_base = "timidina 5'-fosforotioato"

<400> 78  
25 acgccguagg ucagggugt t 21

<210> 79  
<211> 21  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

30 <220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: cadena codificante de ARNbc

<220>  
<221> base\_modificada  
35 <222> 1  
<223> /mod\_base = "nucleósido: carece de grupo 5'-fosfato"

<220>  
<221> base\_modificada  
40 <222> 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18  
<223> /mod\_base = "2'-O-metilnucleósido correspondiente"

<220>  
<221> base\_modificada  
45 <222> 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19  
<223> /mod\_base = "2'-desoxi-2'-fluoro-nucleósido correspondiente"

<220>  
<221> base\_modificada  
50 <222> 21  
<223> /mod\_base = "timidina 5'-fosforotioato"

<400> 79  
55 cgacuucaag gaggacggct t 21

<210> 80  
<211> 21  
<212> ADN  
60 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: cadena no codificante de ARNbc

65 <220>  
<221> base\_modificada

<222> 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19  
 <223> /mod\_base = "2'-O-metilnucleósido correspondiente"

<220>  
 5 <221> base\_modificada  
 <222> 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "2'-desoxi-2'-fluoro-nucleósido correspondiente"

<220>  
 10 <221> base\_modificada  
 <222> 21  
 <223> /mod\_base = "timidina 5'-fosforotioato"

<400> 80  
 15 gccguccucc uugaagucgt t 21

<210> 81  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 20 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena codificante de ARNbc

<220>  
 25 <221> base\_modificada  
 <222> 1  
 <223> /mod\_base = "nucleósido: carece de grupo 5'-fosfato"

<220>  
 30 <221> base\_modificada  
 <222> 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "2'-O-metilnucleósido correspondiente"

<220>  
 35 <221> base\_modificada  
 <222> 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19  
 <223> /mod\_base = "2'-desoxi-2'-fluoro-nucleósido correspondiente"

<220>  
 40 <221> base\_modificada  
 <222> 21  
 <223> /mod\_base = "timidina 5'-fosforotioato"

<400> 81  
 45 uucaagaucc gccacaacat t 21

<210> 82  
 <211> 21  
 50 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena no codificante de ARNbc

<220>  
 55 <221> base\_modificada  
 <222> 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19  
 <223> /mod\_base = "2'-O-metilnucleósido correspondiente"

<220>  
 60 <221> base\_modificada  
 <222> 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "2'-desoxi-2'-fluoro-nucleósido correspondiente"

<220>  
 65

<221> base\_modificada  
 <222> 21  
 <223> /mod\_base = "timidina 5'-fosforotioato"

5 <400> 82  
 uguuguggcg gaucuugaat t 21

<210> 83  
 <211> 21  
 10 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena codificante de ARNbc

15 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1  
 <223> /mod\_base = "nucleósido: carece de grupo 5'-fosfato"

20 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "2'-O-metilnucleósido correspondiente"

25 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19  
 <223> /mod\_base = "2'-desoxi-2'-fluoro-nucleósido correspondiente"

30 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 21  
 <223> /mod\_base = "timidina 5'-fosforotioato"

35 <400> 83  
 ggcaacuaca agaccgcgct t 21  
 <210> 84

40 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 45 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena no codificante de ARNbc

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19  
 50 <223> /mod\_base = "2'-O-metilnucleósido correspondiente"

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18  
 55 <223> /mod\_base = "2'-desoxi-2'-fluoro-nucleósido correspondiente"

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 21  
 60 <223> /mod\_base = "timidina 5'-fosforotioato"

<400> 84  
 cgcgggucuu guaguugcct t 21

65 <210> 85  
 <211> 21

## ES 2 574 177 T3

<212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

5

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena codificante de ARNbc

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1  
 <223> /mod\_base = "nucleósido: carece de grupo 5'-fosfato"

10

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "2'-O-metilnucleósido correspondiente"

15

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19  
 <223> /mod\_base = "2'-desoxi-2'-fluoro-nucleósido correspondiente"

20

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 21  
 <223> /mod\_base = "timidina 5'-fosforotioato"

25

<400> 85  
 ccggcaagcu gcccgucct t                    21

30

<210> 86  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

35

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena no codificante de ARNbc

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19  
 <223> /mod\_base = "2'-O-metilnucleósido correspondiente"

40

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "2'-desoxi-2'-fluoro-nucleósido correspondiente"

45

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 21  
 <223> /mod\_base = "timidina 5'-fosforotioato"

50

<400> 86  
 ggcacgggca gcuugccgt t                    21

55

<210> 87  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

60

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena codificante de ARNbc

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1

65



<223> /mod\_base = "nucleósido: carece de grupo 5'-fosfato"

<220>  
 <221> base\_modificada  
 5 <222> 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "2'-O-metilnucleósido correspondiente"

<220>  
 <221> base\_modificada  
 10 <222> 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19  
 <223> /mod\_base = "2'-desoxi-2'-fluoro-nucleósido correspondiente"

<220>  
 <221> base\_modificada  
 15 <222> 21  
 <223> /mod\_base = "timidina 5'-fosforotioato"

<400> 87  
 20 ugcccauccu ggucgagcut t 21

<210> 88  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 25

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena no codificante de ARNbc

<220>  
 30 <221> base\_modificada  
 <222> 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19  
 <223> /mod\_base = "2'-O-metilnucleósido correspondiente"

<220>  
 35 <221> base\_modificada  
 <222> 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "2'-desoxi-2'-fluoro-nucleósido correspondiente"

<220>  
 40 <221> base\_modificada  
 <222> 21  
 <223> /mod\_base = "timidina 5'-fosforotioato"

<400> 88  
 45 agcucgacca ggaugggcat t 21

<210> 89  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 50

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena codificante de ARNbc

<220>  
 55 <221> base\_modificada  
 <222> 1  
 <223> /mod\_base = "nucleósido: carece de grupo 5'-fosfato"

<220>  
 60 <221> base\_modificada  
 <222> 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "2'-O-metilnucleósido correspondiente"

<220>  
 65 <221> base\_modificada  
 <222> 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19

<223> /mod\_base = "2'-desoxi-2'-fluoro-nucleósido correspondiente"

<220>  
 <221> base\_modificada  
 5 <222> 21  
 <223> /mod\_base = "timidina 5'-fosforotioato"

<400> 89  
 10 caaguucagc guguccggt t 21

<210> 90  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

15 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena no codificante de ARNbc

<220>  
 20 <221> base\_modificada  
 <222> 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19  
 <223> /mod\_base = "2'-O-metilnucleósido correspondiente"

<220>  
 25 <221> base\_modificada  
 <222> 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "2'-desoxi-2'-fluoro-nucleósido correspondiente"

<220>  
 30 <221> base\_modificada  
 <222> 21  
 <223> /mod\_base = "timidina 5'-fosforotioato"

<400> 90  
 35 gccggacacg cugaacuugt t 21

<210> 91  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 40 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena codificante de ARNbc

45 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1  
 <223> /mod\_base = "nucleósido: carece de grupo 5'-fosfato"

50 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "2'-O-metilnucleósido correspondiente"

55 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17  
 <223> /mod\_base = "2'-desoxinucleósido correspondiente"

<220>  
 60 <221> base\_modificada  
 <222> 21  
 <223> /mod\_base = "timidina 5'-fosforotioato"

<400> 91  
 65 acaugaagca gcacgacutt t 21

<210> 92  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 5  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena no codificante de ARNbc  
 <220>  
 10 <221> base\_modificada  
 <222> 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19  
 <223> /mod\_base = "2'-O-metilnucleósido correspondiente"  
 <220>  
 15 <221> base\_modificada  
 <222> 2, 6, 8, 12, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "2'-desoxinucleósido correspondiente"  
 <220>  
 20 <221> base\_modificada  
 <222> 21  
 <223> /mod\_base = "timidina 5'-fosforotioato"  
 <400> 92  
 25 aagtcgugct gcutcaugt t 21  
 <210> 93  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 30  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena codificante de ARNbc  
 35 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1  
 <223> /mod\_base = "nucleósido: carece de grupo 5'-fosfato"  
 40 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "2'-O-metilnucleósido correspondiente"  
 45 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19  
 <223> /mod\_base = "2'-desoxinucleósido correspondiente"  
 50 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 21  
 <223> /mod\_base = "timidina 5'-fosforotioato"  
 55 <400> 93  
 gcccgacaac cacuaccugt t 21  
 <210> 94  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 60  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena no codificante de ARNbc  
 65 <220>

<221> base\_modificada  
 <222> 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19  
 <223> /mod\_base = "2'-O-metilnucleósido correspondiente"

5 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 2, 4, 6, 10, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "2'-desoxinucleósido correspondiente"

10 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 21  
 <223> /mod\_base = "timidina 5'-fosforotioato"

15 <400> 94  
 cagguagtgg utgtcgggct t 21

<210> 95  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena codificante de ARNbc

25 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1  
 <223> /mod\_base = "nucleósido: carece de grupo 5'-fosfato"

30 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "2'-O-metilnucleósido correspondiente"

35 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1, 3, 5, 7, 9, 11, 15, 17, 19  
 <223> /mod\_base = "2'-desoxinucleósido correspondiente"

40 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 21  
 <223> /mod\_base = "timidina 5'-fosforotioato"

45 <400> 95  
 cgagaagcgc gatcacaugt t 21

<210> 96  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena no codificante de ARNbc

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19  
 <223> /mod\_base = "2'-O-metilnucleósido correspondiente"

60 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 2, 4, 6, 10, 12, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "2'-desoxinucleósido correspondiente"

65 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 2, 4, 6, 10, 12, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "2'-desoxinucleósido correspondiente"

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 21  
 <223> /mod\_base = "timidina 5'-fosforotioato"  
 5  
 <400> 96  
 caugugatcg cgctucucgt t 21  
 <210> 97  
 10 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 15 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena codificante de ARNbc  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1  
 20 <223> /mod\_base = "nucleósido: carece de grupo 5'-fosfato"  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18  
 25 <223> /mod\_base = "2'-O-metilnucleósido correspondiente"  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1, 3, 5, 9, 11, 13, 15, 17, 19  
 30 <223> /mod\_base = "2'-desoxinucleósido correspondiente"  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 21  
 35 <223> /mod\_base = "timidina 5'-fosforotioato"  
 <400> 97  
 auaucatggc cgacaagcat t 21  
 40 <210> 98  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 45 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena no codificante de ARNbc  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 50 <222> 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19  
 <223> /mod\_base = "2'-O-metilnucleósido correspondiente"  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 55 <222> 2, 6, 8, 10, 12, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "2'-desoxinucleósido correspondiente"  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 60 <222> 21  
 <223> /mod\_base = "timidina 5'-fosforotioato"  
 <400> 98  
 ugctugucgg ccatgauaut t 21  
 65 <210> 99

<211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

5 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena codificante de ARNbc

<220>  
 <221> base\_modificada  
 10 <222> 1  
 <223> /mod\_base = "nucleósido: carece de grupo 5'-fosfato"

<220>  
 <221> base\_modificada  
 15 <222> 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "2'-O-metilnucleósido correspondiente"

<220>  
 <221> base\_modificada  
 20 <222> 1, 3, 5, 9, 11, 13, 15, 17, 19  
 <223> /mod\_base = "2'-desoxinucleósido correspondiente"

<220>  
 <221> base\_modificada  
 25 <222> 21  
 <223> /mod\_base = "timidina 5'-fosforotioato"

<400> 99  
 acaagctgga guacaacuat t 21  
 30

<210> 100  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

35 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena no codificante de ARNbc

<220>  
 <221> base\_modificada  
 40 <222> 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19  
 <223> /mod\_base = "2'-O-metilnucleósido correspondiente"

<220>  
 <221> base\_modificada  
 45 <222> 2, 6, 8, 12, 14, 18  
 <223> /mod\_base = "2'-desoxinucleósido correspondiente"

<220>  
 <221> base\_modificada  
 50 <222> 21  
 <223> /mod\_base = "timidina 5'-fosforotioato"

<400> 100  
 55 uagtuguact ccagctugut t 21

<210> 101  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 60 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena codificante de ARNbc

65 <220>  
 <221> base\_modificada

<222> 1  
 <223> /mod\_base = "nucleósido: carece de grupo 5'-fosfato"

<220>  
 5 <221> base\_modificada  
 <222> 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "2'-O-metilnucleósido correspondiente"

<220>  
 10 <221> base\_modificada  
 <222> 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 19  
 <223> /mod\_base = "2'-desoxinucleósido correspondiente"

<220>  
 15 <221> base\_modificada  
 <222> 21  
 <223> /mod\_base = "timidina 5'-fosforotioato"

<400> 101  
 20 gcagcugcc gaccactact t 21

<210> 102  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 25 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena no codificante de ARNbc

<220>  
 30 <221> base\_modificada  
 <222> 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19  
 <223> /mod\_base = "2'-O-metilnucleósido correspondiente"

<220>  
 35 <221> base\_modificada  
 <222> 4, 6, 10, 12, 14, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "2'-desoxinucleósido correspondiente"

<220>  
 40 <221> base\_modificada  
 <222> 21  
 <223> /mod\_base = "timidina 5'-fosforotioato"

<400> 102  
 45 gtaguggtcg gcgagcugct t 21

<210> 103  
 <211> 21  
 50 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena codificante de ARNbc

<220>  
 55 <221> base\_modificada  
 <222> 1  
 <223> /mod\_base = "nucleósido: carece de grupo 5'-fosfato"

<220>  
 60 <221> base\_modificada  
 <222> 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "2'-O-metilnucleósido correspondiente"

<220>  
 65

<221> base\_modificada  
 <222> 1, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19  
 <223> /mod\_base = "2'-desoxinucleósido correspondiente"

5 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 21  
 <223> /mod\_base = "timidina 5'-fosforotioato"

10 <400> 103  
 cgtccaggag cgcaccauct t 21

<210> 104  
 <211> 21

15 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena no codificante de ARNbc

20 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19  
 <223> /mod\_base = "2'-O-metilnucleósido correspondiente"

25 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 2, 4, 8, 10, 12, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "2'-desoxinucleósido correspondiente"

30 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 21  
 <223> /mod\_base = "timidina 5'-fosforotioato"

35 <400> 104  
 gauggtgcg c ucctggacgt t 21

<210> 105  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena codificante de ARNbc

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1  
 <223> /mod\_base = "nucleósido: carece de grupo 5'-fosfato"

50 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "2'-O-metilnucleósido correspondiente"

55 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1, 5, 7, 11, 13, 15, 17, 19  
 <223> /mod\_base = "2'-desoxinucleósido correspondiente"

60 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 21  
 <223> /mod\_base = "timidina 5'-fosforotioato"

65 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 21  
 <223> /mod\_base = "timidina 5'-fosforotioato"



<400> 105  
 gctggagutc gugaccgct t 21

5 <210> 106  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena no codificante de ARNbc

15 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19  
 <223> /mod\_base = "2'-O-metilnucleósido correspondiente"

20 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 2, 4, 8, 10, 12, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "2'-desoxinucleósido correspondiente"

25 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 21  
 <223> /mod\_base = "timidina 5'-fosforotioato"

<400> 106  
 ggcggtcacg aactccagct t 21

30 <210> 107  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

35 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena codificante de ARNbc

40 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1  
 <223> /mod\_base = "nucleósido: carece de grupo 5'-fosfato"

45 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "2'-O-metilnucleósido correspondiente"

50 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1, 3, 5, 9, 11, 13, 15, 17  
 <223> /mod\_base = "2'-desoxinucleósido correspondiente"

55 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 21  
 <223> /mod\_base = "timidina 5'-fosforotioato"

60 <400> 107  
 ccaccctgac cuacggcggt t 21

65 <210> 108  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: cadena no codificante de ARNbc

<220>  
 <221> base\_modificada  
 5 <222> 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19  
 <223> /mod\_base = "2'-O-metilnucleósido correspondiente"

<220>  
 <221> base\_modificada  
 10 <222> 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "2'-desoxinucleósido correspondiente"

<220>  
 <221> base\_modificada  
 15 <222> 21  
 <223> /mod\_base = "timidina 5'-fosforotioato"

<400> 108  
 20 acgccguagg ucagggugt t 21

<210> 109  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 25

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena codificante de ARNbc

<220>  
 30 <221> base\_modificada  
 <222> 1  
 <223> /mod\_base = "nucleósido: carece de grupo 5'-fosfato"

<220>  
 35 <221> base\_modificada  
 <222> 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "2'-O-metilnucleósido correspondiente"

<220>  
 40 <221> base\_modificada  
 <222> 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19  
 <223> /mod\_base = "2'-desoxinucleósido correspondiente"

<220>  
 45 <221> base\_modificada  
 <222> 21  
 <223> /mod\_base = "timidina 5'-fosforotioato"

<400> 109  
 50 cgactucaag gaggacggct t 21

<210> 110  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 55 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena no codificante de ARNbc

<220>  
 60 <221> base\_modificada  
 <222> 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19  
 <223> /mod\_base = "2'-O-metilnucleósido correspondiente"

<220>  
 65 <221> base\_modificada

<222> 2, 4, 6, 10, 14, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "2'-desoxinucleósido correspondiente"

<220>  
 5 <221> base\_modificada  
 <222> 21  
 <223> /mod\_base = "timidina 5'-fosforotioato"

<400> 110  
 10 gccgucctcc utgaagucgt t 21

<210> 111  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 15 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena codificante de ARNbc

<220>  
 20 <221> base\_modificada  
 <222> 1  
 <223> /mod\_base = "nucleósido: carece de grupo 5'-fosfato"

<220>  
 25 <221> base\_modificada  
 <222> 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "2'-O-metilnucleósido correspondiente"

<220>  
 30 <221> base\_modificada  
 <222> 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19  
 <223> /mod\_base = "2'-desoxinucleósido correspondiente"

<220>  
 35 <221> base\_modificada  
 <222> 21  
 <223> /mod\_base = "timidina 5'-fosforotioato"

<400> 111  
 40 tucaagaucc gccacaacat t 21

<210> 112  
 <211> 21  
 45 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena no codificante de ARNbc

<220>  
 50 <221> base\_modificada  
 <222> 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19  
 <223> /mod\_base = "2'-O-metilnucleósido correspondiente"

<220>  
 55 <221> base\_modificada  
 <222> 2, 8, 10, 12, 14, 18  
 <223> /mod\_base = "2'-desoxinucleósido correspondiente"

<220>  
 60 <221> base\_modificada  
 <222> 21  
 <223> /mod\_base = "timidina 5'-fosforotioato"

<400> 112  
 65

ugutgtggcg gaucutgaat t 21

5 <210> 113  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena codificante de ARNbc

15 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1  
 <223> /mod\_base = "nucleósido: carece de grupo 5'-fosfato"

20 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "2'-O-metilnucleósido correspondiente"

25 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1, 3, 5, 9, 11, 13, 15, 17, 19  
 <223> /mod\_base = "2'-desoxinucleósido correspondiente"

30 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 21  
 <223> /mod\_base = "timidina 5'-fosforotioato"

35 <400> 113  
 ggcaactaca agacccgcgt t 21

40 <210> 114  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

45 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena no codificante de ARNbc

50 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19  
 <223> /mod\_base = "2'-O-metilnucleósido correspondiente"

55 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 2, 4, 6, 8, 14, 18  
 <223> /mod\_base = "2'-desoxinucleósido correspondiente"

60 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 21  
 <223> /mod\_base = "timidina 5'-fosforotioato"

65 <400> 114  
 cgcgggucut gtagutgcct t 21  
 <210> 115  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena codificante de ARNbc

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1  
 <223> /mod\_base = "nucleósido: carece de grupo 5'-fosfato"  
 5

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "2'-O-metilnucleósido correspondiente"  
 10

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19  
 <223> /mod\_base = "2'-desoxinucleósido correspondiente"  
 15

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 21  
 <223> /mod\_base = "timidina 5'-fosforotioato"  
 20

<400> 115  
 ccggcaagcu gcccgucct t            21

<210> 116  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena no codificante de ARNbc  
 30

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19  
 <223> /mod\_base = "2'-O-metilnucleósido correspondiente"  
 35

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 2, 4, 6, 8, 10, 12, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "2'-desoxinucleósido correspondiente"  
 40

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 21  
 <223> /mod\_base = "timidina 5'-fosforotioato"  
 45

<400> 116  
 ggcacgggca gcutgccgt t            21

<210> 117  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena codificante de ARNbc  
 55

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1  
 <223> /mod\_base = "nucleósido: carece de grupo 5'-fosfato"  
 60

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "2'-O-metilnucleósido correspondiente"  
 65

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 3, 5, 9, 11, 15, 17  
 <223> /mod\_base = "2'-desoxinucleósido correspondiente"  
 5

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 21  
 <223> /mod\_base = "timidina 5'-fosforotioato"  
 10

<400> 117  
 tgcccatccu ggtcgagctt t                    21

<210> 118  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena no codificante de ARNbc

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19  
 <223> /mod\_base = "2'-O-metilnucleósido correspondiente"  
 25

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 2, 6, 8, 10, 12, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "2'-desoxinucleósido correspondiente"  
 30

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 21  
 <223> /mod\_base = "timidina 5'-fosforotioato"  
 35

<400> 118  
 agctcgacca ggatgggcat t                    21

<210> 119  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena codificante de ARNbc

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1  
 <223> /mod\_base = "nucleósido: carece de grupo 5'-fosfato"  
 50

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "2'-O-metilnucleósido correspondiente"  
 55

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1, 3, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19  
 <223> /mod\_base = "2'-desoxinucleósido correspondiente"  
 60

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 21  
 <223> /mod\_base = "timidina 5'-fosforotioato"  
 65

ES 2 574 177 T3

<400> 119  
 caagtucagc guguccggt t                    21

5    <210> 120  
      <211> 21  
      <212> ADN  
      <213> Secuencia artificial

10   <220>  
      <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena no codificante de ARNbc

15   <220>  
      <221> base\_modificada  
      <222> 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19  
      <223> /mod\_base = "2'-O-metilnucleósido correspondiente"

20   <220>  
      <221> base\_modificada  
      <222> 2, 4, 6, 8, 10, 14, 16  
      <223> /mod\_base = "2'-desoxinucleósido correspondiente"

25   <220>  
      <221> base\_modificada  
      <222> 21  
      <223> /mod\_base = "timidina 5'-fosforotioato"

30   <400> 120  
      gccggacacg ctgaacutgt t                    21

35   <210> 121  
      <211> 21  
      <212> ADN  
      <213> Secuencia artificial

40   <220>  
      <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena codificante de ARNbc

45   <220>  
      <221> base\_modificada  
      <222> 1  
      <223> /mod\_base = "nucleósido: carece de grupo 5'-fosfato"

50   <220>  
      <221> base\_modificada  
      <222> 2, 6, 8, 10, 12, 14, 16  
      <223> /mod\_base = "2'-desoxinucleósido correspondiente"

55   <220>  
      <221> base\_modificada  
      <222> 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19  
      <223> /mod\_base = "2'-desoxi-2'-fluoro-nucleósido correspondiente"

60   <220>  
      <221> base\_modificada  
      <222> 21  
      <223> /mod\_base = "timidina 5'-fosforotioato"

65   <400> 121  
      acatgaagca gcacgactut t                    21

70   <210> 122  
      <211> 21  
      <212> ADN  
      <213> Secuencia artificial

75   <220>  
      <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena no codificante de ARNbc

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1, 3, 5, 9, 11, 15  
 <223> /mod\_base = "2'-desoxinucleósido correspondiente"  
 5

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "2'-desoxi-2'-fluoro-nucleósido correspondiente"  
 10

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 21  
 <223> /mod\_base = "timidina 5'-fosforotioato"  
 15

<400> 122  
 aagucgtgcu gctucattgt t                    21

<210> 123  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena codificante de ARNbc

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1  
 <223> /mod\_base = "nucleósido: carece de grupo 5'-fosfato"  
 30

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 2, 4, 6, 8, 10, 12, 16  
 <223> /mod\_base = "2'-desoxinucleósido correspondiente"  
 35

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19  
 <223> /mod\_base = "2'-desoxi-2'-fluoro-nucleósido correspondiente"  
 40

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 21  
 <223> /mod\_base = "timidina 5'-fosforotioato"  
 45

<400> 123  
 gcccgacaac cactacctgt t                    21

<210> 124  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena no codificante de ARNbc

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1, 3, 7, 9, 13, 15, 17, 19  
 <223> /mod\_base = "2'-desoxinucleósido correspondiente"  
 60

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "2'-desoxi-2'-fluoro-nucleósido correspondiente"  
 65



<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 21  
 <223> /mod\_base = "timidina 5'-fosforotioato"  
 5  
 <400> 124  
 caggtagugg tugucgggct t 21  
 <210> 125  
 10 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 15 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena codificante de ARNbc  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1  
 20 <223> /mod\_base = "nucleósido: carece de grupo 5'-fosfato"  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16  
 25 <223> /mod\_base = "2'-desoxinucleósido correspondiente"  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19  
 30 <223> /mod\_base = "2'-desoxi-2'-fluoro-nucleósido correspondiente"  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 21  
 35 <223> /mod\_base = "timidina 5'-fosforotioato"  
 <400> 125  
 cgagaagcgc gaucacatgt t 21  
 40 <210> 126  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 45 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena no codificante de ARNbc  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1, 7, 9, 11, 13, 19  
 50 <223> /mod\_base = "2'-desoxinucleósido correspondiente"  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18  
 55 <223> /mod\_base = "2'-desoxi-2'-fluoro-nucleósido correspondiente"  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 21  
 60 <223> /mod\_base = "timidina 5'-fosforotioato"  
 <400> 126  
 catgtgaucg cgcutctcgt t 21  
 65 <210> 127

<211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

5 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena codificante de ARNbc

<220>  
 <221> base\_modificada  
 10 <222> 1  
 <223> /mod\_base = "nucleósido: carece de grupo 5'-fosfato"

<220>  
 <221> base\_modificada  
 15 <222> 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "2'-desoxinucleósido correspondiente"

<220>  
 <221> base\_modificada  
 20 <222> 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19  
 <223> /mod\_base = "2'-desoxi-2'-fluoro-nucleósido correspondiente"

<220>  
 <221> base\_modificada  
 25 <222> 21  
 <223> /mod\_base = "timidina 5'-fosforotioato"

<400> 127  
 30 atatcauggc cgacaagcat t 21

<210> 128  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

35 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena no codificante de ARNbc

<220>  
 <221> base\_modificada  
 40 <222> 3, 9, 11, 13, 15  
 <223> /mod\_base = "2'-desoxinucleósido correspondiente"

<220>  
 <221> base\_modificada  
 45 <222> 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "2'-desoxi-2'-fluoro-nucleósido correspondiente"

<220>  
 <221> base\_modificada  
 50 <222> 21  
 <223> /mod\_base = "timidina 5'-fosforotioato"

<400> 128  
 55 tgcutgtcgg ccaugatatt t 21

<210> 129  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 60 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena codificante de ARNbc

65 <220>  
 <221> base\_modificada

<222> 1  
 <223> /mod\_base = "nucleósido: carece de grupo 5'-fosfato"

<220>  
 5 <221> base\_modificada  
 <222> 2, 4, 6, 8, 10, 14, 16  
 <223> /mod\_base = "2'-desoxinucleósido correspondiente"

<220>  
 10 <221> base\_modificada  
 <222> 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19  
 <223> /mod\_base = "2'-desoxi-2'-fluoro-nucleósido correspondiente"

<220>  
 15 <221> base\_modificada  
 <222> 21  
 <223> /mod\_base = "timidina 5'-fosforotioato"

<400> 129  
 20 acaagcugga gtacaactat t 21

<210> 130  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 25 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena no codificante de ARNbc

<220>  
 30 <221> base\_modificada  
 <222> 3, 9, 11, 13, 15  
 <223> /mod\_base = "2'-desoxinucleósido correspondiente"

<220>  
 35 <221> base\_modificada  
 <222> 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "2'-desoxi-2'-fluoro-nucleósido correspondiente"

<220>  
 40 <221> base\_modificada  
 <222> 21  
 <223> /mod\_base = "timidina 5'-fosforotioato"

<400> 130  
 45 tagutgtacu ccagcutggt t 21

<210> 131  
 <211> 21  
 50 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena codificante de ARNbc

<220>  
 55 <221> base\_modificada  
 <222> 1  
 <223> /mod\_base = "nucleósido: carece de grupo 5'-fosfato"

<220>  
 60 <221> base\_modificada  
 <222> 2, 4, 8, 10, 12, 14, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "2'-desoxinucleósido correspondiente"

<220>  
 65 <221> base\_modificada

<222> 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19  
 <223> /mod\_base = "2'-desoxi-2'-fluoro-nucleósido correspondiente"

5 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 21  
 <223> /mod\_base = "timidina 5'-fosforotioato"

10 <400> 131  
 gcagctgcc gaccacuact t 21

<210> 132  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 15 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena no codificante de ARNbc

20 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1, 3, 7, 9, 11, 13, 15, 19  
 <223> /mod\_base = "2'-desoxinucleósido correspondiente"

25 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "2'-desoxi-2'-fluoro-nucleósido correspondiente"

30 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 21  
 <223> /mod\_base = "timidina 5'-fosforotioato"

35 <400> 132  
 guagtggucg gcgagctgct t 21

<210> 133  
 <211> 21  
 40 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena codificante de ARNbc

45 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1  
 <223> /mod\_base = "nucleósido: carece de grupo 5'-fosfato"

50 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16  
 <223> /mod\_base = "2'-desoxinucleósido correspondiente"

55 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19  
 <223> /mod\_base = "2'-desoxi-2'-fluoro-nucleósido correspondiente"

60 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 21  
 <223> /mod\_base = "timidina 5'-fosforotioato"

65 <400> 133  
 cguccaggag cgcacatct t 21

ES 2 574 177 T3

<210> 134  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 5  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena no codificante de ARNbc  
 <220>  
 10 <221> base\_modificada  
 <222> 1, 5, 7, 9, 13, 15, 17, 19  
 <223> /mod\_base = "2'-desoxinucleósido correspondiente"  
 <220>  
 15 <221> base\_modificada  
 <222> 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "2'-desoxi-2'-fluoro-nucleósido correspondiente"  
 <220>  
 20 <221> base\_modificada  
 <222> 21  
 <223> /mod\_base = "timidina 5'-fosforotioato"  
 <400> 134  
 25 gatggugcgc tccuggacgt t 21  
 <210> 135  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 30  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena codificante de ARNbc  
 <220>  
 35 <221> base\_modificada  
 <222> 1  
 <223> /mod\_base = "nucleósido: carece de grupo 5'-fosfato"  
 <220>  
 40 <221> base\_modificada  
 <222> 2, 4, 6, 10, 14, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "2'-desoxinucleósido correspondiente"  
 <220>  
 45 <221> base\_modificada  
 <222> 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19  
 <223> /mod\_base = "2'-desoxi-2'-fluoro-nucleósido correspondiente"  
 <220>  
 50 <221> base\_modificada  
 <222> 21  
 <223> /mod\_base = "timidina 5'-fosforotioato"  
 <400> 135  
 55 gcuggagtuc gtagccgcct t 21  
 <210> 136  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 60  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena no codificante de ARNbc  
 <220>  
 65 <221> base\_modificada

<222> 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19  
 <223> /mod\_base = "2'-desoxinucleósido correspondiente"

<220>  
 5 <221> base\_modificada  
 <222> 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "2'-desoxi-2'-fluoro-nucleósido correspondiente"

<220>  
 10 <221> base\_modificada  
 <222> 21  
 <223> /mod\_base = "timidina 5'-fosforotioato"

<400> 136  
 15 ggcggucacg aacuccagct t 21

<210> 137  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 20 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena codificante de ARNbc

<220>  
 25 <221> base\_modificada  
 <222> 1  
 <223> /mod\_base = "nucleósido: carece de grupo 5'-fosfato"

<220>  
 30 <221> base\_modificada  
 <222> 2, 4, 6, 8, 10, 14, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "2'-desoxinucleósido correspondiente"

<220>  
 35 <221> base\_modificada  
 <222> 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19  
 <223> /mod\_base = "2'-desoxi-2'-fluoro-nucleósido correspondiente"

<220>  
 40 <221> base\_modificada  
 <222> 21  
 <223> /mod\_base = "timidina 5'-fosforotioato"

<400> 137  
 45 ccaccugac ctacggcgt t 21

<210> 138  
 <211> 21  
 50 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena no codificante de ARNbc

<220>  
 55 <221> base\_modificada  
 <222> 1, 3, 5, 9, 13, 15, 19  
 <223> /mod\_base = "2'-desoxinucleósido correspondiente"

<220>  
 60 <221> base\_modificada  
 <222> 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "2'-desoxi-2'-fluoro-nucleósido correspondiente"

<220>  
 65

<221> base\_modificada  
 <222> 21  
 <223> /mod\_base = "timidina 5'-fosforotioato"

5 <400> 138  
 acgccgtagg tcagggtgt t 21

<210> 139  
 <211> 21  
 10 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena codificante de ARNbc

15 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1  
 <223> /mod\_base = "nucleósido: carece de grupo 5'-fosfato"

20 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 2, 4, 8, 10, 12, 14, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "2'-desoxinucleósido correspondiente"

25 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19  
 <223> /mod\_base = "2'-desoxi-2'-fluoro-nucleósido correspondiente"

30 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 21  
 <223> /mod\_base = "timidina 5'-fosforotioato"

35 <400> 139  
 cgacutcaag gaggacggct t 21

<210> 140  
 40 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 45 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena no codificante de ARNbc

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1, 3, 7, 9, 13, 15, 19  
 50 <223> /mod\_base = "2'-desoxinucleósido correspondiente"

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18  
 55 <223> /mod\_base = "2'-desoxi-2'-fluoro-nucleósido correspondiente"

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 21  
 60 <223> /mod\_base = "timidina 5'-fosforotioato"

<400> 140  
 gccgtccucc tugaagtcgt t 21

65 <210> 141  
 <211> 21

## ES 2 574 177 T3

<212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

5

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena codificante de ARNbc

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1  
 <223> /mod\_base = "nucleósido: carece de grupo 5'-fosfato"

10

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 4, 6, 10, 12, 14, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "2'-desoxinucleósido correspondiente"

15

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19  
 <223> /mod\_base = "2'-desoxi-2'-fluoro-nucleósido correspondiente"

20

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 21  
 <223> /mod\_base = "timidina 5'-fosforotioato"

25

<400> 141  
 utcaagatcc gccacaacat t                    21

30

<210> 142  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

35

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena no codificante de ARNbc

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 5, 7, 9, 11, 17, 19  
 <223> /mod\_base = "2'-desoxinucleósido correspondiente"

40

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "2'-desoxi-2'-fluoro-nucleósido correspondiente"

45

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 21  
 <223> /mod\_base = "timidina 5'-fosforotioato"

50

<400> 142  
 tgtuguggcg gatctugaat t                    21

55

<210> 143  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

60

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena codificante de ARNbc

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1

65



<223> /mod\_base = "nucleósido: carece de grupo 5'-fosfato"

<220>  
 <221> base\_modificada  
 5 <222> 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "2'-desoxinucleósido correspondiente"

<220>  
 <221> base\_modificada  
 10 <222> 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19  
 <223> /mod\_base = "2'-desoxi-2'-fluoro-nucleósido correspondiente"

<220>  
 <221> base\_modificada  
 15 <222> 21  
 <223> /mod\_base = "timidina 5'-fosforotioato"

<400> 143  
 20 ggcaacuaca agaccgcgt t 21

<210> 144  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 25

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena no codificante de ARNbc

<220>  
 30 <221> base\_modificada  
 <222> 1, 3, 5, 11, 13, 17, 19  
 <223> /mod\_base = "2'-desoxinucleósido correspondiente"

<220>  
 35 <221> base\_modificada  
 <222> 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "2'-desoxi-2'-fluoro-nucleósido correspondiente"

<220>  
 40 <221> base\_modificada  
 <222> 21  
 <223> /mod\_base = "timidina 5'-fosforotioato"

<400> 144  
 45 cgcggtctt guagtgcct t 21

<210> 145  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 50

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena codificante de ARNbc  
 <220>  
 55 <221> base\_modificada  
 <222> 1  
 <223> /mod\_base = "nucleósido: carece de grupo 5'-fosfato"

<220>  
 60 <221> base\_modificada  
 <222> 2, 4, 6, 8, 12, 14, 18  
 <223> /mod\_base = "2'-desoxinucleósido correspondiente"

<220>  
 65 <221> base\_modificada  
 <222> 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19

<223> /mod\_base = "2'-desoxi-2'-fluoro-nucleósido correspondiente"

<220>  
 <221> base\_modificada  
 5 <222> 21  
 <223> /mod\_base = "timidina 5'-fosforotioato"

<400> 145  
 10 ccggcaagct gcccgctgct t 21

<210> 146  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

15 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena no codificante de ARNbc

<220>  
 20 <221> base\_modificada  
 <222> 1, 3, 5, 7, 9, 11, 15, 17, 19  
 <223> /mod\_base = "2'-desoxinucleósido correspondiente"

<220>  
 25 <221> base\_modificada  
 <222> 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "2'-desoxi-2'-fluoro-nucleósido correspondiente"

<220>  
 30 <221> base\_modificada  
 <222> 21  
 <223> /mod\_base = "timidina 5'-fosforotioato"

<400> 146  
 35 ggcacgggca gctugccggt t 21

<210> 147  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 40 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena codificante de ARNbc

45 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1  
 <223> /mod\_base = "nucleósido: carece de grupo 5'-fosfato"

50 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 2, 4, 6, 8, 12, 14, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "2'-desoxinucleósido correspondiente"

<220>  
 55 <221> base\_modificada  
 <222> 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19  
 <223> /mod\_base = "2'-desoxi-2'-fluoro-nucleósido correspondiente"

<220>  
 60 <221> base\_modificada  
 <222> 21  
 <223> /mod\_base = "timidina 5'-fosforotioato"

<400> 147  
 65 ugcccaucct ggucgagcut t 21

<210> 148  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 5  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena no codificante de ARNbc  
 <220>  
 10 <221> base\_modificada  
 <222> 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19  
 <223> /mod\_base = "2'-desoxinucleósido correspondiente"  
 <220>  
 15 <221> base\_modificada  
 <222> 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "2'-desoxi-2'-fluoro-nucleósido correspondiente"  
 <220>  
 20 <221> base\_modificada  
 <222> 21  
 <223> /mod\_base = "timidina 5'-fosforotioato"  
 <400> 148  
 25 agcucgacca ggaugggcat t 21  
 <210> 149  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 30  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena codificante de ARNbc  
 <220>  
 35 <221> base\_modificada  
 <222> 1  
 <223> /mod\_base = "nucleósido: carece de grupo 5'-fosfato"  
 <220>  
 40 <221> base\_modificada  
 <222> 2, 4, 8, 10, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "2'-desoxinucleósido correspondiente"  
 <220>  
 45 <221> base\_modificada  
 <222> 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19  
 <223> /mod\_base = "2'-desoxi-2'-fluoro-nucleósido correspondiente"  
 <220>  
 50 <221> base\_modificada  
 <222> 21  
 <223> /mod\_base = "timidina 5'-fosforotioato"  
 <400> 149  
 55 caagutcagc ggtgccgct t 21  
 <210> 150  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 60  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena no codificante de ARNbc  
 <220>  
 65 <221> base\_modificada

<222> 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 19  
 <223> /mod\_base = "2'-desoxinucleósido correspondiente"

<220>  
 5 <221> base\_modificada  
 <222> 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "2'-desoxi-2'-fluoro-nucleósido correspondiente"

<220>  
 10 <221> base\_modificada  
 <222> 21  
 <223> /mod\_base = "timidina 5'-fosforotioato"

<400> 150  
 15 gcggacacg cugaactugt t 21

<210> 151  
 <211> 21  
 <212> ARN  
 20 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena codificante de ARNbc dirigida contra apoB

<220>  
 25 <221> base\_modificada  
 <222> 1  
 <223> /mod\_base = "nucleósido: carece de grupo 5'-fosfato"

<400> 151  
 30 ggaaucuuau auuugaucca a 21

<210> 152  
 <211> 23  
 35 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena no codificante de ARNbc dirigida contra apoB

<220>  
 40 <221> base\_modificada  
 <222> 1  
 <223> /mod\_base = "nucleósido: carece de grupo 5'-fosfato"

<400> 152  
 45 uuggaucaaa uauaagauuc ccu 23

<210> 153  
 <211> 21  
 50 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 55 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena codificante de ARNbc dirigida contra apoB

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1  
 60 <223> /mod\_base = "nucleósido: carece de grupo 5'-fosfato"

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 7, 8, 10, 12, 13, 14, 19  
 65 <223> /mod\_base = "2'-O-metilnucleósido correspondiente"

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 21  
 <223> /mod\_base = "base 5'-fosforotioato correspondiente"  
 5  
 <400> 153  
 ggaaucuuau auuugaucca a 21  
 <210> 154  
 10 <211> 23  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 15 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena no codificante de ARNbc dirigida contra apoB  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1  
 20 <223> /mod\_base = "nucleósido: carece de grupo 5'-fosfato"  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1,2, 7, 11, 13, 18, 21  
 25 <223> /mod\_base = "2'-O-metilnucleósido correspondiente"  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 23  
 30 <223> /mod\_base = "base 5'-fosforotioato correspondiente"  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 22  
 35 <223> /mod\_base = "base 2'-O-metil-5'-fosforotioato correspondiente"  
 <400> 154  
 uuggaucaaa uauaagauuc ccu 23  
 40 <210> 155  
 <211> 19  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
 45 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena codificante de ARNbc dirigida contra aha1  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1  
 50 <223> /mod\_base = "nucleósido: carece de grupo 5'-fosfato"  
 <400> 155  
 ggauagaagug gagauuagu 19  
 55 <210> 156  
 <211> 19  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
 60 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena no codificante de ARNbc dirigida contra aha1  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1  
 65 <223> /mod\_base = "nucleósido: carece de grupo 5'-fosfato"

<223> /mod\_base = "nucleósido: carece de grupo 5'-fosfato"

<400> 156  
 acuaaucucc acuucaucc 19

5 <210> 157  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena codificante de ARNbc targeting ahal

15 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1  
 <223> /mod\_base = "nucleósido: carece de grupo 5'-fosfato"

20 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 4, 9, 15, 16, 19  
 <223> /mod\_base = "2'-O-metilnucleósido correspondiente"

25 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 21  
 <223> /mod\_base = "timidina 5'-fosforotioato"

30 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1,2, 3, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 12, 13, 14, 17, 18  
 <223> /mod\_base = "2'-hidroxi-nucleósido correspondiente"

35 <400> 157  
 ggauagaagug gagauuagut t 21

<210> 158  
 <211> 21  
 <212> ADN

40 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena no codificante de ARNbc dirigida contra aha1

45 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1  
 <223> /mod\_base = "nucleósido: carece de grupo 5'-fosfato"

50 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 3, 10, 15  
 <223> /mod\_base = "2'-O-metilnucleósido correspondiente"

55 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 21  
 <223> /mod\_base = "timidina 5'-fosforotioato"

60 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1,2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 13, 14, 16, 17, 18, 19  
 <223> /mod\_base = "2'-hidroxi-nucleósido correspondiente"

<400> 158

65 acuaaucucc acuucaucct t 21

<210> 159  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 5  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena codificante de ARNbc dirigida contra aha1  
 <220>  
 10 <221> base\_modificada  
 <222> 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19  
 <223> /mod\_base = "2'-O-metilnucleósido correspondiente"  
 <220>  
 15 <221> base\_modificada  
 <222> 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "2'-desoxi-2'-fluoro-nucleósido correspondiente"  
 <220>  
 20 <221> base\_modificada  
 <222> 2  
 <223> /mod\_base = "base 2'-desoxi-2'-fluoro-5'-fosforotioato correspondiente"  
 <220>  
 25 <221> base\_modificada  
 <222> 20  
 <223> /mod\_base = "desoxitimidina con enlace 3',3"  
 <400> 159  
 30 acuaaucucc acuucaucct 20  
 <210> 160  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 35 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena no codificante de ARNbc dirigida contra aha1  
 <220>  
 40 <221> base\_modificada  
 <222> 1  
 <223> /mod\_base = "nucleósido: carece de grupo 5'-fosfato"  
 <220>  
 45 <221> base\_modificada  
 <222> 1  
 <223> /mod\_base = "base con engarzador 5'-hexilamino (NH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>)"  
 <220>  
 50 <221> base\_modificada  
 <222> 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "2'-O-metilnucleósido correspondiente"  
 <220>  
 55 <221> base\_modificada  
 <222> 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19  
 <223> /mod\_base = "2'-desoxi-2'-fluoro-nucleósido correspondiente"  
 <220>  
 60 <221> base\_modificada  
 <222> 20  
 <223> /mod\_base = "desoxitimidina con enlace 3',3"  
 <400> 160  
 65 ggauaagug gagauagut 20

<210> 161  
 <211> 19  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
 5  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena codificante de ARNbc  
 <400> 161  
 10 gcaaaggcgu gccaacuca 19  
 <210> 162  
 <211> 19  
 <212> ARN  
 15 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena no codificante de ARNbc  
 20 <400> 162  
 ugaguuggca cgccuuugc 19  
 <210> 163  
 <211> 19  
 25 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena codificante de ARNbc  
 30 <400> 163  
 ggaucaucuc aagucuuac 19  
 <210> 164  
 <211> 19  
 35 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 40 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena no codificante de ARNbc  
 <400> 164  
 gaaagacuug agaugauc 19  
 45 <210> 165  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 50 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena codificante de ARNbc  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 55 <222> 1  
 <223> /mod\_base = "nucleósido: carece de grupo 5'-fosfato"  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 60 <222> 1  
 <223> /mod\_base = "base con engarzador 5'-hexilamino (NH2C6)"  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 65 <222> 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "2'-O-metilnucleósido correspondiente"



<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19  
 <223> /mod\_base = "2'-desoxi-2'-fluoro-nucleósido correspondiente"  
 5

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 20  
 <223> /mod\_base = "desoxitimidina con enlace 3',3"  
 10

<400> 165  
 gcaaaggcgu gccaacucat                    20

<210> 166  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena no codificante de ARNbc

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19  
 <223> /mod\_base = "2'-O-metilnucleósido correspondiente"  
 25

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "2'-desoxi-2'-fluoro-nucleósido correspondiente"  
 30

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 20  
 <223> /mod\_base = "desoxitimidina con enlace 3',3"  
 35

<400> 166  
 ugaguuggca cgccuuugct                    20

<210> 167  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena codificante de ARNbc

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1  
 <223> /mod\_base = "nucleósido: carece de grupo 5'-fosfato"  
 50

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1  
 <223> /mod\_base = "base con engarzador 5'-hexilamino (NH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>)"  
 55

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 2, 8, 10, 12, 13, 16, 17, 18  
 <223> /mod\_base = "2'-O-metilnucleósido correspondiente"  
 60

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 21  
 <223> /mod\_base = "timidina 5'-fosforotioato"  
 65

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 11, 14, 15, 19  
 <223> /mod\_base = "2'-hidroxi-nucleósido correspondiente"  
 5  
 <400> 167  
 gcaaaggcgu gccaacucat t 21  
 <210> 168  
 10 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 15 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena no codificante de ARNbc  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1  
 20 <223> /mod\_base = "nucleósido: carece de grupo 5'-fosfato"  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 9  
 25 <223> /mod\_base = "2'-O-metilnucleósido correspondiente"  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 21  
 30 <223> /mod\_base = "timidina 5'-fosforotioato"  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1,2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19  
 35 <223> /mod\_base = "2'-hidroxi-nucleósido correspondiente"  
 <400> 168  
 ugaguuggca cgccuuugct t 21  
 40 <210> 169  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 45 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena codificante de ARNbc  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 50 <222> 1  
 <223> /mod\_base = "nucleósido: carece de grupo 5'-fosfato"  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1  
 55 <223> /mod\_base = "base con engarzador 5'-hexilamino (NH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>)"  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 4, 5, 7, 8, 9, 10, 14, 15, 16, 17, 19  
 60 <223> /mod\_base = "2'-desoxi-2'-fluoro-nucleósido correspondiente"  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 21  
 65 <223> /mod\_base = "timidina 5'-fosforotioato"

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1,2, 3, 6, 11, 12, 13, 18  
 <223> /mod\_base = "2'-hidroxi-nucleósido correspondiente"  
 5  
 <400> 169  
 ggaucaucuc aagucuuact t 21  
 <210> 170  
 10 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 15 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena no codificante de ARNbc  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1  
 20 <223> /mod\_base = "nucleósido: carece de grupo 5'-fosfato"  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 2, 7, 8, 9, 14, 17, 18, 19  
 25 <223> /mod\_base = "2'-desoxi-2'-fluoro-nucleósido correspondiente"  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 21  
 30 <223> /mod\_base = "timidina 5'-fosforotioato"  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1, 3, 4, 5, 6, 10, 11, 12, 13, 15, 16  
 35 <223> /mod\_base = "2'-hidroxi-nucleósido correspondiente"  
 <400> 170  
 guaagacuug agaugaucct t 21  
 40 <210> 171  
 <211> 19  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
 45 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena codificante de ARNbc dirigida contra PTPN1  
 <400> 171  
 50 ugaccacagu cggauuaaa 19  
 <210> 172  
 <211> 19  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
 55 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena no codificante de ARNbc dirigida contra PTPN1  
 <400> 172  
 60 uuuuauccga cugugguca 19  
 <210> 173  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 65 <213> Secuencia artificial

ES 2 574 177 T3

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena codificante de ARNbc targeting PTPN1

5 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1  
 <223> /mod\_base = "nucleósido: carece de grupo 5'-fosfato"

10 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1  
 <223> /mod\_base = "base con engarzador 5'-hexilamino (NH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>)"

15 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "2'-O-metilnucleósido correspondiente"

20 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19  
 <223> /mod\_base = "2'-desoxi-2'-fluoro-nucleósido correspondiente"

25 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 20  
 <223> /mod\_base = "desoxitimidina con enlace 3',3'"

30 <400> 173  
 ugaccacagu cggauuaaat 20

<210> 174  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 35 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena no codificante de ARNbc dirigida contra PTPN1

40 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19  
 <223> /mod\_base = "2'-O-metilnucleósido correspondiente"

45 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "2'-desoxi-2'-fluoro-nucleósido correspondiente"

50 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 2  
 <223> /mod\_base = "base 2'-desoxi-2'-fluoro-5'-fosforotioato correspondiente"

55 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 20  
 <223> /mod\_base = "desoxitimidina con enlace 3',3'"

60 <400> 174  
 uuuaaucga cuguggucac 20

<210> 175  
 <211> 21  
 65 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

## ES 2 574 177 T3

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena codificante de ARNbc targeting PTPN1

5 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1  
 <223> /mod\_base = "nucleósido: carece de grupo 5'-fosfato"

10 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1  
 <223> /mod\_base = "base con engarzador 5'-hexilamino (NH2C6)"

15 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1,4, 5, 7, 10, 11, 15, 16  
 <223> /mod\_base = "2'-O-metilnucleósido correspondiente"

20 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 21  
 <223> /mod\_base = "timidina 5'-fosforotioato"

25 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 2, 3, 6, 8, 9, 12, 13, 14, 17, 18, 19  
 <223> /mod\_base = "2'-hidroxi-nucleósido correspondiente"

30 <400> 175  
 ugaccacagu cggauuaaat t                    21

<210> 176  
 <211> 21  
 <212> ADN

35 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena no codificante de ARNbc dirigida contra PTPN1

40 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1, 3, 17, 18  
 <223> /mod\_base = "2'-O-metilnucleósido correspondiente"

45 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 21  
 <223> /mod\_base = "timidina 5'-fosforotioato"

50 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 19  
 <223> /mod\_base = "2'-hidroxi-nucleósido correspondiente"

55 <400> 176  
 uuuaauccga cuguggucat t                    21

<210> 177  
 <211> 21  
 <212> ADN

60 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena no codificante de ARNbc dirigida contra PTPN1

65 <220>

<221> base\_modificada  
 <222> 1  
 <223> /mod\_base = "nucleósido: carece de grupo 5'-fosfato"

5

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 3, 18  
 <223> /mod\_base = "2'-O-metilnucleósido correspondiente"

10

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 21  
 <223> /mod\_base = "timidina 5'-fosforotioato"

15

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1,2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 19  
 <223> /mod\_base = "2'-hidroxi-nucleósido correspondiente"

20

<400> 177  
 uuuuauccga cuguggucac t 21

<210> 178  
 <211> 19

25

<212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena no codificante de ARNbc

30

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 2..19  
 <223> /mod\_base = "2'-hidroxi-nucleósido correspondiente"

35

<400> 178  
 tgaguuggca cgccuuugc                    19

<210> 179  
 <211> 20

40

<212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena codificante de ARNbc

45

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1  
 <223> /mod\_base = "5'-N-acetilgalactosamina (GalNac) unida por medio de engarzador hexilamino (NHC6)"

50

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "2'-O-metilnucleósido correspondiente"

55

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19  
 <223> /mod\_base = "2'-desoxi-2'-fluoro-nucleósido correspondiente"

60

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 20  
 <223> /mod\_base = "desoxitimidina con enlace 3',3'"

65

<400> 179

ES 2 574 177 T3

gcaaaggcgu gccaacucat 20

<210> 180  
 <211> 21  
 5 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena codificante de ARNbc

10 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1  
 <223> /mod\_base = "5'-N-acetilgalactosamina (GalNac) unida por medio de engarzador hexilamino (NHC6)"

15 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 2, 8, 10, 12, 13, 16, 17, 18  
 <223> /mod\_base = "2'-O-metilnucleósido correspondiente"

20 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 21  
 <223> /mod\_base = "timidina 5'-fosforotioato"

25 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 11, 14, 15, 19  
 <223> /mod\_base = "2'-hidroxi-nucleósido correspondiente"

30 <400> 180  
 gcaaaggcgu gccaacucat t 21

<210> 181  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena codificante de ARNbc

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1  
 45 <223> /mod\_base = "nucleósido: carece de grupo 5'-fosfato"

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18  
 50 <223> /mod\_base = "2'-O-metilnucleósido correspondiente"

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19  
 <223> /mod\_base = "2'-desoxi-2'-fluoro-nucleósido correspondiente"

55 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 20  
 <223> /mod\_base = "desoxitimidina con enlace 3',3'"

60 <400> 181  
 gcaaaggcgu gccaacucat 20

<210> 182  
 <211> 21  
 <212> ADN

65

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena codificante de ARNbc

<220>

<221> base\_modificada

<222> 1

<223> /mod\_base = "nucleósido: carece de grupo 5'-fosfato"

10 <220>

<221> base\_modificada

<222> 2, 8, 10, 12, 13, 16, 17, 18

<223> /mod\_base = "2'-O-metilnucleósido correspondiente"

15 <220>

<221> base\_modificada

<222> 21

<223> /mod\_base = "timidina 5'-fosforotioato"

20 <220>

<221> base\_modificada

<222> 1, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 11, 14, 15, 19

<223> /mod\_base = "2'-hidroxi-nucleósido correspondiente"

25 <400> 182  
gcaaaggcgu gccaacucat t 21

30 <210> 183  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>

35 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena codificante de ARNbc

<220>

<221> base\_modificada

<222> 1

40 <223> /mod\_base = "compuesto de colesterol de fórmula II unido en 5"

<220>

<221> base\_modificada

<222> 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18

45 <223> /mod\_base = "2'-O-metilnucleósido correspondiente"

<220>

<221> base\_modificada

<222> 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19

50 <223> /mod\_base = "2'-desoxi-2'-fluoro-nucleósido correspondiente"

<220>

<221> base\_modificada

<222> 20

<223> /mod\_base = "desoxitimidina con enlace 3',3"

55 <400> 183  
gcaaaggcgu gccaacucat 20

60 <210> 184  
<211> 19  
<212> ARN  
<213> Secuencia artificial

<220>

65 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena codificante de ARNbc



<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1  
 <223> /mod\_base = "nucleósido: carece de grupo 5'-fosfato"  
 5

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "2'-O-metilnucleósido correspondiente"  
 10

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17  
 <223> /mod\_base = "2'-desoxi-2'-fluoro-nucleósido correspondiente"  
 15

<400> 184  
 gcaaaggcgu gccaacuca                      19

<210> 185  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena no codificante de ARNbc

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19  
 <223> /mod\_base = "2'-O-metilnucleósido correspondiente"  
 30

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1,4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "2'-desoxi-2'-fluoro-nucleósido correspondiente"  
 35

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 2  
 <223> /mod\_base = "base 2'-desoxi-2'-fluoro-5'-fosforotioato correspondiente"  
 40

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 20  
 <223> /mod\_base = "desoxitimidina con enlace 3',3"  
 45

<400> 185  
 ugaguuggca cgccuuugct                      20

<210> 186  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena no codificante de ARNbc

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19  
 <223> /mod\_base = "2'-O-metilnucleósido correspondiente"  
 60

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 2  
 <223> /mod\_base = "2'-desoxinucleósido correspondiente"  
 65

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "2'-desoxi-2'-fluoro-nucleósido correspondiente"  
 5

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1  
 <223> /mod\_base = "timidina 5'-fosforotioato"  
 10

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 20  
 <223> /mod\_base = "desoxitimidina con enlace 3',3"  
 15

<400> 186  
 tgaguuggca cgccuugct                      20

<210> 187  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 20

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena no codificante de ARNbc  
 25

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19  
 <223> /mod\_base = "2'-O-metilnucleósido correspondiente"  
 30

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "2'-desoxi-2'-fluoro-nucleósido correspondiente"  
 35

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 2  
 <223> /mod\_base = "base 2'-desoxi-2'-fluoro-5'-fosforotioato correspondiente"  
 40

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1  
 <223> /mod\_base = "timidina 5'-fosforotioato"  
 45

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 20  
 <223> /mod\_base = "desoxitimidina con enlace 3',3"  
 50

<400> 187  
 tgaguuggca cgccuugct                      20

<210> 188  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 55

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena no codificante de ARNbc  
 60

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19  
 <223> /mod\_base = "2'-O-metilnucleósido correspondiente"  
 65

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "2'-desoxi-2'-fluoro-nucleósido correspondiente"  
 5

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 2  
 <223> /mod\_base = "5'-tio 5'-desoxi"  
 10

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 20  
 <223> /mod\_base = "desoxitimidina con enlace 3',3"  
 15

<400> 188  
 tgaguuggca cgccuuugct                    20

<210> 189  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena no codificante de ARNbc

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19  
 <223> /mod\_base = "2'-O-metilnucleósido correspondiente"  
 30

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "2'-desoxi-2'-fluoro-nucleósido correspondiente"  
 35

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 2  
 <223> /mod\_base = "base 2'-desoxi-2'-fluoro-5'-fosforotioato correspondiente"  
 40

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 20  
 <223> /mod\_base = "desoxitimidina con enlace 3',3"  
 45

<400> 189  
 tgaguuggca cgccuuugct                    20

<210> 190  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena no codificante de ARNbc

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19  
 <223> /mod\_base = "2'-O-metilnucleósido correspondiente"  
 60

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "2'-desoxi-2'-fluoro-nucleósido correspondiente"  
 65

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 2  
 <223> /mod\_base = "base 2'-desoxi-2'-fluoro-5'-fosforotioato correspondiente"  
 5

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 20  
 <223> /mod\_base = "desoxitimidina con enlace 3',3"  
 10

<400> 190  
 ugaguuggca cgccuuugct                    20

<210> 191  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena no codificante de ARNbc

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19  
 <223> /mod\_base = "2'-O-metilnucleósido correspondiente"  
 25

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "2'-desoxi-2'-fluoro-nucleósido correspondiente"  
 30

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1  
 <223> /mod\_base = "base 2'-desoxi-2'-fluoro-5'-fosforotioato correspondiente"  
 35

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 20  
 <223> /mod\_base = "desoxitimidina con enlace 3',3"  
 40

<400> 191  
 ugaguuggca cgccuuugct                    20

<210> 192  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena no codificante de ARNbc

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1  
 <223> /mod\_base = "nucleósido: carece de grupo 5'-fosfato"  
 55

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19  
 <223> /mod\_base = "2'-O-metilnucleósido correspondiente"  
 60

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1,4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "2'-desoxi-2'-fluoro-nucleósido correspondiente"  
 65

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 2  
 <223> /mod\_base = "base 2'-desoxi-2'-fluoro-5'-fosforotioato correspondiente"  
 5  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 20  
 <223> /mod\_base = "desoxitimidina con enlace 3',3"  
 10  
 <400> 192  
 ugaguuggca cgccuuugct                    20  
 15  
 <210> 193  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 20  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena no codificante de ARNbc  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19  
 25  
 <223> /mod\_base = "2'-O-metilnucleósido correspondiente"  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18  
 30  
 <223> /mod\_base = "2'-desoxi-2'-fluoro-nucleósido correspondiente"  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1, 2  
 35  
 <223> /mod\_base = "base 2'-desoxi-2'-fluoro-5'-fosforotioato correspondiente"  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 20  
 40  
 <223> /mod\_base = "desoxitimidina con enlace 3',3"  
 <400> 193  
 ugaguuggca cgccuuugct                    20  
 45  
 <210> 194  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 50  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena no codificante de ARNbc  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19  
 55  
 <223> /mod\_base = "2'-O-metilnucleósido correspondiente"  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18  
 60  
 <223> /mod\_base = "2'-desoxi-2'-fluoro-nucleósido correspondiente"  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 2  
 65  
 <223> /mod\_base = "5'-tio,5'-desoxi"

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1  
 <223> /mod\_base = "timidina 5'-fosforotioato"  
 5

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 20  
 <223> /mod\_base = "desoxitimidina con enlace 3',3"  
 10

<400> 194  
 tgaguuggca cgccuuugct                    20

<210> 195  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena no codificante de ARNbc

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1  
 <223> /mod\_base = "nucleósido: carece de grupo 5'-fosfato"  
 25

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19  
 <223> /mod\_base = "2'-O-metilnucleósido correspondiente"  
 30

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "2'-desoxi-2'-fluoro-nucleósido correspondiente"  
 35

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 2  
 <223> /mod\_base = "base 2'-desoxi-2'-fluoro-5'-fosforotioato correspondiente"  
 40

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 20  
 <223> /mod\_base = "desoxitimidina con enlace 3',3"  
 45

<400> 195  
 ugaguuggca cgccuuugct                    20  
 <210> 196

<211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena no codificante de ARNbc

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1  
 <223> /mod\_base = "nucleósido: carece de grupo 5'-fosfato"  
 60

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19  
 <223> /mod\_base = "2'-O-metilnucleósido correspondiente"  
 65

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "2'-desoxi-2'-fluoro-nucleósido correspondiente"  
 5

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 20  
 <223> /mod\_base = "desoxitimidina con enlace 3',3"  
 10

<400> 196  
 ugaguuggca cgccuuugct                    20

<210> 197  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena no codificante de ARNbc

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1  
 <223> /mod\_base = "nucleósido: carece de grupo 5'-fosfato"  
 25

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19  
 <223> /mod\_base = "2'-O-metilnucleósido correspondiente"  
 30

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "2'-desoxi-2'-fluoro-nucleósido correspondiente"  
 35

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 2  
 <223> /mod\_base = "base 2'-desoxi-2'-fluoro-5'-fosforotioato correspondiente"  
 40

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 20  
 <223> /mod\_base = "desoxitimidina con enlace 3',3"  
 45

<400> 197  
 tgaguuggca cgccuuugct                    20  
 <210> 198

<211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena no codificante de ARNbc

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19  
 <223> /mod\_base = "2'-O-metilnucleósido correspondiente"  
 60

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "2'-desoxi-2'-fluoro-nucleósido correspondiente"  
 65

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1  
 <223> /mod\_base = "timidina 5'-fosforotioato"  
 5

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 20  
 <223> /mod\_base = "desoxitimidina con enlace 3',3"  
 10

<400> 198  
 tgaguuggca cgccuuugct                    20

<210> 199  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena no codificante de ARNbc

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1  
 <223> /mod\_base = "nucleósido: carece de grupo 5'-fosfato"  
 25

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19  
 <223> /mod\_base = "2'-O-metilnucleósido correspondiente"  
 30

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "2'-desoxi-2'-fluoro-nucleósido correspondiente"  
 35

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 2  
 <223> /mod\_base = "5'-tio,5'-desoxi"  
 40

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 20  
 <223> /mod\_base = "desoxitimidina con enlace 3',3"  
 45

<400> 199  
 tgaguuggca cgccuuugct                    20  
 <210> 200  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena codificante de ARNbc dirigida contra EGFP

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1  
 <223> /mod\_base = "nucleósido: carece de grupo 5'-fosfato"  
 60

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1,4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "2'-O-metilnucleósido correspondiente"  
 65



<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19  
 <223> /mod\_base = "2'-desoxi-2'-fluoro-nucleósido correspondiente"  
 5

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 2  
 <223> /mod\_base = "base 2'-O-metil-5'-fosforotioato correspondiente"  
 10

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 20  
 <223> /mod\_base = "desoxitimidina con enlace 3',3"  
 15

<400> 200  
 gcuggaguuc gugaccgcct                    20

<210> 201  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena codificante de ARNbc dirigida contra EGFP

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1  
 <223> /mod\_base = "nucleósido: carece de grupo 5'-fosfato"  
 30

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1,2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "2'-O-metilnucleósido correspondiente"  
 35

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19  
 <223> /mod\_base = "2'-desoxi-2'-fluoro-nucleósido correspondiente"  
 40

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 20  
 <223> /mod\_base = "desoxitimidina con enlace 3',3"  
 45

<400> 201  
 gcuggaguuc gugaccgcct                    20

<210> 202  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena codificante de ARNbc dirigida contra EGFP

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1  
 <223> /mod\_base = "nucleósido: carece de grupo 5'-fosfato"  
 60

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1,4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "2'-O-metilnucleósido correspondiente"  
 65

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19  
 <223> /mod\_base = "2'-desoxi-2'-fluoro-nucleósido correspondiente"  
 5

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 2  
 <223> /mod\_base = "base 2'-O-metil-5'-fosforotioato correspondiente"  
 10

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 21  
 <223> /mod\_base = "timidina 5'-fosforotioato"  
 15

<400> 202  
 gcuggaguuc gugaccgct t                    21

<210> 203  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena codificante de ARNbc dirigida contra EGFP

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1  
 <223> /mod\_base = "nucleósido: carece de grupo 5'-fosfato"  
 30

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1,2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "2'-O-metilnucleósido correspondiente"  
 35

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19  
 <223> /mod\_base = "2'-desoxi-2'-fluoro-nucleósido correspondiente"  
 40

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 21  
 <223> /mod\_base = "timidina 5'-fosforotioato"  
 45

<400> 203  
 gcuggaguuc gugaccgct t                    21

<210> 204  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena codificante de ARNbc dirigida contra EGFP

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1  
 <223> /mod\_base = "nucleósido: carece de grupo 5'-fosfato"  
 60

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "2'-O-metilnucleósido correspondiente"  
 65

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19  
 <223> /mod\_base = "2'-desoxi-2'-fluoro-nucleósido correspondiente"  
 5

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 20  
 <223> /mod\_base = "desoxitimidina con enlace 3',3"  
 10

<400> 204  
 gcuggaguuc gugaccgct                    20

<210> 205  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena codificante de ARNbc dirigida contra EGFP

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1  
 <223> /mod\_base = "nucleósido: carece de grupo 5'-fosfato"  
 25

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "2'-O-metilnucleósido correspondiente"  
 30

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19  
 <223> /mod\_base = "2'-desoxi-2'-fluoro-nucleósido correspondiente"  
 35

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 2  
 <223> /mod\_base = "base 2'-O-metil-5'-fosforotioato correspondiente"  
 40

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 20  
 <223> /mod\_base = "desoxitimidina con enlace 3',3"  
 45

<400> 205  
 gcuggaguuc gugaccgct                    20  
 <210> 206  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena codificante de ARNbc dirigida contra EGFP

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1  
 <223> /mod\_base = "nucleósido: carece de grupo 5'-fosfato"  
 60

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "2'-O-metilnucleósido correspondiente"  
 65

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19  
 <223> /mod\_base = "2'-desoxi-2'-fluoro-nucleósido correspondiente"  
 5

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 21  
 <223> /mod\_base = "timidina 5'-fosforotioato"  
 10

<400> 206  
 gcuggaguuc gugaccgct t                    21

<210> 207  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena codificante de ARNbc dirigida contra EGFP

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1  
 <223> /mod\_base = "nucleósido: carece de grupo 5'-fosfato"  
 25

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "2'-O-metilnucleósido correspondiente"  
 30

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19  
 <223> /mod\_base = "2'-desoxi-2'-fluoro-nucleósido correspondiente"  
 35

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 21  
 <223> /mod\_base = "desoxitimidina con enlace 3',3"  
 40

<400> 207  
 gcuggaguuc gugaccgct t                    21

<210> 208  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena codificante de ARNbc dirigida contra EGFP

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1  
 <223> /mod\_base = "nucleósido: carece de grupo 5'-fosfato"  
 55

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1,4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "2'-O-metilnucleósido correspondiente"  
 60

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19  
 <223> /mod\_base = "2'-desoxi-2'-fluoro-nucleósido correspondiente"  
 65

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 2  
 <223> /mod\_base = "base 2'-O-metil-5'-fosforotioato correspondiente"  
 5

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 21  
 <223> /mod\_base = "desoxitimidina con enlace 3',3"  
 10

<400> 208  
 gcuggaguuc gugaccgct t                    21

<210> 209  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena codificante de ARNbc dirigida contra EGFP

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1  
 <223> /mod\_base = "nucleósido: carece de grupo 5'-fosfato"  
 25

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "2'-O-metilnucleósido correspondiente"  
 30

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19  
 <223> /mod\_base = "2'-desoxi-2'-fluoro-nucleósido correspondiente"  
 35

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 2  
 <223> /mod\_base = "base 2'-O-metil-5'-fosforotioato correspondiente"  
 40

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 21  
 <223> /mod\_base = "timidina 5'-fosforotioato"  
 45

<400> 209  
 gcuggaguuc gugaccgct t                    21  
 <210> 210  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena codificante de ARNbc dirigida contra EGFP

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1  
 <223> /mod\_base = "nucleósido: carece de grupo 5'-fosfato"  
 60

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "2'-O-metilnucleósido correspondiente"  
 65

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19  
 <223> /mod\_base = "2'-desoxi-2'-fluoro-nucleósido correspondiente"  
 5

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 2  
 <223> /mod\_base = "base 2'-O-metil-5'-fosforotioato correspondiente"  
 10

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 21  
 <223> /mod\_base = "desoxitimidina con enlace 3',3"  
 15

<400> 210  
 gcuggaguuc gugaccgct t                    21

<210> 211  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena codificante de ARNbc dirigida contra EGFP

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1  
 <223> /mod\_base = "nucleósido: carece de grupo 5'-fosfato"  
 30

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1,2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "2'-O-metilnucleósido correspondiente"  
 35

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19  
 <223> /mod\_base = "2'-desoxi-2'-fluoro-nucleósido correspondiente"  
 40

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 21  
 <223> /mod\_base = "desoxitimidina con enlace 3',3"  
 45

<400> 211  
 gcuggaguuc gugaccgct t                    21  
 <210> 212  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena codificante de ARNbc dirigida contra EGFP

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1  
 <223> /mod\_base = "nucleósido: carece de grupo 5'-fosfato"  
 60

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 2, 3, 8, 9, 10, 12, 15, 16, 18, 19  
 <223> /mod\_base = "2'-O-metilnucleósido correspondiente"  
 65

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 21  
 <223> /mod\_base = "timidina 5'-fosforotioato"  
 5

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1,4, 5, 6, 7, 11, 13, 14, 17  
 <223> /mod\_base = "2'-hidroxi-nucleósido correspondiente"  
 10

<400> 212  
 gcuggaguuc gugaccgct t                    21

<210> 213  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena no codificante de ARNbc dirigida contra EGFP

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19  
 <223> /mod\_base = "2'-O-metilnucleósido correspondiente"  
 25

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1  
 <223> /mod\_base = "2'-desoxinucleósido correspondiente"  
 30

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "2'-desoxi-2'-fluoro-nucleósido correspondiente"  
 35

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 2  
 <223> /mod\_base = "base 2'-desoxi-2'-fluoro-5'-fosforotioato correspondiente"  
 40

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 21  
 <223> /mod\_base = "timidina 5'-fosforotioato"  
 45

<400> 213  
 ggcggucacg aacuccagct t                    21  
 <210> 214  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena no codificante de ARNbc dirigida contra EGFP

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1  
 <223> /mod\_base = "nucleósido: carece de grupo 5'-fosfato"  
 60

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19  
 <223> /mod\_base = "2'-O-metilnucleósido correspondiente"  
 65

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1  
 <223> /mod\_base = "2'-desoxinucleósido correspondiente"  
 5

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "2'-desoxi-2'-fluoro-nucleósido correspondiente"  
 10

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 2  
 <223> /mod\_base = "base 2'-desoxi-2'-fluoro-5'-fosforotioato correspondiente"  
 15

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 21  
 <223> /mod\_base = "timidina 5'-fosforotioato"  
 20

<400> 214  
 ggcggucacg aacuccagct t            21

<210> 215  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 25

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena no codificante de ARNbc dirigida contra EGFP  
 30

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19  
 <223> /mod\_base = "2'-O-metilnucleósido correspondiente"  
 35

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1,4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "2'-desoxi-2'-fluoro-nucleósido correspondiente"  
 40

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 2  
 <223> /mod\_base = "base 2'-desoxi-2'-fluoro-5'-fosforotioato correspondiente"  
 45

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 21  
 <223> /mod\_base = "timidina 5'-fosforotioato"  
 50

<400> 215  
 ggcggucacg aacuccagct t            21

<210> 216  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 55

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena no codificante de ARNbc dirigida contra EGFP  
 60

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1  
 <223> /mod\_base = "nucleósido: carece de grupo 5'-fosfato"  
 65



<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19  
 <223> /mod\_base = "2'-O-metilnucleósido correspondiente"  
 5

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1,4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "2'-desoxi-2'-fluoro-nucleósido correspondiente"  
 10

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 2  
 <223> /mod\_base = "base 2'-desoxi-2'-fluoro-5'-fosforotioato correspondiente"  
 15

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 21  
 <223> /mod\_base = "timidina 5'-fosforotioato"  
 20

<400> 216  
 gccggucacg aacuccagct t 21

<210> 217  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 25

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena no codificante de ARNbc dirigida contra EGFP  
 30

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19  
 <223> /mod\_base = "2'-O-metilnucleósido correspondiente"  
 35

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1  
 <223> /mod\_base = "2'-desoxinucleósido correspondiente"  
 40

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "2'-desoxi-2'-fluoro-nucleósido correspondiente"  
 45

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 2  
 <223> /mod\_base = "base 2'-desoxi-2'-fluoro-5'-fosforotioato correspondiente"  
 50

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 20  
 <223> /mod\_base = "desoxitimidina con enlace 3',3'"  
 55

<400> 217  
 gccggucacg aacuccagct 20

<210> 218  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 60

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena no codificante de ARNbc dirigida contra EGFP  
 65

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19  
 <223> /mod\_base = "2'-O-metilnucleósido correspondiente"  
 5

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1,4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "2'-desoxi-2'-fluoro-nucleósido correspondiente"  
 10

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 2  
 <223> /mod\_base = "base 2'-desoxi-2'-fluoro-5'-fosforotioato correspondiente"  
 15

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 21  
 <223> /mod\_base = "desoxitimidina con enlace 3',3"  
 20

<400> 218  
 gccggucacg aacuccagct t            21

<210> 219  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 25

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena no codificante de ARNbc dirigida contra EGFP  
 30

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19  
 <223> /mod\_base = "2'-O-metilnucleósido correspondiente"  
 35

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1  
 <223> /mod\_base = "2'-desoxinucleósido correspondiente"  
 40

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "2'-desoxi-2'-fluoro-nucleósido correspondiente"  
 45

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 2  
 <223> /mod\_base = "base 2'-desoxi-2'-fluoro-5'-fosforotioato correspondiente"  
 50

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 21  
 <223> /mod\_base = "desoxitimidina con enlace 3',3"  
 55

<400> 219  
 gccggucacg aacuccagct t            21

<210> 220  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 60

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena no codificante de ARNbc  
 65

targeting EGFP

```

<220>
<221> base_modificada
5 <222> 1
<223> /mod_base = "nucleósido: carece de grupo 5'-fosfato"

<220>
<221> base_modificada
10 <222> 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19
<223> /mod_base = "2'-O-metilnucleósido correspondiente"

<220>
<221> base_modificada
15 <222> 1,4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18
<223> /mod_base = "2'-desoxi-2'-fluoro-nucleósido correspondiente"

<220>
<221> base_modificada
20 <222> 2
<223> /mod_base = "base 2'-desoxi-2'-fluoro-5'-fosforotioato correspondiente"

<220>
<221> base_modificada
25 <222> 20
<223> /mod_base = "desoxitimidina con enlace 3',3'"

<400> 220
30 ggcggucacg aacuccagct          20

<210> 221
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
35

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: cadena no codificante de ARNbc dirigida contra EGFP

<220>
40 <221> base_modificada
<222> 1
<223> /mod_base = "nucleósido: carece de grupo 5'-fosfato"

<220>
45 <221> base_modificada
<222> 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19
<223> /mod_base = "2'-O-metilnucleósido correspondiente"

<220>
50 <221> base_modificada
<222> 1
<223> /mod_base = "2'-desoxinucleósido correspondiente"

<220>
55 <221> base_modificada
<222> 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18
<223> /mod_base = "2'-desoxi-2'-fluoro-nucleósido correspondiente"

<220>
60 <221> base_modificada
<222> 2
<223> /mod_base = "base 2'-desoxi-2'-fluoro-5'-fosforotioato correspondiente"

<220>
65 <221> base_modificada
<222> 20

```

<223> /mod\_base = "desoxitimidina con enlace 3',3'"

<400> 221  
gcgguacg aacuccagct 20

5 <210> 222  
<211> 21  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

10 <220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: cadena no codificante de ARNbc dirigida contra EGFP

<220>

15 <221> base\_modificada  
<222> 1  
<223> /mod\_base = "nucleósido: carece de grupo 5'-fosfato"

<220>

20 <221> base\_modificada  
<222> 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19  
<223> /mod\_base = "2'-O-metilnucleósido correspondiente"

<220>

25 <221> base\_modificada  
<222> 1,4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18  
<223> /mod\_base = "2'-desoxi-2'-fluoro-nucleósido correspondiente"

<220>

30 <221> base\_modificada  
<222> 2  
<223> /mod\_base = "base 2'-desoxi-2'-fluoro-5'-fosforioato correspondiente"

<220>

35 <221> base\_modificada  
<222> 21  
<223> /mod\_base = "desoxitimidina con enlace 3',3'"

<400> 222  
40 gcgguacg aacuccagct t                    21

<210> 223  
<211> 21  
<212> ADN

45 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: cadena no codificante de ARNbc dirigida contra EGFP

<220>

50 <221> base\_modificada  
<222> 1  
<223> /mod\_base = "nucleósido: carece de grupo 5'-fosfato"

<220>

55 <221> base\_modificada  
<222> 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19  
<223> /mod\_base = "2'-O-metilnucleósido correspondiente"

<220>

60 <221> base\_modificada  
<222> 1  
<223> /mod\_base = "2'-desoxinucleósido correspondiente"

<220>

65 <221> base\_modificada

<222> 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "2'-desoxi-2'-fluoro-nucleósido correspondiente"

5 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 2  
 <223> /mod\_base = "base 2'-desoxi-2'-fluoro-5'-fosforotioato correspondiente"

10 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 21  
 <223> /mod\_base = "desoxitimidina con enlace 3',3'"

15 <400> 223  
 gccggucacg aacuccagct t 21

<210> 224  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 20 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena no codificante de ARNbc dirigida contra EGFP

25 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19  
 <223> /mod\_base = "2'-O-metilnucleósido correspondiente"

30 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1,4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "2'-desoxi-2'-fluoro-nucleósido correspondiente"

35 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 2  
 <223> /mod\_base = "base 2'-desoxi-2'-fluoro-5'-fosforotioato correspondiente"

40 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 20  
 <223> /mod\_base = "desoxitimidina con enlace 3',3'"

45 <400> 224  
 gccggucacg aacuccagct 20  
 <210> 225  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 50 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena no codificante de ARNbc dirigida contra EGFP

55 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1  
 <223> /mod\_base = "nucleósido: carece de grupo 5'-fosfato"

60 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 7, 16  
 <223> /mod\_base = "2'-O-metilnucleósido correspondiente"

65 <220>  
 <221> base\_modificada

<222> 21  
 <223> /mod\_base = "timidina 5'-fosforotioato"

<220>  
 5 <221> base\_modificada  
 <222> 1,2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 17, 18, 19  
 <223> /mod\_base = "2'-hidroxi-nucleósido correspondiente"

<400> 225  
 10 ggcggucacg aacuccagct t 21

<210> 226  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 15 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena codificante de ARNbc dirigida contra aha1

<220>  
 20 <221> base\_modificada  
 <222> 1  
 <223> /mod\_base = "nucleósido: carece de grupo 5'-fosfato"

<220>  
 25 <221> base\_modificada  
 <222> 1,4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "2'-O-metilnucleósido correspondiente"

<220>  
 30 <221> base\_modificada  
 <222> 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19  
 <223> /mod\_base = "2'-desoxi-2'-fluoro-nucleósido correspondiente"

<220>  
 35 <221> base\_modificada  
 <222> 2  
 <223> /mod\_base = "base 2'-O-metil-5'-fosforotioato correspondiente"

<220>  
 40 <221> base\_modificada  
 <222> 21  
 <223> /mod\_base = "timidina 5'-fosforotioato"

<400> 226  
 45 ggauagaagug gagauuagut t 21  
 <210> 227  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 50 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena codificante de ARNbc dirigida contra aha1

<220>  
 55 <221> base\_modificada  
 <222> 1  
 <223> /mod\_base = "nucleósido: carece de grupo 5'-fosfato"

<220>  
 60 <221> base\_modificada  
 <222> 1,4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "2'-O-metilnucleósido correspondiente"

<220>  
 65 <221> base\_modificada

<222> 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19  
 <223> /mod\_base = "2'-desoxi-2'-fluoro-nucleósido correspondiente"

5 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 2  
 <223> /mod\_base = "base 2'-O-metil-5'-fosforotioato correspondiente"

10 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 20  
 <223> /mod\_base = "desoxitimidina con enlace 3',3'"

15 <400> 227  
 ggaugaagug gagauuagut 20  
 <210> 228  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 20 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena codificante de ARNbc dirigida contra aha1

25 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1  
 <223> /mod\_base = "nucleósido: carece de grupo 5'-fosfato"

30 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "2'-O-metilnucleósido correspondiente"

35 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19  
 <223> /mod\_base = "2'-desoxi-2'-fluoro-nucleósido correspondiente"

40 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 2  
 <223> /mod\_base = "base 2'-O-metil-5'-fosforotioato correspondiente"

45 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 21  
 <223> /mod\_base = "timidina 5'-fosforotioato"

50 <400> 228  
 ggaugaagug gagauuagut t 21  
 <210> 229  
 <211> 21  
 55 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena codificante de ARNbc dirigida contra aha1

60 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1  
 <223> /mod\_base = "nucleósido: carece de grupo 5'-fosfato"

65 <220>

<221> base\_modificada  
 <222> 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "2'-O-metilnucleósido correspondiente"

5

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19  
 <223> /mod\_base = "2'-desoxi-2'-fluoro-nucleósido correspondiente"

10

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 2  
 <223> /mod\_base = "base 2'-O-metil-5'-fosforotioato correspondiente"

15

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 21  
 <223> /mod\_base = "desoxitimidina con enlace 3',3'"

20

<400> 229  
 ggauagaagug gagauuagut t 21

<210> 230  
 <211> 21

25

<212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena codificante de ARNbc dirigida contra aha1

30

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1  
 <223> /mod\_base = "nucleósido: carece de grupo 5'-fosfato"

35

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1,2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "2'-O-metilnucleósido correspondiente"

40

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19  
 <223> /mod\_base = "2'-desoxi-2'-fluoro-nucleósido correspondiente"

45

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 21  
 <223> /mod\_base = "timidina 5'-fosforotioato"

50

<400> 230  
 ggauagaagug gagauuagut t 21

<210> 231  
 <211> 20

55

<212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena codificante de ARNbc dirigida contra aha1

60

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1

65

<223> /mod\_base = "nucleósido: carece de grupo 5'-fosfato"



<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "2'-O-metilnucleósido correspondiente"  
 5

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19  
 <223> /mod\_base = "2'-desoxi-2'-fluoro-nucleósido correspondiente"  
 10

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 2  
 <223> /mod\_base = "base 2'-O-metil-5'-fosforotioato correspondiente"  
 15

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 20  
 <223> /mod\_base = "desoxitimidina con enlace 3',3"  
 20

<400> 231  
 ggaugaagug gagauuagut                      20

<210> 232  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 25

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena codificante de ARNbc dirigida contra aha1  
 30

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1  
 <223> /mod\_base = "nucleósido: carece de grupo 5'-fosfato"  
 35

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1,2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "2'-O-metilnucleósido correspondiente"  
 40

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19  
 <223> /mod\_base = "2'-desoxi-2'-fluoro-nucleósido correspondiente"  
 45

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 20  
 <223> /mod\_base = "desoxitimidina con enlace 3',3"  
 50

<400> 232  
 ggaugaagug gagauuagut                      20

<210> 233  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 55

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena codificante de ARNbc dirigida contra aha1  
 60

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1  
 <223> /mod\_base = "nucleósido: carece de grupo 5'-fosfato"  
 65

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "2'-O-metilnucleósido correspondiente"  
 5

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19  
 <223> /mod\_base = "2'-desoxi-2'-fluoro-nucleósido correspondiente"  
 10

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 21  
 <223> /mod\_base = "desoxitimidina con enlace 3',3"  
 15

<400> 233  
 ggauagaagug gagauuagut t 21

<210> 234  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena codificante de ARNbc dirigida contra aha1  
 25

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1  
 <223> /mod\_base = "nucleósido: carece de grupo 5'-fosfato"  
 30

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "2'-O-metilnucleósido correspondiente"  
 35

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19  
 <223> /mod\_base = "2'-desoxi-2'-fluoro-nucleósido correspondiente"  
 40

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 20  
 <223> /mod\_base = "desoxitimidina con enlace 3',3"  
 <400> 234  
 ggauagaagug gagauuagut                      20  
 45

<210> 235  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena codificante de ARNbc dirigida contra aha1  
 55

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1  
 <223> /mod\_base = "nucleósido: carece de grupo 5'-fosfato"  
 60

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1,4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "2'-O-metilnucleósido correspondiente"  
 65

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19  
 <223> /mod\_base = "2'-desoxi-2'-fluoro-nucleósido correspondiente"  
 5

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 2  
 <223> /mod\_base = "base 2'-O-metil-5'-fosforotioato correspondiente"  
 10

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 21  
 <223> /mod\_base = "desoxitimidina con enlace 3',3"  
 15

<400> 235  
 ggauagaug gagauagut t 21

<210> 236  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena codificante de ARNbc dirigida contra aha1

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1  
 <223> /mod\_base = "nucleósido: carece de grupo 5'-fosfato"  
 30

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "2'-O-metilnucleósido correspondiente"  
 35

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19  
 <223> /mod\_base = "2'-desoxi-2'-fluoro-nucleósido correspondiente"  
 40

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 21  
 <223> /mod\_base = "timidina 5'-fosforotioato"  
 <400> 236  
 ggauagaug gagauagut t 21

<210> 237  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena codificante de ARNbc dirigida contra aha1

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1  
 <223> /mod\_base = "nucleósido: carece de grupo 5'-fosfato"  
 60

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1,2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "2'-O-metilnucleósido correspondiente"  
 65

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19  
 <223> /mod\_base = "2'-desoxi-2'-fluoro-nucleósido correspondiente"  
 5

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 21  
 <223> /mod\_base = "desoxitimidina con enlace 3',3"  
 10

<400> 237  
 ggauagaagug gagauuagut t 21

<210> 238  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena no codificante de ARNbc dirigida contra aha1  
 20

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1  
 <223> /mod\_base = "nucleósido: carece de grupo 5'-fosfato"  
 25

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19  
 <223> /mod\_base = "2'-O-metilnucleósido correspondiente"  
 30

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1  
 <223> /mod\_base = "2'-desoxinucleósido correspondiente"  
 35

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "2'-desoxi-2'-fluoro-nucleósido correspondiente"  
 40

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 2  
 <223> /mod\_base = "base 2'-desoxi-2'-fluoro-5'-fosforotioato correspondiente"  
 45

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 21  
 <223> /mod\_base = "timidina 5'-fosforotioato"  
 50

<400> 238  
 acuaaucucc acuucauct t                    21

<210> 239  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena no codificante de ARNbc dirigida contra aha1  
 60

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1  
 <223> /mod\_base = "nucleósido: carece de grupo 5'-fosfato"  
 65

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19  
 <223> /mod\_base = "2'-O-metilnucleósido correspondiente"  
 5

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1,4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "2'-desoxi-2'-fluoro-nucleósido correspondiente"  
 10

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 2  
 <223> /mod\_base = "base 2'-desoxi-2'-fluoro-5'-fosforotioato correspondiente"  
 15

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 21  
 <223> /mod\_base = "desoxitimidina con enlace 3',3"  
 20

<400> 239  
 acuaaucucc acuucaucct t            21

<210> 240  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 25

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena no codificante de ARNbc dirigida contra aha1  
 30

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1  
 <223> /mod\_base = "nucleósido: carece de grupo 5'-fosfato"  
 35

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19  
 <223> /mod\_base = "2'-O-metilnucleósido correspondiente"  
 40

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1,4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "2'-desoxi-2'-fluoro-nucleósido correspondiente"  
 45

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 2  
 <223> /mod\_base = "base 2'-desoxi-2'-fluoro-5'-fosforotioato correspondiente"  
 50

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 21  
 <223> /mod\_base = "timidina 5'-fosforotioato"  
 55

<400> 240  
 acuaaucucc acuucaucct t            21

<210> 241  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 60

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena no codificante de ARNbc dirigida contra aha1  
 65

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19  
 <223> /mod\_base = "2'-O-metilnucleósido correspondiente"  
 5

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1,4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "2'-desoxi-2'-fluoro-nucleósido correspondiente"  
 10

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 2  
 <223> /mod\_base = "base 2'-desoxi-2'-fluoro-5'-fosforotioato correspondiente"  
 15

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 20  
 <223> /mod\_base = "desoxitimidina con enlace 3',3"  
 20

<400> 241  
 acuaaucucc acucaucct 20

<210> 242  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena no codificante de ARNbc dirigida contra aha1  
 30

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19  
 <223> /mod\_base = "2'-O-metilnucleósido correspondiente"  
 35

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1  
 <223> /mod\_base = "2'-desoxinucleósido correspondiente"  
 40

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "2'-desoxi-2'-fluoro-nucleósido correspondiente"  
 45

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 2  
 <223> /mod\_base = "base 2'-desoxi-2'-fluoro-5'-fosforotioato correspondiente"  
 50

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 21  
 <223> /mod\_base = "desoxitimidina con enlace 3',3"  
 55

<400> 242  
 acuaaucucc acucaucct t 21

<210> 243  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena no codificante de ARNbc dirigida contra aha1  
 65

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19  
 <223> /mod\_base = "2'-O-metilnucleósido correspondiente"  
 5

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1  
 <223> /mod\_base = "2'-desoxinucleósido correspondiente"  
 10

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "2'-desoxi-2'-fluoro-nucleósido correspondiente"  
 15

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 2  
 <223> /mod\_base = "base 2'-desoxi-2'-fluoro-5'-fosforotioato correspondiente"  
 20

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 20  
 <223> /mod\_base = "desoxitimidina con enlace 3',3"  
 25

<400> 243  
 acuaaucucc acuucauct                      20

<210> 244  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena no codificante de ARNbc dirigida contra aha1

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1  
 <223> /mod\_base = "nucleósido: carece de grupo 5'-fosfato"  
 40

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19  
 <223> /mod\_base = "2'-O-metilnucleósido correspondiente"  
 45

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1  
 <223> /mod\_base = "2'-desoxinucleósido correspondiente"  
 50

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "2'-desoxi-2'-fluoro-nucleósido correspondiente"  
 55

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 2  
 <223> /mod\_base = "base 2'-desoxi-2'-fluoro-5'-fosforotioato correspondiente"  
 60

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 21  
 <223> /mod\_base = "desoxitimidina con enlace 3',3"  
 65

<400> 244

acuaaucucc acuucaucct t 21

<210> 245  
 <211> 20  
 5 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena no codificante de ARNbc dirigida contra aha1

10 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1  
 <223> /mod\_base = "nucleósido: carece de grupo 5'-fosfato"

15 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19  
 <223> /mod\_base = "2'-O-metilnucleósido correspondiente"

20 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1  
 <223> /mod\_base = "2'-desoxinucleósido correspondiente"

25 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "2'-desoxi-2'-fluoro-nucleósido correspondiente"

30 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 2  
 <223> /mod\_base = "base 2'-desoxi-2'-fluoro-5'-fosforotioato correspondiente"

35 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 20  
 <223> /mod\_base = "desoxitimidina con enlace 3',3'"

40 <400> 245  
 acuaaucucc acuucaucct 20

45 <210> 246  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

50 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena no codificante de ARNbc dirigida contra aha1

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1  
 55 <223> /mod\_base = "nucleósido: carece de grupo 5'-fosfato"

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19  
 60 <223> /mod\_base = "2'-O-metilnucleósido correspondiente"

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1,4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18  
 65 <223> /mod\_base = "2'-desoxi-2'-fluoro-nucleósido correspondiente"



<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 2  
 <223> /mod\_base = "base 2'-desoxi-2'-fluoro-5'-fosforotioato correspondiente"  
 5  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 20  
 <223> /mod\_base = "desoxitimidina con enlace 3',3"  
 10  
 <400> 246  
 acuaaucucc acuucaucct 20  
 <210> 247  
 <211> 19  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
 15  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena codificante de ARNbc  
 <400> 247  
 guuggugaau ggagcucag 19  
 20  
 <210> 248  
 <211> 19  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
 25  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena no codificante de ARNbc  
 <400> 248  
 cugagcucca uucaccaac 19  
 30  
 <210> 249  
 <211> 19  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
 35  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena codificante de ARNbc  
 <400> 249  
 gguccuguug uuggugaau 19  
 40  
 <210> 250  
 <211> 19  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
 45  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena no codificante de ARNbc  
 <400> 250  
 auucaccaac aacaggacc 19  
 50  
 <210> 251  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 55  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena codificante de ARNbc  
 60  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 65

<222> 1  
 <223> /mod\_base = "nucleósido: carece de grupo 5'-fosfato"

5 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1  
 <223> /mod\_base = "base con engarzador 5'-hexilamino (NH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>)"

10 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "2'-O-metilnucleósido correspondiente"

15 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19  
 <223> /mod\_base = "2'-desoxi-2'-fluoro-nucleósido correspondiente"

20 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 20  
 <223> /mod\_base = "desoxitimidina con enlace 3',3'"

25 <400> 251  
 guuggugaau ggagcucagt 20

<210> 252  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 30 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena no codificante de ARNbc

35 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19  
 <223> /mod\_base = "2'-O-metilnucleósido correspondiente"

40 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1,4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "2'-desoxi-2'-fluoro-nucleósido correspondiente"

45 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 2  
 <223> /mod\_base = "base 2'-desoxi-2'-fluoro-5'-fosforotioato correspondiente"

50 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 20  
 <223> /mod\_base = "desoxitimidina con enlace 3',3'"

55 <400> 252  
 cugagcucca uucaccaact 20

<210> 253  
 <211> 20  
 60 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena codificante de ARNbc

65 <220>

<221> base\_modificada  
 <222> 1  
 <223> /mod\_base = "nucleósido: carece de grupo 5'-fosfato"

5

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1  
 <223> /mod\_base = "base con engarzador 5'-hexilamino (NH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>)"

10

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "2'-O-metilnucleósido correspondiente"

15

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19  
 <223> /mod\_base = "2'-desoxi-2'-fluoro-nucleósido correspondiente"

20

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 20  
 <223> /mod\_base = "desoxitimidina con enlace 3',3'"

25

<400> 253  
 gguccuguug uuggugaaut                      20

<210> 254  
 <211> 21

30

<212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena no codificante de ARNbc

35

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19  
 <223> /mod\_base = "2'-O-metilnucleósido correspondiente"

40

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1,4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "2'-desoxi-2'-fluoro-nucleósido correspondiente"

45

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 2  
 <223> /mod\_base = "base 2'-desoxi-2'-fluoro-5'-fosforotioato correspondiente"

50

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 21  
 <223> /mod\_base = "timidina 5'-fosforotioato"

55

<400> 254  
 auucaccaac aacaggacct t                      21

<210> 255  
 <211> 21

60

<212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena no codificante de ARNbc

65

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19  
 <223> /mod\_base = "2'-O-metilnucleósido correspondiente"  
 5

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1,4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "2'-desoxi-2'-fluoro-nucleósido correspondiente"  
 10

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 2  
 <223> /mod\_base = "base 2'-desoxi-2'-fluoro-5'-fosforotioato correspondiente"  
 15

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 21  
 <223> /mod\_base = "timidina 5'-fosforotioato"  
 20

<400> 255  
 cugagcucca uucaccaact t            21

<210> 256  
 <211> 19  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 25

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena no codificante de ARNbc  
 30

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 2..19  
 <223> /mod\_base = "2'-hidroxi-nucleósido correspondiente"  
 35

<400> 256  
 tgaguuggca cgccuuugc            19

<210> 257  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 40

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena codificante de ARNbc  
 45

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1  
 <223> /mod\_base = "compuesto de 5'-colesterol de fórmula II"  
 50

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "2'-O-metilnucleósido correspondiente"  
 55

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19  
 <223> /mod\_base = "2'-desoxi-2'-fluoro-nucleósido correspondiente"  
 60

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 20  
 <223> /mod\_base = "desoxitimidina con enlace 3',3'"  
 65

<400> 257  
gcaaaggcgu gccaacucat 20

5 <210> 258  
<211> 21  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
10 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena codificante de ARNbc

<220>  
<221> base\_modificada  
<222> 1  
15 <223> /mod\_base = "compuesto de 5'-colesterol de fórmula II"

<220>  
<221> base\_modificada  
<222> 2, 8, 10, 12, 13, 16, 17, 18  
20 <223> /mod\_base = "2'-O-metilnucleósido correspondiente"

<220>  
<221> base\_modificada  
<222> 21  
25 <223> /mod\_base = "timidina 5'-fosforotioato"

<220>  
<221> base\_modificada  
<222> 1, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 11, 14, 15, 19  
30 <223> /mod\_base = "2'-hidroxi-nucleósido correspondiente"

<400> 258  
gcaaaggcgu gccaacucat t 21

35 <210> 259  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

40 <220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: cadena codificante de ARNbc

<220>  
<221> base\_modificada  
45 <222> 1  
<223> /mod\_base = "compuesto de 5'-colesterol de fórmula II unido por medio de C6SSC6"

<220>  
<221> base\_modificada  
50 <222> 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18  
<223> /mod\_base = "2'-O-metilnucleósido correspondiente"

<220>  
<221> base\_modificada  
55 <222> 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19  
<223> /mod\_base = "2'-desoxi-2'-fluoro-nucleósido correspondiente"

<220>  
<221> base\_modificada  
60 <222> 20  
<223> /mod\_base = "desoxitimidina con enlace 3',3'"

<400> 259  
gcaaaggcgu gccaacucat 20

65 <210> 260

<211> 23  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

5 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena codificante de ARNbc

<220>  
 <221> base\_modificada  
 10 <222> 1  
 <223> /mod\_base = "compuesto de colesterol de fórmula II unido en 5'"

<220>  
 <221> base\_modificada  
 15 <222> 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21  
 <223> /mod\_base = "2'-O-metilnucleósido correspondiente"

<220>  
 <221> base\_modificada  
 20 <222> 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22  
 <223> /mod\_base = "2'-desoxi-2'-fluoro-nucleósido correspondiente"

<220>  
 <221> base\_modificada  
 25 <222> 23  
 <223> /mod\_base = "desoxitimidina con enlace 3',3'"

<220>  
 <221> base\_modificada  
 30 <222> 1..3  
 <223> /mod\_base = "2'-hidroxi-nucleósido correspondiente"

<400> 260  
 35 aucgcaaagg cgugccaacu cat 23

<210> 261  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

40 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena codificante de ARNbc

<220>  
 <221> base\_modificada  
 45 <222> 1  
 <223> /mod\_base = "catepsina unida en 5' por medio de compuesto de colesterol de fórmula II y hexilamino engarzador (NHC6)"

<220>  
 <221> base\_modificada  
 50 <222> 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "2'-O-metilnucleósido correspondiente"

<220>  
 <221> base\_modificada  
 55 <222> 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19  
 <223> /mod\_base = "2'-desoxi-2'-fluoro-nucleósido correspondiente"

<220>  
 <221> base\_modificada  
 60 <222> 20  
 <223> /mod\_base = "desoxitimidina con enlace 3',3'"

<400> 261  
 65 gcaaaggcgu gccaacucat 20

<210> 262  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 5  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena no codificante de ARNbc  
 <220>  
 10 <221> base\_modificada  
 <222> 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19  
 <223> /mod\_base = "2'-O-metilnucleósido correspondiente"  
 <220>  
 15 <221> base\_modificada  
 <222> 1,4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "2'-desoxi-2'-fluoro-nucleósido correspondiente"  
 <220>  
 20 <221> base\_modificada  
 <222> 2  
 <223> /mod\_base = "base 2'-desoxi-2'-fluoro-5'-fosforotioato correspondiente"  
 <220>  
 25 <221> base\_modificada  
 <222> 20  
 <223> /mod\_base = "desoxitimidina con enlace 3',3"  
 <400> 262  
 30 ugaguuggca cgccuugct 20  
 <210> 263  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 35 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena no codificante de ARNbc  
 <220>  
 40 <221> base\_modificada  
 <222> 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20  
 <223> /mod\_base = "2'-O-metilnucleósido correspondiente"  
 <220>  
 45 <221> base\_modificada  
 <222> 2  
 <223> /mod\_base = "2'-desoxinucleósido correspondiente"  
 <220>  
 50 <221> base\_modificada  
 <222> 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19  
 <223> /mod\_base = "2'-desoxi-2'-fluoro-nucleósido correspondiente"  
 <220>  
 55 <221> base\_modificada  
 <222> 1  
 <223> /mod\_base = "timidina 5'-fosforotioato"  
 <220>  
 60 <221> base\_modificada  
 <222> 21  
 <223> /mod\_base = "desoxitimidina con enlace 3',3"  
 <400> 263  
 65 tgaguuggca cgccuugct 20

<210> 264  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 5  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena no codificante de ARNbc  
 <220>  
 10 <221> base\_modificada  
 <222> 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19  
 <223> /mod\_base = "2'-O-metilnucleósido correspondiente"  
 <220>  
 15 <221> base\_modificada  
 <222> 1,4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "2'-desoxi-2'-fluoro-nucleósido correspondiente"  
 <220>  
 20 <221> base\_modificada  
 <222> 2  
 <223> /mod\_base = "base 2'-desoxi-2'-fluoro-5'-fosforotioato correspondiente"  
 <220>  
 25 <221> base\_modificada  
 <222> 20  
 <223> /mod\_base = "desoxitimidina con enlace 3',3"  
 <400> 264  
 30 ugaguuggca cgccuuugct 20  
 <210> 265  
 <211> 21  
 <212> ARN  
 35 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena codificante de ARNbc dirigida contra apoB  
 <220>  
 40 <221> base\_modificada  
 <222> 1  
 <223> /mod\_base = "compuesto de colesterol de fórmula II unido en 5"  
 <220>  
 45 <221> base\_modificada  
 <222> 7, 8, 10, 12, 13, 14, 19  
 <223> /mod\_base = "2'-O-metilnucleósido correspondiente"  
 <220>  
 50 <221> base\_modificada  
 <222> 21  
 <223> /mod\_base = "base 5'-fosforotioato correspondiente"  
 <400> 265  
 55 ggaauuuau auuugaucca a 21  
 <210> 266  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 60 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena no codificante de ARNbc dirigida contra aha1  
 <220>  
 65 <221> base\_modificada



<222> 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19  
 <223> /mod\_base = "2'-O-metilnucleósido correspondiente"

5 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1  
 <223> /mod\_base = "2'-desoxinucleósido correspondiente"

10 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "2'-desoxi-2'-fluoro-nucleósido correspondiente"

15 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 2  
 <223> /mod\_base = "base 2'-desoxi-2'-fluoro-5'-fosforotioato correspondiente"

20 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 21  
 <223> /mod\_base = "timidina 5'-fosforotioato"

25 <400> 266  
 acuaaucucc acuucaucct t 21

<210> 267  
 <211> 21  
 <212> ADN

30 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena no codificante de ARNbc dirigida contra aha1

35 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19  
 <223> /mod\_base = "2'-O-metilnucleósido correspondiente"

40 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1,4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "2'-desoxi-2'-fluoro-nucleósido correspondiente"

45 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 2  
 <223> /mod\_base = "base 2'-desoxi-2'-fluoro-5'-fosforotioato correspondiente"

50 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 21  
 <223> /mod\_base = "timidina 5'-fosforotioato"

55 <400> 267  
 acuaaucucc acuucaucct t 21  
 <210> 268

<211> 21  
 <212> ADN

60 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena no codificante de ARNbc dirigida contra aha1

65 <220>  
 <221> base\_modificada

## ES 2 574 177 T3

<222> 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19  
 <223> /mod\_base = "2'-O-metilnucleósido correspondiente"

5 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1,4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "2'-desoxi-2'-fluoro-nucleósido correspondiente"

10 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 2  
 <223> /mod\_base = "base 2'-desoxi-2'-fluoro-5'-fosforotioato correspondiente"

15 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 21  
 <223> /mod\_base = "desoxitimidina con enlace 3',3'"

20 <400> 268  
 acuaaucucc acuucauct t                      21

25 <210> 269  
 <211> 17  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: sonda de APN para la detección de la SEQ ID NO. 182 (cadena codificante)

35 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1  
 <223> /mod\_base = "conjugado de Atto425 por medio de engarzador doble de serina (Panagen)"

40 <400> 269  
 tgagttggca cgccttt                      17

45 <210> 270  
 <211> 17  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

50 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: sonda de APN para la detección de la SEQ ID NO. 168 cadena no codificante)

55 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1  
 <223> /mod\_base = "conjugado de Atto425 por medio de engarzador doble de serina (Panagen)"

60 <400> 270  
 gcaaaggcgt gccaact                      17

65 <210> 271  
 <211> 22  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

70 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena codificante de ARNbc dirigida contra FVII

75 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1

<223> /mod\_base = "nucleósido: carece de grupo 5'-fosfato"

5 <400> 271  
 ugugcaaagg cgugccaacu ca 22

<210> 272  
 <211> 23  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena codificante de ARNbc dirigida contra FVII

15 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1  
 <223> /mod\_base = "nucleósido: carece de grupo 5'-fosfato"

20 <400> 272  
 uauugcaaag gcgugccaac uca 23

<210> 273  
 <211> 23  
 <212> ARN

25 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena codificante de ARNbc dirigida contra FVII

30 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1  
 <223> /mod\_base = "nucleósido: carece de grupo 5'-fosfato"

35 <400> 273  
 uguugcaaag gcgugccaac uca 23

<210> 274  
 <211> 23  
 <212> ARN

40 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena codificante de ARNbc dirigida contra FVII

45 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1  
 <223> /mod\_base = "nucleósido: carece de grupo 5'-fosfato"

50 <400> 274  
 uuaggcaaag gcgugccaac uca 23

<210> 275  
 <211> 23  
 <212> ARN

55 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena codificante de ARNbc dirigida contra FVII

60 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1

65 <223> /mod\_base = "nucleósido: carece de grupo 5'-fosfato"

ES 2 574 177 T3

<400> 275  
uagugcaaag gcgugccaac uca 23

5 <210> 276  
<211> 23  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

10 <220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: cadena no codificante de ARNbc dirigida contra FVII

15 <220>  
<221> base\_modificada  
<222> 1  
<223> /mod\_base = "nucleósido: carece de grupo 5'-fosfato"

20 <220>  
<221> base\_modificada  
<222> 1  
<223> /mod\_base = "compuesto de colesterol de fórmula II unido en 5'"

25 <220>  
<221> base\_modificada  
<222> 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21  
<223> /mod\_base = "2'-O-metilnucleósido correspondiente"

30 <220>  
<221> base\_modificada  
<222> 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22  
<223> /mod\_base = "2'-desoxi-2'-fluoro-nucleósido correspondiente"

35 <220>  
<221> base\_modificada  
<222> 23  
<223> /mod\_base = "desoxitimidina con enlace 3',3'"

40 <220>  
<221> base\_modificada  
<222> 2  
<223> /mod\_base = "2'-hidroxi-nucleósido correspondiente"

45 <400> 276  
uaugcaaagg cgugccaacu cat 23  
<210> 277  
<211> 23  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

50 <220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: cadena no codificante de ARNbc dirigida contra FVII

55 <220>  
<221> base\_modificada  
<222> 1  
<223> /mod\_base = "nucleósido: carece de grupo 5'-fosfato"

60 <220>  
<221> base\_modificada  
<222> 1  
<223> /mod\_base = "compuesto de colesterol de fórmula II unido en 5'"

65 <220>  
<221> base\_modificada  
<222> 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21  
<223> /mod\_base = "2'-O-metilnucleósido correspondiente"

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22  
 <223> /mod\_base = "2'-desoxi-2'-fluoro-nucleósido correspondiente"  
 5

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 23  
 <223> /mod\_base = "desoxitimidina con enlace 3',3"  
 10

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 2  
 <223> /mod\_base = "2'-hidroxi-nucleósido correspondiente"  
 15

<400> 277  
 ugugcaaagg cgugccaacu cat        23

<210> 278  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena no codificante de ARNbc dirigida contra FVII  
 25

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1  
 <223> /mod\_base = "nucleósido: carece de grupo 5'-fosfato"  
 30

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1  
 <223> /mod\_base = "compuesto de colesterol de fórmula II unido en 5"  
 35

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22  
 <223> /mod\_base = "2'-O-metilnucleósido correspondiente"  
 40

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21,23  
 <223> /mod\_base = "2'-desoxi-2'-fluoro-nucleósido correspondiente"  
 45

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 24  
 <223> /mod\_base = "desoxitimidina con enlace 3',3"  
 50

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 2  
 <223> /mod\_base = "2'-hidroxi-nucleósido correspondiente"  
 55

<400> 278  
 uauugcaaag gcgugccaac ucat        24

<210> 279  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena no codificante de ARNbc dirigida contra FVII  
 65

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1  
 <223> /mod\_base = "nucleósido: carece de grupo 5'-fosfato"  
 5

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1  
 <223> /mod\_base = "compuesto de colesterol de fórmula II unido en 5"  
 10

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22  
 <223> /mod\_base = "2'-O-metilnucleósido correspondiente"  
 15

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21,23  
 <223> /mod\_base = "2'-desoxi-2'-fluoro-nucleósido correspondiente"  
 20

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 24  
 <223> /mod\_base = "desoxitimidina con enlace 3',3"  
 25

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 2  
 <223> /mod\_base = "2'-hidroxi-nucleósido correspondiente"  
 30

<400> 279  
 uguugcaaag gcgugccaac ucat 24

<210> 280  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena no codificante de ARNbc dirigida contra FVII

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1  
 <223> /mod\_base = "nucleósido: carece de grupo 5'-fosfato"  
 45

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1  
 <223> /mod\_base = "compuesto de colesterol de fórmula II unido en 5"  
 50

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1,2, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22  
 <223> /mod\_base = "2'-O-metilnucleósido correspondiente"  
 55

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21,23  
 <223> /mod\_base = "2'-desoxi-2'-fluoro-nucleósido correspondiente"  
 60

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 24  
 <223> /mod\_base = "desoxitimidina con enlace 3',3"  
 65

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 3..4  
 <223> /mod\_base = "2'-hidroxi-nucleósido correspondiente"  
 5  
 <400> 280  
 uuaggcaaag gcgugccaac ucat 24  
 <210> 281  
 10 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 15 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena no codificante de ARNbc dirigida contra FVII  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1  
 20 <223> /mod\_base = "nucleósido: carece de grupo 5'-fosfato"  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1  
 25 <223> /mod\_base = "compuesto de colesterol de fórmula II unido en 5"  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1,4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22  
 30 <223> /mod\_base = "2'-O-metilnucleósido correspondiente"  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21,23  
 35 <223> /mod\_base = "2'-desoxi-2'-fluoro-nucleósido correspondiente"  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 24  
 40 <223> /mod\_base = "desoxitimidina con enlace 3',3"  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 2..3  
 45 <223> /mod\_base = "2'-hidroxi-nucleósido correspondiente"  
 <400> 281  
 uagugcaaag gcgugccaac ucat 24  
 50 <210> 282  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 55 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena no codificante de ARNbc dirigida contra FVII  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 60 <222> 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19  
 <223> /mod\_base = "2'-O-metilnucleósido correspondiente"  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 65 <222> 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "2'-desoxi-2'-fluoro-nucleósido correspondiente"

## ES 2 574 177 T3

<220>

<221> base\_modificada

<222> 2

<223> /mod\_base = "base 2'-desoxi-2'-fluoro-5'-fosforotioato correspondiente"

5

<220>

<221> base\_modificada

<222> 21

<223> /mod\_base = "timidina 5'-fosforotioato"

10

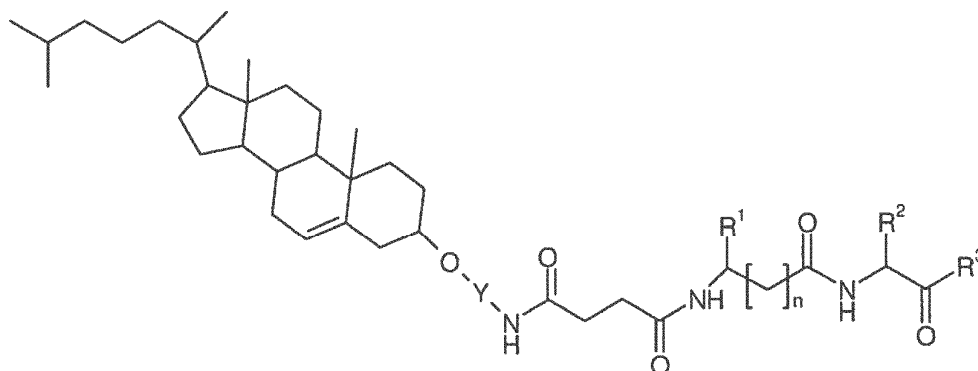
<400> 282

tgaguuggca cgccuugct t 21



REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula



5 en la que (I)

Y es un grupo engarzador seleccionado entre  $-(CH_2)_3-$  o  $-C(O)-N-(CH_2-CH_2-O)_p-CH_2-CH_2-$ ;

$R^1$  es alquil(C1-6);

10 naftil- $(CH_2)-$ ; o

fenil- $(CH_2)_m-$ , cuyo fenilo está sin sustituir o está sustituido hasta cuatro veces con un sustituyente seleccionado de forma independiente entre

- $NO_2$ ,

-CN,

15 halógeno,

fenil- $(CH_2)-O$ ,

alquil(C1-6)-O-, o

-C(O)- $NH_2$ ;

$R^2$  es hidrógeno;

20  $-(CH_2)_k-N-C(Ph)_3$ , cuyos anillos fenilo están sin sustituir o están sustituidos de forma independiente con alquil(C1-4)-O-;

$-(CH_2)_k-C(O)-NH_2$ ;

fenil $(CH_2)_k-$ ;

25 alquil C1-6, que está sin sustituir o está sustituido una vez con -S- $CH_3$ ;

$R^3$  es fenil-NH-, cuyo grupo fenilo está sustituido adicionalmente con un sustituyente seleccionado de forma independiente entre

- $(CH_2)-OH$ ; o

- $(CH_2)-O-C(O)-O-(4-nitro-fenil)$ ;

k es 1, 2, 3, 4, 5, 6;

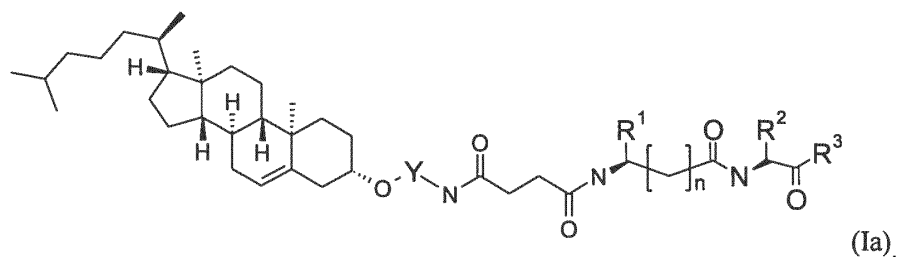
30 m es 1, 2, 3 o 4;

n es 0 o 1;

p es un número entero de 1 a 20 y

35 en los que los grupos  $R^2$  y  $R^3$ , junto con los átomos a los que están unidos, forman un sustrato que puede escindirse con Catepsina B.

2. El compuesto de la reivindicación 1, que tiene la conformación tal como se muestra en la fórmula (Ia).



(Ia).

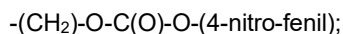
40 3. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en las que Y es  $-(CH_2)_3-$ .

4. El compuesto de la reivindicación 3, en el que

Y es  $-(CH_2)_3-$ ;

$R^2$  es  $-(CH_2)_k-N-C(Ph)_3$ , cuyos anillos fenilo están sin sustituir o están sustituidos de forma independiente con alquil(C1-4)-O-; y

5  $R^3$  es fenil-NH-, cuyo grupo fenilo está sustituido adicionalmente con



n es 0, y

$R^1$  y k tienen los significados dados anteriormente.

10

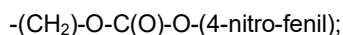
5. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en el que Y es  $-C(O)-N-(CH_2-CH_2-O)_p-CH_2-CH_2-$ .

6. El compuesto de la reivindicación 5, en el que

Y es  $-C(O)-N-(CH_2-CH_2-O)_p-CH_2-CH_2-$ ;

15  $R^2$  es  $-(CH_2)_k-N-C(Ph)_3$ , cuyos anillos fenilo están sin sustituir o están sustituidos de forma independiente con alquil(C1-4)-O-; y

$R^3$  es fenil-NH-, cuyo grupo fenilo está sustituido adicionalmente con



20 n es 0; y

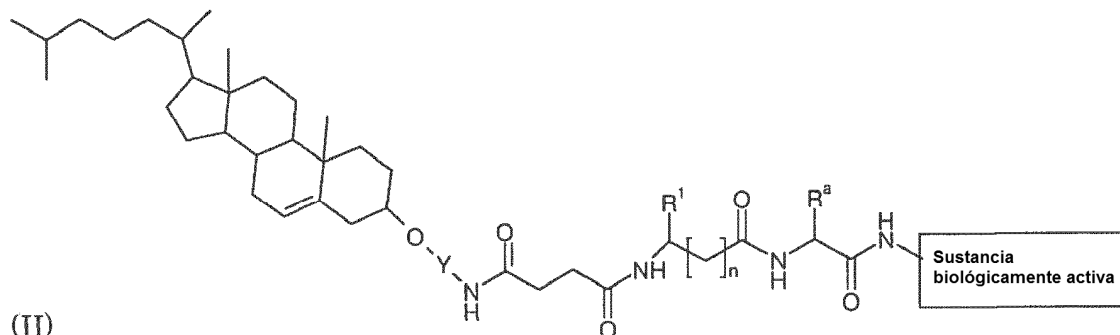
$R^1$ , k y p tienen los significados dados anteriormente.

7. Uso del compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1-6 como un ligando de un compuesto biológicamente activo, en el que dicho ligando está unido de forma covalente al compuesto biológicamente activo.

25

8. Uso de acuerdo con la reivindicación 7, en la que dicho compuesto biológicamente activo es un péptido.

9. Un compuesto de la fórmula:



30

en la que

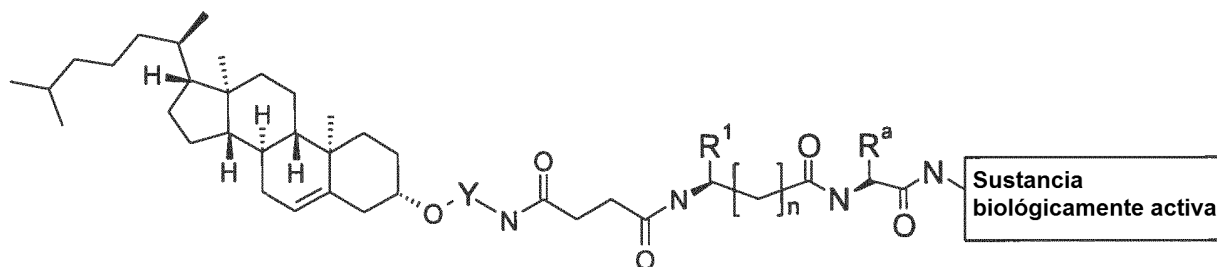
$R^a$  es  $-(CH_2)_k-NH_2$ ;

$R^1$  y k tienen los significados dados para la fórmula (I) anterior;

la sustancia biológicamente activa es una proteína o un péptido; y

35 en la que los grupos  $R^a$  y la sustancia biológicamente activa, junto con los átomos a los que están unidos, forman un sustrato que puede escindirse con Cathepsina B.

10. El compuesto de la reivindicación 9, que tiene la conformación tal como se muestra en la fórmula (IIa)



(IIa)

40

en la que

$R^a$  es  $-(CH_2)_k-NH_2$ ;

R<sup>1</sup> y k tienen los significados dados para la fórmula (I) anterior; y la sustancia biológicamente activa es una proteína o un péptido.

11. Una composición farmacéutica que comprende los compuestos de cualquiera de las reivindicaciones 9 y 10.

5

Fig. 1

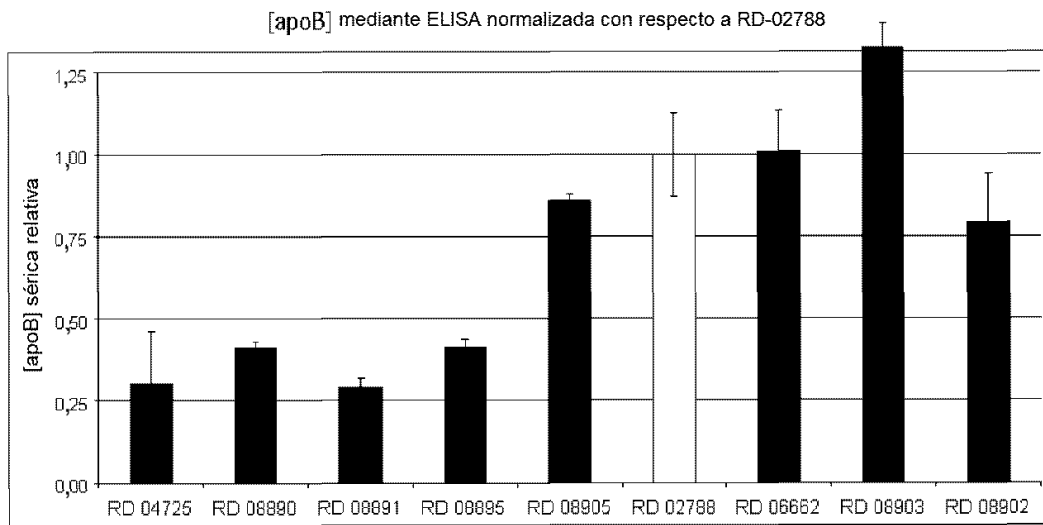


Fig. 2

- [apoB] mediante ELISA normalizada con respecto a RD-02788

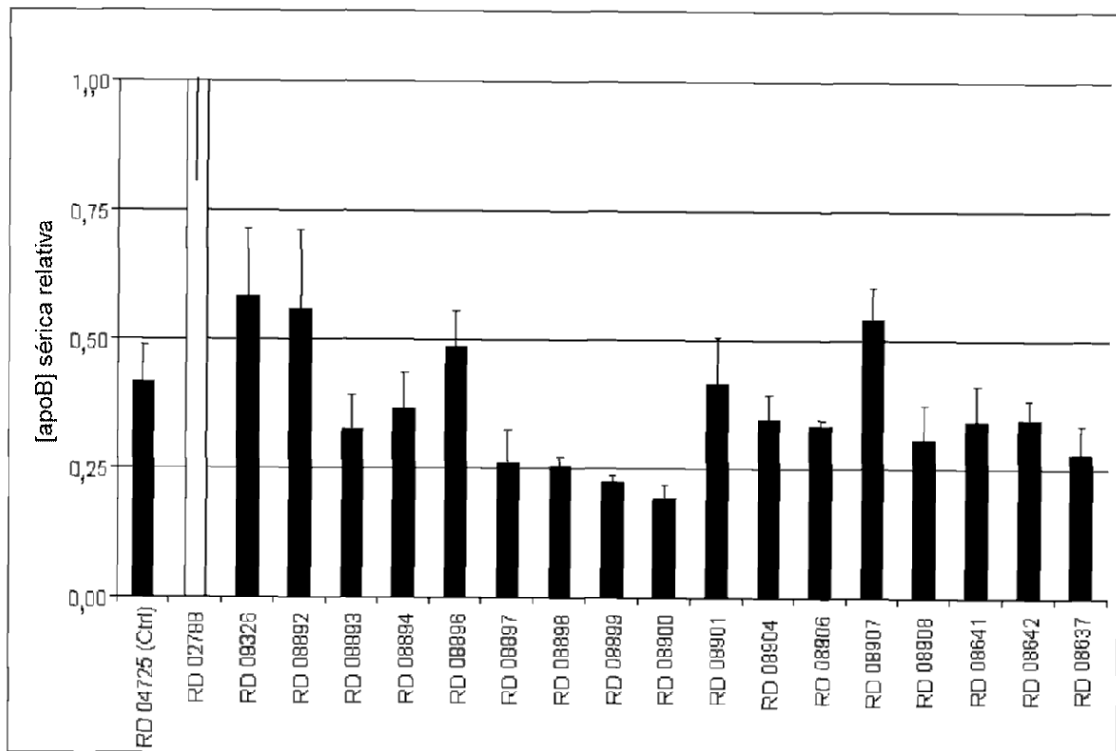


Fig. 3

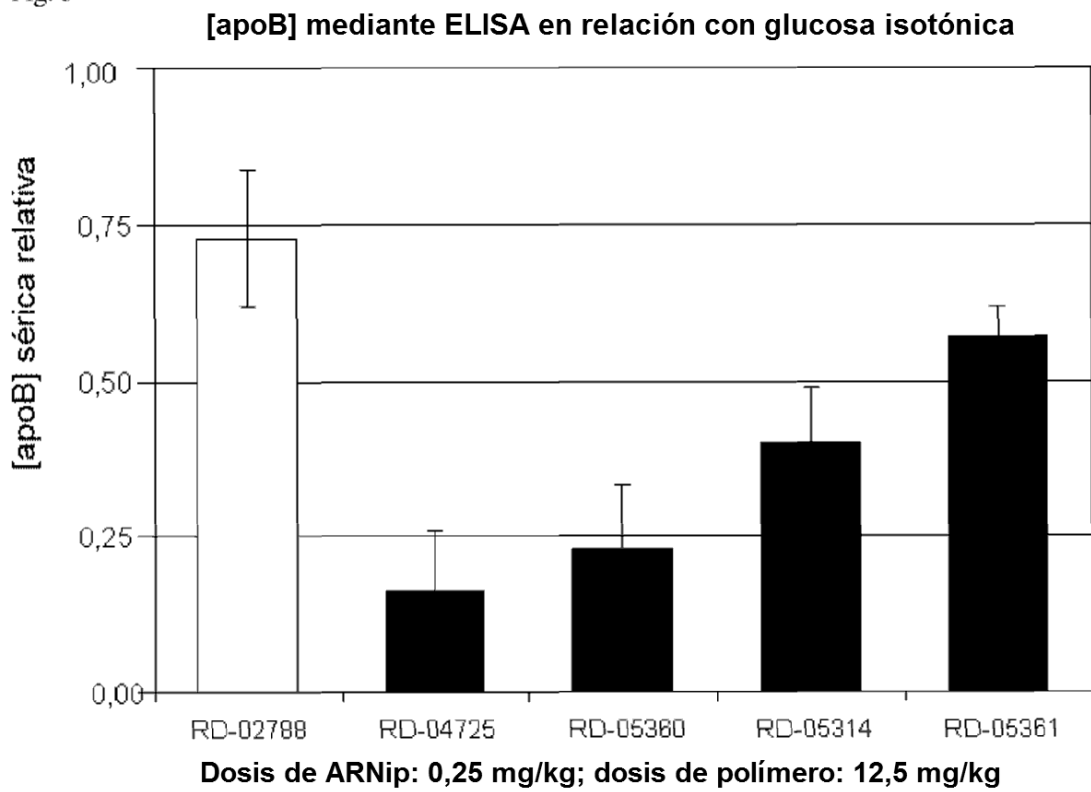


Fig. 4

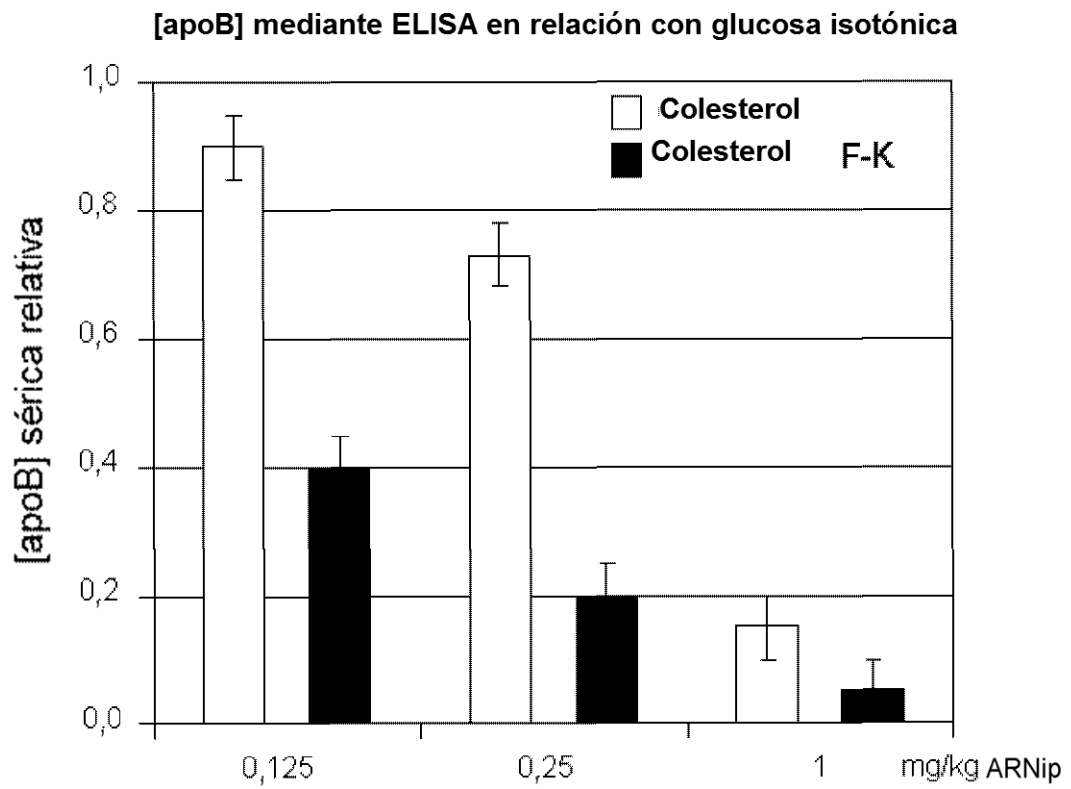


Fig. 5 a)

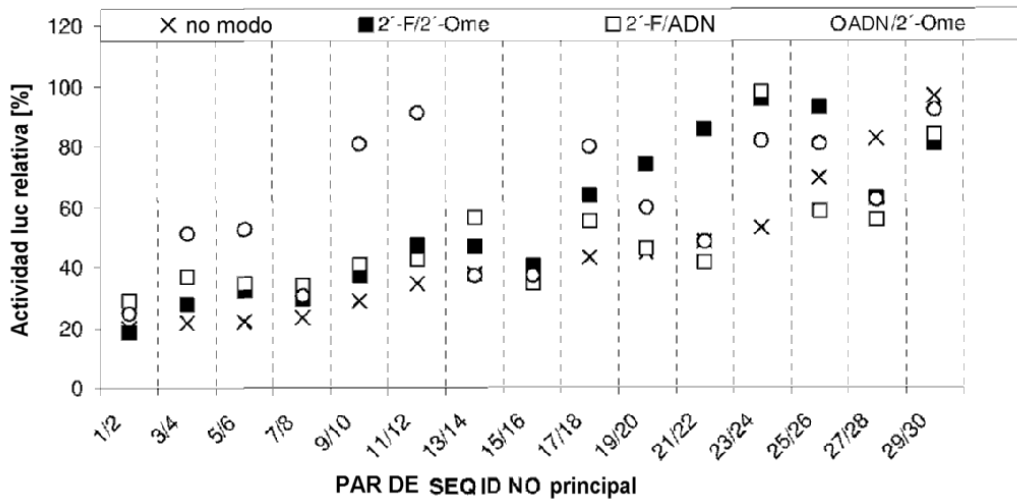


Fig. 5 b)

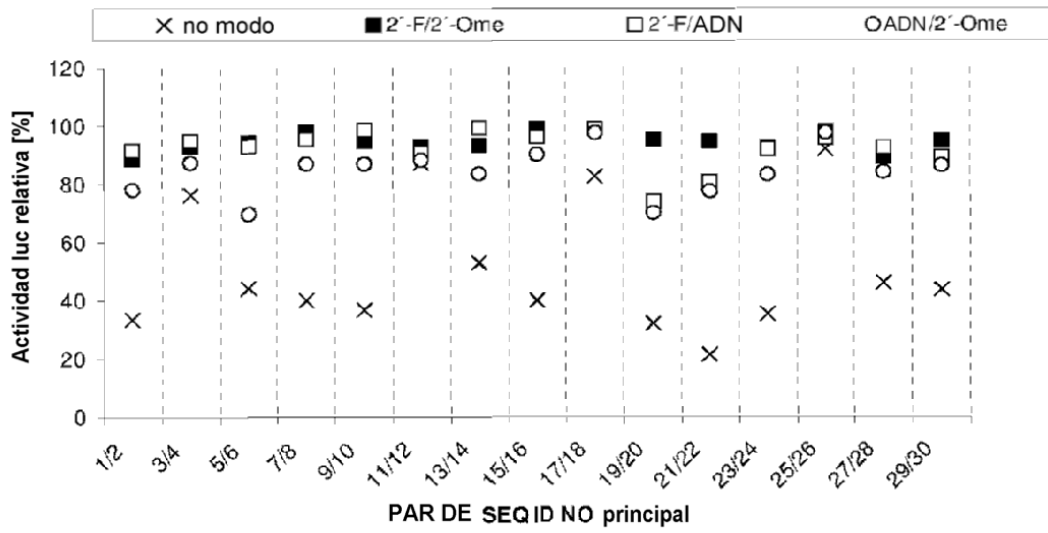




Fig. 6 a)

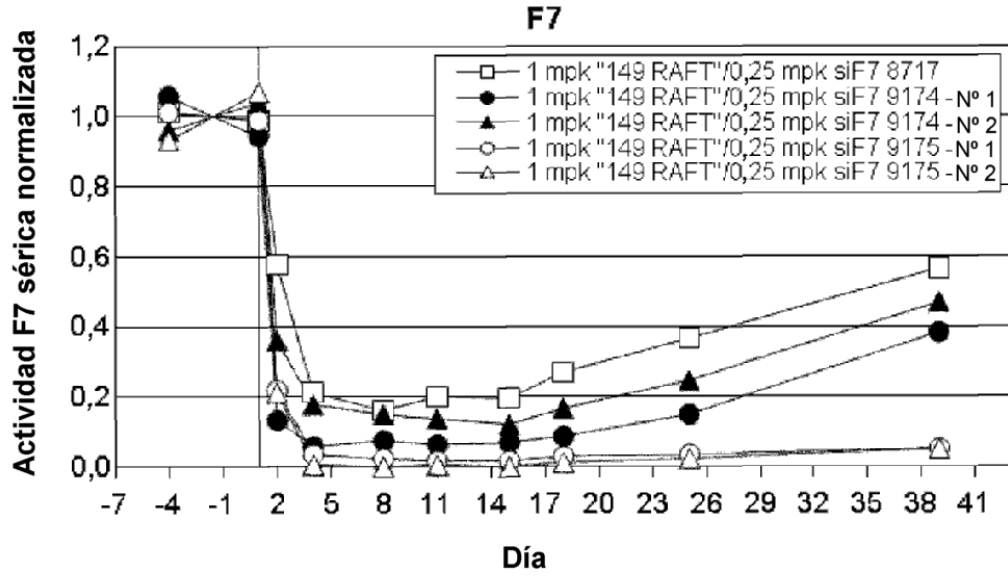


Fig. 6 b)

