

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 605 990**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/00** (2006.01)  
**A61K 31/7088** (2006.01)  
**A61K 48/00** (2006.01)  
**A61K 47/48** (2006.01)  
**C07C 271/20** (2006.01)  
**C07C 69/96** (2006.01)  
**C07K 7/02** (2006.01)  
**C12N 15/87** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.08.2011 PCT/EP2011/063436**  
 87 Fecha y número de publicación internacional: **05.07.2012 WO12089352**  
 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.08.2011 E 11739076 (5)**  
 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.09.2016 EP 2658981**

54 Título: **Conjugados de molécula pequeña para la administración intracelular de ácidos nucleicos**

30 Prioridad:

**29.12.2010 US 201061427845 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**17.03.2017**

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 2 605 990 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

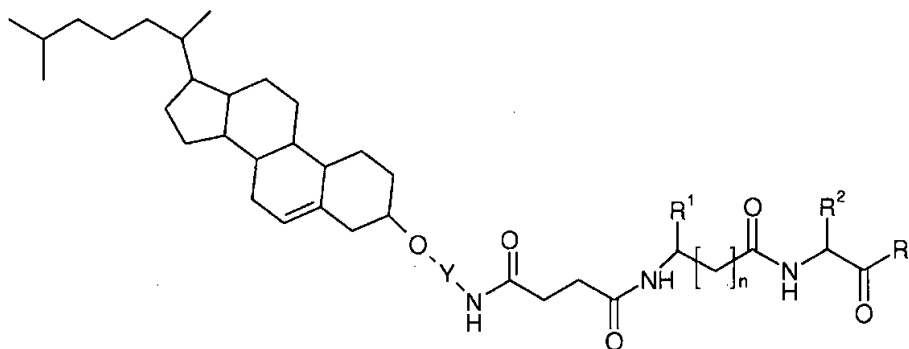
Conjugados de molécula pequeña para la administración intracelular de ácidos nucleicos

5 La presente invención se refiere a novedosos conjugados de molécula pequeña para la administración de ácidos nucleicos, tales como ARNip. La administración de ácidos nucleicos en una célula viva está altamente limitada por el complejo sistema de membranas de la célula.

10 Chen, Q. et al. (2010) desvelan un compuesto para la administración de ARNip, que está conjugado con colesterol mediante un resto escindible usado para el silenciamiento génico en oligodendrocitos (Journal of controlled release, vol. 144, 227 - 232).

15 Un medio que se ha usado para administrar ácidos nucleicos *in vivo* ha sido unir el ácido nucleico a tanto una molécula diana pequeña como a una molécula hidrófoba tal como un lípido o esteroil. Aunque se ha observado alguna administración y actividad con estos conjugados cuando se administran a los roedores, la dosis requerida ha sido prohibitivamente grande, produciendo frecuentemente efectos de toxicidad no deseados *in vivo* y altos costes y pauta de tratamiento imposible cuando se traduce a los seres humanos. En el presente documento se proporciona el uso de compuestos de molécula pequeña para la administración de ácidos nucleicos, tales como ARNip. Cuando los compuestos de molécula pequeña están conjugados con el ácido nucleico, median en la administración satisfactoria del ácido nucleico en una célula. Sorprendentemente se ha encontrado que dosis significativamente reducidas del ácido nucleico son ahora suficientes para la satisfactoria administración si se usan los compuestos novedosos proporcionados en el presente documento. Así, el uso de los compuestos proporciona una herramienta poderosa para la administración de los ácidos nucleicos con toxicidad considerablemente limitada *in vivo*.

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



(I),

para su uso en la administración *in vivo* de ácidos nucleicos, en la que

30 Y es un grupo conector seleccionado de  $-(CH_2)_3-$  o  $-C(O)-N-(CH_2-CH_2-O)_p-CH_2-CH_2-$ ;

R<sup>1</sup> es -alquilo (C<sub>1-6</sub>);  
 -(CH<sub>2</sub>)-naftilo; o  
 -(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-fenilo, cuyo fenilo está sin sustituir o hasta cuatro veces sustituido con un sustituyente  
 35 independientemente seleccionado de

-NO<sub>2</sub>,  
 -CN,  
 Halógeno,  
 40 -O-(CH<sub>2</sub>)-fenilo,  
 -O-alquilo (C<sub>1-6</sub>), o  
 -C(O)-NH<sub>2</sub>;

R<sup>2</sup> es hidrógeno;  
 45 -(CH<sub>2</sub>)<sub>k</sub>-N-C(Ph)<sub>3</sub>, cuyos anillos de fenilo están sin sustituir o independientemente sustituidos con -  
 O-alquilo (C<sub>1-4</sub>);  
 -(CH<sub>2</sub>)<sub>k</sub>-C(O)-NH<sub>2</sub>;  
 -(CH<sub>2</sub>)<sub>k</sub>-fenilo;  
 -alquilo (C<sub>1-6</sub>), que está sin sustituir o sustituido una vez con -S-CH<sub>3</sub>;

50

R<sup>3</sup> es -NH-fenilo, cuyo fenilo está adicionalmente sustituido con un sustituyente independientemente seleccionado de

- 5           -(CH<sub>2</sub>)-OH; o  
          -(CH<sub>2</sub>)-O-C(O)-O-(4-nitro-fenilo);

k es 1, 2, 3, 4, 5, 6;

m es 1, 2, 3 o 4;

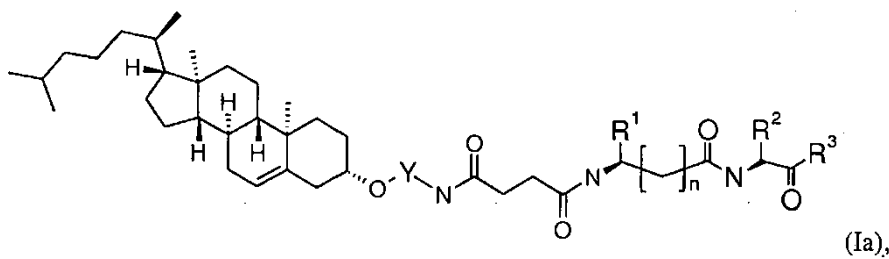
- 10          n es 0 o 1; y

p es un número entero de 1 a 20; y en la que

- 15          dicho compuesto está covalentemente unido al ácido nucleico; y en la que

los grupos R<sup>2</sup> y R<sup>3</sup>, junto con los átomos a los que están unidos, forman un sustrato que es susceptible a escisión por catepsina B.

- 20          En otra realización, se proporcionan los compuestos de fórmula (I) con la conformación específica como se muestra en la fórmula (Ia)



- 25          para su uso en la administración *in vivo* de ácidos nucleicos, en la que todos los sustituyentes R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup> e Y, además de las variables k, m, n y p, tienen el significado dado anteriormente.

- 30          En otra realización más, la presente invención se refiere a los compuestos de fórmula (I) o (Ia) para su uso en la administración *in vivo* de ácidos nucleicos, en la que Y es -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-; y todos los grupos de sustituyentes restantes tienen el significado dado anteriormente.

- 35          En otra realización más, la presente invención se refiere a los compuestos de fórmula (I) o (Ia) para su uso en la administración *in vivo* de ácidos nucleicos, en las que Y es -C(O)-N-(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>p</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-; y todos los grupos de sustituyentes tienen el significado dado anteriormente.

- 40          En otra realización más, se proporcionan los compuestos de fórmulas (I) o (Ia) para su uso en la administración *in vivo* de ácidos nucleicos, en las que

Y es -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-;

R<sup>2</sup> es -(CH<sub>2</sub>)<sub>k</sub>-N-C(Ph)<sub>3</sub>, cuyos anillos de fenilo están sin sustituir o independientemente sustituidos con -O-alquilo (C<sub>1-4</sub>); y

- 45          R<sup>3</sup> es -NH-fenilo, cuyo fenilo está adicionalmente sustituido con -(CH<sub>2</sub>)-O-C(O)-O-(4-nitro-fenilo);

n es 0; y

R<sup>1</sup> y k tienen los significados dados anteriormente.

- 50          En otra realización más, se proporcionan compuestos de fórmulas (I) o (Ia) para su uso en la administración *in vivo* de ácidos nucleicos, en las que

Y es -C(O)-N-(CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>p</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-;

- 55          R<sup>2</sup> es -(CH<sub>2</sub>)<sub>k</sub>-N-C(Ph)<sub>3</sub>, cuyos anillos de fenilo están sin sustituir o independientemente sustituidos con -O-alquilo (C<sub>1-4</sub>); y

R<sup>3</sup> es -NH-fenilo, cuyo fenilo está adicionalmente sustituido con -(CH<sub>2</sub>)-O-C(O)-O-(4-nitro-fenilo);  
n es 0; y

R<sup>1</sup>, k y p tienen los significados dados anteriormente

5 El término "alquilo (C<sub>1-6</sub>)", como se usa en el presente documento, significa un hidrocarburo saturado lineal o ramificado que contiene de 1 a 6 átomos de carbono. Grupos alquilo C<sub>1-6</sub> preferidos incluyen metilo, etilo, propilo, iso-propilo, butilo, 2-butilo y similares.

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

15 Los compuestos para su uso en la administración de ácidos nucleicos según la presente invención pueden ser generalmente obtenidos usando métodos conocidos para el experto habitual en la materia de la química orgánica o medicinal. Asimismo, se entiende que el resto de colesterol puede sustituirse con otros compuestos naturales o químicamente sintetizados de la clase de los esteroides (por ejemplo, ácido colánico, ácido litocólico, etc.) u otras moléculas pequeñas (por ejemplo, vitaminas) conocidas por ser eficaces en la administración de ácidos nucleicos tales como tocoferol (Molecular Therapy, 2008, 16, 734).

20 Para la administración satisfactoria de los ácidos nucleicos, los compuestos de fórmula (I) o (Ia) se unen covalentemente a los ácidos nucleicos. Preferentemente, el enlace covalente se crea mediante la reacción de un grupo funcional adecuado, tal como, es decir, un grupo amina primaria, en el ácido nucleico con el grupo carbonilo activado en el resto -O-C(O)-O- de R<sup>3</sup> como se define en el presente documento antes. Por lo tanto, en el presente documento se proporciona un conjugado que comprende los compuestos de fórmula (I) o (Ia) y un ácido nucleico.

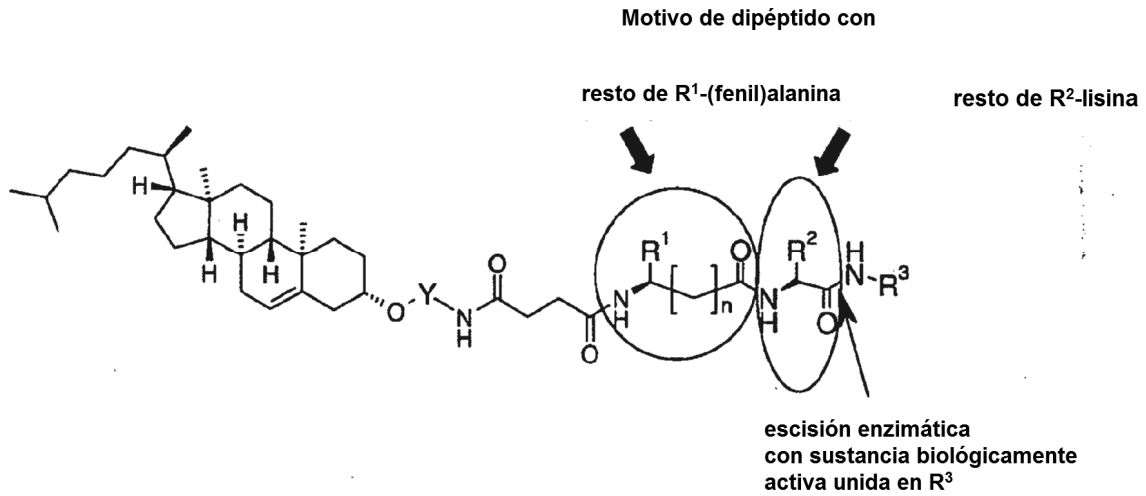
25 El término "ácido nucleico", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier forma de ADN, que incluye ADNc, o ARN, o un fragmento de los mismos, nucleótido, nucleósido, oligonucleótidos (incluyendo oligonucleótidos antisentido, LNA y ARNip), que producen un efecto biológico cuando se administran *in vivo* a un animal, que incluye, pero no se limitan a, aves y mamíferos, que incluyen seres humanos. Ácidos nucleicos preferidos usados en el presente documento son ARNip.

35 El conjugado que comprende los compuestos covalentemente unidos a un ácido nucleico muestra una capacidad mejorada para ser captado por células en comparación con dicho ácido nucleico solo. Una vez el conjugado se administra en la célula y circula al lisosoma, el ácido nucleico correspondiente se libera por escisión enzimática. Esta escisión preferentemente tiene lugar cuando un motivo de dipéptido, que preferentemente consiste en la secuencia α- o β-(fenil)alanina y lisina como están presentes en los compuestos de fórmula (I) o (Ia), se incorpora en el conjugado (véase el Esquema 1). Lo más preferentemente, el conjugado contiene el motivo de dipéptido y un espaciador, tal como el espaciador de p-aminobencilcarbamato (Bioconjugate Chem. 2002,13,855) que fragmenta espontáneamente una vez el enlace amida del extremo C del motivo de dipéptido, se escinde como se ejemplifica para ARNip en el Esquema 2. Por lo tanto, los conjugados que comprenden compuestos de fórmula (I) o (Ia) también se denominan conjugados de colesterol que contienen dipéptido. La escisión enzimática del ácido nucleico de los conjugados de colesterol que contienen dipéptido de la presente invención se cataliza por proteasas innatas de la célula. Un ejemplo de una proteasa innata capaz de escindir el motivo de dipéptido presente en los compuestos de fórmula (I) o (Ia) es la catepsina B. La catepsina B es una cisteína proteasa ubicua conocida localizada en los lisosomas de las células de mamífero (Bioconjugate Chem. 2002,13,855; J. Med. Chem. 2005,48,1344; Nat. Biotechnology 2003,21,778). Así, el motivo de dipéptido descrito anteriormente también se denomina motivo de dipéptido escindible por catepsina.

50 La presente divulgación, por tanto, también proporciona un método para la administración de un ácido nucleico, en células en las que dicho ácido nucleico puede posteriormente escindirse del conjugado para desdoblarse una actividad terapéutica.

55 En otra realización de la presente divulgación, se proporciona el uso de un conjugado de los compuestos de fórmula (I) o (Ia) covalentemente unidos a un ARNip para la administración intracelular.

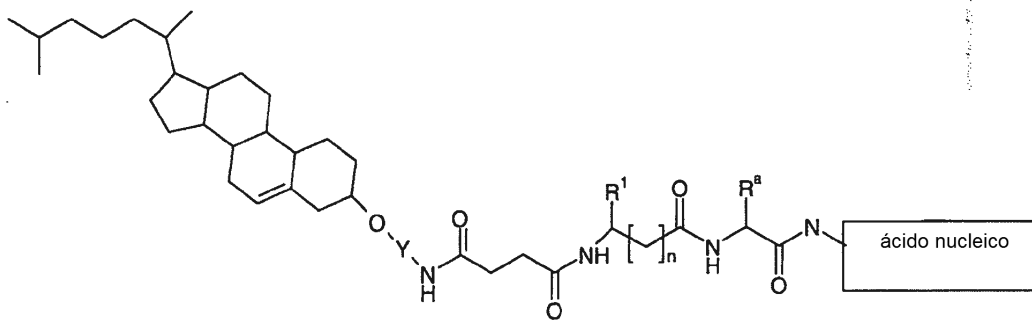
Los conjugados de fórmula (I) o (Ia) covalentemente unidos a un ácido nucleico se designan en el presente documento la fórmula (II) o (IIa), respectivamente.



Esquema 1

Por tanto, en otra realización, la presente invención proporciona un compuesto de fórmula

5



(II)

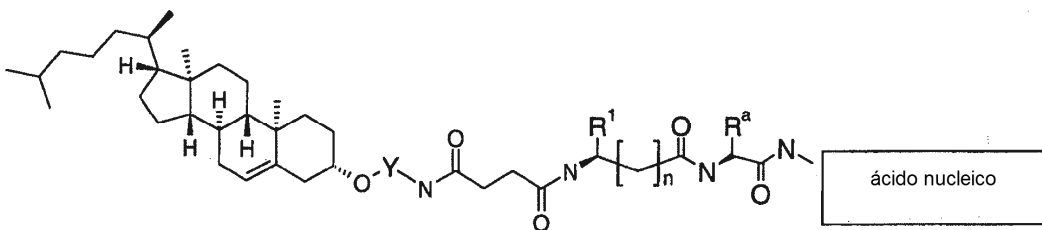
en la que

10 R<sup>a</sup> es -(CH<sub>2</sub>)<sub>k</sub>-NH<sub>2</sub>;

R<sup>1</sup> y k tienen los significados dados para la fórmula (I) anterior.

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

15



(IIa)

en la que

20 R<sup>a</sup> es -(CH<sub>2</sub>)<sub>k</sub>-NH<sub>2</sub>;

R<sup>1</sup> y k tienen los significados dados para la fórmula (I) anterior.

En una realización preferida, el ácido nucleico en fórmula (II) o (IIa) es un ARNip.

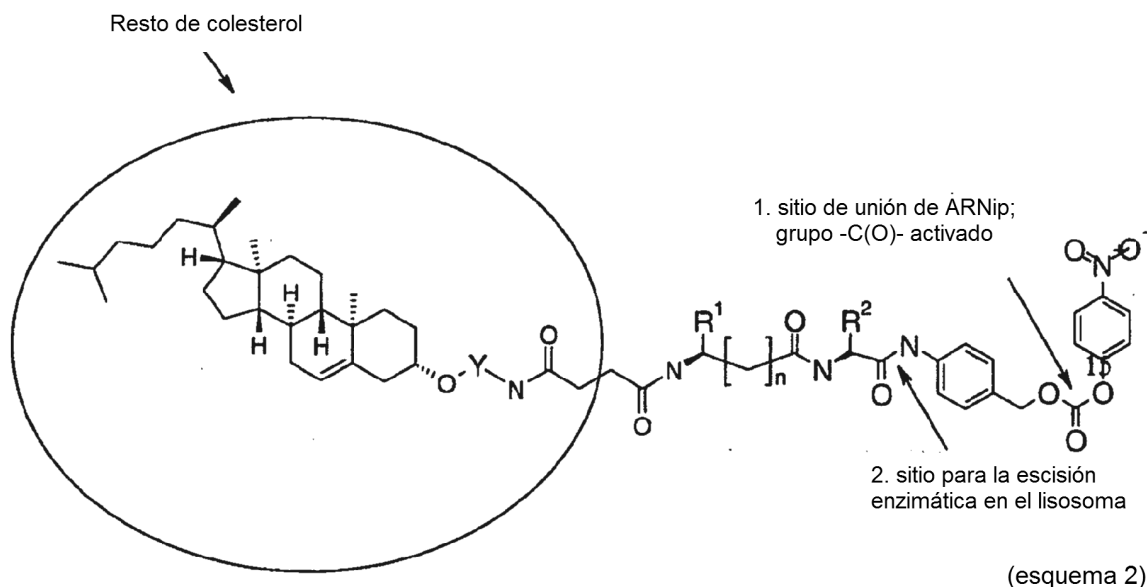
Los compuestos de fórmula (II) o (IIa) pueden tener valiosas propiedades en terapia. Por tanto, en otra realización, se proporcionan los compuestos de fórmula (II) o (IIa) para su uso como medicamentos.

5 Otra realización de la invención es una composición farmacéutica que comprende los conjugados de los compuestos de fórmula (I) o (Ia) covalentemente unidos a un ácido nucleico.

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

10 Las siguientes realizaciones se ejemplifican para conjugados de los compuestos de fórmula (I) o (Ia) covalentemente unidos a ARNip. Se entiende que estas realizaciones también son aplicables a otros tipos de ácidos nucleicos como se ha definido anteriormente.

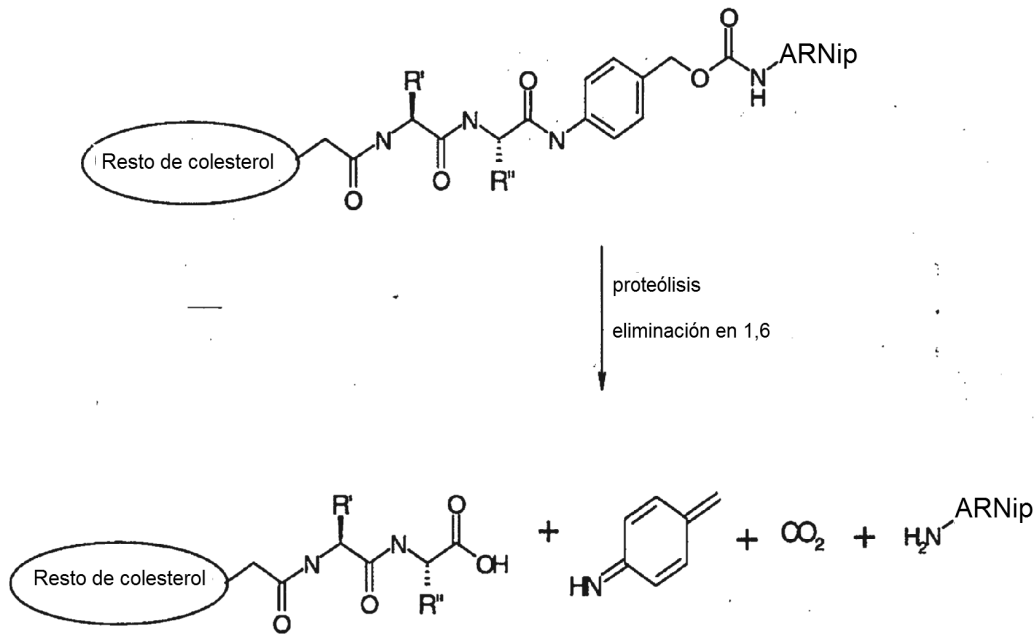
15 La unión covalente del ARNip a los compuestos de fórmula (I) o (Ia) se logra mediante la reacción de un grupo nucleófilo adecuado, es decir, un grupo amina primaria, en el ARNip con el grupo -C(O)- activado en R<sup>3</sup> de dichos compuestos de fórmula (I) o (Ia). La activación de ese grupo -C(O)- se obtiene por un *p*-nitrofenoxicarbonato como se muestra en el Esquema 2 a continuación.



20 El carbonato activado con *p*-nitrofenilo puede, por ejemplo, hacerse reaccionar con el ARNip equipado con un nucleófilo adecuado tal como la amina primaria de un conector de hexilamino para generar un enlace carbamato para dar el conjugado de ARNip covalente. Una vez el ARNip se recoge intracelularmente y se transfiere al lisosoma, los compuestos de fórmula (II) o (IIa) en los que la sustancia activa biológica es un ARNip se escinden por  
 25 la actividad de proteasa que libera el ARNip mediante una reacción de eliminación 1,6 como también se muestra en el Esquema 3. El resto de colesterol del conjugado de los compuestos de fórmula (II) o (IIa) modifica las propiedades PK del ARNip de tal forma que la administración sistémica permita el silenciamiento génico *in vivo*.

30 En una realización, los compuestos de fórmula (II) o (IIa) en los que el ácido nucleico es ARNip se co-administra con un polímero de administración. Los polímeros de administración proporcionan un medio de alteración de las membranas celulares y median en la liberación endosómica. En otra realización, dicho polímero de administración y el conjugado de ARNip de la invención no están covalentemente unidos y se sintetizan por separado y pueden suministrarse en recipientes separados o un recipiente único. Polímeros de administración para oligonucleótidos  
 35 tales como ARNip son muy conocidos en la técnica.

40 Por ejemplo, Rozema et al., en la publicación de patente de EE.UU. 20040162260, demostraron un medio para regular reversiblemente la actividad perturbadora de la membrana de una poliamina activa de la membrana. La regulación reversible proporcionó un medio para limitar la actividad a los endosomas de células diana, limitando así la toxicidad. Su método se basó en la reacción de aminas sobre la poliamina con anhídrido 2-propiónico-3-metilmaleico. Esta modificación convirtió el polication en un polianión mediante la conversión de aminas primarias en grupos que contienen carboxilo e inhibió reversiblemente la actividad de membrana de la poliamina.



5 Para permitir la co-administración del ácido nucleico con el vehículo de administración, el ácido nucleico se ligó covalentemente al polímero de administración. En la solicitud de patente provisional de EE.UU. 61/307490 se describe una nueva generación de polímeros de administración. En ella, se proporciona la poliamina activa de la membrana que comprende un terpolímero anfipático formado por polimerización al azar de monómeros que contienen amina, monómeros hidrófobos inferiores y monómeros hidrófobos superiores. Esta nueva generación de polímeros de administración eliminó el requisito de que el polinucleótido y el polímero estuvieran asociados tanto por enlace covalente como por interacción carga-carga.

15 Ejemplos no limitantes de polímeros de administración usados para la co-administración con los conjugados de ARNip de la presente invención son poliaminas activas de la membrana y poli(éter vinílico) (PBAVE), Dynamic PolyConjugates (DPC; Rozema et al. 2007) y DPCs mejorados como se desvela en la solicitud de patente provisional de EE.UU. 61/307490.

20 En otra realización, se proporciona un nuevo patrón de modificación de ARNip químico para la administración *in vivo* funcional. Este nuevo patrón de modificación de ARNip químico es especialmente útil con los vehículos de administración que muestran una retención endosómica / lisosómica relativamente fuerte.

25 Se encontró que la estabilización de ARNip frente a la degradación por nucleasas localizadas en el endosoma / lisosoma tales como DNAsa II mejora fuertemente la inactivación diana. Tal estabilización puede afectar directamente la cantidad de ARNip liberada en el citoplasma donde se localiza la maquinaria de iARN celular. Solo la porción de ARNip disponible en el citoplasma es capaz de desencadenar el efecto de iARN.

30 Además de las malas características farmacocinéticas, los ARNip son susceptibles a las nucleasas en el entorno biológico cuando se administran como tales en la circulación sin un vehículo de administración protector. Por consiguiente, muchos ARNip son rápidamente degradados tanto extracelularmente en el tejido y la corriente sanguínea como después de la captación intracelular (por ejemplo, en el endosoma).

35 Una nucleasa muy conocida localizada en el compartimento endosómico / lisosómico es la DNAsa II. Esta enzima es activa a un pH por debajo de 6-6,5 con actividad máxima en el intervalo de pH de 4,5-5, reflejando condiciones presentes en el entorno acidificado del compartimento endosómico / lisosómico. Las siguientes vías de degradación de ARN inducidas por la DNAsa II se identificaron *in vitro* y se desvelan en la presente invención:

40 A. Hebras de ARN que contienen al menos un 2'-OH-nucleótido se degradan rápidamente mediante un producto intermedio de fósforo pentavalente cíclico, que conduce a fosfatos cíclicos 2'-3' en el producto intermedio de escisión 5'. La formación del producto intermedio pentavalente puede inhibirse por nucleótidos que carecen de un grupo 2'-OH tal como nucleótidos 2'-desoxi, 2'-O-metilo (2'-OMe) o 2'-desoxi-2'-flúor (2'-F).

B. Adicionalmente, el ARN se degrada en una vía 5'-exonucleolítica independiente de la modificación en 2' en los nucleótidos del extremo 5'. Esta vía de degradación puede inhibirse por los restos no de nucleótido del extremo

5' como, por ejemplo, colesterol, conector de aminoalquilo o un fosforotioato en el primer enlace internucleotídico.

C. Un 5'-fosfato también protege y ralentiza la escisión cinética exonucleolítica, pero puede no bloquear completamente esta vía. Esto es lo más probable debido a la escisión del 5'-fosfato por fosfatasa o una actividad de fosfatasa inherente de la preparación de enzima DNAsa II usada en el ensayo de estabilidad *in vitro*.

D. Se logró la mejor protección con oligonucleótidos que carecían de cualquier 2'-OH-nucleótido dentro de la hebra, empezando con un nucleótido 2'-OMe en el extremo 5' conectado por un enlace fosforotioato (PTO) al segundo nucleótido. Otros nucleótidos terminales que carecen de un grupo 2'-OH también protegen contra la degradación en 5'-exo, pero a un grado más bajo en comparación con la modificación de 2'-OMe.

Por lo tanto, los inventores de la presente invención encontraron que los ARNip pueden estabilizarse significativamente si se usa el siguiente diseño, en el que un oligonucleótido está provisto de una hebra no codificante con el patrón de modificación: 5'-(w)- (Z1)- (Z2)- (Z3) $n_a$ -3' y una hebra codificante con el patrón de modificación 5'- (Z3)  $n_s$ -3', en el que

w es independientemente un 5'-fosfato o 5'-fosforotioato o H,

Z1 es independientemente un nucleósido modificado en 2'.

Z2 es independientemente un 2'-desoxi-nucleósido o nucleósido modificado con 2'-flúor,

Z3 es independientemente un nucleósido modificado en 2',

$n_a$  es 8-23 y  $n_s$  es 8-25.

En una realización preferida, un oligonucleótido está provisto de una hebra no codificante con el patrón de modificación: 5'-(w)- (Z1)- (Z2)- (Z3)  $n_a$ -3' y una hebra codificante con el patrón de modificación 5'- (Z3)  $n_s$ -3', en la que Z1 es un nucleósido modificado con 2'-flúor o un 2'-desoxi-nucleósido y todos los sustituyentes restantes, además de las variables  $n_a$  y  $n_s$ , tienen el significado dado anteriormente.

En una realización preferida, un oligonucleótido está provisto de una hebra no codificante con el patrón de modificación: 5'-(w)- (Z1)- (Z2)- (Z3)  $n_a$ -3' y una hebra codificante con el patrón de modificación 5'- (Z3)  $n_s$ -3', en la que Z3 es un nucleósido modificado con 2'-O-metilo, un nucleósido modificado con 2'-flúor o un 2'-desoxi-nucleósido y todos los sustituyentes restantes, además de las variables  $n_a$  y  $n_s$ , tienen el significado dado anteriormente.

En una realización preferida, un oligonucleótido está provisto de una hebra no codificante con el patrón de modificación: 5'-(w)- (Z1)- (Z2)- (Z3)  $n_a$ -3' y una hebra codificante con el patrón de modificación 5'-(Z3)  $n_s$ -3', en la que Z1 es un nucleósido modificado con 2'-flúor o un 2'-desoxi-nucleósido y Z3 es un nucleósido modificado con 2'-O-metilo, un nucleósido modificado con 2'-flúor o un 2'-desoxi-nucleósido y todos los sustituyentes restantes, además de las variables  $n_a$  y  $n_s$ , tienen el significado dado anteriormente.

Los nucleósidos en la secuencia de ácidos nucleicos del oligonucleótido con el novedoso patrón de modificación pueden tanto estar unidos por 5'-3' fosfodiésteres como por 5'-3' fosforotioatos.

Como se usa en el presente documento, la hebra "antisentido" es la hebra de ARNip que es complementaria al ARN diana y que se unirá al ARNm una vez el ARNip se desenrolle.

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

Dicho ARNip que comprende el novedoso patrón de modificación demostró ser particularmente ventajoso cuando se unía covalentemente a un polímero de administración como se ejemplifica por Rozema et al. (Dynamic PolyConjugates (DPC; Rozema et al. 2007). La potencia y duración del efecto puede potenciarse significativamente empleando la estrategia de modificación de ARNip brevemente explicada en la presente invención.

En otra realización, dicho ARNip que comprende el novedoso patrón de modificación es especialmente útil cuando se conjuga con moléculas pequeñas que alteran las propiedades farmacocinéticas del ARNip tales como colesterol o los compuestos de fórmula (I) y (Ia) proporcionados en el presente documento. En una realización, se proporcionan un conjugado de una molécula pequeña y un oligonucleótido en los que el oligonucleótido tiene el siguiente patrón de modificación: la hebra no codificante con el patrón de modificación: 5'-(w)- (Z1)- (Z2)- (Z3)  $n_a$ -3' y una hebra codificante con el patrón de modificación 5'- (Z3)  $n_s$  -, en las que los sustituyentes, además de las variables  $n_a$  y  $n_s$ , tienen el significado dado anteriormente. En una realización, dicha molécula pequeña es colesterol. En otra realización, dicha molécula pequeña es un compuesto de fórmula (I) o (I a), produciendo compuestos de fórmula (II) o (IIa).

Preferentemente, dichos conjugados de ARNip se co-administran con un polímero de administración. Polímeros de administración adecuados se han descrito anteriormente.

El presente ARNip que comprende el novedoso patrón de modificación es especialmente útil cuando se conjuga con un ligando que se sabe que se une a un receptor específico que internaliza el conjugado en una célula.



Particularmente, el receptor de asialoglicoproteína (ASGPR) expresado en hepatocitos es un receptor muy conocido que permite la eliminación (endocitosis y degradación lisosómica) de proteínas desialiladas de la circulación. Se ha mostrado que la *N*-acetil-D-galactosamina tiene una alta afinidad de unión por el receptor, especialmente cuando se presenta multivalente y cuando los restos de galactosa están apropiadamente separados (J Biol Chem, 2001, 276, 37577). Con el fin de utilizar este receptor de alta capacidad para la endocitosis mediada por receptor del ácido nucleico, el ligando sintético mostrado a continuación se preparó para unirse covalentemente a los ARNip que comprenden el novedoso patrón de modificación. Como este tipo de endocitosis conduce a degradación lisosómica del material internalizado, el ARNip debe prepararse de tal forma que sea estable en el lisosoma, que ahora se resuelve por el novedoso patrón de modificación brevemente expuesto anteriormente.

Se encontró que para estos patrones de modificación los conectores escindibles demostraron ser ventajosos en comparación con ligandos de molécula pequeña establemente unidos. Posibles conectores escindibles son un motivo de dipéptido como se ejemplifica en el Esquema 1 o un conector de ARN escindible que comprende nucleótidos que contienen 2'-OH. El conector de ARN escindible es especialmente útil a propósito de los ARNip que tienen el novedoso patrón de modificación (ARNip completamente modificado en 2') descrito anteriormente.

En principio, un sitio de escisión de nucleasa puede introducirse por los nucleótidos protuberantes de 3' o 5' que contienen al menos un 2'-OH-nucleótido en tanto la hebra codificante como no codificante. La especie de ARNip activa final se genera por procesamiento de nucleasas intracelulares. Por tanto, es posible el uso de sitios de escisión definidos implementados por 2'-OH-nucleótidos dentro de la región de bases apareadas. Esto puede hacerse usando al menos un 2'-OH-nucleótido complementario a la hebra opuesta o por la introducción de tanto al menos un 2'-OH-nucleótido de apareamiento erróneo como una horquilla/protuberancia que contiene al menos un 2'-OH-nucleótido.

A diferencia de otras químicas de conector escindible, el uso de sitios de escisión definidos por la introducción de 2'-OH-nucleótidos conduce a un enfoque de conjugación más versátil. Introduciendo sitios de escisión selectivos en una o ambas hebras del ARNip tanto en el extremo 3' y/o 5' como dentro de la estructura de dúplex es posible conjugación múltiple.

El conector de nucleótidos se escinde, por ejemplo, en el endosoma por nucleasas intracelulares tales como DNAsa II después de la internalización del conjugado, liberando así el ARNip.

Preferentemente, dicho conjugado se co-administra con un polímero de administración. Polímeros de administración adecuados se han descrito anteriormente.

#### Definiciones

El término "molécula pequeña", como se usa en el presente documento, se refiere a moléculas orgánicas o inorgánicas tanto sintetizadas como encontradas en la naturaleza, que generalmente tienen un peso molecular inferior a 10.000 gramos por mol, opcionalmente inferior a 5.000 gramos por mol, y opcionalmente inferior a 2.000 gramos por mol.

El término "péptido", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier compuesto de polímero producido por la formación de enlaces amida entre un grupo .alfa.-carboxilo de un D- o L-aminoácido y un grupo .alfa.-amino de otro D- o L-aminoácido. El término "proteína", como se usa en el presente documento, se refiere a polipéptidos de secuencia específica de más de aproximadamente 50 residuos.

El término "motivo de dipéptido", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier motivo que comprenda un enlace amida formado por tanto el grupo D- como L-alfa o beta-amino de un primer aminoácido con el grupo alfa-carboxilo de un segundo D- o L-aminoácido.

Como se usa en el presente documento, el término "aminoácido" se refiere a cualquier molécula que contenga tanto grupos funcionales amina como carboxilo. Así, el término "aminoácido" se refiere a tanto aminoácidos naturales, no naturales como a sintéticos. Cualquier aminoácido natural usado en la presente invención se denomina en el presente documento por sus abreviaturas comunes.

El término "ligando", como se usa en el presente documento, se refiere a un resto que es capaz de unirse covalentemente o de otro modo químicamente al ácido nucleico. El término "ligando", en el contexto de la invención, es preferentemente un compuesto de fórmula (I) o (Ia) covalentemente unido a un ácido nucleico.

El término "ácido nucleico", como se usa en el presente documento, significa un oligómero o polímero compuesto de nucleótidos, por ejemplo, desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos, o compuestos producidos sintéticamente (por ejemplo, PNA como se describe en la patente de EE.UU. N.º 5.948.902 y las referencias citadas en su interior) que pueden hibridarse con ácidos nucleicos que existen de forma natural en un modo específico de secuencia análogo al de dos ácidos nucleicos que existen de forma natural, por ejemplo, pueden participar en apareamiento de bases de

Watson-Crick tanto al menos un 2'-OH-nucleótido erróneamente apareado como un horquilla/protuberancia que contiene al menos un 2'-OH-nucleótido.

5 A diferencia de otras químicas de conector escindible, el uso de sitios de escisión definidos por la introducción de 2'-OH-nucleótidos conduce a un enfoque de conjugación más versátil. Introduciendo sitios de escisión selectivos en una o ambas hebras del ARNip tanto en el extremo 3' y/o el 5' como dentro de la estructura de dúplex es posible conjugación múltiple.

10 Por consiguiente, en una realización, se proporciona un conjugado de una molécula pequeña y un oligonucleótido en el que

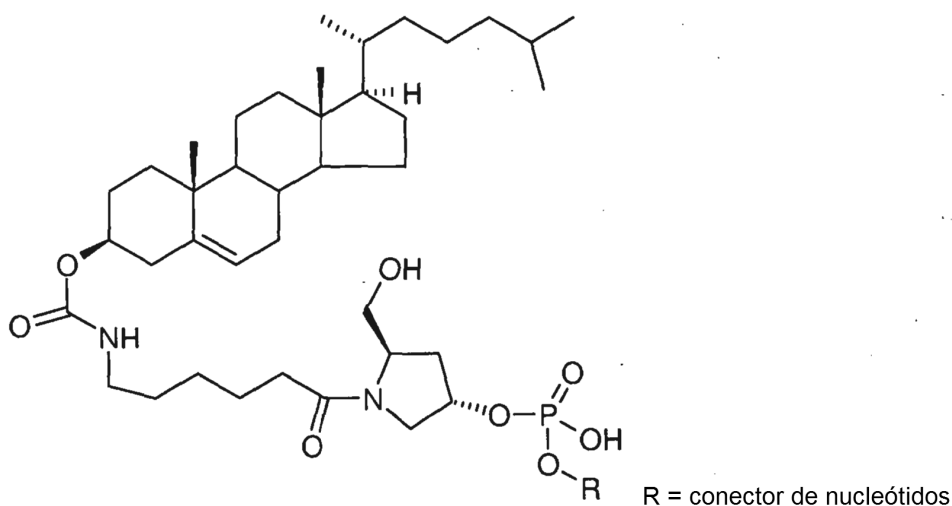
- a) la molécula pequeña comprende un conector de nucleótidos que comprende 1-10, preferentemente 1-5, lo más preferentemente 1-3 2'-OH-nucleótidos;
- 15 b) el oligonucleótido tiene el siguiente patrón de modificación: la hebra no codificante con el patrón de modificación 5'-(w)- (Z1)- (Z2)- (Z3)  $n_a$  -3' y una hebra codificante con el patrón de modificación 5'-(Z3) $n_s$ -, en las que los sustituyentes, además de las variables  $n_a$  y  $n_s$ , tienen el significado dado anteriormente; y
- c) el oligonucleótido está covalentemente unido mediante el conector de nucleótidos a la molécula pequeña.

20 El conector de nucleótidos se escinde, por ejemplo, en el endosoma por nucleasas intracelulares tales como DNAsa II después de la internalización del conjugado, liberando así el ARNip.

Preferentemente, dicho conjugado se co-administra con un polímero de administración. Polímeros de administración adecuados se han descrito anteriormente.

25 En otra realización de la divulgación, se proporciona un compuesto de fórmula (V). Este compuesto comprende un resto de colesterol y un conector de nucleótidos que comprende 1-10, preferentemente 1-5, lo más preferentemente 1-3 2'-OH-nucleótidos. Este conector de nucleótido es útil para unir covalentemente un oligonucleótido tal como un ARNip al compuesto de fórmula (V). Preferentemente, dicho oligonucleótido tiene el novedoso patrón de modificación brevemente expuesto anteriormente. Por lo tanto, en otra realización, se proporciona un conjugado de un compuesto de fórmula (V) y un oligonucleótido, en el que el oligonucleótido está covalentemente unido al conector de nucleótidos del compuesto de fórmula (V).

35 El conector de nucleótidos se escinde por nucleasas intracelulares tales como DNAsa II después de la internalización del conjugado de un compuesto de fórmula (V) y un oligonucleótido en el endosoma, liberando así el ARNip.



(V)

40 Preferentemente, dicho conjugado de un compuesto de fórmula (V) y un oligonucleótido se co-administra con un polímero de administración. Polímeros de administración adecuados se han descrito anteriormente.

45 En otra realización, dicho polímero de administración y el conjugado de un compuesto de fórmula (V) y un oligonucleótido de la invención no están covalentemente unidos y se sintetizan por separado y pueden suministrarse en recipientes separados o un recipiente único.

## Definiciones

5 El término "molécula pequeña", como se usa en el presente documento, se refiere a moléculas orgánicas o inorgánicas tanto sintetizadas como encontradas en la naturaleza, que generalmente tienen un peso molecular inferior a 10.000 gramos por mol, opcionalmente inferior a 5.000 gramos por mol, y opcionalmente inferior a 2.000 gramos por mol.

10 El término "péptido", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier compuesto de polímero producido por la formación de enlaces amida entre un grupo .alfa.-carboxilo de un D- o L-aminoácido y un grupo .alfa.-amino de otro D- o L-aminoácido. El término "proteína", como se usa en el presente documento, se refiere a polipéptidos de secuencia específica de más de aproximadamente 50 residuos.

15 El término "motivo de dipéptido", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier motivo que comprenda un enlace amida formado por tanto el grupo D- como L-alfa o beta-amino de un primer aminoácido con el grupo alfa-carboxilo de un segundo D- o L-aminoácido.

20 Como se usa en el presente documento, el término "aminoácido" se refiere a cualquier molécula que contenga tanto grupos funcionales amina como carboxilo. Así, el término "aminoácido" se refiere a tanto aminoácidos naturales, no naturales como a sintéticos. Cualquier aminoácido natural usado en la presente invención se denomina en el presente documento por sus abreviaturas comunes.

25 El término "ligando", como se usa en el presente documento, se refiere a un resto que es capaz de unirse covalentemente o de otro modo químicamente al ácido nucleico. El término "ligando", en el contexto de la invención, es preferentemente un compuesto de fórmula (I) o (Ia) covalentemente unido a un ácido nucleico.

30 El término "ácido nucleico", como se usa en el presente documento, significa un oligómero o polímero compuesto de nucleótidos, por ejemplo, desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos, o compuestos producidos sintéticamente (por ejemplo, PNA como se describe en la patente de EE.UU. N.º 5.948.902 y las referencias citadas en su interior) que pueden hibridarse con ácidos nucleicos que existen de forma natural en un modo específico de secuencia análogo al de dos ácidos nucleicos que existen de forma natural, por ejemplo, pueden participar en interacciones de apareamiento de bases de Watson-Crick. Los ácidos nucleicos que no existen de forma natural son oligómeros o polímeros que contienen secuencias de nucleobases que no se producen en la naturaleza, o especies que contienen equivalentes funcionales de nucleobases que existen de forma natural, azúcares, o enlaces inter-azúcar, como ácidos nucleicos peptídicos (PNA), ácidos nucleicos de treosa (TNA), ácidos nucleicos bloqueados (LNA) o ácidos nucleicos de glicerol (GNA). Este término incluye oligómeros que contienen las nucleobases de ácido nucleico que existen de forma natural adenina (A), guanina (G), timina (T), citosina (C) y uracilo (U), además de oligómeros que contienen análogos de bases o nucleobases modificadas. Los ácidos nucleicos pueden derivarse de una variedad de fuentes naturales tales como ADN y ARNs virales, bacterianos y eucariotas. Otros ácidos nucleicos pueden derivarse de fuentes sintéticas, e incluyen cualquiera de los múltiples oligonucleótidos que están siendo fabricados para su uso como reactivos de investigación, agentes de diagnóstico o posibles agentes terapéuticos y definidos. El término incluye oligómeros que comprenden un ácido nucleico monocatenario o un ácido nucleico bicatenario.

45 El término "modificado en 2'", como se usa en el presente documento, se refiere a un  $\beta$ -D-ribonucleósido o  $\beta$ -D-ribonucleótido que comprende nucleobases que existen de forma natural que tienen el grupo 2'-OH sustituido con H, F, O-CH<sub>3</sub> u otros sustituyentes conocidos en la técnica.

El término "2'-OH-nucleótido", como se usa en el presente documento, se refiere a  $\beta$ -D-ribonucleótido que comprende nucleobases que existen de forma natural que tienen un grupo 2'-OH.

50 El término "5'-fosfato", 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 forma que uno de los grupos O o OH esté sustituido con S y se llama en el presente documento "5'-fosfotioato".

55 El término "fosforotioato", como se usa en el presente documento, se refiere a un enlace internucleotídico en el que uno de los oxígenos no de unión está sustituido con azufre.

60 El término "polímero de administración", como se usa en el presente documento, se refiere a polímeros adecuados para la administración funcional de un ácido nucleico. En el contexto de la presente invención, el polímero de administración está tanto covalentemente unido a como se co-administra con la sustancia biológica conjugada con los compuestos descritos en el presente documento y media en el escape endosómico después de la internalización en la célula y captación en el endosoma. El término "polímero" en este contexto significa cualquier compuesto que esté constituido de dos o más unidades monoméricas covalentemente unidas entre sí, donde las unidades monoméricas pueden ser iguales o diferentes, de forma que el polímero pueda ser un homopolímero o un heteropolímero. Polímeros representativos incluyen péptidos, polisacáridos, ácidos nucleicos y similares, donde puede ser que los polímeros existan de forma natural o sean sintéticos. Ejemplos no limitantes de polímeros de administración se revisan, por ejemplo, en INTERNATIONAL JOURNAL OF PHARMACEUTICAL RESEARCH AND

DEVELOPMENT, Octubre - 2010 / Volumen - 2 / Edición - 8 / Artículo N.º - 2. Ejemplos no limitantes de polímeros de administración útiles para la administración de ácidos nucleicos se desvelan en las solicitudes EP 10165502.5 y 10191030.5, publicación PCT WO 2008/0022309 y solicitud provisional de EE.UU. 61/307490 y referencias citadas en el presente documento; que están todas incluidas por referencia.

5 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.

10 Como se usa en el presente documento, "vehículo farmacéutico" incluye todos y cada uno de 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 administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, parenteral, espinal o epidérmica (por ejemplo, mediante inyección o infusión).

15 Un conjugado de la presente invención puede administrarse mediante una variedad de métodos conocidos en la técnica. Como será apreciado por el experto, la vía y/o modo de administración variará dependiendo de los resultados deseados. La administración de un conjugado de la invención por ciertas vías de administración puede ser necesaria para recubrir el conjugado con, o co-administrar el conjugado con, un material para prevenir su inactivación. Por ejemplo, el conjugado puede administrarse a un sujeto en un vehículo o un diluyente apropiado.

20 Diluyentes farmacéuticamente aceptables incluyen solución salina y soluciones de tampón acuosas. Vehículos farmacéuticos incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones inyectables estériles o dispersión. El uso de tales medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas se conoce en la técnica.

25 Las expresiones "administración parenteral" y "administrado por vía parenteral", como se usan en el presente documento, significan modos de administración distintos de administración enteral y tópica, normalmente mediante inyección, e incluyen, sin limitación, inyección intravenosa, intramuscular, intrarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intrarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal, epidural e intraesternal, e infusión.

30 Estos vehículos también pueden contener adyuvantes tales como conservantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes y agentes dispersantes. La prevención de la presencia de microorganismos puede garantizarse tanto por procedimientos de esterilización, arriba, como por la inclusión de diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabeno, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, y similares. También puede desearse incluir

35 agentes isotónicos, tales como azúcares, cloruro sódico, y similares, en las composiciones. Además, puede provocarse la absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable por la inclusión de agentes que retrasan la absorción tal como monoestearato de aluminio y gelatina.

40 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 por métodos convencionales conocidos para aquellos expertos en la materia.

45 Los niveles de dosificación reales de los principios activos en 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 particular, composición y modo de administración, sin ser tóxica para el paciente. El nivel de dosificación seleccionado dependerá de una variedad de factores farmacocinéticos que incluyen la actividad de las composiciones particulares de la presente invención empleadas, la vía de administración, el momento de administración, la tasa de eliminación del compuesto particular que se emplea, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos y/o materiales usados en combinación con las composiciones particulares empleadas, la edad, sexo, peso, afección, salud general e historia médica previa del paciente que está tratándose, y factores similares muy conocidos en las artes médicas.

50 La composición farmacéutica debe ser estéril y fluida hasta el punto que la composición sea administrable por jeringa. Además de agua, el vehículo es preferentemente una solución salina tamponada isotónica.

55 Puede mantenerse la fluidez apropiada, por ejemplo, usando recubrimiento tal como lecitina, por el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de la dispersión y por el uso de los tensioactivos. En muchos casos, es preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol o sorbitol, y cloruro sódico en la composición.

#### Breve descripción de las figuras

60 La Figura 1 muestra la co-administración de conjugados de ARNip que comprenden los compuestos de fórmula (I) o (Ia) y un polímero de administración *in vivo*.

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

5 La Figura 3 muestra la co-administración de conjugados de ARNip que comprenden los compuestos de fórmula (I) o (Ia) y un polímero de administración *in vivo*.

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

10 La Figura 5a muestra el silenciamiento génico mediado por hebra no codificante con ARNip completamente modificados en 2'. Se cotransfectaron células COS7 con ARNip dirigido a EGFP a 3 nM y psiCHECK2-AT. Se evaluó la actividad de inactivación de los ARNip midiendo la actividad de luciferasa de Renilla frente a la de luciérnaga de la construcción indicadora. Los ARNip se clasificaron por actividad de inactivación de ARNip de referencia sin modificar (2-19-2).

15 La Figura 5b muestra el silenciamiento génico mediado por hebra codificante con ARNip completamente modificados en 2'. Se cotransfectaron células COS7 con ARNip dirigido a EGFP a 3 nM y psiCHECK2-ST. Se evaluó la actividad de inactivación de los ARNip midiendo la expresión de luciferasa de la construcción indicadora. Los ARNip se clasificaron por actividad de inactivación de ARNip de referencia sin modificar (2-19-2).

20 La Figura 6a muestra la reducción de la actividad de FVII en suero en primates no humanos tras la inyección intravenosa de diversos ARNip modificados en 2' covalentemente unidos a un polímero de administración.

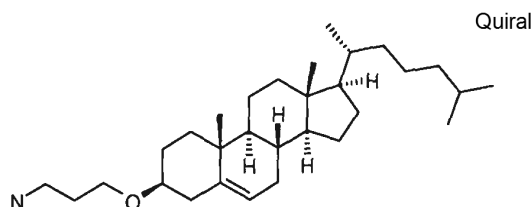
25 La Figura 6b muestra la evolución del tiempo de protrombina en primates no humanos tras el tratamiento con ARNip modificados en 2' covalentemente conjugados con un polímero de administración.

### Ejemplos

30 Los siguientes ejemplos se indican como ejemplos de referencia únicamente, con el fin de ilustrar la síntesis de los compuestos para su uso en la administración de ácidos nucleicos. No pretenden formar parte de la invención.

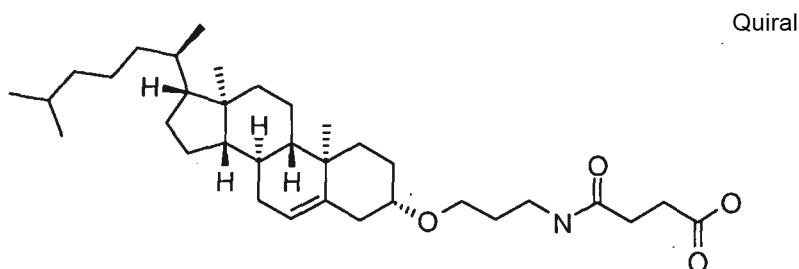
#### Ejemplo 1

35 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



40 La amina del título se preparó a partir de su precursor de nitrilo según 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

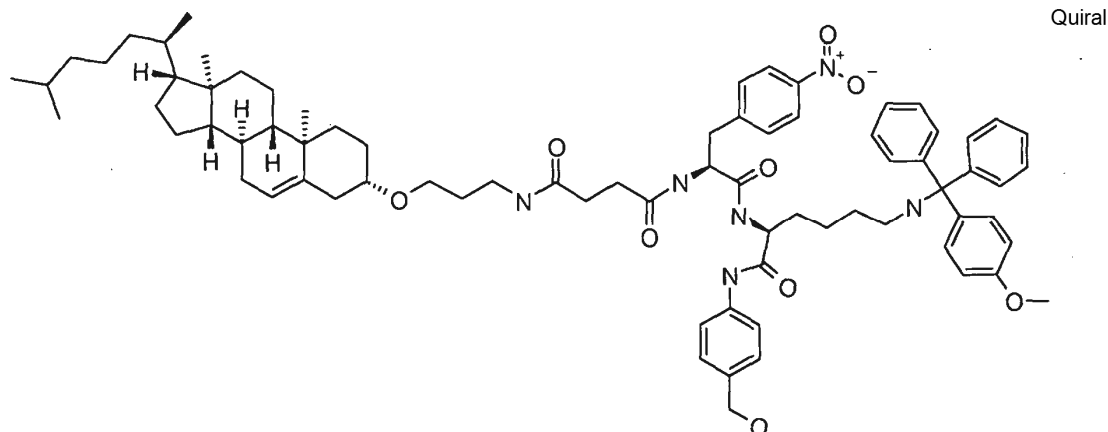


45 En un matraz redondo de 2 l, se combinaron 3-((3S,8S,9S,10R,13R,14S,17R)-10,13-dimetil-17-((R)-6-metilheptan-2-il)-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecahidro-1H-ciclopenta[a]fenantren-3-iloxi)propan-1-amina (21,15 g, 47,7 mmoles, Eq: 1,00) y base de Hünig (12,3 g, 16,6 ml, 95,3 mmoles, Eq: 2,00) con AcOEt (845 ml) dando una

solución incolora. Se añadió dihidrofurano-2,5-diona (4,77 g, 47,7 mmoles, Eq: 1,00) en THF (42 ml) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche => suspensión blanca. Se eliminaron todos los volátiles a vacío, el residuo se disolvió en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, la fase 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 en bruto se disolvió en CH<sub>3</sub>CN / H<sub>2</sub>O y se liofilizó dando 29,8 g del compuesto del título como un polvo esponjoso.

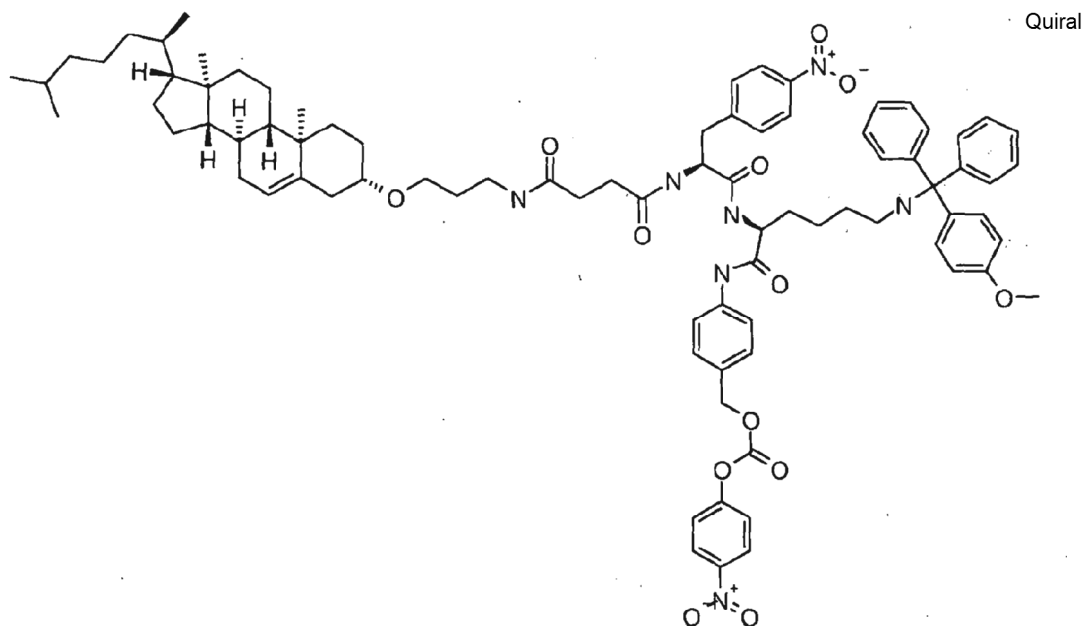
EM (ISP): (M-H) 542,5.

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



En un matraz 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-oxobutanoico anteriormente preparado (106 mg, 184 μmoles, Eq: 1,00), (S)-2-((S)-2-amino-3-(4-nitrofenil)propanamido)-N-(4-(hidroximetil)fenil)-6-((4-metoxifenil)difenilmetilamino)hexanamida (132 mg, 184 μmoles, Eq: 1,00), HOAt (25,0 mg, 184 μmoles, Eq: 1,00) y clorhidrato de EDC (35,3 mg, 184 μmoles, Eq: 1,00) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1,8 ml) dando una solución amarilla. Se añadió base de Hünig (47,5 mg, 64,2 μl, 368 μmoles, Eq: 2,00) y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche. La CCF indicó el consumo de material de partida. Se eliminaron todos los volátiles a vacío y el producto en bruto se purificó por cromatografía ultrarrápida SiO<sub>2</sub> / 7 % de MeOH / 0,1 % de NEt<sub>3</sub> en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> produciendo 128 mg del compuesto del título como un sólido amarillo claro. EM: masa esperada: 1240,7552, masa hallada: 1240,7518.

Etapa 4:

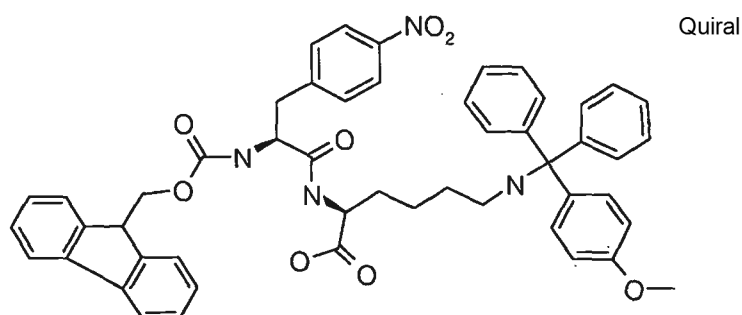


En un matraz redondo de 10 ml, se combinaron la N1-(3-((3S,8S,9S,10R,13R,14S,17R)-10,13-dimetil-17-((R)-6-metilheptan-2-il)-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecahidro-1H-ciclopenta[a]fenantren-3-iloxi)propil)-N4-((S)-1-((S)-1-(4-(hidroximetil)fenilamino)-6-((4-metoxifenil)difenilmetilamino)-1-oxohexan-2-ilamino)-3-(4-nitrofenil)-1-oxopropan-2-il)succinamida anteriormente preparada (126 mg, 101  $\mu$ moles, Eq: 1,00) y base de Hünig (39,3 mg, 53,2  $\mu$ l, 304  $\mu$ moles, Eq: 3,00) con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1,4 ml) y DMF (1,0 ml) dando una suspensión amarilla; se añadió carbonato de bis(4-nitrofenilo) (46,3 mg, 152  $\mu$ moles, Eq: 1,50) y se dejó que la reacción continuara durante la noche. La mezcla se vertió sobre hielo picado, se extrajo 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 la trituración con ~10 ml de éter dietílico, se obtuvieron 99 mg del producto del título como un sólido blanquecino.

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

El elemento estructural de dipéptido necesario para la etapa 3 se preparó del siguiente modo:

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

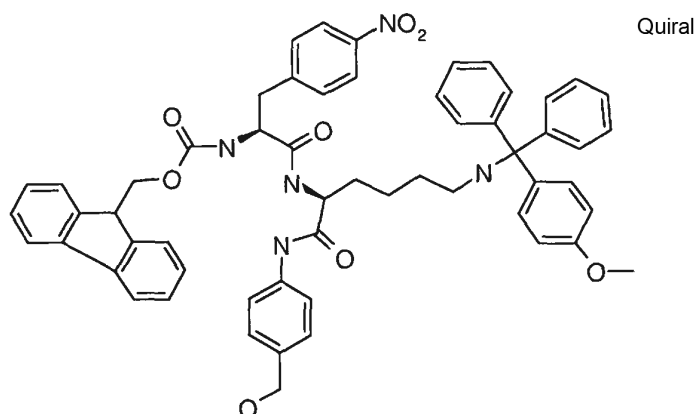


En un matraz redondo de 25 ml, se disolvió ácido (S)-2-amino-6-((4-metoxifenil)difenilmetil-amino)hexanoico (Bioconjugate Chem. 2002, 13, 855-869, 968 mg, 2,31 mmoles, Eq: 1,00) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (20 ml) dando una solución amarilla clara. Se añadieron base de Hünig (897 mg, 1,21 ml, 6,94 mmoles, Eq: 3,00) y trimetilclorosilano (528 mg, 621  $\mu$ l, 4,86 mmoles, Eq: 2,10) y la mezcla de reacción se agitó durante 15 min.

En un segundo matraz redondo de 50 ml, se disolvió ácido (S)-2-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonilamino)-3-(4-nitrofenil)propanoico (1 g, 2,31 mmoles, Eq: 1,00) en DMF (20 ml) dando una solución incolora. Se añadieron base de Hünig (359 mg, 485  $\mu$ l, 2,78 mmoles, Eq: 1,20) y TPTU [125700-71-2] (687 mg, 2,31 mmoles, Eq: 1,00) y la mezcla de reacción se agitó durante 20'. Se añadió la solución del primer matraz que contiene la monosililamina del éster silílico correspondiente y la reacción se agitó durante otras 3 horas. La mezcla se vertió sobre hielo picado / NH<sub>4</sub>Cl, se extrajo 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 SiO<sub>2</sub> / 10 % de MeOH / 0,1 % de NEt<sub>3</sub> en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> dio 1,38 g del compuesto del título como espuma parduzca.

EM (ISP): (M+H) 833,5, (M+Na) 855,4.

Etapa b: Éster 9H-fluoren-9-ilmetilíco del ácido [(S)-1-((S)-1-(4-Hidroximetil-fenilcarbamoil)-5-[[4-metoxi-fenil]-difenil-metil]-amino)-pentilcarbamoil]-2-(4-nitro-fenil)-etil]-carbámico

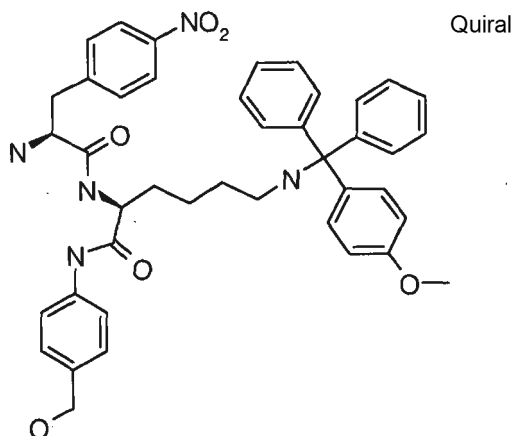


En un matraz con forma de pera de 250 ml, se disolvieron el ácido (S)-2-((S)-2-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonilamino)-3-(4-nitrofenil)propanamido)-6-((4-metoxifenil)difenil-metilamino)hexanoico anteriormente

sintetizado (1,38 g, 1,66 mmoles, Eq: 1,00), (4-aminofenil)metanol (204 mg, 1,66 mmoles, Eq: 1,00), HOAt (226 mg, 1,66 mmoles, Eq: 1,00) y clorhidrato de EDC (318 mg, 1,66 mmoles, Eq: 1,00) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (16,6 ml) dando una solución amarilla. Se añadió base de Hünig (428 mg, 579 µl, 3,31 mmoles, Eq: 2,00) y se dejó que la reacción continuara durante la noche. La mezcla se vertió sobre hielo picado / NH<sub>4</sub>Cl (pH ~7), se extrajo 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 en bruto se trituró con éter dietílico (1 x 50 ml); el sólido resultante se separó por filtración y se secó dando 1,214 g del compuesto del título como un sólido marrón claro.

EM (ISP): (M+H) 938,7.

- 10 Etapa c: (4-Hidroximetil-fenil)-amida del ácido (S)-2-[(S)-2-Amino-3-(4-nitro-fenil)-propionilamino]-6-[[4-metoxi-fenil]-difenil-metil]-amino]-hexanoico



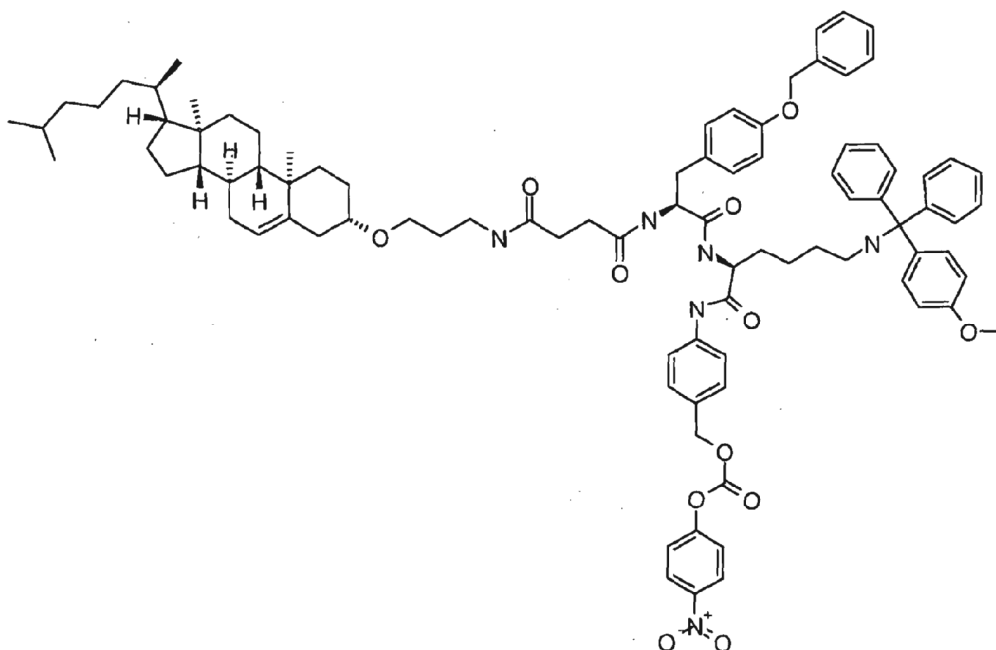
- 15 En un matraz redondo de 50 ml, se combinó el éster 9H-fluoren-9-ilmetílico del ácido [(S)-1-((S)-1-(4-hidroximetil-fenilcarbamoil)-5-[[4-metoxi-fenil]-difenil-metil]-amino)-pentilcarbamoil)-2-(4-nitro-fenil)-etil]-carbámico anteriormente preparado (1,214 g, 1,29 mmoles, Eq: 1,001) con THF (19 ml) dando una solución marrón. A 0°, se añadió dietilamina (1,77 g, 2,49 ml, 24,2 mmoles, Eq: 18,70). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3 h cuando La EM indicó la desaparición del material de partida. Se evaporaron todos los volátiles a vacío; la
- 20 subsiguiente cromatografía ultrarrápida SiO<sub>2</sub> / 0,1 % de NEt<sub>3</sub> en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> => 10 % de MeOH / 0,1 % de NEt<sub>3</sub> en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, seguido de una segunda cromatografía ultrarrápida SiO<sub>2</sub> / 5 % de MeOH / 0,1 % de NEt<sub>3</sub> en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, proporcionó 502 mg del compuesto del título como una espuma marrón clara. EM: masa esperada: 715,337, masa hallada: 715,3362.

- 25 Ejemplo 2

O-Bencil-N-[4-({3-[(3beta)-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



Quiral

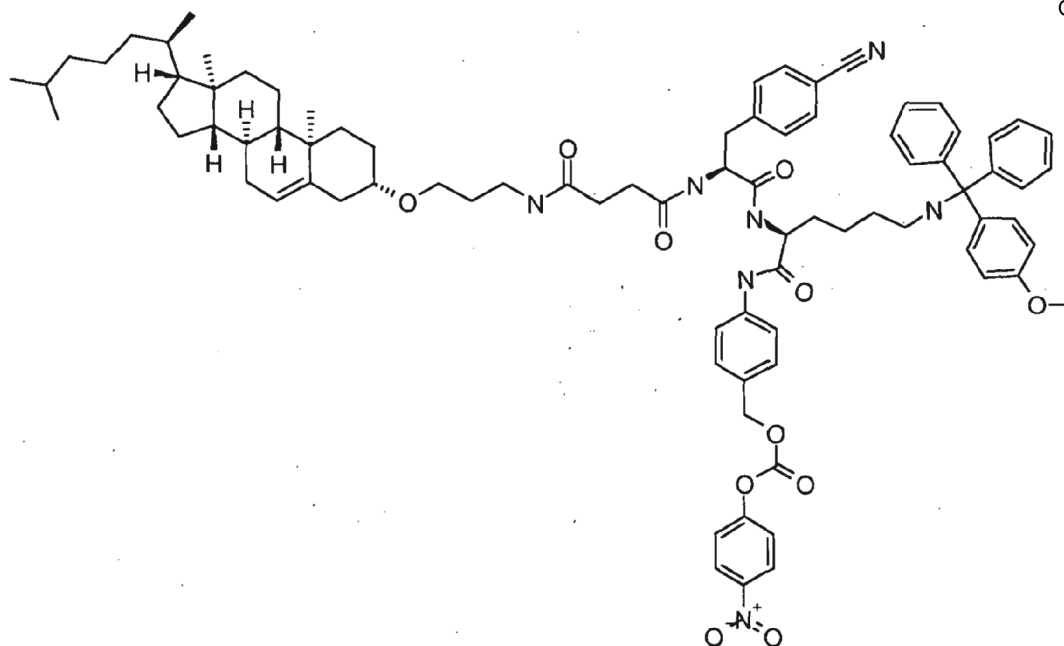


5 Se preparó en analogía al Ejemplo 1, pero usando en la etapa 3 (4-hidroxi-metil-fenil)-amida del ácido (S)-2-[(S)-2-amino-3-(4-benciloxifenil)-propionil-amino]-6-[[4-metoxi-fenil]-difenil-metil]-amino]-hexanoico en lugar de (S)-2-[(S)-2-amino-3-(4-nitrofenil)propanamido]-N-(4-(hidroximetil)fenil)-6-((4-metoxifenil)difenil-metil-amino)hexanamida como reactivo de acoplamiento. Lo anterior se preparó a partir del ácido (S)-2-((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil-amino)-3-(4-(benciloxi)fenil)propanoico como se ha descrito anteriormente en las etapas a) -c].  
EM: masa esperada: 1466,8182, masa hallada: 1466,8136.

## 10 Ejemplo 3

N-[4-((3-[(3Beta)-colest-5-en-3-iloxi]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

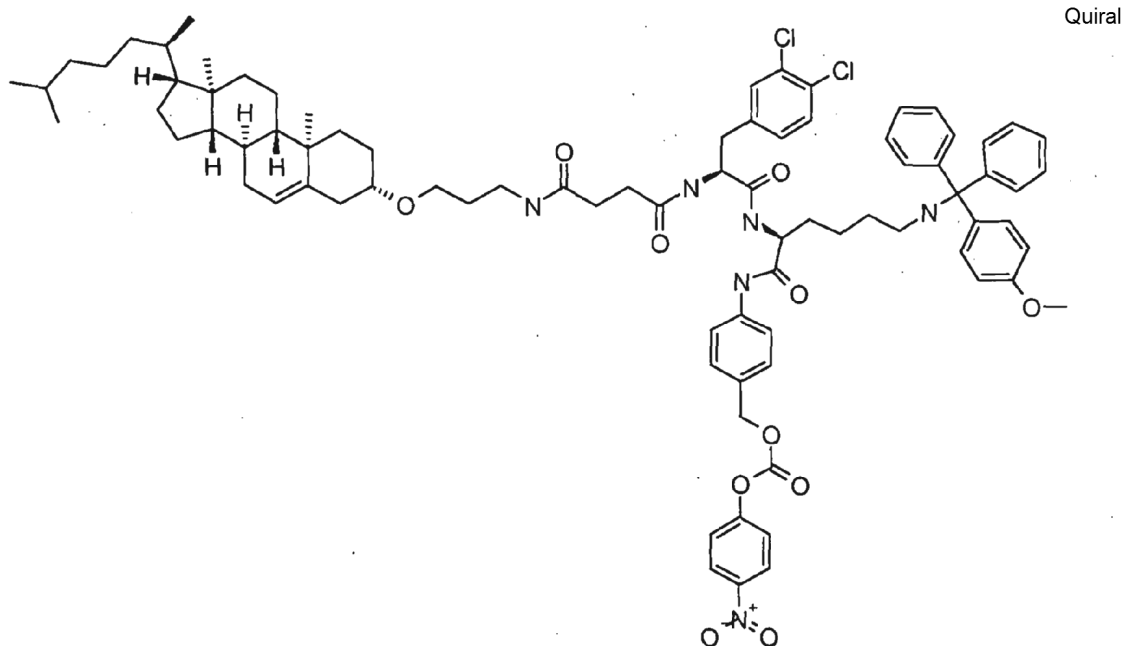


15 Se preparó en analogía al Ejemplo 1, pero usando en la etapa 3 (4-hidroxi-metil-fenil)-amida del ácido (S)-2-[(S)-2-amino-3-(4-ciano-fenil)-propionil-amino]-6-[[4-metoxi-fenil]-difenil-metil]-amino]-hexanoico en lugar de (S)-2-[(S)-2-amino-3-(4-nitrofenil)-propanamido]-N-(4-(hidroximetil)fenil)-6-((4-metoxifenil)difenil-metil-amino)hexanamida como

reactivo de acoplamiento. Lo anterior se preparó a partir de ácido (S)-2-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonilamino)-3-(4-cianofenil)propanoico como se ha descrito anteriormente en las etapas a] - c].  
EM: masa esperada: 1385,7716, masa hallada: 1385,7696.

5 Ejemplo 4

3,4-Dicloro-N-[4-({3-[(3beta)-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]-L-lisinamida



10

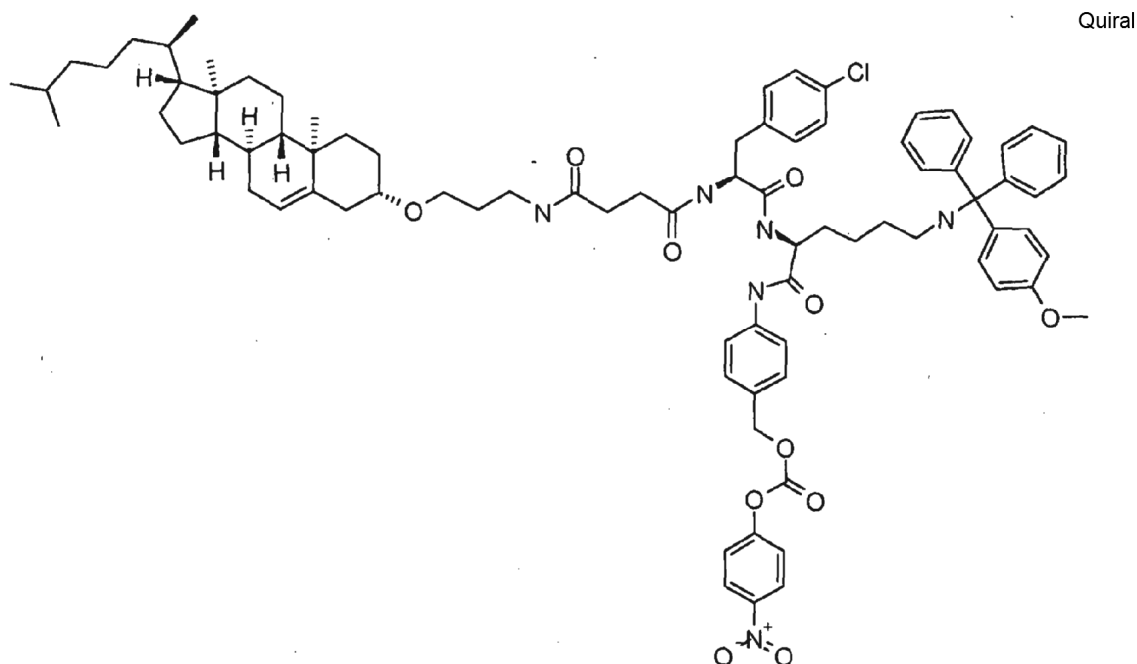
Se preparó en analogía al Ejemplo 1, pero usando en la etapa 3 (4-hidroxi-metil-fenil)-amida del ácido (S)-2-[(S)-2-amino-3-(3,4-dicloro-fenil)-propionilamino]-6-[[4-(4-metoxi-fenil)-difenil-metil]-amino]-hexanoico en lugar de (S)-2-[(S)-2-amino-3-(4-nitrofenil)-propanamido]-N-(4-(hidroximetil)fenil)-6-[(4-metoxifenil)difenil-metilamino]hexanamida como reactivo de acoplamiento. Lo anterior se preparó a partir de ácido (S)-2-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonilamino)-3-(3,4-diclorofenil)propanoico como se ha descrito anteriormente en las etapas a] - c].  
EM: masa esperada: 1428,6984, masa hallada: 1428,695.

15

Ejemplo 5

20

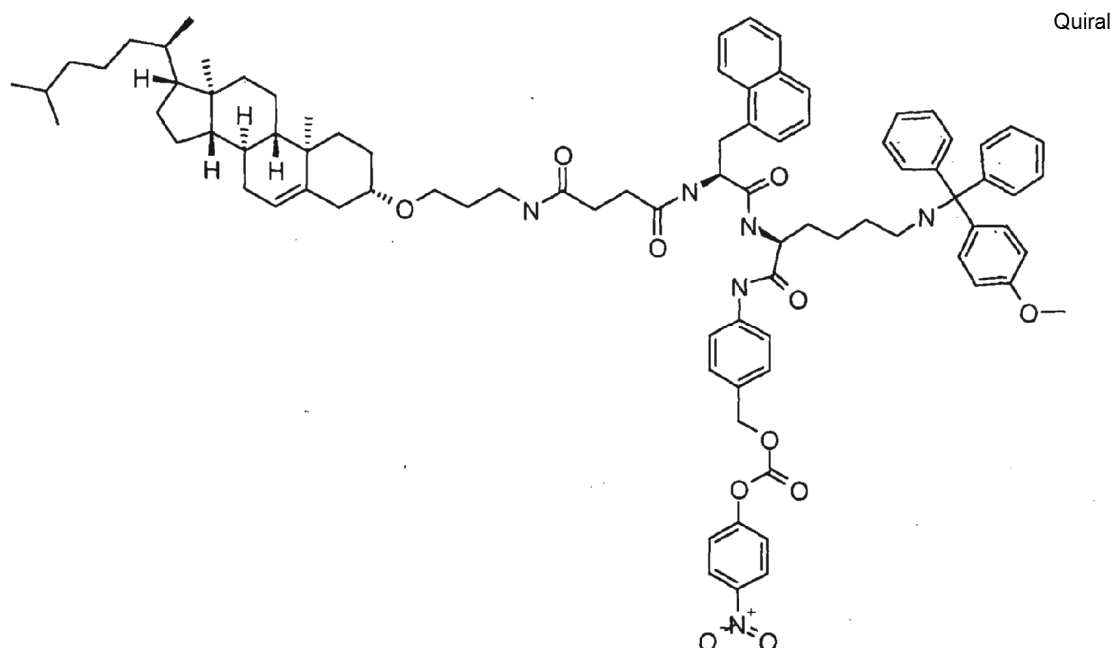
4-Cloro-N-[4-({3-[(3beta)-colest-5-en-3-ilo]propil}amino)-4-oxobutanoil]-L-fenilalanil-N~6~-[4-metoxifenil](difenil)metil]-N-[4-({[(4-nitrofenoxi)carbonil]oxi}metil)fenil]-L-lisinamida



5 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 reactivo de acoplamiento. Lo anterior se preparó a partir de (S)-2-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)-carbonilamino)-3-(4-clorofenil)propanoico ácido como se ha descrito anteriormente en las etapas a) - c].  
EM: masa esperada: 1394,7373, masa hallada: 1394,7342.

10 Ejemplo 6

15 4-Nitrofenilcarbonato de 4-[[[(2S)-2-[[[(2S)-2-[(4-[[[3-(((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)propanoil]amino]-6-[[[(4-metoxifenil)(difenil)metil]amino]hexanoil]amino]bencilo (nombre no preferido)

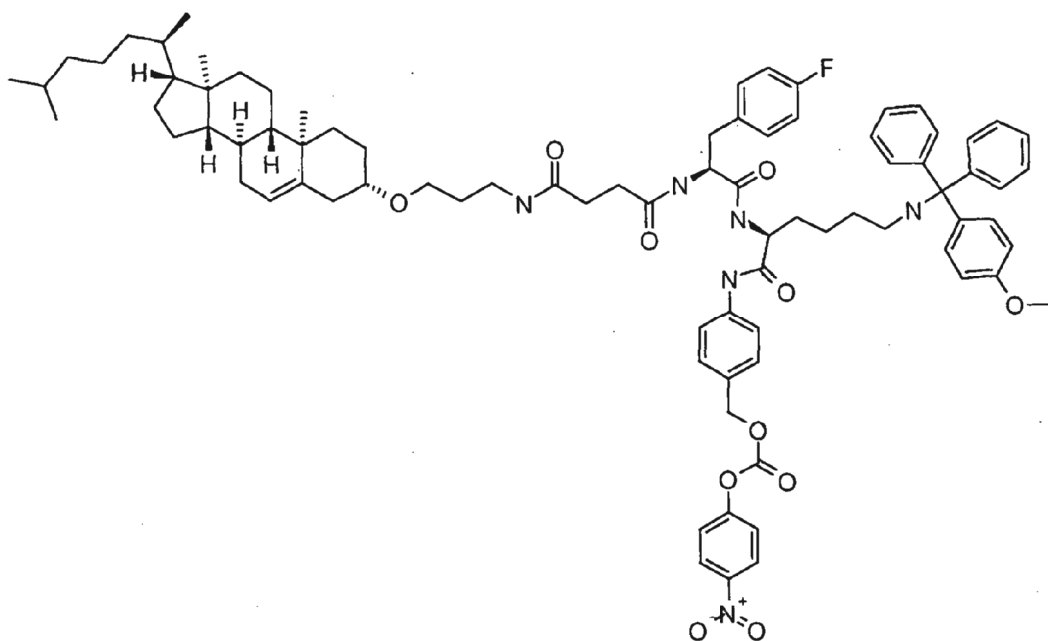


Se preparó en analogía al Ejemplo 1, pero usando en la etapa 3 (4-hidroxi metil-fenil)-amida del ácido (S)-2-((S)-2-amino-3-naftalen-1-il-propionilamino)-6-[[4-metoxi-fenil]-difetil-metil]-amino}-hexanoico en lugar de (S)-2-((S)-2-amino-3-(4-nitrofenil)-propanamido)-N-(4-(hidroximetil)fenil)-6-((4-metoxifenil)difenil-metilamino)hexanamida como reactivo de acoplamiento. Lo anterior se preparó a partir de ácido (S)-2-((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonilamino)-3-(naftalen-1-il)propanoico como se ha descrito anteriormente en las etapas a)-c).

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

Ejemplo 7

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



Quiral

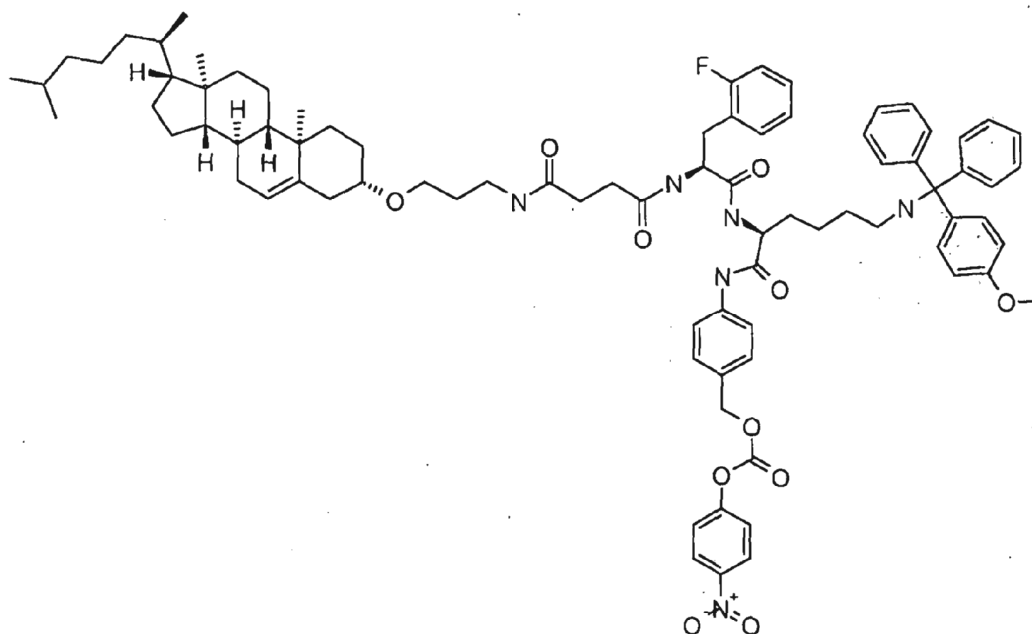
15 Se preparó en analogía al Ejemplo 1, pero usando en la etapa 3 (4-hidroxi metil-fenil)-amida del ácido (S)-2-[(S)-2-amino-3-(4-fluoro-fenil)-propionilamino]-6-[[4-metoxi-fenil]-difetil-metil]-amino}-hexanoico en lugar de (S)-2-((S)-2-amino-3-(4-nitrofenil)-propanamido)-N-(4-(hidroximetil)fenil)-6-((4-metoxifenil)difenil-metilamino)-hexanamida como reactivo de acoplamiento. Lo anterior se preparó a partir de ácido (S)-2-((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonilamino)-3-(4-fluorofenil)propanoico como se ha descrito anteriormente en las etapas a) - c).

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

Ejemplo 8

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

Quiral



5

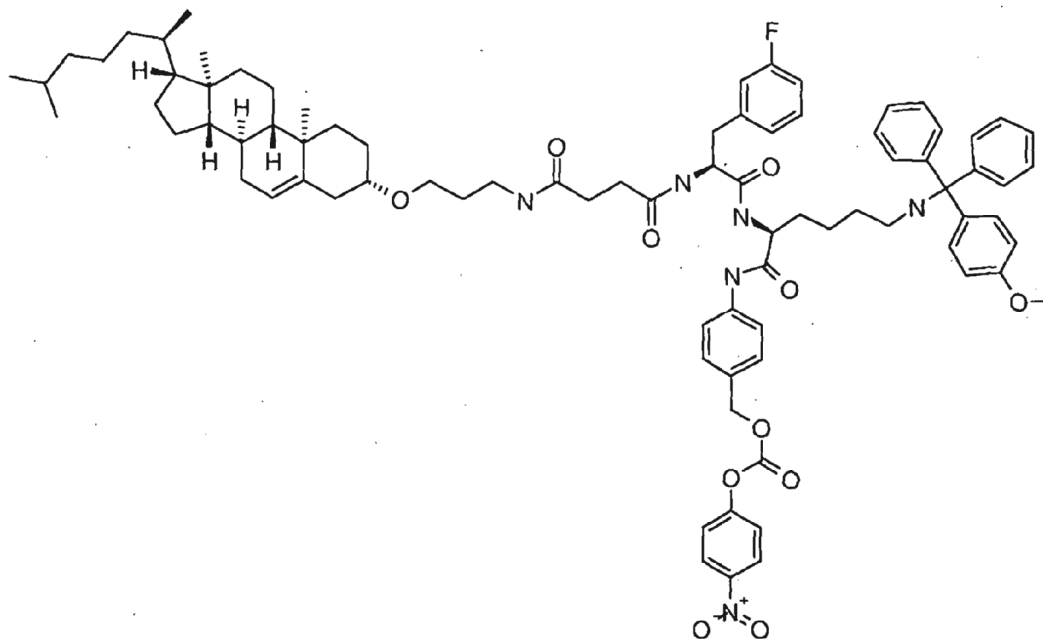
Se preparó en analogía al Ejemplo 1, pero usando en la etapa 3 (4-hidroxi-metil-fenil)-amida del ácido (S)-2-[(S)-2-amino-3-(2-fluorofenil)-propionilamino]-6-[[4-metoxi-fenil]-difenil-metil]-amino]-hexanoico en lugar de (S)-2-[(S)-2-amino-3-(4-nitrofenil)-propanamido]-N-(4-(hidroximetil)fenil)-6-((4-metoxifenil)difenil-metilamino)-hexanamida como reactivo de acoplamiento. Lo anterior se preparó a partir de ácido (S)-2-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonilamino)-3-(2-fluorofenil)propanoico como se ha descrito anteriormente en las etapas a) - c].

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

## 10 Ejemplo 9

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

Quiral



15

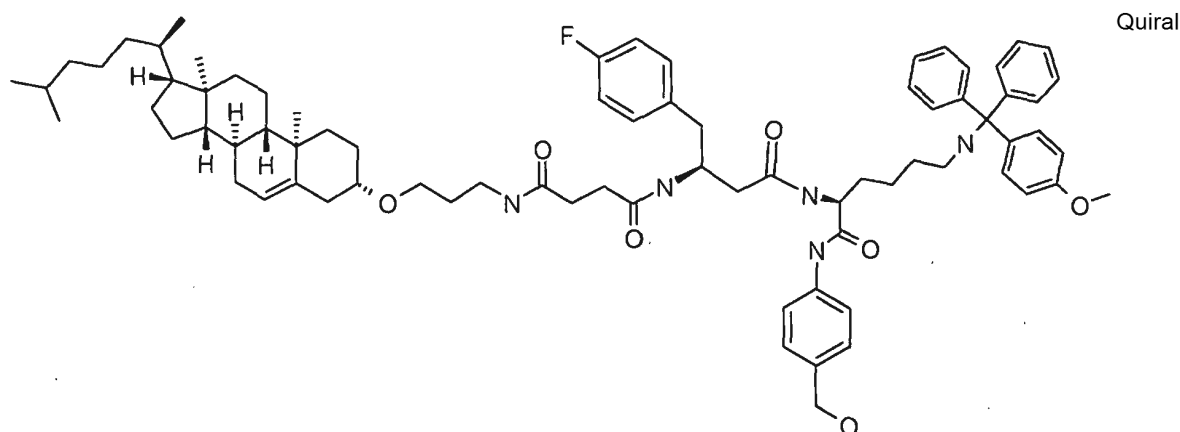
Se preparó en analogía al Ejemplo 1, pero usando en la etapa 3 (4-hidroxi-metil-fenil)-amida del ácido (S)-2-[(S)-2-amino-3-(3-fluorofenil)-propionilamino]-6-[[4-metoxi-fenil]-difenil-metil]-amino]-hexanoico en lugar de (S)-2-[(S)-2-amino-3-(4-nitrofenil)-propanamido]-N-(4-(hidroximetil)fenil)-6-((4-metoxifenil)difenil-metilamino)-hexanamida como

reactivo de acoplamiento. Lo anterior se preparó a partir de ácido (S)-2-((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonilamino)-3-(3-fluorofenil)propanoico como se ha descrito anteriormente en las etapas a] - c].

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

## 5 Ejemplo 10

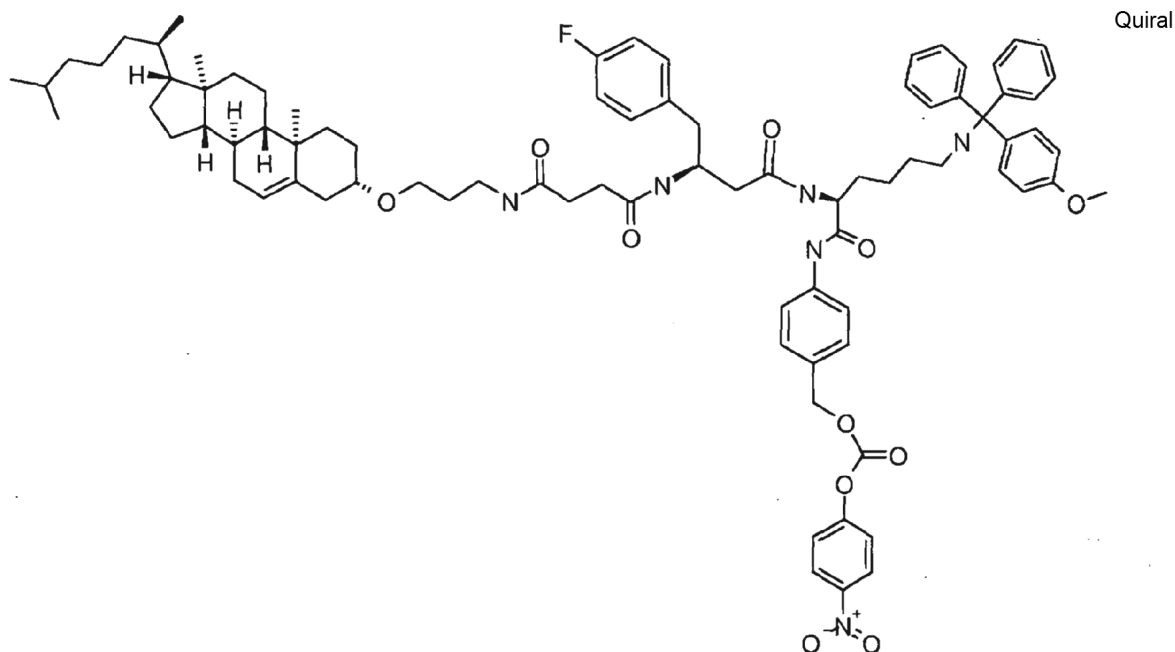
Etapa 1: N1-(3-((3S,8S,9S,10R,13R,14S,17R)-10,13-dimetil-17-((R)-6-metilheptan-2-il)-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecahidro-1H-ciclopenta[a]fenantren-3-iloxi)propil)-N4-((S)-1-(4-fluorofenil)-4-((S)-1-(4-(hidroximetil)fenilamino)-6-((4-metoxifenil)difenilmetilamino)-1-oxohexan-2-ilamino)-4-oxobutan-2-il)succinamida



15 En un matraz 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-oxobutanoico anteriormente preparado (109 mg, 188  $\mu$ moles, Eq: 1,00), (4-hidroximetil-fenil)-amida del ácido (S)-2-[(S)-3-amino-4-(4-fluoro-fenil)-butirilamino]-6-[[4-(4-metoxi-fenil)-difenil-metil]-amino]-hexanoico (132 mg, 188  $\mu$ moles, Eq: 1,00), HOAt (25,6 mg, 188  $\mu$ moles, Eq: 1,00) y clorhidrato de EDC (36,1 mg, 188  $\mu$ moles, Eq: 1,00) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2 ml) dando una solución amarilla. Se añadió base de Hünig (48,7 mg, 64,1  $\mu$ l, 377  $\mu$ moles, Eq: 2,00) y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche. La CCF indicó el consumo de material de partida. Se eliminaron todos los volátiles a vacío y el producto en bruto se purificó por cromatografía ultrarrápida SiO<sub>2</sub> / 5 % de MeOH / 0,1 % de NEt<sub>3</sub> en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> dando 197 mg del compuesto del título como un sólido blanquecino.

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

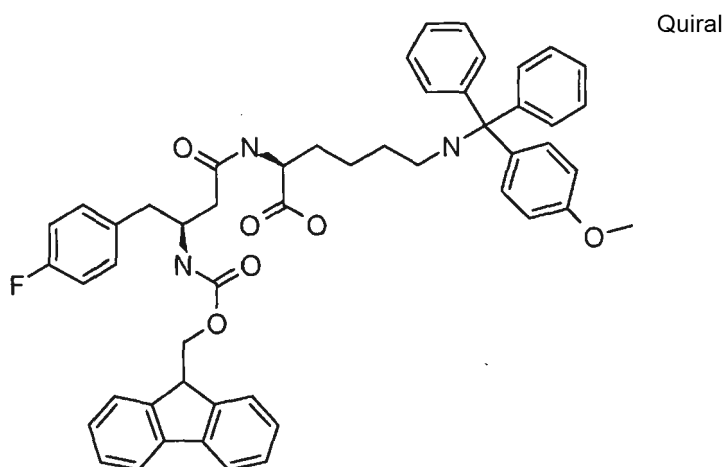
25 Etapa 2: 4-Nitrofenilcarbonato de 4-((S)-2-((S)-3-(4-(3-((3S,8S,9S,10R,13R,14S,17R)-10,13-dimetil-17-((R)-6-metilheptan-2-il)-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecahidro-1H-ciclopenta[a]fenantren-3-iloxi)propilamino)-4-oxobutanamido)-4-(4-fluorofenil)butanamido)-6-((4-metoxifenil)difenilmetilamino)hexanamido)-bencilo



En un matraz 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-(4-fluorofenil)-4-((S)-1-(4-(hidroximetil)fenilamino)-6-((4-metoxifenil)difenilmetilamino)-1-oxohexan-2-ilamino)-4-oxobutan-2-il)succinamida anteriormente preparada (196 mg, 160  $\mu$ moles, Eq: 1,00) y base de Hünig (61,9 mg, 81,4  $\mu$ l, 479  $\mu$ moles, Eq: 3,00) con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1,6 ml) y DMF (0,8 ml) dando una suspensión amarilla; se añadió carbonato de bis(4-nitrofenilo) (72,8 mg, 239  $\mu$ moles, Eq: 1,50) y se dejó que la reacción continuara a temperatura ambiente durante la noche. La mezcla se vertió sobre hielo picado / NH<sub>4</sub>Cl (pH ~6), se extrajo 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. Después de la trituración con AcOEt / heptano se obtuvieron 123 mg del compuesto del título como un sólido amarillo claro.  
EM: masa esperada: 1392,7825, masa hallada: 1392,7819.

El elemento estructural dipeptídico necesario para la etapa 1 se preparó del siguiente modo:

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

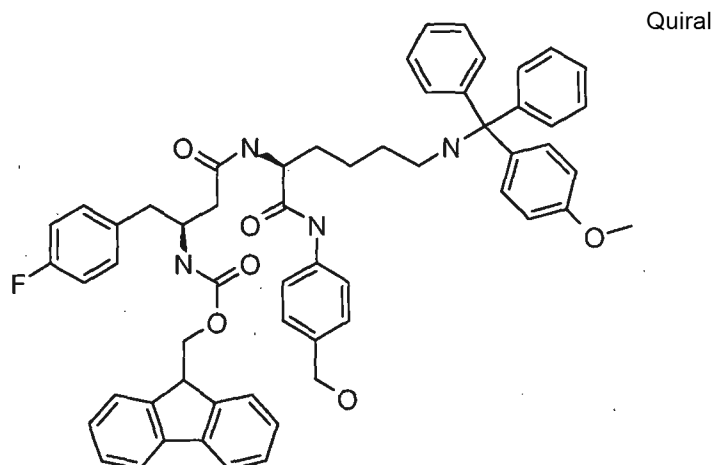


En un matraz redondo de 25 ml, se disolvió ácido (S)-2-amino-6-((4-metoxifenil)difenilmetil-amino)hexanoico (Bioconjugate Chem. 2002, 13, 855-869, 1040 mg, 2,48 mmoles, Eq: 1,00) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (12,5 ml) dando una solución amarilla pálida. Se añadieron base de Hünig (961 mg, 1,27 ml, 7,44 mmoles, Eq: 3,00) y trimetilclorosilano (566 mg, 621  $\mu$ l, 5,21 mmoles, Eq: 2,10) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 20 min.

En un segundo matraz redondo de 50 ml, se disolvió ácido (S)-3-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil-amino)-4-(4-

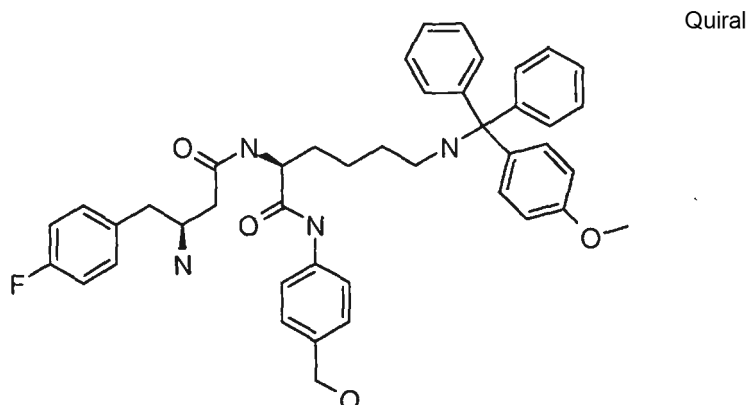
5 fluorofenil)butanoico (1040 mg, 2,48 mmoles, Eq: 1,00) en DMF (12,5 ml) dando una solución incolora. Se añadieron base de Hünig (385 mg, 506  $\mu$ l, 2,98 mmoles, Eq: 1,20) y TPTU [125700-71-2] (737 mg, 2,48 mmoles, Eq: 1,00) y la mezcla de reacción se agitó durante 15 min. Se añadió la solución del primer matraz que contenía la monosililamina del éster de sililo correspondiente y la reacción se agitó durante otras 3 horas a temperatura ambiente. La mezcla se vertió sobre hielo picado /  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , se extrajo 2 x con AcOEt, se lavó con  $\text{H}_2\text{O}$  y salmuera, se secó sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  y se evaporó a sequedad. La cromatografía ultrarrápida  $\text{SiO}_2$  / 5 % de MeOH / 0,1 % de  $\text{NEt}_3$  en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  proporcionó 2,10 g del compuesto del título como una espuma amarilla.  
EM (ISP): (M+H) 820,6.

10 Etapa b: Éster 9*H*-fluoren-9-ilmetilico del ácido {(S)-2-(4-fluoro-fenil)-1-[(S)-1-(4-hidroximetil-fenilcarbamoil)-5-[(4-metoxi-fenil)-difenil-metil]-amino]-pentilcarbamoil)-metil]-etil}-carbámico



15 En un matraz con forma de pera de 250 ml, se disolvieron el éster 9*H*-fluoren-9-ilmetilico del ácido {(S)-2-(4-fluoro-fenil)-1-[(S)-1-(4-hidroximetil-fenilcarbamoil)-5-[(4-metoxi-fenil)-difenil-metil]-amino]-pentilcarbamoil)-metil]-etil}-carbámico anteriormente sintetizado (2,10 g, 2,56 mmoles, Eq: 1,00), (4-aminofenil)metanol (315 mg, 2,55 mmoles, Eq: 1,00), HOAt (349 mg, 2,56 mmoles, Eq: 1,00) y clorhidrato de EDC (491 mg, 2,56 mmoles, Eq: 1,00) en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (12,5 ml). Se añadió base de Hünig (662 mg, 871  $\mu$ l, 5,21 mmoles, Eq: 2,00) y se dejó que la reacción continuara durante la noche. La mezcla se vertió sobre hielo picado /  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (pH  $\sim$ 7), se extrajo 2 x con AcOEt, se lavó con  $\text{H}_2\text{O}$  y salmuera, se secó sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  y se evaporó a sequedad. El producto en bruto se trituró con éter dietílico (1 x 50 ml); el sólido resultante se separó por filtración y se secó dando 0,796 g del compuesto del título como un sólido marrón claro.  
EM (ISP): (M+H) 925,6.

25 Etapa c: (4-Hidroximetil-fenil)-amida del ácido (S)-2-[(S)-3-Amino-4-(4-fluoro-fenil)-butirilamino]-6-[(4-metoxi-fenil)-difenil-metil]-amino]-hexanoico



30 En un matraz redondo de 50 ml, se combinó el éster 9*H*-fluoren-9-ilmetilico del ácido {(S)-2-(4-fluoro-fenil)-1-[(S)-1-(4-hidroximetil-fenilcarbamoil)-5-[(4-metoxi-fenil)-difenil-metil]-amino]-pentilcarbamoil)-metil]-etil}-carbámico anteriormente preparado (793 mg, 857 moles, Eq: 1,001) con THF (12 ml) dando una solución parduzca. A 0°, se añadió dietilamina (1,13 g, 1,59 ml, 15,4 mmoles, Eq: 18). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante la



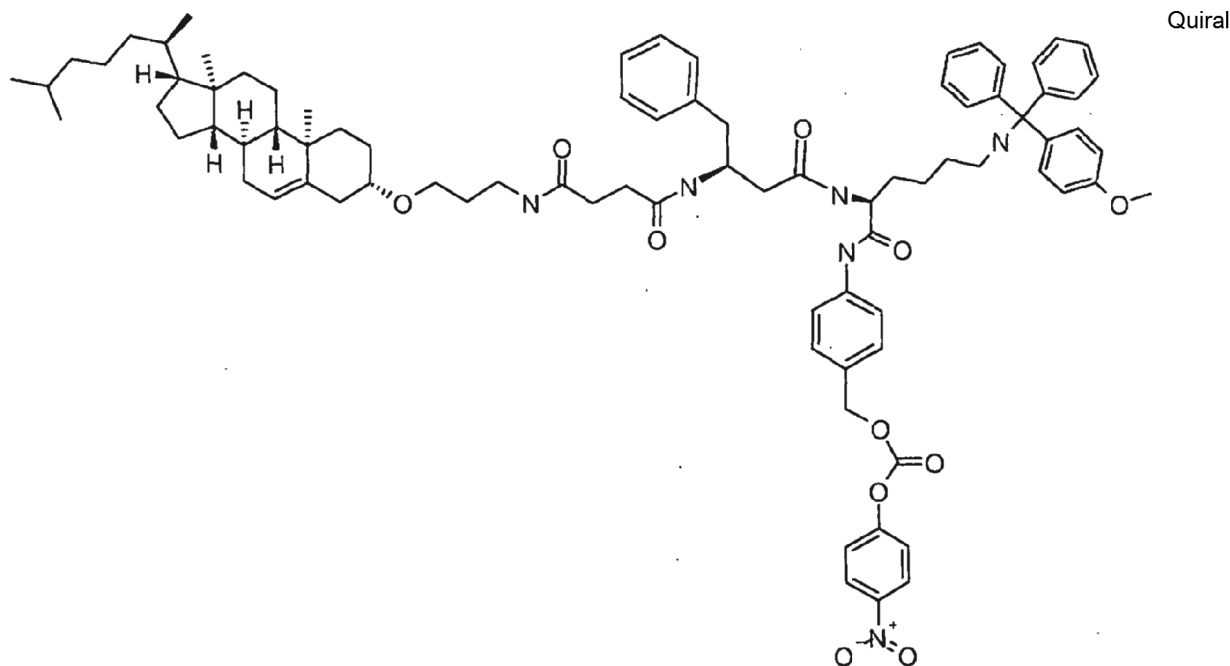
noche. La mezcla se vertió sobre hielo picado / NH<sub>4</sub>Cl (pH ~7), se extrajo 2 x con AcOEt, se lavó con H<sub>2</sub>O y salmuera, se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se evaporó a sequedad. La cromatografía ultrarrápida SiO<sub>2</sub> / 10 % de MeOH / 0,1 % de NEt<sub>3</sub> en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> dio 500 mg del compuesto del título como un sólido blanquecino.  
EM: masa esperada: 702,3581, masa hallada: 702,3578.

5

## Ejemplo 11

10

4-Nitrofenilcarbonato de 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)encilo



15

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 del ácido (S)-2-[[S]-3-amino-4-(4-fluoro-fenil)-butirilamino]-6-[[4-metoxi-fenil]-difenil-metil]-amino}-hexanoico como reactivo de acoplamiento. Lo anterior se preparó a partir de ácido (S)-3-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonilamino)-4-fenilbutanoico como se ha descrito anteriormente en las etapas a) - c].

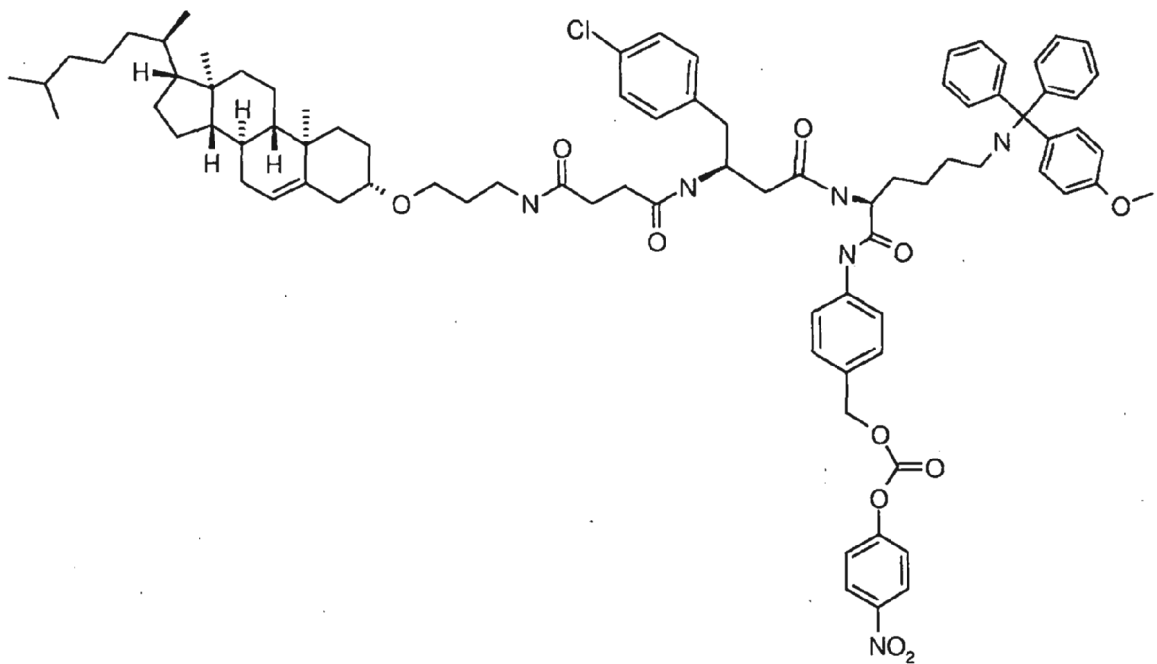
20

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

## Ejemplo 12

25

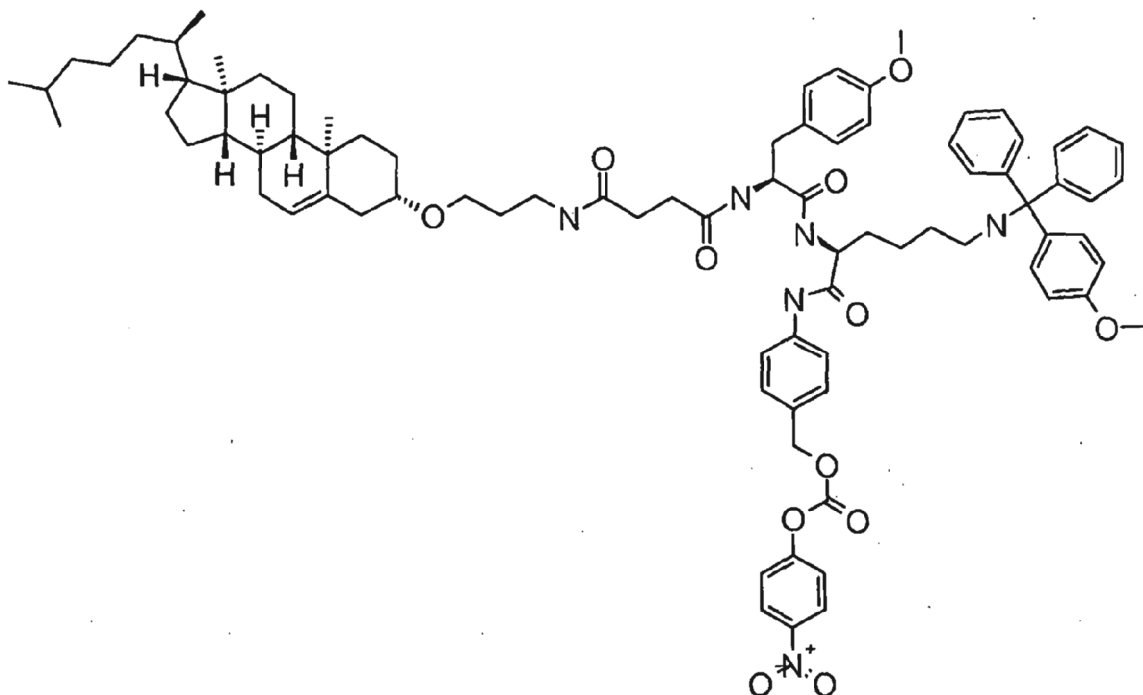
4-Nitrofenilcarbonato de 4-(1N~2~-[(3S)-4-(4-clorofenil)-3-[[4-({3-[(3beta)-colest-5-en-3-iloxi]propil}amino)-4-oxobutanoil]amino]butanoil]-N~6~-[(4-metoxifenil)(difenil)metil]-L-lisil]amino)encilo



5 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 del ácido (S)-2-[(S)-3-amino-4-(4-fluoro-fenil)-butirilamino]-6-[[4-metoxi-fenil]-difenil-metil]-amino)-hexanoico como reactivo de acoplamiento. Lo anterior se preparó a partir de ácido (S)-3-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonilamino)-4-(4-clorofenil)-butanoico como se ha descrito anteriormente en las etapas a) - c).  
EM (ISP): (M+H) 1409,9.

10 Ejemplo 13

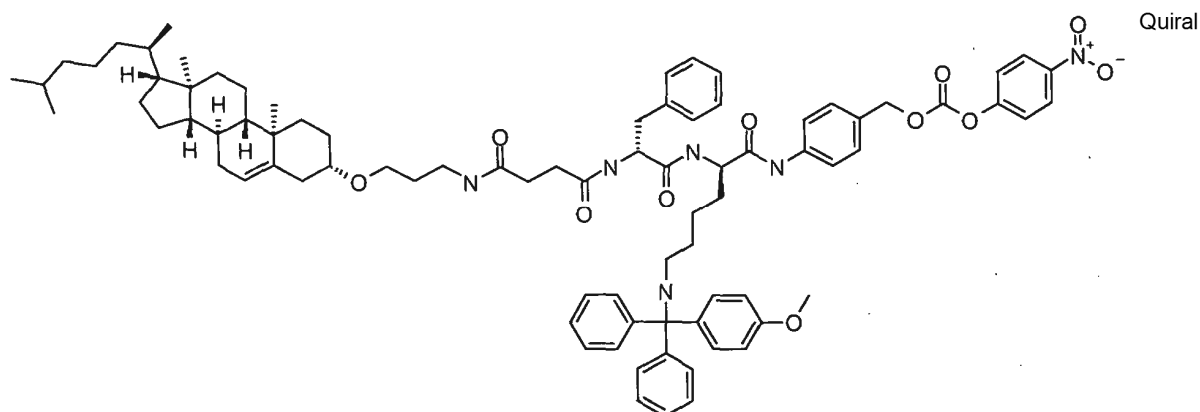
N-[4-((3-[(3Beta)-colest-5-en-3-iloxi]propil)amino)-4-oxobutanoil]-O-metil-L-tirosil-N~6~-[(4-metoxifenil)(difenil)metil]-N-[4-(((4-nitrofenoxi)carbonil]oxi)metil)fenil]-L-lisinamida



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 reactivo de acoplamiento. Lo anterior se preparó a partir de ácido (S)-2-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonilamino)-3-(4-metoxifenil)propanoico como se ha descrito anteriormente en las etapas a) - c) del Ejemplo 1.  
EM (ISP): (M+H) 1391,9.

Ejemplo 14

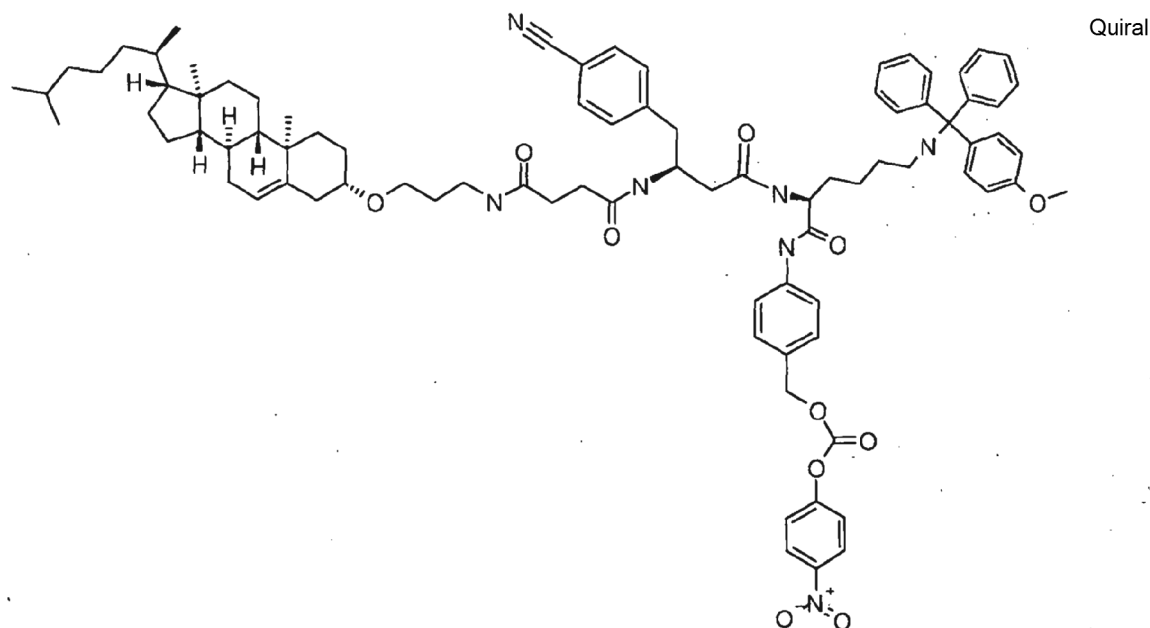
10 N-[4-({3-[(3Beta)-colest-5-en-3-ilo]propil}amino)-4-oxobutanoil]-D-fenilalanil-N-6-~-[4-metoxifenil](difenil)metil]-N-[4-(((4-nitrofenoxi)carbonil]oxi)metil]fenil]-D-lisinamida



15 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 reactivo de acoplamiento. Este elemento estructural 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) como se ha descrito anteriormente en las etapas a) - c).  
20 EM: masa esperada: 1360,7763, masa hallada: 1360,7774.

Ejemplo 15

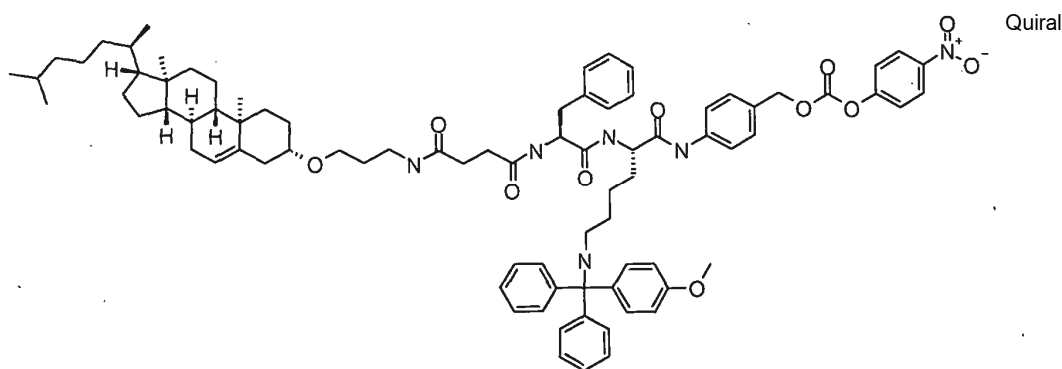
25 4-Nitrofenilcarbonato de 4-({N-2-~-[3S]-3-[[4-({3-[(3beta)-colest-5-en-3-ilo]propil}amino)-4-oxobutanoil]amino]-4-(4-cianofenil)butanoil]-N-6-~-[4-metoxifenil](difenil)metil]-L-lisil}amino)encilo



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-metil-amino)hexanamida en lugar de (4-hidroximetil-fenil)-amida del ácido (S)-2-((S)-3-amino-4-(4-fluoro-fenil)-butirilamino)-6-(((4-metoxi-fenil)-difenil-metil)-amino)-hexanoico como reactivo de acoplamiento. Lo anterior se preparó a partir de ácido (S)-3-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonilamino)-4-(4-cianofenil)butanoico como se ha descrito anteriormente en las etapas a) - c).  
 EM: masa esperada: 1399,7872, masa hallada: 1399,7857.

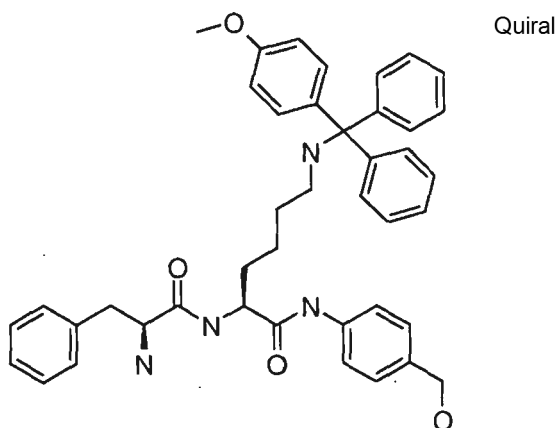
Ejemplo 16

10 N-[4-({3-[(3beta)-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-lisnamida



15 Etapa 1:

(4-Hidroximetil-fenil)-amida del ácido (S)-2-((S)-2-amino-3-fenil-propionilamino)-6-(((4-metoxi-fenil)-difenil-metil)-amino)-hexanoico

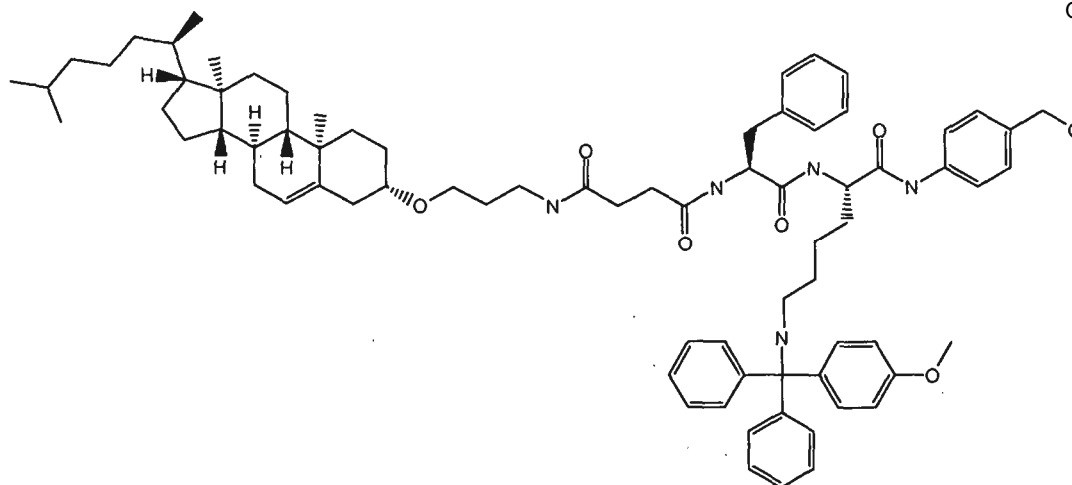


20 Se preparó el elemento estructural (4-hidroximetil-fenil)-amida del ácido (S)-2-((S)-2-amino-3-fenil-propionilamino)-6-(((4-metoxi-fenil)-difenil-metil)-amino)-hexanoico en analogía al procedimiento descrito en Bioconjugate Chem., Vol. 13, No.4, 2002, 855-869  
 25 EM (ISP): (M+H) 671,5

Etapa 2:

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)-6-((4-metoxifenil)difenilmetilamino)-1-oxohexan-2-ilamino)-1-oxo-3-fenilpropan-2-il)succinamida

Quiral



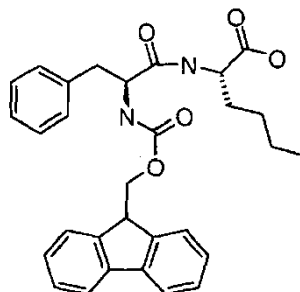
5 Se añadió TPTU [125700-71-2] (233 mg, 784  $\mu$ moles, Eq: 1,00) a una solución de ácido N-{3-[(3S,8S,9S,10R,13R,14S,17R)-17-((R)-1,5-dimetil-hexil)-10,13-dimetil-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecahidro-1H-ciclopenta[a]fenantren-3-iloxi]-propil}-succinámico (véase el Ejemplo 1, etapa 2) (426 mg, 0,784 mmoles, Eq: 1,00) y base de Hünig (304 mg, 411  $\mu$ l, 2,35 mmoles, Eq: 3) en DMF (10 ml). Después de 3 minutos se añadió (4-hidroximetil-fenil)-amida del ácido (S)-2-((S)-2-amino-3-fenil-propionil-amino)-6-[[4-metoxi-fenil]-difenil-metil]-amino}-hexanoico (etapa 1). La CCF a t = 1 h mostró que la reacción estaba 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 0,05 M de hidrogenofterato de potasio (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 en bruto se purificó por cromatografía ultrarrápida para obtener el producto del título (682 mg, 513,  $\mu$ moles) como un sólido marrón claro. EM (ISP): (M+H) 1196,8

15 Etapa 3:

Se añadió base de Hünig (465 mg, 629  $\mu$ l, 3,6 mmoles, Eq: 6) a una solución del alcohol previo (718 mg, 600  $\mu$ moles, Eq: 1,00) y carbonato de bis(4-nitrofenilo) (548 mg, 1,8 mmoles, Eq: 3) en THF (20 ml). La solución amarilla se agitó durante la noche a temperatura ambiente. El disolvente se eliminó a presión reducida. El residuo restante se trituró con éter dietílico. El sólido se recogió por filtración, se lavó con éter y se secó a presión reducida para obtener el compuesto del título (800 mg, 529  $\mu$ moles) como un sólido marrón claro. EM (ISP): (M+H) 1361,9

25 Ejemplo 17

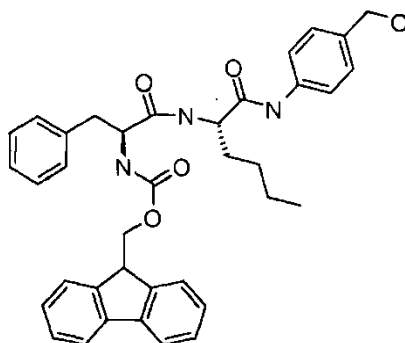
Etapa 1 Ácido (S)-2-[(S)-2-(9H-fluoren-9-ilmetoxicarbonil-amino)-3-fenil-propionil-amino]-hexanoico



30 Se suspendió L-Fmoc-Phe-OSu comercialmente disponible (0,969 g, 2,00 mmoles, Eq: 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 mmoles, Eq: 1,05) y NaHCO<sub>3</sub> (0,185 g, 2,20 mmoles, Eq: 1,10). Se retiró el baño de refrigeración y se dejó que la reacción continuara a temperatura ambiente durante 14 h. La mezcla se vertió sobre hielo picado / ácido cítrico (pH ~3), se extrajo 2x con acetato de etilo, 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 SiO<sub>2</sub> / AcOEt dio 0,870 mg del compuesto del título como un sólido blanco. EM (ISP): (M+H) 501,2.

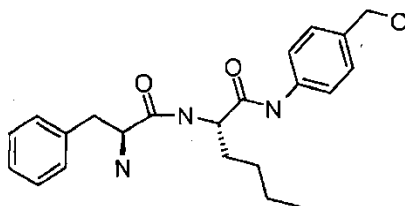
Etapa 2: Éster 9H-fluoren-9-ilmetilico del ácido {(S)-1-[(S)-1-(4-Hidroximetil-fenil-carbamoyl)-pentil-carbamoyl]-2-fenil-

etil}-carbámico



- 5 En un matraz con forma de pera, se disolvieron el ácido (S)-2-[(S)-2-(9H-fluoren-9-ylmetoxi-carbonilamino)-3-fenil-propionilamino]-hexanoico anteriormente sintetizado (10,72 g, 21 mmoles, Eq: 1,00), (4-aminofenil)metanol (2,717 g, 22 mmoles, Eq: 1,03), y 2-etoxi-1-etoxicarbonil-1,2-dihidroquinolina (EEDQ) (7,994 g, 32 mmoles, Eq: 1,50) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (320 ml) y se agitaron durante la noche bajo un globo de Ar. La mezcla se vertió sobre hielo picado / NH<sub>4</sub>Cl, se extrajo 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 a ~ 300 ml. El precipitado se separó por filtración y se secó dando 5,25 g del compuesto del título como un sólido marrón claro. EM (ISP): (M+H) 606,3.

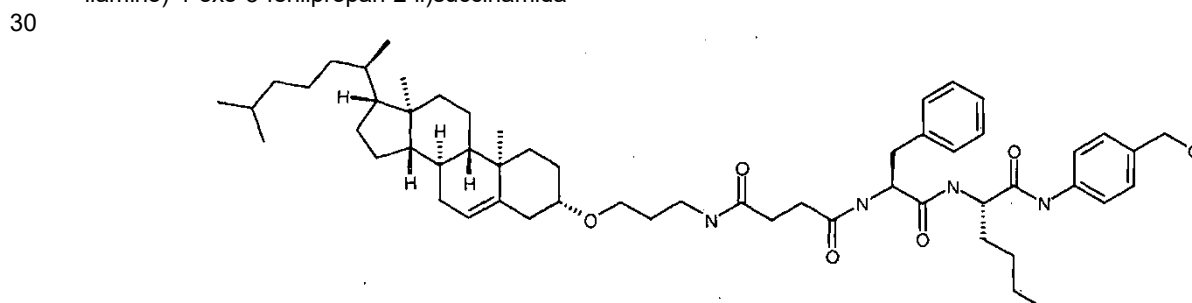
Etapa 3: (4-Hidroximetilfenil)-amida del ácido (S)-2-((S)-2-amino-3-fenil-propionilamino)-hexanoico



- 15 En un matraz redondo, el éster 9H-fluoren-9-ylmetílico del ácido {(S)-1-[(S)-1-(4-hidroximetil-fenilcarbamoil)-pentilcarbamoil]-2-fenil-etil}-carbámico anteriormente preparado (4,738 g, 7,822 mmoles, Eq: 1,0) se disolvió en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (28 ml). A 0°, se añadió dietilamina (28 ml, 19,80 g, 271 mmoles, Eq: 35) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche. Se evaporaron todos los volátiles a vacío; la subsiguiente cromatografía ultrarrápida SiO<sub>2</sub> / CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> / 10 % de MeOH, seguido de cristalización en AcOEt, dio 2,116 g del compuesto del título como cristales marrón claro. EM (ISP): (M+H) 384,2.

25 Etapa 4

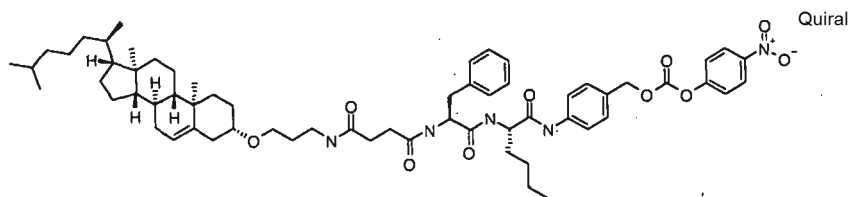
N1-(3-((3S,8S,9S,10R,13R,14S,17R)-10,13-dimetil-17-((R)-6-metilheptan-2-il)-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecahidro-1H-ciclopenta[a]fenantren-3-iloxi)propil)-N4-((S)-1-((S)-1-(4-(hidroximetil)fenilamino)-1-oxohexan-2-ilamino)-1-oxo-3-fenilpropan-2-il)succinamida



se preparó en analogía al Ejemplo 16 etapa 2  
EM (ISP): (M+H) 909,7 (M+Na) 931,8.

35 Etapa 5

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



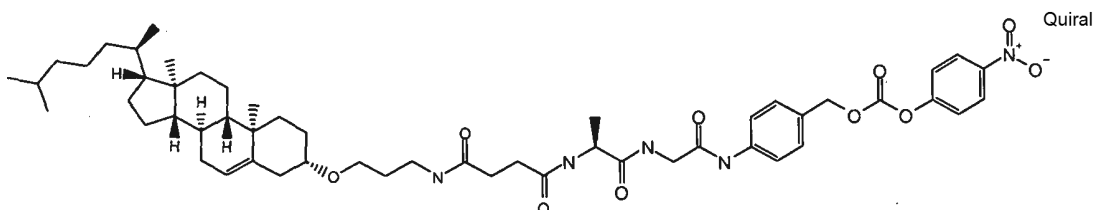
se preparó en analogía al Ejemplo 16 etapa 3  
EM masa esperada: 1073,6453, masa hallada 1073,642

5

Ejemplo 18

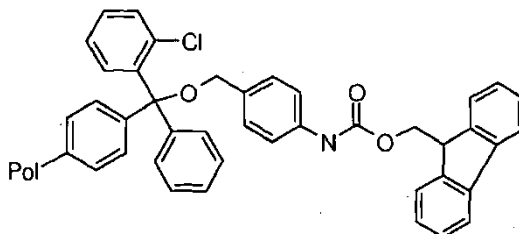
N-[4-({3-[(3beta)-colest-5-en-3-iloxi]propil}amino)-4-oxobutanoil]-L-alanil-N-[4-({[(4-nitrofenoxi)carbonil]oxi}metil)fenil]glicinamida

10



Etapa 1:

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

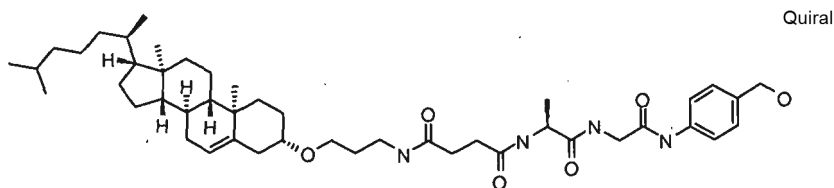


20 Se hinchó resina de cloruro de 2-clorotritilo (Novabiochem 01-64-0114, 100-200 de malla), 1 % de DVB (18 g, 21,6 mmoles, Eq: 1,00) en DCM/DMF=1/1 (300 ml) durante diez minutos. Se drenó la resina y se añadió una solución de alcohol FMOC-4-aminobencílico (14,9 g, 43,2 mmoles, Eq: 2) y piridina (6,83 g, 6,99 ml, 86,4 mmoles, Eq: 4) en DCM/DMF=1/1 (300 ml). La mezcla se agitó durante la noche. La resina se drenó y se terminó con una solución de 10 % de base de Hünig en metanol (300 ml). La resina se lavó con DMF y DCM y se secó durante la noche con HV para obtener 21,7 g de resina. La determinación de la carga produjo 0,41 mmol/g.

25

Etapa 2:

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-(2-(4-(hidroximetil)fenilamino)-2-oxoetilamino)-1-oxopropan-2-il)succinamida



35 Se lavó previamente la resina de la etapa 1 (1 g, 410 µmoles, Eq: 1,00) con DMF (2 X) y se trató con piperidina/DMF=1/4 (10 ml) durante 5 y 10 minutos. La resina se lavó de forma alterna con DMF e IPA (3 X 10 ml).

Se agitó una solución de Fmoc-Gly-OH (488 mg, 1,64 mmoles, Eq: 4), TPTU (487 mg, 1,64 mmoles, Eq: 4) y base de Hünig (636 mg, 859 µl, 4,92 mmoles, Eq: 12) en DMF (10 ml) durante 5 minutos y entonces se agitó con la resina durante una hora. La resina se lavó de forma alterna con DMF y alcohol isopropílico (3X).

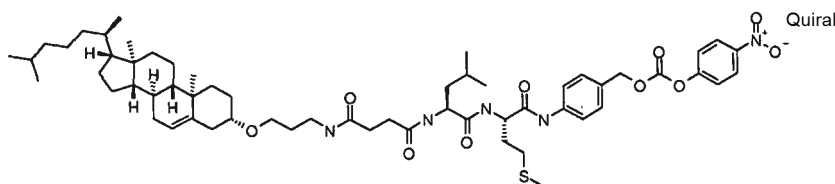
- 5 Se realizaron, por consiguiente, las siguientes escisiones de Fmoc y los posteriores acoplamiento de Fmoc-Ala-OH (511 mg, 1,64 mmoles, Eq: 4) y ácido *N*-{3-[(3*S*,8*S*,9*S*,10*R*,13*R*,14*S*,17*R*)-17-((*R*)-1,5-Dimetil-hexil)-10,13-dimetil-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecahidro-1*H*-ciclopenta[*a*]fenantren-3-iloxi]propil}-succinámico (ejemplo 1, etapa 2) (892 mg, 1,64 mmoles, Eq: 4). Se agitó la resina de péptido secada durante aproximadamente 2 x 30 min en TFA 1 %/DCM (2 X 20 ml). La mezcla de reacción se filtró y la resina se lavó con DCM. Los filtrados se reunieron y los disolventes se evaporaron a vacío. El material en bruto se trituró con éter dietílico (2 x). Después de la purificación por cromatografía ultrarrápida, el producto (84 mg, 97,3 µmoles) se obtuvo como un sólido blanco. EM masa esperada: 776,5452, masa hallada 776,5455

Etapa 3:

- 15 Se disolvieron la *N*1-(3-((3*S*,8*S*,9*S*,10*R*,13*R*,14*S*,17*R*)-10,13-dimetil-17-((*R*)-6-metilheptan-2-il)-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecahidro-1*H*-ciclopenta[*a*]fenantren-3-iloxi)propil)-*N*4-((*S*)-1-(2-(4-(hidroximetil)fenilamino)-2-oxoetilamino)-1-oxopropan-2-il)succinamida de alcohol anteriormente preparada [RO5545270] (70 mg, 90,1 µmoles, Eq: 1,00) y carbonato de bis(4-nitrofenilo) (137 mg, 450 µmoles, Eq: 5) bajo argón a temperatura ambiente en DMF (4 ml) y se trataron con base de Hünig (34,9 mg, 47,2 µl, 270 µmoles, Eq: 3), y la mezcla se dejó reaccionar durante la noche. El disolvente se eliminó a vacío. El sólido resultante se trituró con éter dietílico. El sólido se recogió por filtración y se lavó con éter dietílico. El producto se secó a vacío para obtener el compuesto del título (84 mg, 80,2 µmoles) como un sólido marrón claro. EM masa esperada: 941,5514, masa hallada 941,5518

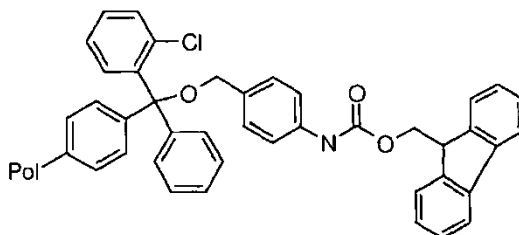
25 Ejemplo 19

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



Etapa 1:

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

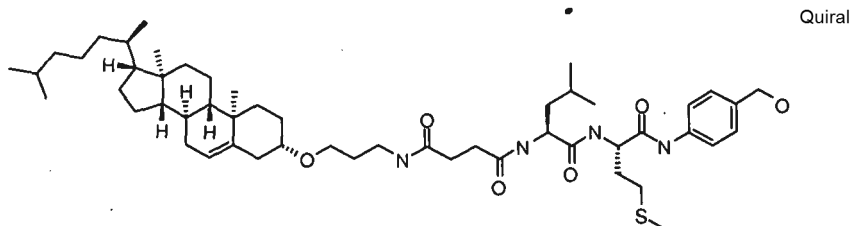


- 40 se preparó en analogía al Ejemplo 18, etapa 1

Etapa 2

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





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

5

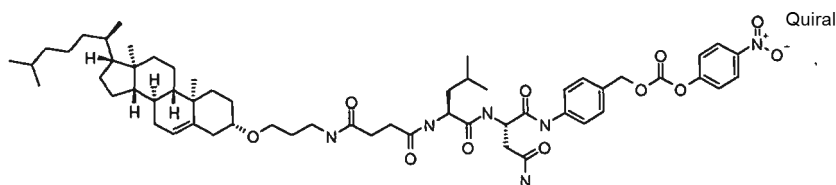
El producto (208 mg, 210  $\mu$ moles) se obtuvo como un sólido amarillo claro.  
EM (ISP): (M+H) 893,6183

La etapa 3 se preparó en analogía al Ejemplo 18, etapa 3. Después de la purificación sobre gel de sílice, el compuesto del título (161 mg, 137  $\mu$ moles) se obtuvo como un sólido marrón claro.  
EM masa esperada: 1057,6174, masa hallada 1057,6184

10

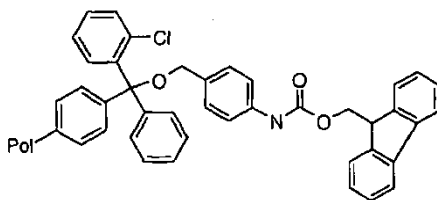
#### Ejemplo 20

15 N-[4-((3-((3 $\beta$ )-colest-5-en-3-iloxi)propil)amino)-4-oxobutanoil]-L-leucil-N $\sim$ 1 $\sim$ -[4-(((4-nitrofenoxi)carbonil]oxi)metil)fenil]-L-aspartamida



20 Etapa 1:

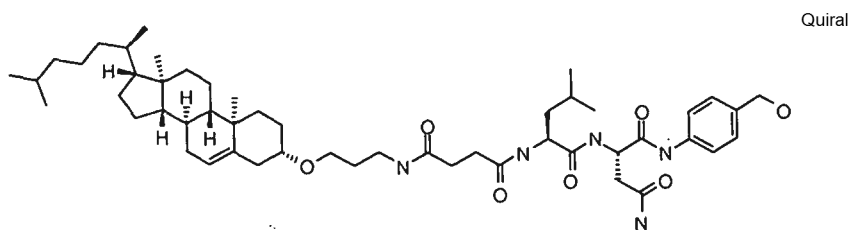
La adición de alcohol FMOC-4-aminobencílico a la resina de 2-clorotritilo



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)-4-metilpentanamido)-N1-(4-(hidroximetil)fenil)succinamida



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

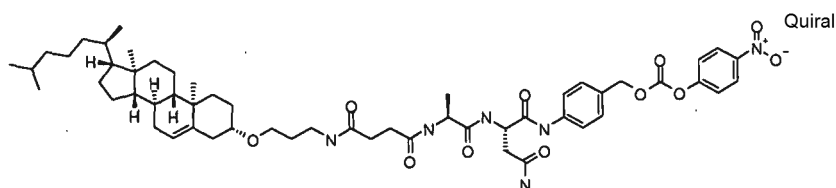
El producto (87 mg, 89,4 μmoles) se obtuvo como un sólido amarillo claro.  
EM masa esperada: 875,6136, masa hallada 875,6133

Etapa 3

5 El compuesto del título se preparó en analogía al Ejemplo 18, etapa 3. Después de la purificación sobre gel de sílice (87 mg, 89,4 μmoles) el compuesto del título se obtuvo como un sólido marrón claro.  
EM masa esperada: 1040,6198, masa hallada 1040,6188

10 Ejemplo 21

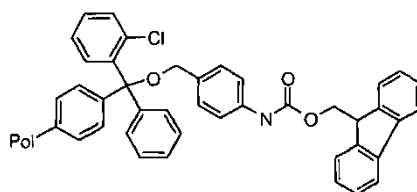
N-[4-({3-[(3β)-colest-5-en-3-iloxi]propil}amino)-4-oxobutanoil]-L-alanil-N~1~-[4-({[(4-nitrofenoxi)carbonil]oxi}metil)fenil]-L-aspartamida



Etapa 1:

La adición de alcohol FMOC-4-aminobencílico a la resina de 2-clorotritilo

20

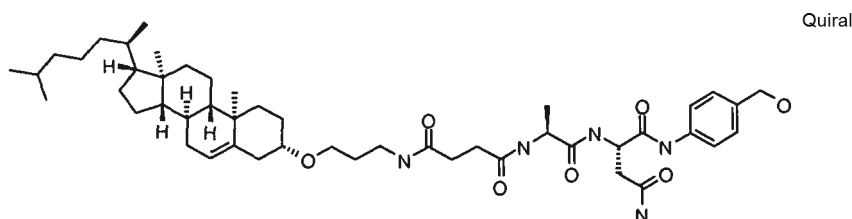


se realizó en analogía al Ejemplo 18, etapa 1

25 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-iloxi)propilamino)-4-oxobutanamido)propanamido)-N1-(4-(hidroximetil)fenil)succinamida

30



Se preparó en analogía al Ejemplo 18, etapa 2, usando Fmoc-Asn-OH (581 mg, 1,64 mmoles, Eq: 4) y Fmoc-Ala-OH (511 mg, 1,64 mmoles, Eq: 4) como aminoácidos.

El producto (140 mg, 159 μmoles) se obtuvo como un sólido amarillo claro.  
EM (ISP): (M+H) 834,8 (M+Na) 856,7

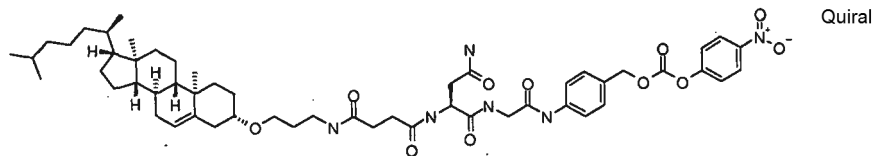
Etapa 3

40 El compuesto del título se preparó en analogía al Ejemplo 18, etapa 3. Después de la purificación sobre gel de sílice (169 mg, 152 μmoles) se obtuvo como un sólido marrón claro.  
EM masa esperada: 998,5729, masa hallada 998,5739

Ejemplo 22

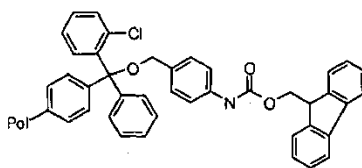
N~2~-[4-((3-((3beta)-colest-5-en-3-iloxi)propil)amino)-4-oxobutanoil]-L-asparaginil-N-[4-(((4-nitrofenoxi)carbonil]oxi)metil)fenil]glicinamida

5



Etapa 1:

10 La adición de alcohol FMOC-4-aminobencílico a la resina de 2-clorotritilo



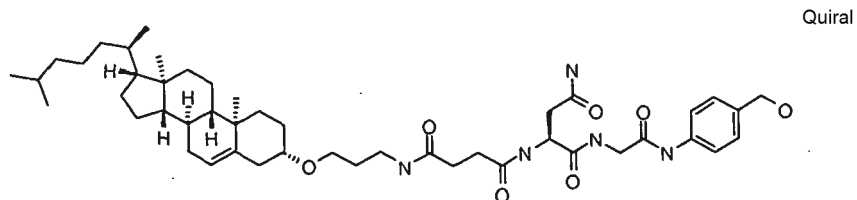
se realizó en analogía al Ejemplo 18, etapa 1

15

Etapa 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)-N1-(2-(4-(hidroximetil)fenilamino)-2-oxoetil)succinamida

20



25 Se preparó en analogía al Ejemplo 18, etapa 2, usando Fmoc-Gly-OH (488 mg, 1,64 mmoles, Eq: 4) y Fmoc-Asn-OH (581 mg, 1,64 mmoles, Eq: 4) como aminoácidos.

El producto (140 mg, 162 µmoles) se obtuvo como un sólido blanco.  
EM masa esperada: 819,551, masa hallada 819,5503

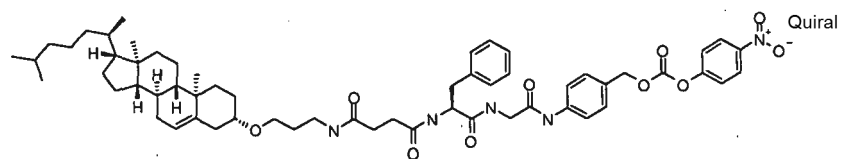
30 Etapa 3: El compuesto del título se obtuvo en analogía al Ejemplo 18, etapa 3 (176 mg, 161 µmoles) como un sólido marrón claro.

EM masa esperada: 984,5572, masa hallada 984,5489

Ejemplo 23

35

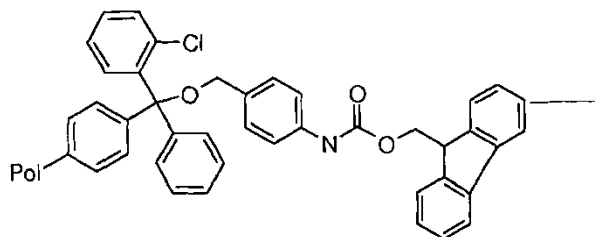
N-[4-((3-((3beta)-colest-5-en-3-iloxi)propil)amino)-4-oxobutanoil]-L-fenilalanil-N-[4-(((4-nitrofenoxi)carbonil]oxi)metil)fenil]glicinamida



40

Etapa 1:

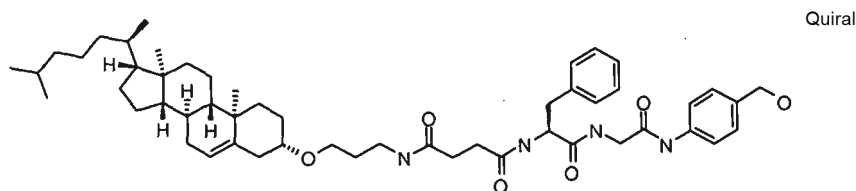
La adición de alcohol FMOC-4-aminobencílico a la resina de 2-clorotritilo



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-(2-(4-(hidroximetil)fenilamino)-2-oxoetilamino)-1-oxo-3-fenilpropan-2-il)succinamida



15 Se preparó en analogía al Ejemplo 18, etapa 2, usando Fmoc-Gly-OH (488 mg, 1,64 mmoles, Eq: 4) y Fmoc-Phe-OH (635 mg, 1,64 mmoles, Eq: 4) como aminoácidos.

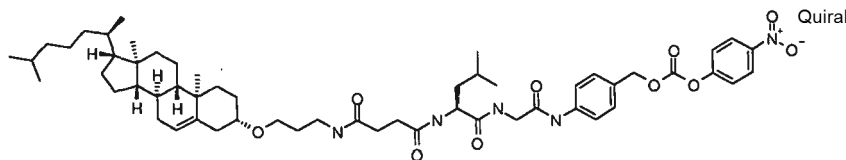
El producto (259 mg, 288  $\mu$ moles) se obtuvo como un sólido blanco.  
EM masa esperada: 852,5765, masa hallada 852,5754

20 Etapa 3  
El compuesto del título se obtuvo en analogía al Ejemplo 18, etapa 3 (280 mg, 247  $\mu$ moles) como un sólido marrón claro.

25 EM masa esperada: 1017,5827, masa hallada 1017,5775

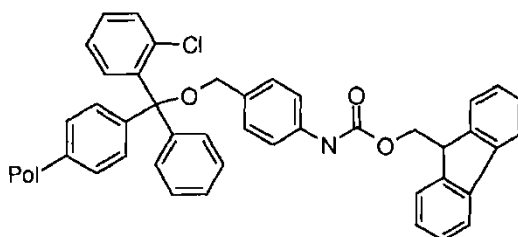
Ejemplo 24

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



35 Etapa 1:

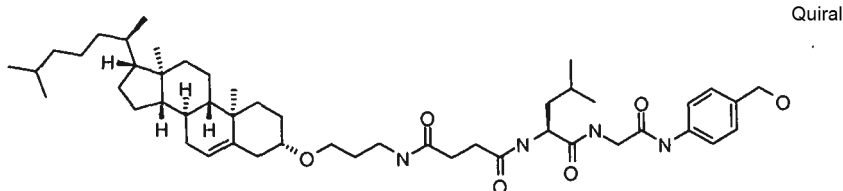
La adición de alcohol FMOC-4-aminobencílico a la resina de 2-clorotritilo



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-(2-(4-(hidroximetil)fenilamino)-2-oxoetilamino)-4-metil-1-oxopentan-2-il)succinamida



- 10 Se preparó en analogía al Ejemplo 18, etapa 2, usando Fmoc-Gly-OH (488 mg, 1,64 mmoles, Eq: 4) y Fmoc-Leu-OH (580 mg, 1,64 mmoles, Eq: 4) como aminoácidos.

El producto (240 mg, 278  $\mu$ moles) se obtuvo como un sólido amarillo claro.

- 15 EM masa esperada: 818,5921, masa hallada 818,5921

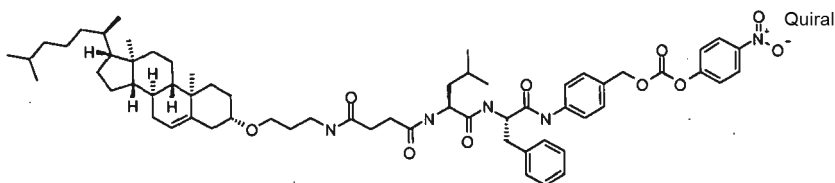
Etapa 3

- 20 El compuesto del título se preparó en analogía al Ejemplo 18, etapa 3. Después de la purificación sobre gel de sílice (194 mg, 177  $\mu$ moles) se obtuvo como un sólido amarillo claro.

EM masa esperada: 983,5983 masa hallada 983,6004

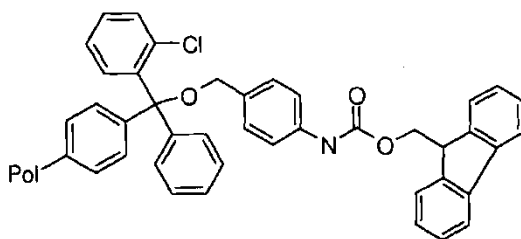
Ejemplo 25

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



- 30 Etapa 1:

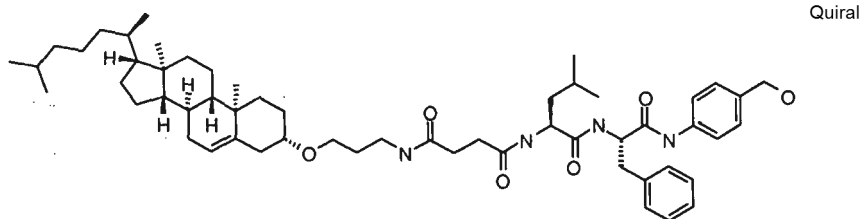
La adición de alcohol FMOC-4-aminobencílico a la resina de 2-clorotritilo



- 35 se realizó en analogía al Ejemplo 18, etapa 1

Etapa 2

- 40 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



Se preparó en analogía al Ejemplo 18, etapa 2, usando Fmoc-Phe-OH (635 mg, 1,64 mmoles, Eq: 4) y Fmoc-Leu-OH (580 mg, 1,64 mmoles, Eq: 4) como aminoácidos.

5

El producto (153 mg, 151  $\mu$ moles) se obtuvo como un sólido amarillo claro.  
EM masa esperada: 908,6391 masa hallada 908,637

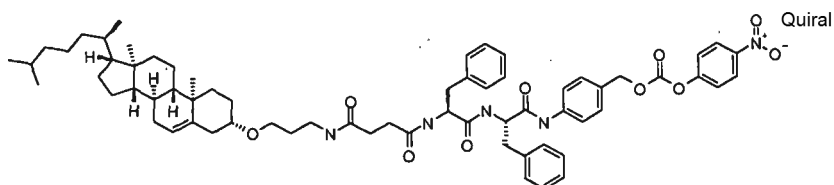
Etapa 3:

10

El compuesto del título se preparó en analogía al Ejemplo 18, etapa 3. Después de la purificación sobre gel de sílice (117 mg, 98  $\mu$ moles), se obtuvo como un sólido blanco.  
EM masa esperada: 1073,6453 masa hallada 1073,646

15 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

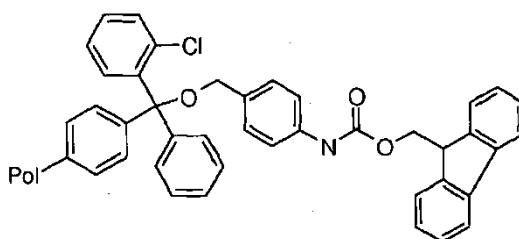


20

Etapa 1:

La adición de alcohol Fmoc-4-aminobencílico a la resina de 2-clorotritilo

25

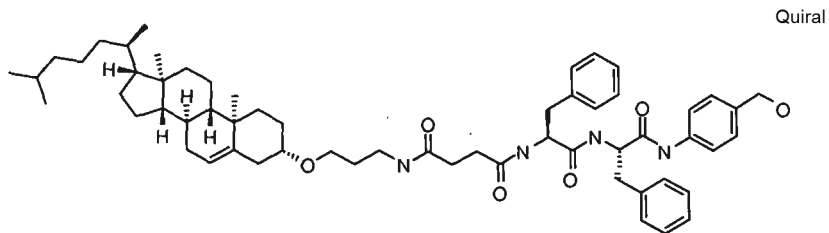


se realizó en analogía al Ejemplo 18, etapa 1

30 Etapa 2

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-il)amino)-1-oxo-3-fenilpropan-2-il)succinamida

35



Se preparó en analogía al Ejemplo 18, etapa 2, con Fmoc-Phe-OH (635 mg, 1,64 mmoles, Eq: 4) como aminoácido.

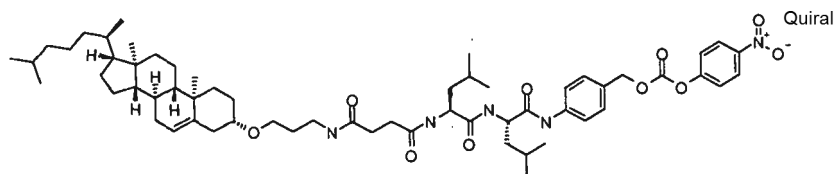
- 5 El producto (240 mg, 204  $\mu$ moles) se obtuvo como un sólido amarillo claro.  
EM masa esperada: 942,6234 masa hallada 942,6218

Etapa 3:

- 10 El compuesto del título se preparó análogamente al Ejemplo 18, etapa 3. Después de la purificación sobre gel de sílice (190 mg, 154  $\mu$ moles) se obtuvo como un sólido blanco.  
EM masa esperada: 1107,6296 masa hallada 1107,6287

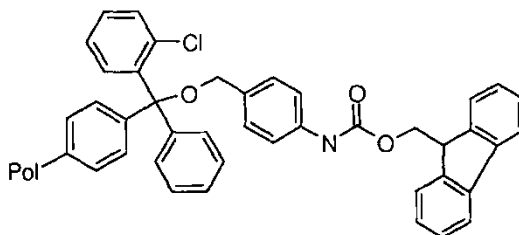
Ejemplo 27

- 15 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



- 20 Etapa 1:

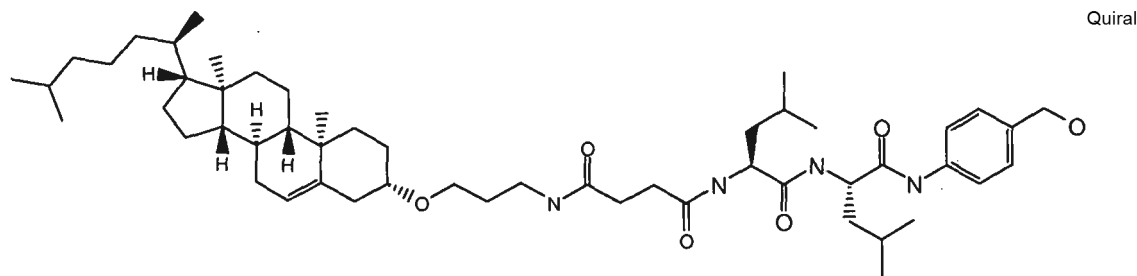
Adición de alcohol FMOC-4-aminobencílico a la resina de 2-clorotritilo



- 25 Se realizó análogamente al Ejemplo 18, etapa 1

Etapa 2

- 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)-4-metil-1-oxopentan-2-ilamino)-4-metil-1-oxopentan-2-il)succinamida



Se preparó en analogía al Ejemplo 18, etapa 2, con Fmoc-Leu-OH (1,59 g, 4,5 mmoles, Eq: 3) como aminoácido.

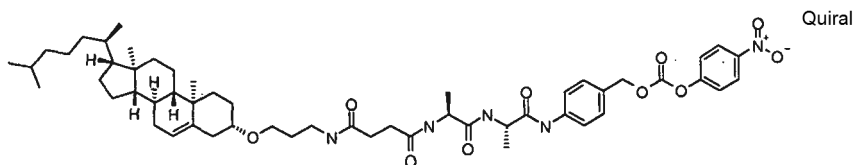
- 5 El producto (254 mg, 284  $\mu$ moles) se obtuvo como un sólido blanco  
EM masa esperada: 874,6547 masa hallada 874,6527

Etapa 3

- 10 El compuesto del título se preparó en analogía al Ejemplo 18, etapa 3. Después de la purificación sobre gel de sílice se obtuvo como un sólido blanco (178 mg, 168  $\mu$ moles).  
EM masa esperada: 1039,6609 masa hallada 1039,6588

Ejemplo 28

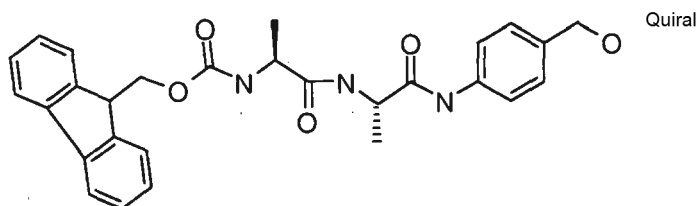
- 15 N-[4-({3-[(3beta)-colest-5-en-3-iloxi]propil}amino)-4-oxobutanoil]-L-alanil-N-[4-({[(4-nitrofenoxi)carbonil]oxi}metil)fenil]-L-alaninamida



- 20 Etapa 1

Éster 9H-fluoren-9-ilmetilico del ácido {(S)-1-[(S)-1-(4-Hidroximetil-fenilcarbamoil)-etilcarbamoil]-etil}-carbámico

- 25

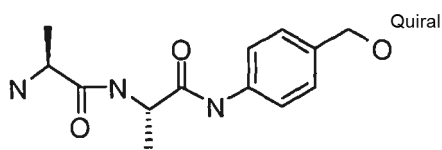


- 30 Se trató una solución de Fmoc-Ala-Ala-OH (1 g, 2,61 mmoles, Eq: 1,00) y (4-aminofenil)metanol (483 mg, 3,92 mmoles, Eq: 1,5) en THF (20 ml) con EEDQ (970 mg, 3,92 mmoles, Eq: 1,5). La solución se agitó durante la noche a temperatura ambiente. La mezcla se diluyó con 10 % de 2-propanol/acetato de etilo (100 ml) y la solución se lavó con KHSO<sub>4</sub> 5 %/K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10 % (2 X), agua (1X) y salmuera (1X), se secó sobre MgSO<sub>4</sub> y se evaporó a vacío. El residuo se sonicó en éter dietílico durante varios minutos y el sólido se recogió por filtración para obtener el producto (1,27 g, 1,2 mmoles) como un sólido marrón claro.  
EM (ISP): (M+H) 488,3

- 35 Etapa 2:

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



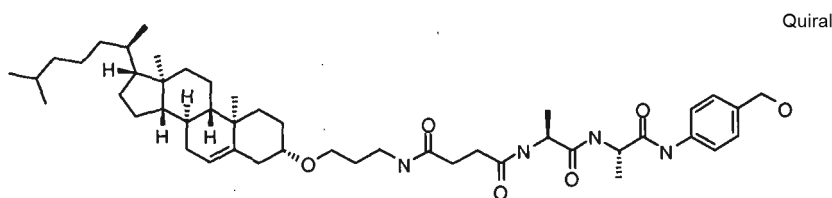


El compuesto se preparó en analogía al Ejemplo 1 etapa c para obtener el producto (245 mg, 877  $\mu$ moles) como un sólido amarillo claro.

5 EM (ISP): (M+H) 266,3, (M+Na) 288,2 (2M+H) 531,3

Etapa 3:

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-oxopropan-2-ilamino)-1-oxopropan-2-il)succinamida



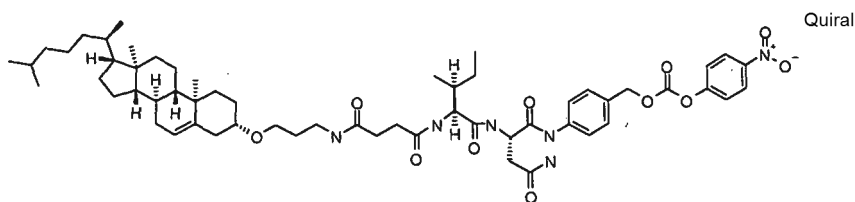
15 El compuesto se preparó en analogía al Ejemplo 16 etapa 2 (165 mg, 198  $\mu$ moles) como un sólido marrón claro.  
EM masa esperada: 790,5608, masa hallada 790,5587

Etapa 4

20 El compuesto del título se preparó en analogía al Ejemplo 18, etapa 3. Después de la purificación sobre gel de sílice se obtuvo como un sólido blanco (99 mg, 98,4  $\mu$ moles).  
EM masa esperada: 955,567, masa hallada 955,5651

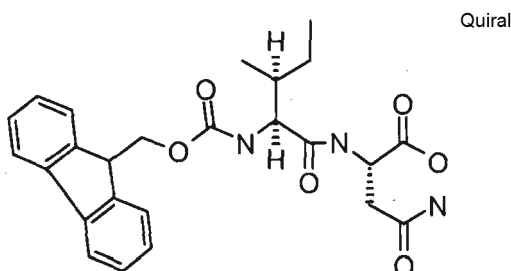
Ejemplo 29

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



30 Etapa 1

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



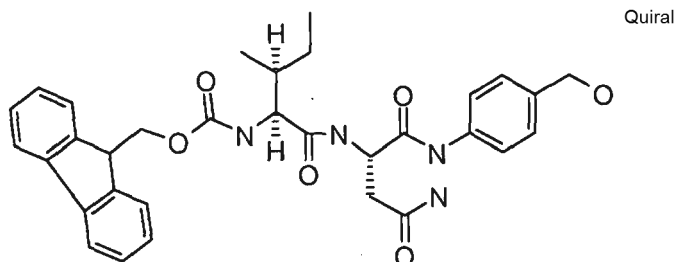
35 Se hinchó resina de cloruro de 2-clorotritilo (5 g, 7,5 mmoles, Eq: 1,00) en DCM y entonces se trató con una solución

de Fmoc-Asn(Trt)-OH (8,95 g, 15,0 mmoles, Eq: 2) y base de Hünig (3,88 g, 5,1 ml, 30,0 mmoles, Eq: 4) en DCM durante la noche. La resina se lavó con DCM y se terminó con una solución de 10 % de base de Hünig en metanol. Acoplamiento de Fmoc-Ile-OH (5,3 g, 15,0 mmoles, Eq: 2) con TPTU (4,46 g, 15,0 mmoles, Eq: 2) y base de Hünig (3,88 g, 5,1 ml, 30,0 mmoles, Eq: 4) según síntesis de péptidos en fase sólida estándar. El producto se escindió de la resina con una mezcla 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 dando un pequeño volumen. Después de la trituración con éter dietílico, el producto se filtró y se secó a vacío obteniéndose el producto (2,85 g, 5,79 mmoles) como un sólido blanco.

EM masa esperada: 467,2056, masa hallada 467,2056

#### Etapa 2

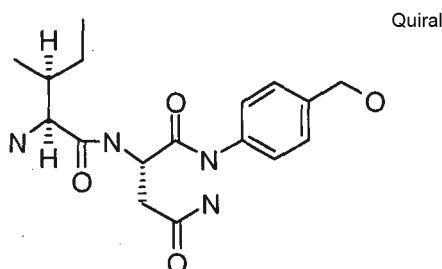
Éster 9H-fluoren-9-ilmetilico del ácido {(1S,2S)-1-[2-carbamoil-1-((S)-4-hidroximetil-fenilcarbamoil)-etilcarbamoil]-2-metil-butil}-carbámico



El compuesto se preparó en analogía al Ejemplo 28 etapa 1 (620 mg, 336  $\mu$ moles) como un sólido amarillo claro.

#### Etapa 3

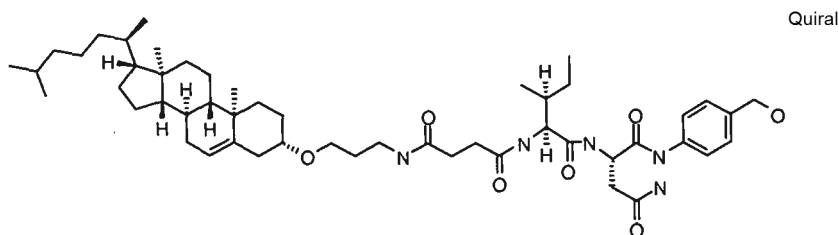
(S)-2-((2S,3S)-2-Amino-3-metil-pentanoilamino)-N\*1\*(4-hidroximetil-fenil)-succinamida



El compuesto se preparó en analogía al Ejemplo 1 etapa c (100 mg, 228  $\mu$ moles) como un sólido amarillo claro.

#### 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



El compuesto se preparó en analogía al Ejemplo 16 etapa 2 (89 mg, 91,4  $\mu$ moles) como un sólido amarillo claro.

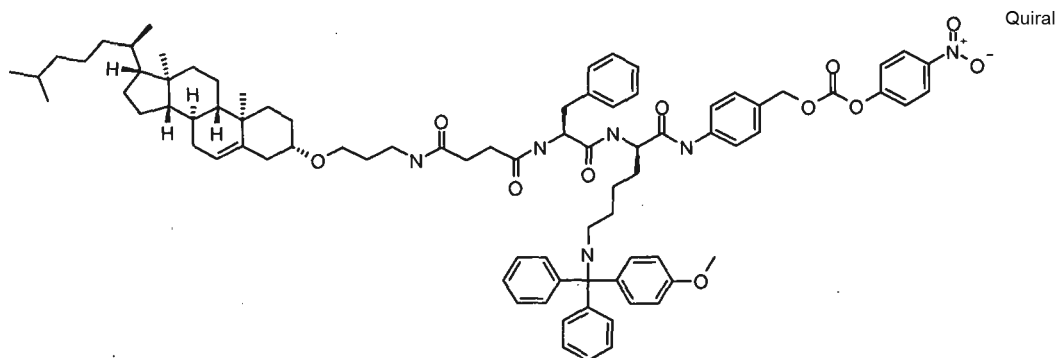
Etapa 5

El compuesto de la etapa previa se hizo reaccionar con el compuesto del título análogamente al Ejemplo 18, etapa 3. Después de la purificación sobre gel de sílice (42 mg, 36,3 μmoles) se obtuvo como un sólido marrón claro.

5 EM masa esperada: 1040,6198, masa hallada 1040,6177

Ejemplo 30

10 N-[4-({3-[(3β)-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-lisinamida

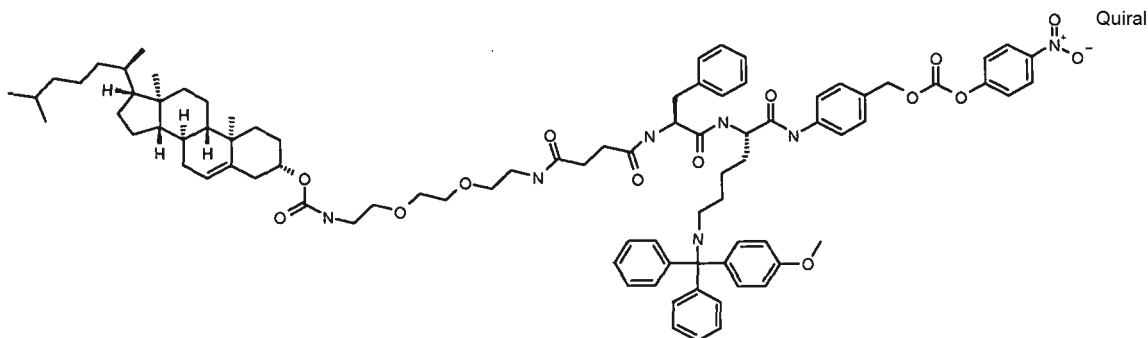


15 El compuesto se preparó en analogía al Ejemplo 16 etapa 1, a partir de Fmoc-D-Lys(Boc)-OH, (158 mg, 116 μmoles) como un sólido marrón claro.

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

Ejemplo 31

20 N-{15-[(3β)-colest-5-en-3-ilo]4,15-dioxo-8,11-dioxa-5,14-diazapentadecan-1-oi]-L-fenilalanil-N~6~-[(4-metoxifenil)(difenil)metil]-N-[4-((4-nitrofenoxi)carbonil)oxi]metil]fenil]-L-lisinamida



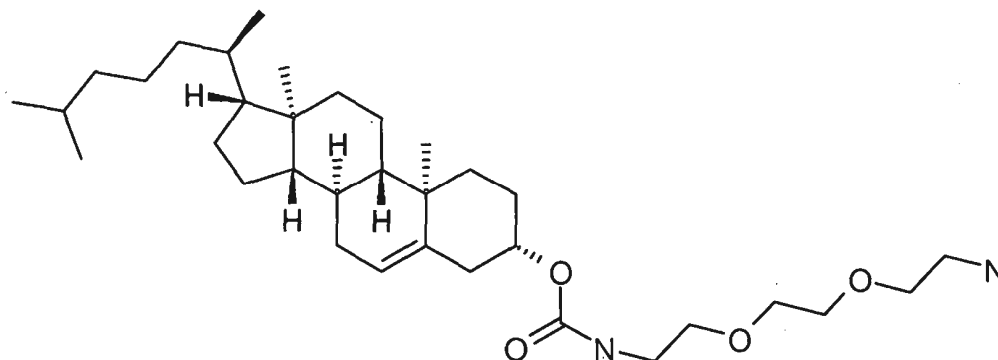
25 El compuesto del título se preparó análogo al Ejemplo 16 usando un derivado de colesterol-oligo-PEG en la etapa 2 de la síntesis.

EM (ISP): (M+H) 1479,8

30 El producto intermedio de colesterol-PEG necesario el ácido N-[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]carbonilamino]-etoxi)-etoxi)-etil]-succinámico para la etapa 2 se preparó del siguiente modo:

35 Etapa \_\_\_\_\_ a: Éster (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-ílico del ácido {2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-etil}-carbámico

Quiral

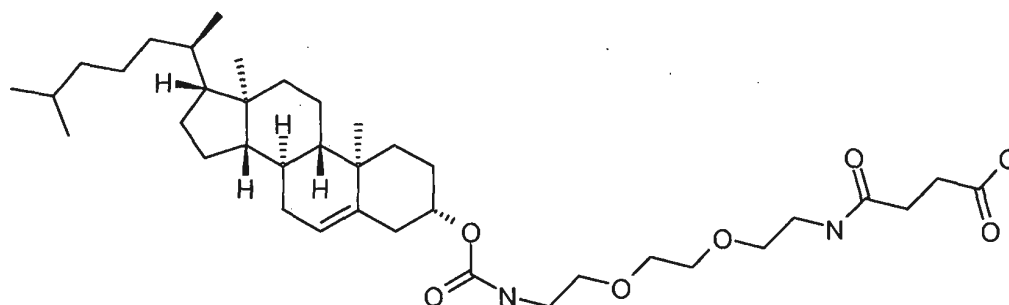


Se añadió gota a gota una solución de cloroformiato de colesterilo (1 g, 2,23 mmoles) en 25 ml de diclorometano con agitación a una solución de 2,2'-(etilendioxi)bis(etilamina) (495 mg, 3,34 mmoles) en 75 ml de diclorometano. La reacción se agitó durante la noche a temperatura ambiente. La reacción se diluyó con diclorometano y se extrajo con agua. El extracto orgánico se secó sobre  $MgSO_4$  dihidratado anhidro, se filtró y se evaporó. Después de la purificación sobre gel de sílice modificado con amino (eluyente:  $MeCl_2 \rightarrow MeCl_2/MeOH=975:25$  v/v) el producto (615 mg) se obtuvo como un sólido ceroso blanco.

EM (ISP): (M+H) 561,5

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)carbonilamino]eto)eto]etil]succinámico

Quiral



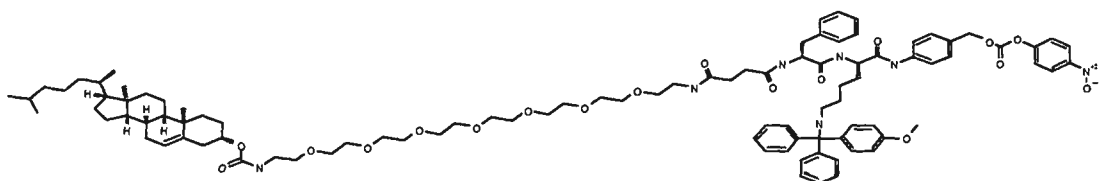
Se disolvieron la amina de la etapa a (480 mg, 0,856 mmoles) y trietilamina (0,13 ml, 0,94 mmoles) en 5 ml de diclorometano. Después de añadir anhídrido succínico (90 mg, 0,9 mmoles), la solución se agitó durante la noche a temperatura ambiente. La comprobación por CCF mostró todavía algún material de partida. Se añadió más anhídrido succínico (20 mg, 0,2 mmoles). Después de agitar la reacción durante otras 3 horas a temperatura ambiente, se diluyó con diclorometano y se lavó con una mezcla de 5 % de  $KHSO_4$ / 10 % de  $K_2SO_4$ . El extracto orgánico se secó sobre  $MgSO_4$  dihidratado anhidro, se filtró y se evaporó a vacío obteniéndose el ácido deseado (490 mg, 0,667 mmoles).

EM (ISP): (M+H) 661,5

Ejemplo 32

N-{30-[(3beta)-colest-5-en-3-ilo]xi}-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

Quiral

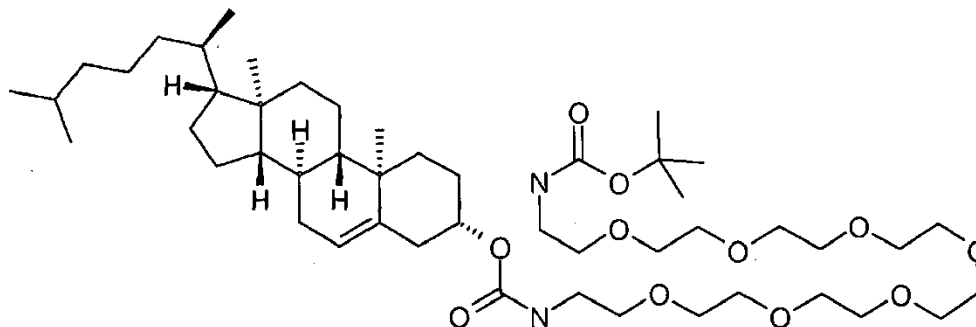


El compuesto del título se preparó análogo al Ejemplo 16 usando un derivado de colesterol-PEG en la etapa 2 de la síntesis.

EM (ISP): (M+H) 1699,9

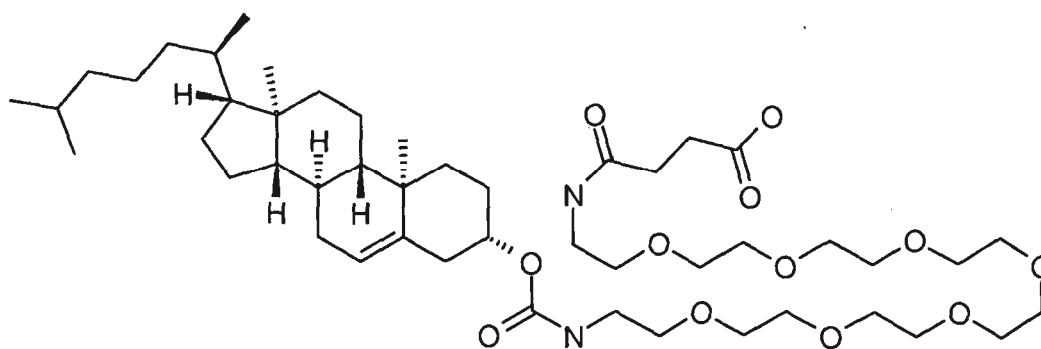
El producto intermedio de colesterol-PEG necesario el ácido 1-[(3beta)-colest-5-en-3-iloxi]-1,27-dioxo-5,8,11,14,17,20,23-heptaoxa-2,26-diazatriacontan-30-oico para la etapa 2 se preparó del siguiente modo:

5 Etapa a: [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 de terc-butilo



10 Se disolvieron cloroformiato de colesterilo (476 mg, 1,06 mmoles) y trietilamina (155 ul, 1,113 mmoles) en 5 ml de diclorometano. Entonces se añadió una solución de alfa-amino-omega-boc-amino-octa(etilenglicol) (497 mg, 1,06 mmoles) disuelto en 1 ml de diclorometano. La solución se agitó durante 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 a vacío. Después de la purificación sobre gel de sílice (eluyente: MeCl<sub>2</sub>/MeOH=975:25 -> 95:5 v/v) el producto (530 mg, 0,571 mmoles) se obtuvo como un aceite incoloro.  
EM (ISP): (M+NH<sub>4</sub>) 898,7

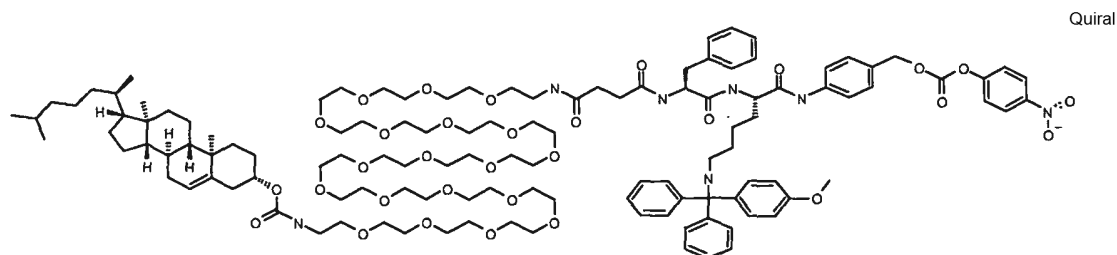
20 Etapa b: Ácido 1-[(3beta)-colest-5-en-3-iloxi]-1,27-dioxo-5,8,11,14,17,20,23-heptaoxa-2,26-diazatriacontan-30-oico



25 Se disolvió el derivado de Boc previo (450 mg, 0,511 mmoles) en HCl 4 M en dioxano (10,2 ml, 40,9 mmoles). La solución se agitó a temperatura ambiente durante 40 min. El disolvente se eliminó a vacío y el sólido blanco restante se disolvió en 5 ml de diclorometano y se trató con trietilamina (32 ul, 0,229 mmoles) y anhídrido succínico (11,5 mg, 0,114 mmoles) durante la noche. Se añadió más anhídrido succínico (11 mg, 0,11 mmoles, 0,2 equiv.) y después de 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 obteniéndose 390 mg del producto deseado.  
EM (ISP): (M+H) 881,7

Ejemplo 33

35 N-{66-[(3beta)-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-nonadeca-5,65-diazahexacontan-1-oi]-L-fenilalanil-N~6~-[(4-metoxifenil)(difenil)metil]-N-[4-(((4-nitrofenoxi)carbonil]oxi)metil]fenil]-L-lisinamida

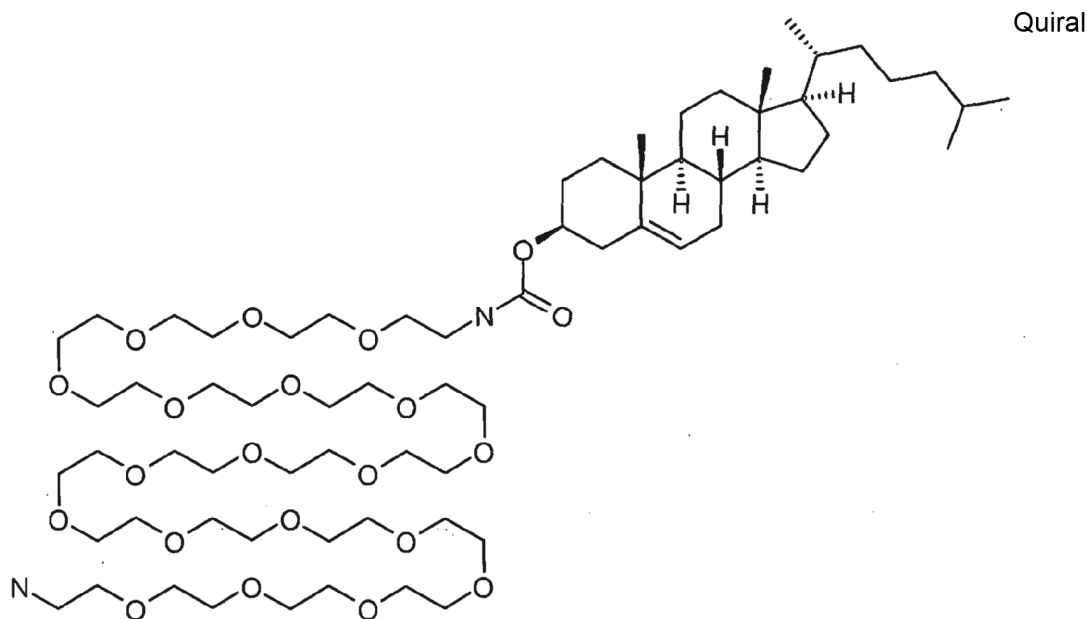


El compuesto del título se preparó análogo al Ejemplo 16 usando un derivado de colesterol-PEG en la etapa 2 de la síntesis.

5 EM (ISP): (M+H) 2228,1

El producto intermedio de colesterol-PEG necesario el ácido 1-[(3beta)-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-nonadeca-2,62-diazahexahexacontan-66-oico para la etapa 2 se preparó del siguiente modo:

10 Etapa a: (59-Amino-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,33,36,39,42,45,48,51,54,57-nonadeca-2,62-diazahexahexacontan-66-oico)carbamato de (3beta)-colest-5-en-3-ilo

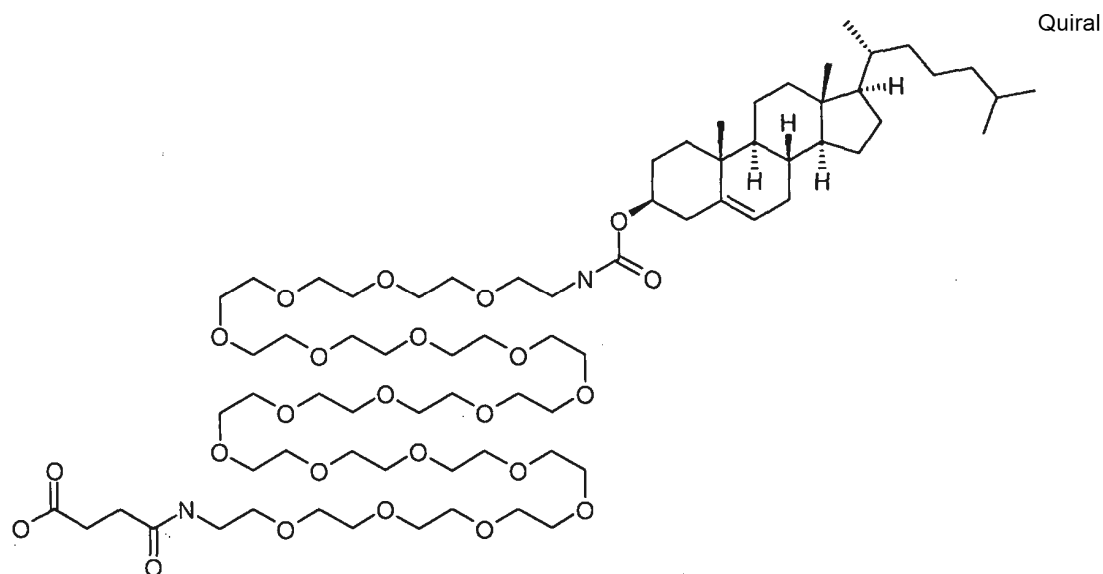


15 Se disolvieron alfa,omega-bis-amino 20(etilenglicol) (538 mg, 0,6 mmoles) y trietilamina (92 ul, 0,66 mmoles) en 15 ml de diclorometano seco. Se añadió gota a gota una solución de cloroformato de colesterilo (270 mg, 0,6 mmoles) en 2 ml de diclorometano seco a temperatura ambiente. La solución se agitó durante la noche, entonces se concentró a vacío dando un pequeño volumen y se purificó directamente sobre gel de sílice (eluyente: MeCl<sub>2</sub>/MeOH=95:5 -> 9:4 -> 4:1 v/v) obteniéndose el producto (350 mg, 0,254 mmoles) como un sólido ceroso.

20 EM (ISP): (M+H) 1309,9

Etapa b: Ácido 1-[(3beta)-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-nonadeca-2,62-diazahexahexacontan-66-oico

25



Se disolvieron la amina de la etapa a (329 mg, 0,251 mmoles), anhídrido succínico (26,4 mg, 0,264 mmoles) y trietilamina (40  $\mu$ l, 0,286 mmoles) en 5 ml de diclorometano seco. Después de añadir más trietilamina (40  $\mu$ l, 0,286 mmoles), la solución (pH>8) se agitó durante 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 obteniéndose el producto (260 mg, 0,175 mmoles) como un sólido ceroso incoloro.

EM (ISP): (M+NH<sub>4</sub>) 1408,9

Los siguientes ejemplos de trabajo ilustran la invención:

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

#### 15 Materiales

Se compraron sulfóxido de dimetilo (DMSO), *N,N*-diisopropiletilamina (DIPEA) y solución de acetato sódico (3 M, pH 5,2) de Sigma Aldrich Chemie GmbH (Traufkirchen, Alemania).

20 Se compraron acetato de trietilamonio (TEAA) (2,0 M, pH 7,0) y acetonitrilo (ACN, calidad para HPLC) para RP-HPLC de Biosolve (Valkenswaard, Los Países Bajos).

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

25 Se compró la columna Resource RPC 3 ml (10 x 0,64 cm; 15  $\mu$ m de tamaño de partícula) de GE Healthcare (Friburgo, Alemania).

Se llevó a cabo purificación por HPLC usando un sistema ÄKTA Explorer 100 (GE Healthcare).

#### 30 Síntesis de ARN modificado con amino

35 Se produjo ARN equipado con un conector de hexilamino en el extremo 5' de la hebra codificante por química de fosoramidito estándar sobre fase sólida a una escala de 1215  $\mu$ moles usando un ÄKTA Oligopilot 100 (GE Healthcare, Friburgo, Alemania) y vidrio de poro controlado como soporte sólido (Prime Synthesis, Aston, PA, EE.UU.). Se generaron 2'-*O*-metil-nucleótidos que contenían ARN empleando los fosoramiditos correspondientes, 2'-*O*-metil-fosoramiditos y amidito de conector de TFA-hexilamino (Sigma-Aldrich, SAFC, Hamburgo, Alemania). La escisión y desprotección, además de la purificación, se logró por métodos conocidos en el campo (Wincott F. et al, NAR 1995, 23,14, 2677-84).

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

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

#### Procedimiento experimental general de conjugación

Los compuestos del título de los Ejemplos 1-33 se acoplaron mediante el ARN modificado con amino según el siguiente procedimiento:

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

15 Los conjugados de ARN que contienen un grupo protector de MMT en la secuencia de dipéptidos se procesan adicionalmente según el procedimiento dado a continuación.

#### Procedimiento general para la escisión de MMT

20 Se disuelve el sedimento de conjugado de ARN en bruto en 500 µl de agua y 1,5 ml de tampón acetato sódico (3 M, pH 5,2 o 0,1 M, pH 4,0). La solución se agita durante 2 días a 30 °C. La mezcla de reacción se monitoriza usando RP-HPLC (Resource RPC 3 ml, tampón: A: TEAA 0,1 M en agua, B: TEAA 0,1 M en 95 % de ACN, gradiente: 3 % de B a 100 % de B en 20 VC). Después de la escisión completa del grupo protector de MMT, el conjugado de ARN se purifica directamente usando las condiciones que se acaban de mencionar anteriormente. Las fracciones puras se reúnen y el conjugado deseado se precipita usando acetato sódico/EtOH.

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

35 Todos los conjugados de ARN se analizaron por RP-HPLC para pureza y la identidad se confirmó por ESI-EM (modo negativo). Brevemente, se realizó RP-HPLC en un sistema Dionex Ultimate (Dionex, Idstein, Alemania) equipado con una columna XBridge C<sub>18</sub> (2,5 x 50 mm, 2,5 µm de tamaño de partícula, Waters, Eschborn, Alemania) a 65 °C de temperatura de la columna. Se realizó elución en gradiente usando hexafluoroisopropanol (HFIP) 100 mM y trietilamina 16 mM en 1 % de metanol como eluyente A y en 95 % de metanol como eluyente B (1 % de B a 18 % de B en 30 minutos). La detección UV se registró a 260 nm. Para el análisis espectrométrico de masa, un sistema ThermoFinnigan LCQ DecaXP ESI-EM con fuente de micro-pulverización y detector de trampa de iones se acopló en línea al sistema de HPLC.

40 Ejemplos de compuestos específicos de fórmula (Ha) se desvelan en la Tabla 1. Los compuestos resultantes se denominan "conjugados de colesterol-ARNip que contienen dipéptido", en los que los conjugados de colesterol-ARNip que contienen dipéptido específicos se denominan adicionalmente "Compuesto del título del Ejemplo X-(NHC6)-(secuencia de ARNip)" y "ARNip con Compuesto del título del Ejemplo X".

#### Preparación de ARNip

50 Secuencia antisentido: 5'-uuGGAUcAAAUuAAGAUcscsU-3'  
u, c: 2'-O-metil-nucleótidos de nucleótidos de ARN correspondientes, s: fosforotioato

55 Los conjugados de colesterol-ARNip que contienen dipéptido dirigidos contra el ARNm de apolipoproteína B se generaron mezclando una solución equimolar de hebras complementarias en tampón de hibridación (fosfato de sodio 20 mM, pH 6,8; cloruro sódico 100 mM), se calentaron en un baño de agua a 80-85 °C durante 3 minutos y se enfriaron a temperatura ambiente durante un periodo de 3 - 4 horas. La formación del dúplex se confirmó por electroforesis en gel nativo.

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



ES 2 605 990 T3

Tabla 1: Conjugados de colesterol-ARNip que contienen dipéptido (5' -3') y datos analíticos. Clave: letras minúsculas a, c, g, u, son 2'-O-metil-nucleótidos; un enlace fosforotioato se simboliza con una "s" minúscula. (NHC6) es el conector de aminohexilo incorporado en el extremo 5' de la hebra codificante.

Compuesto del título del Ejemplo N.º		masa molar calc.	masa molar rip.	pureza (%) (RP)
16	(Compuesto del título Ej. 16)(NHC6)GGAAUCuuAuAuuuGAUCcAsA	7885,7	7887,5	94,4
31	(Compuesto del título Ej. 31)(NHC6)GGAAUCuuAuAuuuGAUCcAsA	8003,3	8003,3	97,3
33	(Compuesto del título Ej. 31)(NHC6)GGAAUCuuAuAuuuGAUCcAsA	8752,4	8752,4	97,6
32	(Compuesto del título Ej. 32)(NHC6)GGAAUCuuAuAuuuGAUCcAsA	8223,1	8226,5	97,3
17	(Compuesto del título Ej. 17)(NHC6)GGAAUCuuAuAuuuGAUCcAsA	7870,7	78733,5	90,6
20	(Compuesto del título Ex 26)(NHC6)GGAAUCuuAuAuuuGAUCcAsA	7884,8	7883,3	95,2
27	(Compuesto del título Ej. 27)(NHC6)GGAAUCuuAuAuuuGAUCcAsA	7840,0	7840,0	94,8
28	(Compuesto del título Ej. 28)(NHC6)GGAAUCuuAuAuuuGAUCcAsA	7755,4	7754,9	93,2
29	(Compuesto del título Ej. 29)(NHC6)GGAAUCuuAuAuuuGAUCcAsA	7840,4	7839,9	87,2
1	(Compuesto del título Ej. 1)(NHC6)GGAAUCuuAuAuuuGAUCcAsA	7931.	7935,2	98,2
2	(Compuesto del título Ej. 2)(NHC6)GGAAUCuuAuAuuuGAUCcAsA	7992,2	7995,0	96,7
3	(Compuesto del título Ej. 3)(NHC6)GGAAUCuuAuAuuuGAUCcAsA	7911.	7913,8	98,2
4	(Compuesto del título Ej. 4)(NHC6)GGAAUCuuAuAuuuGAUCcAsA	7955.	7985,5	98,0
5	(Compuesto del título Ej. 5)(NHC6)GGAAUCuuAuAuuuGAUCcAsA	7920,5	7923,9	97,3
6	(Compuesto del título Ej. 6)(NHC6)GGAAUCuuAuAuuuGAUCcAsA	7936.	7939,6	98,5
7	(Compuesto del título Ej. 7)(NHC6)GGAAUCuuAuAuuuGAUCcAsA	7904,2	7905,5	95,1
7	Compuesto del título Ej. 8)(NHC6)GGAAUCuuAuAuuuGAUCcAsA	7904,2	7908,7	98,8
9	(Compuesto del título Ej. 9)(NHC6)GGAAUCuuAuAuuuGAUCcAsA	7904,2	7906,7	98,7
1	(Compuesto del título Ej. 10)(NHC6)GGAAUCuuAuAuuuGAUCcAsA	7918,2	7921,0	95,4
11	(Compuesto del título Ej. 11)(NHC6)GGAAUCuuAuAuuuGAUCcAsA	7902,0	7901,5	98,7
12	(Compuesto del título Ej. 12)(NHC6)GGAAUCuuAuAuuuGAUCcAsA	7934,54	7836,5	94,4
13	(Compuesto del título Ej. 13)(NHC6)GGAAUCuuAuAuuuGAUCcAsA	7916,09	7917,9	96,5
14	(Compuesto del título Ej. 14)(NHC6)GGAAUCuuAuAuuuGAUCcAsA	7886,07	7887,3	94,9
24	(Compuesto del título Ej. 26)(NHC6)GGAAUCuuAuAuuuGAUCcAsA	7781,8	7783,4	97,2
23	(Compuesto del título Ej. 23)(NHC6)GGAAUCuuAuAuuuGAUCcAsA	7815,8	7817,3	97,2
22	(Compuesto del título Ej. 22)(NHC6)GGAAUCuuAuAuuuGAUCcAsA	7781,8	7783,9	90,5
26	(Compuesto del título Ej. 20)(NHC6)GGAAUCuuAuAuuuGAUCcAsA	7905,9	7907,0	96,4
25	(Compuesto del título Ej. 25)(NHC6)GGAAUCuuAuAuuuGAUCcAsA	7871,9	7873,2	96,1
20	(Compuesto del título Ej. 20)(NHC6)GGAAUCuuAuAuuuCAUCcAuA	7840,1	7840,0	95,9
19	(Compuesto del título Ej.	7857,8	7856,6	97,3

Compuesto del título del Ejemplo N.º		masa molar calc.	masa molar rip.	pureza (%) (RP)
	19)(NHC6)GGAAUCuuAuAuuuGAUCcAsA			
18	(Compuesto del título Ej. 18)(NHC6)GGAAUCuuAuAuuuGAUCcAsA	7741,6	7741,1	93,9
21	(Compuesto del título Ej. 21)(NHC6)GGAAUCuuAuAuuuGAUCcAsA	7798,6	7797,8	87,6
15	(Compuesto del título Ej. 15)(NHC6)GGAAUCuuAuAuuuGAUCcAsA	7927,1	7926,8	97,2

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

5

SEQ ID No	Secuencia sentido (5'-3')	SEQ ID No	Secuencia antisentido (5'-3')
-	(Compuesto del título Ej. 16)(NHC6) GGAAUCuuAuAuuuGAUCcAsA	154	uuGGAUcAAAUuAAGAUJCcscsU
-	(Compuesto del título Ej. 31)(NHC6) GGAAUCuuAuAuuuGAUCcAsA	154	uuGGAUcAAAUuAAGAUJCcscsU
-	(Compuesto del título Ej. 33)(NHC6) GGAAUCuuAuAuuuGAUCcAsA	154	uuGGAUcAAAUuAAGAUJCcscsU
-	(Compuesto del título Ej. 32)(NHC6) GGAAUCuuAuAuuuGAUCcAsA	154	uuGGAUcAAAUuAAGAUJCcscsU
-	(Compuesto del título Ej. 17)(NHC6) GGAAUCuuAuAuuuGAUCcAsA	154	uuGGAUcAAAUuAAGAUJCcscsU
-	(Compuesto del título Ej. 30)(NHC6) GGAAUCuuAuAuuuGAUCcAsA	154	uuGGAUcAAAUuAAGAUJCcscsU
-	(Compuesto del título Ej. 27)(NHC6) GGAAUCuuAuAuuuGAUCcAsA	154	uuGGAUcAAAUuAAGAUJCcscsU
-	(Compuesto del título Ej. 28)(NHC6) GGAAUCuuAuAuuuGAUCcAsA	154	uuGGAUcAAAUuAAGAUJCcscsU
-	(Compuesto del título Ej. 29)(NHC6) GGAAUCuuAuAuuuGAUCcAsA	154	uuGGAUcAAAUuAAGAUJCcscsU
-	(Compuesto del título Ej. 1)(NHC6) GGAAUCuuAuAuuuGAUCcAsA	154	uuGGAUcAAAUuAAGAUJCcscsU
-	(Compuesto del título Ej. 2)(NHC6) GGAAUCuuAuAuuuGAUCcAsA	154	uuGGAUcAAAUuAAGAUJCcscsU
-	(Compuesto del título Ej. 3)(NHC6) GGAAUCuuAuAuuuGAUCcAsA	154	uuGGAUcAAAUuAAGAUJCcscsU
-	(Compuesto del título Ej. 4)(NHC6) GGAAUCuuAuAuuuGAUCcAsA	154	uuGGAUcAAAUuAAGAUJCcscsU
-	(Compuesto del título Ej. 5)(NHC6) GGAAUCuuAuAuuuGAUCcAsA	154	uuGGAUcAAAUuAAGAUJCcscsU
-	(Compuesto del título Ej. 6)(NHC6) GGAAUCuuAuAuuuGAUCcAsA	154	uuGGAUcAAAUuAAGAUJCcscsU
-	(Compuesto del título Ej. 7)(NHC6) GGAAUCuuAuAuuuGAUCcAsA	154	uuGGAUcAAAUuAAGAUJCcscsU
-	(Compuesto del título Ej. 8)(NHC6) GGAAUCuuAuAuuuGAUCcAsA	154	uuGGAUcAAAUuAAGAUJCcscsU
-	(Compuesto del título Ej. 9)(NHC6) GGAAUCuuAuAuuuGAUCcAsA	154	uuGGAUcAAAUuAAGAUJCcscsU
-	(Compuesto del título Ej. 10)(NHC6) GGAAUCuuAuAuuuGAUCcAsA	154	uuGGAUcAAAUuAAGAUJCcscsU
-	(Compuesto del título Ej. 11)(NHC6) GGAAUCuuAuAuuuGAUCcAsA	154	uuGGAUcAAAUuAAGAUJCcscsU
-	(Compuesto del título Ej. 12)(NHC6) GGAAUCuuAuAuuuGAUCcAsA	154	uuGGAUcAAAUuAAGAUJCcscsU
-	(Compuesto del título Ej. 13)(NHC6) GGAAUCuuAuAuuuGAUCcAsA	154	uuGGAUcAAAUuAAGAUJCcscsU
-	(Compuesto del título Ej. 14)(NHC6) GGAAUCuuAuAuuuGAUCcAsA	154	uuGGAUcAAAUuAAGAUJCcscsU
-	(Compuesto del título Ej. 24)(NHC6) GGAAUCuuAuAuuuGAUCcAsA	154	uuGGAUcAAAUuAAGAUJCcscsU

SEQ ID No	Secuencia sentido (5'-3')	SEQ ID No	Secuencia antisentido (5'-3')
-	(Compuesto del título Ej. 23)(NHC6) GGAAUCuuAuAuuuGAUCcAsA	154	uuGGAUcAAAUuAuAAGAuUCcscsU
-	(Compuesto del título Ej. 22)(NHC6) GGAAUCuuAuAuuuGAUCcAsA	154	uuGGAUcAAAUuAuAAGAuUCcscsU
-	(Compuesto del título Ej. 26)(NHC6) GGAAUCuuAuAuuuGAUCcAsA	154	uuGGAUcAAAUuAuAAGAuUCcscsU
-	(Compuesto del título Ej. 25)(NHC6) GGAAUCuuAuAuuuGAUCcAsA	154	uuGGAUcAAAUuAuAAGAuUCcscsU
-	(Compuesto del título Ej. 20)(NHC6) GGAAUCuuAuAuuuGAUCcAsA	154	uuGGAUcAAAUuAuAAGAuUCcscsU
-	(Compuesto del título Ej. 19)(NHC6) GGAAUCuuAuAuuuGAUCcAsA	154	uuGGAUcAAAUuAuAAGAuUCcscsU
-	(Compuesto del título Ej. 18)(NHC6) GGAAUCuuAuAuuuGAUCcAsA	154	uuGGAUcAAAUuAuAAGAuUCcscsU
-	(Compuesto del título Ej. 21)(NHC6) GGAAUCuuAuAuuuGAUCcAsA	154	uuGGAUcAAAUuAuAAGAuUCcscsU
-	(Compuesto del título Ej. 15)(NHC6) GGAAUCuuAuAuuuGAUCcAsA	154	uuGGAUcAAAUuAuAAGAuUCcscsU
266	(Col)GGAAUCuuAuAuuuGAUC cAsA	154	uuGGAUcAAAUuAuAAGAuUCcscsU

## Ejemplo 35: Experimentos in vivo

Co-administración de conjugados de colesterol-ARNip que contienen dipéptido y polímero de administración *in vivo*.

5 Se obtuvieron ratones de seis a ocho semanas de edad (cepa C57BL/6 o ICR, -18-20 g cada uno) de Harlan Sprague Dawley (Indianápolis IN). Los ratones se alojaron al menos 2 días antes de la inyección. La alimentación se realizó a voluntad con la dieta Harlan Teklad Rodent (Harlan, Madison WI).

10 Se inyectaron ratones (n=3 por grupo) con una mezcla de 0,2 ml de solución de polímero de administración y 0,2 ml de conjugados de colesterol-ARNip que contienen dipéptido. La dosis inyectada fue, a menos que se establezca de otro modo, 15 mg/kg para el polímero de administración y 0,1 mg/kg con respecto a los conjugados de colesterol-ARNip que contienen dipéptido. Las soluciones se inyectaron por infusión en la vena de la cola. 48 horas después de la inyección se midieron los niveles de ApoB en suero con respecto a los animales tratados con glucosa isotónica según el siguiente procedimiento.

Determinación de los niveles de ApoB en suero.

20 Los ratones ayunaron durante 4 h antes de la recogida de suero por hemorragia submandibular. Se determinaron los niveles de proteína ApoB en suero por métodos de ELISA de sándwich estándar. Brevemente, se usaron un anticuerpo de cabra anti-ApoB de ratón policlonal y un anticuerpo de conejo anti-ApoB de ratón (Bioscience International) como anticuerpos de captura y de detección, respectivamente. Se aplicó después un anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo conjugado con HRP (Sigma) para unir el complejo ApoB/anticuerpo. Entonces se midió la absorbancia del desarrollo colorimétrico de tetrametil-bencidina (TMB, Sigma) por un lector de microplacas Tecan Safire2 (Austria, Europa) a 450 nm.

30 En la Figura 1 se compararon diversos conjugados de colesterol-ARNip que contienen dipéptido con el mismo ARNip conjugado con colesterol, pero que carecía del motivo escindible elaborado anteriormente en esta sección. El efecto de este conjugado de ARNip (SEQ ID NO par 266/154, "control no escindible") sobre los niveles de ApoB en suero se estableció a 1 con el fin de evaluar la influencia de los conjugados que contienen dipéptido con respecto al control no escindible. El sustituir el motivo Phe-Lys inicialmente usado (ARNip con Compuesto del título del Ejemplo 16) con los D-aminoácidos correspondientes (ARNip con Compuesto del título del Ejemplo 14) o solo sustituir la Lys con el enantiómero no natural (ARNip con Compuesto del título del Ejemplo 30) dio reducción de ApoB menos pronunciada o equivalente al ARNip de control no escindible. El sustituir Lys con Gly (ARNip con Compuesto del título del Ejemplo 23) o Phe con p-metoxifenilalanina (ARNip con Compuesto del título del Ejemplo 13) redujo la potencia en comparación con ARNip con Compuesto del título del Ejemplo 16. Se mostró que otros motivos de dipéptido que contenían conjugados de ARNip eran tan eficaces como el conjugado que contenía Phe-Lys original.

40 La Figura 2 resume conjugados de colesterol-ARNip que contienen dipéptido que fueron tan eficaces o tuvieron eficacia mejorada en comparación con ARNip con Compuesto del título del Ejemplo 16 que consiste en el motivo Phe-Lys. Todos estos conjugados fueron significativamente más activos en comparación con el conjugado de colesterol-ARNip "no escindible" SEQ ID NO par 266/154. Los conjugados de colesterol-ARNip que contienen dipéptido de mejor rendimiento tuvieron un anillo de fenilo modificado con flúor en el motivo Phy-Lys (ARNip con Compuesto del título del Ejemplo 8, ARNip con Compuesto del título del Ejemplo 9) o tuvieron la fenilalanina sustituida con beta-fenilalanina (ARNip con Compuesto del título del Ejemplo 11) o un derivado de la misma (ARNip

con Compuesto del título del Ejemplo 10).

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

Como se muestra en la Figura 3, la incorporación de un motivo de dipéptido escindible por catepsina (en este caso Phe-Lys, ARNip con Compuesto del título del Ejemplo 16) entre el ARNip y el ligando de molécula pequeña colesterol refuerza la potencia del conjugado de ARNip en comparación con el conjugado de colesterol-ARNip convencional (SEQ ID NO par 266/154). La separación adicional del ligando de colesterol del motivo de dipéptido por medio de conectores basados en PEG disminuye la potencia proporcional a la longitud del conector de PEG.

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

Ejemplo 36: Síntesis de oligorribonucleótidos modificados en 2'

Se sintetizaron oligorribonucleótidos según la tecnología de fosforamidito sobre fase sólida. Dependiendo de la escala se usó tanto un sintetizador ABI 394 (Applied Biosystems) como un AKTA oligopilot 100 (GE Healthcare, Friburgo, Alemania). Se realizaron síntesis sobre un soporte sólido hecho de vidrio de poro controlado (CPG, 520Å, con una carga de 75 µmol/g, obtenido de Prime Synthesis, Aston, PA, EE.UU.). Todos los fosforamiditos de ARN modificados en 2', además de reactivos auxiliares, se compraron de SAFC (Hamburgo, Alemania). Específicamente, se usaron los siguientes 2'-O-metil-fosforamiditos: (5'-O-dimetoxitritil-N<sup>6</sup>-(benzoi)-2'-O-metil-adenosina-3'-O-(2-cianoetil-N,N-diisopropilamino)fosforamidito, 5'-O-dimetoxitritil-N<sup>4</sup>-(acetil)-2'-O-metil-citidina-3'-O-(2-cianoetil-N,N-diisopropilamino)fosforamidito, (5'-O-dimetoxitritil-N<sup>2</sup>-(isobutiril)-2'-O-metil-guanosina-3'-O-(2-cianoetil-N,N-diisopropilamino)fosforamidito y 5'-O-dimetoxitritil-2'-O-metil-uridina-3'-O-(2-cianoetil-N,N-diisopropilamino)fosforamidito. Los 2'-desoxi-2'-fluoro-fosforamiditos llevaron los mismos grupos protectores que los amiditos de 2'-O-metil-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)etilsulfoni]etil-(2-cianoetil)-(N,N-diisopropil)-fosforamidito de Glen Research (Sterling, Virginia, EE.UU.). Con el fin de introducir el conector de C-6 amino 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.). Se introdujeron modificaciones en 5' sin ninguna modificación del ciclo de síntesis. Se usó 5-tiltiotetrazol (ETT, 500 mM en acetonitrilo) como solución de activador. Los tiempos de acoplamiento fueron 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).

Ejemplo 37: Escisión y desprotección del oligómero unido a soporte.

Después de la finalización de la síntesis en fase sólida, el soporte sólido secado 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 CPG se lavó con amoniaco acuoso. Se evaporaron las soluciones combinadas y el residuo sólido se reconstituyó en tampón A (véase más adelante).

Ejemplo 38: Purificación de oligorribonucleótidos

Se purificaron oligómeros en bruto por HPLC de intercambio aniónico usando una columna rellena de Source Q15 (GE Healthcare) y un sistema AKTA Explorer (GE Healthcare). El tampón A fue perclorato de sodio 10 mM, Tris 20 mM, EDTA 1 mM, pH 7,4 (Fluka, Buchs, Suiza) y contuvo 20 % de acetonitrilo y el tampón B fue el mismo que el tampón A, con la excepción de perclorato de sodio 500 mM. Se empleó un gradiente de 22 % de B a 42 % de B dentro de 32 volúmenes de columna (VC). Se registraron los trazos de UV a 280 nm. Se reunieron fracciones apropiadas y se precipitaron con NaOAc 3 M, pH=5,2 y 70 % de etanol. Finalmente, el sedimento se lavó con 70 % de etanol.

Ejemplo 39: Hibridación de oligorribonucleótidos para generar ARNip

Se mezclaron hebras complementarias combinando soluciones de ARN equimolares. La mezcla se liofilizó y se reconstituyó con un volumen apropiado de tampón de hibridación (NaCl 100 mM, fosfato de sodio 20 mM, pH 6,8) para lograr la concentración deseada. Esta solución se dispuso en un baño de agua a 85 °C que se enfrió a ta en el plazo de 3 h.

Ejemplo 40: Actividad *in vitro* de ARNip que carecen de restos de 2'-OH

Con el fin de investigar si los ARNip que carecen de cualquier resto de 2'-OH muestran potente actividad de inactivación *in vitro*, los presentes inventores probaron un panel de ARNip dirigidos a ARNm de EGFP con diferentes químicas de modificación en 2' (SEQ ID pares 31/32 a 149/150, y véase la Tabla 3 para ejemplos). Los ARNip se cribaron para actividad codificante y no codificante con el sistema de ensayo de luciferasa Dual-Glo® (Promega) usando el vector psiCHECK2 (Promega) en células COS7 (DSMZ, Braunschweig, Alemania, cat. N.º ACC-60). Para tratar la actividad de silenciamiento conferida por la hebra codificante y no codificante, los presentes inventores clonaron cada secuencia de sitio diana 19mera correspondiente como construcción de psiCHECK2 separada (psiCHECK2-AT para actividad no codificante, psiCHECK2-ST para actividad codificante) en la región de clonación múltiple localizada 3' con respecto al codón de terminación traduccional de la luciferasa de Renilla sintética. Usando Lipofectamine 2000 (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Alemania, cat. N.º 11668-019), se co-transfectaron células COS7 con la construcción de vector y 3 nM del ARNip correspondiente complementario al sitio diana clonado. El satisfactorio silenciamiento mediado por ARNip se determinó 24 horas después de la transfección mediante la actividad de la luciferasa de Renilla normalizada a los niveles de luciferasa de luciérnaga para tener en cuenta la eficiencia de transfección (véase la Figura 5a para actividad antisentido y la Figura 5b para actividad sentido).

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

Dúplex de ARN	
Sin modificar	5'- UGCCCAUCCUGGUCGAGCUTT -3' 3'- TTACGGGUAGGACCAGCUCGAp -5'
F/OMe	5'- UfgCfcCfaUfcCfuGfgUfcGfaGfcUfTsT -3' 3'- TsTaCfGfGfUfaGfgAfcCfaGfcUfcGfap -5'
F/ADN	5'- UfGcCfCfAUfCcfUGfGfUfCGfAGfCufTsT -3' 3'- TsTACfGGfGfUfAGfGfCfCfAGfCufCfGfAp -5'
ADN/OMe	5'- UqCcCaUcCuGgUcGaGcUTsT -3' 3'- TsTaCgGgUaGgAcCaGcUcGap -5'

Se encontró que los 5 ARNip modificados más potentes ( $\geq 60\%$  de inactivación) se diseñaron en un patrón alterno de 2-flúor/2'-O-metilo (2'F/2'-OMe). Aunque confiere actividad no codificante, esta química eliminó completamente la actividad de las hebras codificantes correspondientes, como se muestra por la ausencia o actividad de luciferasa de Renilla mínima para todas las variantes de 2'F/2'-OMe probadas.

Los presentes inventores llegaron a la conclusión de que tal patrón de 2'F/2'-OMe está promoviendo la actividad de la hebra no codificante prevista de ARNip mientras que se suprimen completamente los efectos inespecíficos no deseados procedentes de la hebra codificante.

Ejemplo 41: Detección de sitios sensibles de DNAsa II por ensayo *in vitro*

Se estableció un método basado en cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) de fase inversa (RP) con apareamiento de iones (IP) y acoplada a una espectrometría de masas (EM) con ionización por electropulverización (ESI) o una HPLC de intercambio aniónico (AEX) para probar la estabilidad *in vitro* de ARN mono y bicatenarios seleccionados.

Descripción del método: Para el análisis de estabilidad, se incubó una solución 10  $\mu$ M de tanto ARN monocatenario como bicatenario a 37 °C en solución de tampón acetato sódico 5 mM (pH 4,5) que contenía 0,8 o 8 unidades de DNAsa II (de bazo bovino, tipo V, Sigma Aldrich). La reacción de incubación se detuvo añadiendo una solución de acetato de trietilamonio 100 mM (TEAA), desplazando el pH a 7 e inactivando la enzima DNAsa II. El análisis se hizo por tanto EM/CL combinada con detección UV como por AEX-HPLC con detección UV. Se usaron los trazos de la detección UV a 260 nm para el análisis cuantitativo, los datos de EM sirvieron para la identificación del sitio de escisión dentro de la secuencia de ARN.

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

B. Se realizó AEX-HPLC en una columna Dionex DNA Pac200 (4 x 250 mm) a 50 °C usando un tampón fosfato 20 mM que contenía 10 % de ACN a pH=11. El eluyente B contuvo NaBr 1 M en el eluyente A. Se empleó un gradiente del 25 al 62 % de B en 18 minutos.

Tabla 4: Dúplex y las hebras intactas restantes evaluadas para su estabilidad contra DNAsa II. Clave: letras minúsculas a, c, g, u, son 2'-O-metil-nucleótidos; letras mayúsculas A, C, G, U seguido de "f" indica un 2'-fluoro-nucleótido. "p" minúscula indica un 5'-fosfato. (invdT) representa una desoxitimidina invertida (unida 3'-3'). Un enlace fosforotioato se simboliza con una "s" minúscula. dT es desoxitimidina. (NHC6) es el conector de aminohexilo incorporado en el extremo 5' de la hebra codificante.

SEQ ID NO	Secuencia de la hebra codificante (5'-3')	% de hebra intacta después de 6 horas	SEQ ID NO	Secuencia de la hebra no codificante (5'-3')	% de hebra intacta después de 6 horas
157	GGAuGAAGuGGAGAuAGudTsdT	0	158	ACuAAUCUCcACUUCaUCCdTsdT	0,1
160	(NH2C6)GfgAfuGfaAfgUfgGfaGfaUfuAfgUf(invdT)	101	159	pasCfuAfaUfcUfcCfaCfuUfcAfucfc(invdT)	97
165	(NH2C6)GfcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf(invdT)	103	166	puGfaGfuUfgGfcAfcGfcCfuUfugfc(invdT)	103
167	(NH2C6)GcAAAGGcGuGccAAcucAdTsdT	56	168	UGAGUUGGcACGCCUUUGCdTsdT	49
169	(NH2C6)GGAUfCfAUfCfUfCfAAGUfCfUfUfAcfAdTsdT	64	170	GUfAAGACfUfUfGAGAUfGAUfCfCfdTsdT	54
153	GGAAUCuuAuAuuuGAUCcAsA	0,1	154	uuGGAUCAAAuAuAAGAuUCcscsU	0,1
173	(NH2C6)UfgAfcCfaCfaGfuCfGfaUfuAfaAf(invdT)	102	174	pusUfuAfaUfcCfGfcUfgUfgGfuCfa(invdT)	102
175	(NH2C6)uGAccAcAGucGGAuuAAAAdTsdT	0,4	176	puUuAAUCCGACUGUGGucAdTsdT	0,3
175	(NH2C6)uGAccAcAGucGGAuuAAAAdTsdT	6	177	UUuAAUCCGACUGUGGUcAdTsdT	3

Conclusiones:

- 10 A. Las hebras de ARN que contienen al menos un 2'-OH-nucleótido (por ejemplo, ambas hebras de SEQ ID NO par 157/158) son rápidamente degradadas mediante un producto intermedio pentavalente cíclico, que conducen a fosfatos cíclicos 2'-3' en el producto de escisión de 5'. La formación del producto intermedio pentavalente puede inhibirse usando nucleótidos que carecen de un grupo 2'-OH como, por ejemplo, 2'-desoxi, 2'-OMe o 2'-F.
- 15 B. Adicionalmente, el ARN se degrada mediante una vía 5'-exonucleolítica, que es independiente de la modificación en 2' sobre los nucleótidos del extremo 5'. Esta vía de degradación puede inhibirse usando resto no de nucleótido del extremo 5' como, por ejemplo, un conector de C6-amino (por ejemplo, SEQ ID NO 160 en SEQ ID NO par 160/159 o SEQ ID NO 165 en SEQ ID NO par 165/166) o un fosforotioato en el primer enlace internucleotídico (por ejemplo, SEQ ID NO 160 en SEQ ID NO par 160/159).
- 20 C. Un grupo 5'-fosfato ralentiza la escisión cinética exonucleolítica, pero puede no bloquear completamente la degradación empezando en este extremo (por ejemplo, SEQ ID NO 160 en SEQ ID NO par 160/159). Esto es lo más probablemente debido a la escisión del 5'-fosfato por tanto fosfatasas como por una actividad de fosfatasa inherente de la enzima DNAsa II.
- 25 D. La mejor protección para las hebras de ARN se logró con oligonucleótidos que no contenían 2'-OH-nucleótido, a partir de un 2'-OMe-nucleótido en el extremo 5' conectado por un enlace fosforotioato al segundo nucleótido (por ejemplo, SEQ ID NO 173 en SEQ ID NO par 173/174). Otros no 2'-OH-nucleótidos del extremo también protegen contra la 5'-exodegradación, pero a un menor grado, en comparación con la modificación de 2'-OMe (véase la Tabla 9)

30 Ejemplo 42: Actividad de inactivación *in vivo* de ARNip que carecen de restos 2'-OH

35 Se realizaron experimentos *in vivo* con ratones inyectados con ARNip que se dirigen al factor VII (FVII) (SEQ ID NO pares 179/166 y 180/168, véase la Tabla 5) co-administrados con DPC-GalNac.

40 Tabla 5a: Secuencias de ARNip para el experimento *in vivo*. Clave: letras minúsculas a, c, g, u, son 2'-O-metil-nucleótidos; letras mayúsculas A, C, G, U seguido de "f" indica un 2'-fluoro-nucleótido. "p" minúscula indica un 5'-fosfato. (invdT) representa una desoxitimidina invertida (unida 3'-3'). Un enlace fosforotioato se simboliza con una "s" minúscula. dT es desoxitimidina. (NHC6) es el conector de aminohexilo incorporado en el extremo 5' de la hebra codificante. GalNac se refiere a la estructura en la fórmula (IV).

SEQ ID NO par	SEQ ID NOs	Secuencia 5'->3'
179/166	179	GalNAc-(NHC6)- GfcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf(invdT)
	166	puGfaGfuUfgGfcAfcGfcCfuUfuGfc(invdT)
180/168	180	GalNAc-(NHC6)-GcAAAAGGcGuGccAAcucAdTsdT
	168	UGAGUUGGcACGCCUUUGCdTsdT

Se generó un ARNip de FVII con un patrón alterno de 2'-OMe/2'-F sobre la hebra codificante y no codificante como un 2'-OMe-nucleótido del extremo 5' sobre la hebra no codificante y una de 2'-F del extremo 5' sobre la hebra codificante. Ambas hebras están protegidas por una inv(dT) en un nucleótido protuberante del extremo 3'. La hebra no codificante estaba llevando un grupo 5'-fosfato para mantener la actividad del ARNip. Con el extremo 5' de la hebra codificante se conjugó un ligando de GalNAc-palmitoílo para permitir el direccionamiento a hepatocitos por el receptor de la asialilglicoproteína expresado sobre estas células. Se co-administró ARNip (2,5 mg/kg) con polímero de administración PBAVE dirigido a GalNAc (15 mg/kg) en ratones.

Se hicieron mediciones de ARNm de FVII de homogeneizados de hígado usando el kit de ensayo de ADN ramificado (ADNr) QuantiGene 1.0 (Panomics, Fremont, Calif., EE.UU., Cat-N.º: QG0004).

En la autopsia, se congelaron criogénicamente 1-2 g de tejido de hígado en nitrógeno líquido. El tejido congelado se pulverizó con mortero y pistilo sobre nieve carbónica. Se transfirieron 15-25 mg de tejido a un tubo de reacción de 1,5 ml enfriado, se añadió 1 ml de mezcla de lisis 1:3 previamente diluida en agua MilliQ y 3,3 µl de proteinasa K (50 µg/µl) y el tejido se lisó por sonicación ultrasónica de varios segundos al 30-50 % de potencia (HD2070, Bandelin, Berlín, Alemania). Los lisados se almacenaron a -80 °C hasta el análisis. Para el análisis de ARNm, el lisado se descongeló y se digirió con proteinasa K durante 15 min a 1000 rpm en una termomezcladora a 65 °C (Thermomixer comfort, Eppendorf, Hamburgo, Alemania). Se determinaron los niveles de ARNm de FVII y GAPDH usando reactivos del kit de ensayo de ADNr QuantiGene 1.0 según las recomendaciones del fabricante. Se analizó la expresión de ARNm de FVII usando 20 µl de lisado y un conjunto de sonda de FVII de ratón. Se analizó la expresión de ARNm de GAPDH usando 40 µl de lisado y se mostró que los conjuntos de sondas de *Rattus norvegicus* reaccionaban de forma cruzada con los ratones (secuencias de los conjuntos de sondas, véase anteriormente). Como lectura de ensayo se midió la señal de quimioluminiscencia al final del ensayo en un contador de luminiscencia Victor 2 Light (Perkin Elmer, Wiesbaden, Alemania) como unidades relativas de luz (URL). La señal para el ARNm de FVII se dividió entre la señal para el ARNm de GAPDH del mismo lisado. Los valores se informan como expresión de ARNm de FVII normalizada a GAPDH.

Los resultados demuestran un 79 % de inactivación del ARNm de FVII 48 horas después de la dosificación después de la administración de SEQ ID NO par 179/166. A diferencia, el ARNip que lleva 2'-OH-nucleótido SEQ ID NO par 180/168 no mostró inactivación significativa (< 25 %), como se muestra en la Tabla 5.

Tabla 5b: Resultados de los estudios de inactivación *in vivo*

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

Ejemplo 43: Distribución en tejido de ARNip que carecen de restos 2'-OH

Se determinó la concentración de ARNip en las muestras de tejido de hígado usando un método de detección de oligonucleótidos patentado como se describe en el documento WO2010043512. Brevemente, la cuantificación de ARNip se basa en la hibridación de una sonda de PNA fluorescentemente marcada (Atto-425) (Atto425-OO-GCAAAGGCGTGCCAACT, obtenida de Panagene Inc, Corea) complementaria a la hebra no codificante del dúplex de ARNip, seguido de separación basada en AEX-HPLC. La cuantificación se hizo por detección de fluorescencia contra una curva de calibración externa que se generó a partir de una serie de dilución de los dos ARNip de FVII usados en el experimento *in vivo* (véase el Ejemplo 42). Para muestras de plasma entre 0,2 y 2 µl y para tejido se inyectaron alícuotas de ~ 1 mg en el sistema de HPLC.

El análisis de tejido del hígado que carecía del ARNip estabilizado que carecía del 2'-OH-nucleótido mostró altas concentraciones de hebra no codificante intacta en el hígado en el intervalo de µg/g, pero ~ 95 % estuvo presente en la forma inactiva desfosforilada en 5' (véase la Tabla 6). El ARN resultante con un 2'-OMe-nucleótido terminal no es propenso a la refosforilación en el citoplasma por la fosfocinasa hClp1 (véase más adelante). A diferencia, la hebra no codificante del ARNip que contiene 2'-OH se degradó completamente en el tejido en el plazo de las primeras 6 horas después de la dosificación.

Tabla 6: Análisis de tejido del hígado del ARNip estabilizado que no contiene 2'-OH-nucleótido

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

\* BDL = debajo del límite de detección

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

- 5 Se realizó un cribado *in vitro* adicional para ARNip de FVII con el fin de identificar ARNip que pueden ser intracelularmente (re-)fosforilados en el extremo 5' no codificante para producir las especies competentes para iARN. Todos los ARNip de este cribado se muestran en la Tabla 7. El patrón de modificación alterno de 2'-OMe / 2'-F fue idéntico al diseño de 1ª generación (sin ningún resto 2'-OH), con excepción de diversas modificaciones en los dos primeros nucleótidos en el extremo 5' de la hebra no codificante. Los dos nucleótidos del extremo 5' de la hebra no codificante se generaron como nucleótidos modificados con 2'-F o 2'-desoxi en diversas combinaciones con y sin un 5'-fosfato o 5'-fosfotioato adicional. Todos los ARNip se cribaron en respuesta a dosis (24 nM a 0,00037 nM en diluciones cuádruples) para la actividad de inactivación después de la transfección de hepatocitos de ratón primarios (30000 células por pocillo; formato de placa de 96 pocillos) usando Lipofectamine 2000 según las instrucciones del fabricante. Dos ARNip fueron activos comparables con el dúplex parental (SEQ ID NO par 182/168); ARNip activos comparables: SEQ ID NO pares 181/186 y 181/185) en términos de valores de  $CI_{50}$ , uno con un 2'-F del extremo 5' y un grupo fosfato y uno con dos 2'-desoxi-nucleótidos del extremo 5' y un 5'-fosfotioato (véase la Tabla 7 para los valores de  $CI_{50}$ ). Ambos son ~5-6 veces más activos en comparación con el ARNip (SEQ ID NO par 181/166) usado en el primer experimento animal con el 2'-OMe-nucleótido terminal.

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

Se evaluaron todos los ARNip sin un 5'-fosfato o 5'-fosfotioato enumerados en la Tabla 7 para la fosforilación por hClp1 en un extracto de células HeLa S100.

- 25 La fosforilación en 5' se analizó a partir de los extractos de S100 HeLa como se describe por Weitzer y Martinez (S. Weitzer y J. Martinez. hClp1: a novel kinase revitalizes RNA metabolism. Cell Cycle 6 (17):2133-2137, 2007). Directamente después de la incubación de ARNip 1  $\mu$ M en el extracto de S100 HeLa que contenía ATP 5 mM, la solución se analizó por tanto IP-RP-HPLC como AEX-HPLC bajo condiciones desnaturalizantes mediante inyección de 5  $\mu$ l de solución de muestra:

- 30 A. Se hizo IP-RP-HPLC empleando una columna Waters XBridge  $C_{18}$  (2,5 x 50 mm, 2,5  $\mu$ m de tamaño de partícula) a 65 °C de temperatura de la columna. Se realizó elución en gradiente usando hexafluoroisopropanol (HFIP) 100 mM y trietilamina 16 mM en 1 % de metanol como eluyente A y la composición A en 95 % de metanol como eluyente B. Se empleó un gradiente de 1 % de B a 18 % de B en 30 minutos.
- 35 B. Se realizó AEX-HPLC en una columna Dionex DNA Pac200 (4 x 250 mm) a 50 °C usando un tampón fosfato 20 mM que contenía 10 % de ACN a pH=11. El eluyente B contuvo NaBr 1 M en eluyente A. Se empleó un gradiente del 25 al 62 % de B en 18 minutos.



Tabla 7: Valores de Cl<sub>50</sub>

SEQ ID NO	Secuencia de la hebra codificante (5'-3')	SEQ ID NO	Secuencia de la hebra no codificante (5'-3')	Cl <sub>50</sub> [nM]
181	GfcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf(invdT)	185	pUfsGfaGfuUfgGfcAfcGfcCfuUfuGfc(invdT)	0,17
182	GcAAAGcGuGccAAcucAdTsdT	168	UGAGUUGGcACGGCCUUUGCdTsdT	0,228
181	GfcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf(invdT)	186	psdTdGaGfuUfgGfcAfcGfcCfuUfuGfc(invdT)	0,228
181	GfcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf(invdT)	187	psdTsgfaGfuUfgGfcAfcGfcCfuUfuGfc(invdT)	0,554
181	GfcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf(invdT)	188	pdTsdGaGfuUfgGfcAfcGfcCfuUfuGfc(invdT)	0,631
181	GfcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf(invdT)	189	pdTsgfaGfuUfgGfcAfcGfcCfuUfuGfc(invdT)	0,702
181	GfcAfaAfaAfcGfuGfcCfaAfcUfcAf(invdT)	190	pusGfaGfuUfgGfcAfcGfcCfuUfuGfc(invdT)	0,749
181	GfcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf(invdT)	166	puGfaGfuUfgGfcAfcGfcCfuUfuGfc(invdT)	1,002
181	GfcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf(invdT)	191	psUfgfaGfuUfgGfcAfcGfcCfuUfuGfc(invdT)	1,185
181	GfcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf(invdT)	192	UfsGfaGfuUfgGfcAfcGfcCfuUfuGfc(invdT)	2,257
181	GfcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf(invdT)	193	psUfsGfaGfuUfgGfcAfcGfcCfuUfuGfc(invdT)	2,428
181	GfcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf(invdT)	194	psdTsdGaGfuUfgGfcAfcGfcCfuUfuGfc(invdT)	3,208
181	GfcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf(invdT)	195	usGfaGfuUfgGfcAfcGfcCfuUfuGfc(invdT)	3,974
181	GfcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf(invdT)	196	uGfaGfuUfgGfcAfcGfcCfuUfuGfc(invdT)	4,233
181	GfcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf(invdT)	197	dTsgfaGfuUfgGfcAfcGfcCfuUfuGfc(invdT)	4,233
181	GfcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf(invdT)	198	psdTGfaGfuUfgGfcAfcGfcCfuUfuGfc(invdT)	4,704
181	GfcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf(invdT)	199	dTsdGaGfuUfgGfcAfcGfcCfuUfuGfc(invdT)	5,341
183	(Co)GfcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf(invdT)	190	pusGfaGfuUfgGfcAfcGfcCfuUfuGfc(invdT)	9,771

La relación de 5'-fosforilación se calcula para cada hebra de un ARNip a partir del trazo de UV a 260 nm usando la siguiente ecuación (PA es el área pico):

$$\%_{(5\text{'-fosforilación})} = 100 * PA_{[\text{hebra fosforilada en } 5']} / (PA_{[\text{hebra fosforilada en } 5']} + PA_{[\text{hebra original}]})$$

5 En la Tabla 8 se muestra que la hebra no codificante de un ARNip no puede fosforilarse en 5', cuando un 2'-OMe-nucleótido está localizado en el extremo 5' (SEQ ID NO par 181/196 y SEQ ID NO par 181/195). A diferencia, la hebra no codificante es susceptible a fosforilación en 5', cuando un 2'-F, 2'-desoxi o 2'-OH-nucleótido se incorpora en el extremo 5' (SEQ ID NO par 181/195, SEQ ID NO par 181/192, SEQ ID NO par 181/197, SEQ ID NO par 181/199 y  
10 SEQ ID NO par 182/168). Los dos ARNip, que fueron comparablemente activos en el ensayo *in vitro* como la SEQ ID NO par 182/168 parental (SEQ ID NO par 181/186 y 181/185), son susceptibles a fosforilación en 5' una vez el grupo 5'-fosfato / 5'-PTO sintéticamente introducido se escinde *in vivo*, por ejemplo, por fosfatasas.

Tabla 8: Porcentaje de hebra fosforilada en 5' después de 4 horas de incubación en extracto de células S100 HeLa. Clave: letras minúsculas a, c, g, u, son 2'-O-metilnucleótidos; letras mayúsculas A, C, G, U seguido de "f" indica un 2'-fluoro-nucleótido. (invdT) representa una desoxitimidina invertida (unida 3'-3'). Un enlace fosforotioato se simboliza con una "s" minúscula. dT es desoxitimidina.

SEQ ID NO	Secuencia de la hebra codificante (5'-3')	5'P codificante [%]	SEQ ID NO	Secuencia de la hebra no codificante (5'-3')	5'P no codificante [%]
181	GfcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfc Af(invT)	52	196	uGfaGfuUfgGfcAfcGfcCfuUfuGfc (invdT)	0
181	GfcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfc Af(invT)	53	195	usGfaGfuUfgGfcAfcGfcCfuUfuGfc(invT)	0
181	GfcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfc Af(invT)	44	192	UfsGfaGfuUfgGfcAfcGfcCfuUfuGfc(invT)	22
181	GfcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfc Af(invT)	42	197	dTsGfaGfuUfgGfcAfcGfcCfuUfuGfc(invT)	22
181	GfcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfc Af(invT)	47	199	dTsdGaGfuUfgGfcAfcGfcCfuUfuGfc(invT)	13
182	GcAAAGGgcGuGccAAcucAdTsd T	31	168	UGAGUUGGcACGCCUUUUGCdTsdT	42
184	GfcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfc A	22	168	UGAGUUGGcACGCCUUUUGCdTsdT	100

Ejemplo 46: Estabilidad de DNAsa II *in vitro* de ARNip con extremos 5' optimizados

5 Se cribaron todas las hebras no codificantes para la estabilidad de DNAsa II como se describe en el Ejemplo 41. Las dos hebras no codificantes presentes en los ARNip que fueron activos comparables con el dúplex parental (SEQ ID NO 186 y SEQ ID NO par 185 una con un 2'-F del extremo 5' y un grupo fosfato y una con dos 2'-desoxi-nucleótidos del extremo 5' y un 5'-fosforotioato son estables frente a la escisión por DNAsa II (> 70 % de hebra intacta después de 20 h de incubación).

Tabla 9: Estabilidad *in vitro* de ARNip frente a DNAsa II después de 20 horas de incubación

SEQ ID NO codificante	SEQ ID NO no codificante	Secuencia (5'-3')	% de hebra intacta
181	192	UfsGfaGfuUfgGfcAfcGfcCfuUfuGfc(invdt)	11
181	197	dTsGfaGfuUfgGfcAfcGfcCfuUfuGfc(invdt)	0
181	199	dTsdGaGfuUfgGfcAfcGfcCfuUfuGfc(invdt)	0
181	193	psUfsGfaGfuUfgGfcAfcGfcCfuUfuGfc(invdt)	106
181	187	psdTsdGaGfuUfgGfcAfcGfcCfuUfuGfc(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 inactivación *in vivo* de ARNip con extremos 5' optimizados

15 Con el fin de evaluar si la mejora *in vitro* por extremos 5' optimizados se transfiere a la situación *in vivo*, los presentes inventores realizaron experimentos en ratón adicionales con conjugados de GalNAc-palmitoilo de ARNip seleccionados (véase la Tabla 10). Los ARNip se administraron como en condiciones idénticas a como se describen para el primer experimento en ratón (Ejemplo 42, la presente solicitud de patente). Para la medición de niveles de FVII, se prepararon muestras de plasma de ratones recogiendo sangre (9 volúmenes) por hemorragia submandibular en tubos de microcentrifuga que contenían 0,109 mol/l de anticoagulante de citrato de sodio (1 volumen) siguiendo procedimientos convencionales. La actividad de FVII en plasma se midió con un método cromogénico usando un kit BIOPHEN VII (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 actividad *in vivo* mejorada, que se correlacionaba completamente con los resultados del cribado *in vitro*. Se redujo la actividad de FVII en suero más del 80 % para tanto ARNip 48 horas después de la dosificación, en comparación con el 49 % usando el diseño de ARNip de primera generación (véase la Tabla 10). Este resultado enfatiza claramente la importancia de un nucleótido del extremo 5' sobre la hebra no codificante que puede ser eficazmente fosforilado, en el caso de que las fosfatasas escindan *in vivo* el grupo 5'-fosfato o 5'-fosfotioato sintéticamente generado. En el caso de un 2'-OMe-nucleótido del extremo 5' como se usa en el diseño inicial o se describe en la bibliografía como un diseño de ARNip más potente basado en la comparación *in vitro* con ARNip canónico (Allerson et al. J. Med Chem. 2005, 48, 901-904), la escisión del fosfato sintético *in vivo* conduciría a una fuerte reducción en la potencia del ARNip correspondiente.

30

Tabla 10: Actividad de inactivación *in vivo* de ARNip con extremos 5' optimizados. Clave: letras minúsculas a, c, g, u, son 2'-O-metil-nucleótidos; letras mayúsculas A, C, G, U, seguido de "r" indica un 2'-fluoro-nucleótido. "p" minúscula indica un 5'-fostato. (invdT) representa una desoxitimidina invertida (unida 3'-3'). Un enlace fosforotioato se simboliza con una "s" minúscula. dT es desoxitimidina. (NHC6) es el conector de aminohehilo incorporado en el extremo 5' de la hebra codificante. GaiNac se refiere a la estructura en fórmula (IV).

SEQ ID NO	Secuencia de la hebra codificante (5'-3')	SEQ ID NO	Secuencia de la hebra no codificante (5'-3')	% de FVII restante en suero
179	GaiNac-(NHC6)-pGfcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf(invdT)	166	puGfaGfuUfgGfcAfcGfcCfuUfuGfc(invdT)	27
179	GaiNac-(NHC6)-pGfcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf(invdT)	190	pusGfaGfuUfgGfcAfcGfcCfuUfuGfc(invdT)	51
179	GaiNac-(NHC6)-pGfcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf(invdT)	185	pUfsGfaGfuUfgGfcAfcGfcCfuUfuGfc(invdT)	17
179	GaiNac-(NHC6)-pGfcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf(invdT)	186	psdTdGfaGfuUfgGfcAfcGfcCfuUfuGfc(invdT)	13

Ejemplo 48: Actividad de inactivación in vitro de ARNip con extremos 3' optimizados

5 Para aumentar además la actividad del ARNip estable a DNAsa II, se realizó un estudio SAR del nucleótido protuberante de 3'. Se aplicaron diversas combinaciones de invdT, dTinvdT o dTsdT en el nucleótido protuberante de 3' de tanto la hebra codificante como no codificante a ARNip que se dirige a Aha1 y EGFP (véanse las Tablas 11 y 12, respectivamente) y se compararon por pares para la composición de ambos extremos 3' en los ARNip más potentes. Todos los ARNip se cribaron en respuesta a dosis (24 nM a 0,00037 nM en diluciones cuádruples) para la actividad de inactivación después de la transfección de hepatocitos de ratón primarios (30000 células/pocillo; formato de placa de 96 pocillos) usando Lipofectamine 2000 según las instrucciones del fabricante.

10

Tabla 11: Actividad de inactivación *in vitro* de ARNip que se dirigen a EGFP con extremos 3' diferentes.

SEQ ID NO	Secuencia de la hebra codificante (5'-3')	SEQ ID NO	Secuencia de la hebra no codificante (5'-3')	Cl <sub>50</sub> [nM]
45	GCUGGAGUUCGUGAGCCGCCdTdT	46	GGCGGUCACGAACUCCAGCdTdT	1,0490
212	GcuGGAGuucGuGAccGccdTsdT	225	GGGGUcACGAACUCCAGCdTsdT	#N/A
201	gcUfgGfaGfuUfcGfuGfaCfcGfcCf(invdT)	221	dGsGfcGfgUfcAfcGfaAfcUfcCfaGfc(invdT)	0,4377
201	gcUfgGfaGfuUfcGfuGfaCfcGfcCf(invdT)	214	dGsGfcGfgUfcAfcGfaAfcUfcCfaGfcTsdT	0,1479
211	gcUfgGfaGfuUfcGfuGfaCfcGfcCfdT(invdT)	223	dGsGfcGfgUfcAfcGfaAfcUfcCfaGfcT(invdT)	0,5833
203	gcUfaGfaGfuUfcGfuGfaCfcGfcCfdTsdT	214	dGsGfcGfgUfcAfcGfaAfcUfcCfaGfcTsdT	0,2166
204	GfcUfgGfaGfuUfcGfuGfaCfcGfcCf(invdT)	224	pGfsGfcGfgUfcAfcGfaAfcUfcCfaGfc(invdT)	0,9100
204	GfcUfgGfaGfuUfcGfuGfaCfcGfcCf(invdT)	215	pGfsGfcGfgUfcAfcGfaAfcUfcCfaGfcTsdT	0,2241
207	GfscUfgGfaGfuUfcGfuGfaCfcGfcCfdT(invdT)	218	pGfsGfcGfgUfcAfcGfaAfcUfcCfaGfcT(invdT)	0,3474
206	GfcUfgGfaGfuUfcGfuGfaCfcGfcCfdTsdT	215	pGfsGfcGfgUfcAfcGfaAfcUfcCfaGfcTsdT	0,2392
205	GfscUfgGfaGfuUfcGfuGfaCfcGfcCf(invdT)	220	GfsGfcGfgUfcAfcGfaAfcUfcCfaGfc(invdT)	0,4251
205	GfscUfgGfaGfuUfcGfuGfaCfcGfcCf(invdT)	216	GfsGfcGfgUfcAfcGfaAfcUfcCfaGfcTsdT	0,2349
210	GfscUfgGfaGfuUfcGfuGfaCfcGfcCfdT(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	gscUfgGfaGfuUfcGfuGfaCfcGfcCfdTsdT	213	pdGsGfcGfgUfcAfcGfaAfcUfcCfaGfcTsdT	0,1569

Tabla 12: Actividad de inactivación *in vitro* de ARNip que se dirigen a Aha1 con extremos de 3' diferentes.

SEQ ID NO	Secuencia de la hebra codificante (5'-3')	SEQ ID NO	Secuencia de la hebra no codificante (5'-3')	Cl <sub>50</sub> [nM]
157	GGAUGAAGuGGAGAuAGudTsdT	158	ACuAAUUCcACUuAUCCdTsdT	0,094
234	GfgAfuGfaAfgUfgGfaGfaUfuAfgUf(invdT)	246	AfsCfuAfaUfcUfc0faCfuUfcAfuCfc(invdT)	0,081
234	GfaAfuGfaAfaUfgGfaGfaUfuAfgUf(invdT)	240	AfsCfuAfaUfcUfcCfaCfuUfcAfuCfcdTsdT	0,036
233	GfgAfuGfaAfgUfgGfaGfaUfuAfgUfdT(invdT)	239	AfsCfuAfaUfcUfcCfaCfuUfcAfuCfcdT(invdT)	0,034
236	GfgAfuGfaAfgUfgGfaGfaUfuAfgUfdTsdT	240	AfsCfuAfaUfcUfcCfaCfuUfcAfuCfcdTsdT	0,040
231	GfsgAfuGfaAfgUfgGfaGfaUfuAfgUf(invdT)	241	pAfsCfuAfaUfcUfcCfaCfuUfcAfuCfc(invdT)	0,037
231	GfsgAfuGfaAfgUfgGfaGfaUfuAfgUf(invdT)	267	pAfsCfuAfaUfcUfcGfaCfuUfcAfuCfcdTsdT	0,030
229	GfsgAfuGfaAfgUfgGfaGfaUfuAfgUfdT(invdT)	268	pAfsCfuAfaUfcUfcCfaCfuUfcAfuCfcdT(invdT)	0,024
228	GfsgAfuGfaAfgUfgGfaGfaUfuAfgUfdTsdT	267	pAfsCfuAfaUfcUfcCfaCfuUfcAfuCfcdTsdT	0,021
232	ggAfuGfaAfgUfgGfaGfaUfuAfgUf(invdT)	245	dAsCfuAfaUfcUfcCfaCfuUfcAfuCfc(invdT)	0,060
232	ggAfuGfaAfgUfgGfaGfaUfuAfgUf(invdT)	238	dAsCfuAfaUfcUfcCfaCfuUfcAfuCfcdTsdT	0,030
237	ggAfuGfaAfgUfgGfaGfaUfuAfgUfdT(invdT)	244	dAsCfuAfaUfcUfcCfaCfuUfcAfuCfcdT(invdT)	0,045
230	ggAfuGfaAfgUfgGfaGfaUfuAfgUfdTsdT	238	dAsCfuAfaUfcUfcCfaCfuUfcAfuCfcdTsdT	0,025
227	gsgAfuGfaAfgUfgGfaGfaUfuAfgUf(invdT)	243	pdAsCfuAfaUfcUfcCfaCfuUfcAfuCfc(invdT)	0,045
227	gsgAfuGfaAfgUfgGfaGfaUfuAfgUf(invdT)	266	pdAsCfuAfaUfcUfcCfaCfuUfcRfuCfcdTsdT	0,015
235	gsgAfuGfaAfgUfgGfaGfaUfuAfgUfdT(invdT)	242	pdAsCfuAfaUfcUfcCfaCfuUfcAfuCfcdT(invdT)	0,039
226	gsgAfuGfaAfgUfgGfaGfaUfuAfgUfdTsdT	266	pdAsCfuAfaUfcUfcCfaCfuUfcAfuCfcdTsdT	0,014



Se encontró que los ARNip con nucleótidos protuberantes dTsdT de 2 nucleótidos en la hebra no codificante siempre rindieron mejor que aquellos con un único nucleótido protuberante invdT en el extremo 3 no codificante (mientras que las hebras codificantes eran las mismas). Más beneficiosa fue la combinación con una hebra codificante modificada con un único nucleótido protuberante invdT como nucleótido protuberante de 3'.

5

Ejemplo 49: Actividad de inactivación *in vivo* de ARNip en primates no humanos

#### Preparación de DPCs y dosificación

Se prepararon DPCs uniendo covalentemente el polímero "149 RAFT" al factor de coagulación VII que se dirige al ARNip indicado (siF7) a la relación 4:1 en peso:peso (polímero:ARNip) mediante un enlace disulfuro y entonces modificando el conjugado de polímero-ARNip con una mezcla 2:1 en peso:peso de CDM-PEG:CDM-NAG a una relación 7x en peso:peso (CDM:polímero). Se dosificaron monos cinomolgos con 1 mg/kg de DPC (peso de polímero) y 0,25 mg/kg del ARNip indicado. Un animal recibió DPC que contenía siF7 SEQ ID NO par 151/152, dos animales recibieron DPC que contenían siF7 SEQ ID NO par 253/254, #1 y #2), y dos animales recibieron DPC que contenían SEQ ID NO par 251/255, #1 y #2). Los valores de F7 se normalizaron al promedio de los dos valores previos a la dosis. Los animales que recibieron DPCs que contienen SEQ ID NO par 253/254 o SEQ ID NO par 251/255 tuvieron mayor niveles de inactivación de F7 y PT más largo que el animal que recibió SEQ ID NO par 251/252.

20

#### Procedimiento de inyección de DPC

Para cada procedimiento de inyección, los animales se administraron con 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 en una almohadilla calefactora con camisa agua y el sitio de inyección se rasuró y se preparó con un antiséptico. Se insertó un catéter intravenoso (20 a 22 de calibre) en una vena sistémica (cefálica o safena pequeña) y se infundió la solución de DPC (2 ml/kg) lentamente durante 1 a 2 minutos. Se usó un oxímetro de pulso para monitorizar la frecuencia cardíaca y la saturación de oxígeno durante e inmediatamente tras el procedimiento de inyección. Cada procedimiento de inyección tardó en realizarse aproximadamente 20 minutos. Después de la inyección, se quitó el catéter y se aplicó una suave presión en el sitio de venopunción. Los animales se devolvieron a sus jaulas y se les puso una inyección IM del fármaco inverso atipamezol (antisedan) (0,10 a 0,15 mg/kg). Los animales se monitorizaron hasta que recobraron la actividad normal.

35

#### Procedimiento de extracción de sangre

Se obtuvieron muestras de sangre (1-5 ml) para la medición de la inhibición génica (actividad de F7, tiempo de coagulación), químicas de la sangre y marcadores de daño hepático (CBC, panel de química, ALT, citocinas, complemento). Para estos procedimientos de extracción de sangre, los animales se administraron con 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 procedimiento portátil y se usaron una aguja de calibre 22 y jeringa para recoger sangre de la vena femoral. Inmediatamente después de la extracción de sangre, se aplicó presión al sitio de venopunción y la sangre se dividió en los tubos de muestra apropiados para cada análisis de sangre. Entonces, los animales se administraron con una inyección IM del fármaco inverso atipamezol (antisedan) (0,10 a 0,15 mg/kg) y se devolvieron a su jaula. Se extrajo no más del 20 % de volumen de sangre total en cualquier periodo de 30 días (volumen de sangre estimado = 60 ml/kg). Cada procedimiento de extracción de sangre tardó en realizarse aproximadamente 10 minutos.

50

#### Mediciones de la actividad del factor VII (F7)

Se prepararon muestras de sangre de primates no humanos llenando tubos del separador de suero con sangre completa y dejando que la sangre coagulara a temperatura ambiente durante al menos 20 minutos. Después de la coagulación, los tubos de sangre se centrifugaron durante 3 minutos a 9000 rpm, se separaron en alícuotas en tubos Eppendorf y se guardaron a -20 °C hasta que se ensayaron. Se midió la actividad de F7 en suero con un método cromogénico usando un kit BIOPHEN VII (Hyphen BioMed/Aniara, Mason, OH) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Se midió la absorbancia del desarrollo colorimétrico usando un lector de microplacas Tecan Safire2 a 405 nm.

60

#### Pruebas de coagulación (tiempo de protrombina, tiempo de protrombina parcial y fibrinógeno)

Se prepararon muestras de sangre de primates no humanos llenando completamente tubos con citrato de sodio (BD Vacutainer) con sangre completa y mezclando suavemente para prevenir la formación de coágulos. Los tubos se transportaron a un laboratorio de análisis clínicos en el plazo de una hora y se realizaron los ensayos de coagulación en el plazo de 4 horas desde el momento de la recogida.

65

Tabla 13: ARNbc de FVII usados para el experimento de NHP: Clave: letras minúsculas a, c, g, u, son 2'-O-metil-nucleótidos; letras mayúsculas A, C, G, U seguido de "f " indica un 2'-fluoro-nucleótido. "p" minúscula indica un 5'-fosfato. (invdT) representa una desoxitimidina invertida (unida 3'-3'). Un enlace fosforotioato se simboliza con una "s" minúscula. dT es desoxitimidina. NH2C6 es el conector de aminohexilo incorporado en el extremo 5' de la hebra codificante.

SEQ ID NO	Secuencia de la hebra codificante (5'-3')	SEQ ID NO	Secuencia de la hebra no codificante (5'-3')
251	(NH2C6)GfuUfgGfuGfaAfuGfgAfgCfuCfaGf(invdT)	252	pCfsUfgAfgCfuCfcAfuUfcAfcCfaAfc(invdT)
253	(NH2C6)GfgUfcCfuGfuUfgUfuGfgUfgAfaUf(invdT)	254	pAfsUfuCfaCfcAfaCfaAfcAfgGfaCfcdTsdT
251	(NH2C6)GfuUfgGfuGfaAfuGfgAfgCfuCfaGf(invdT)	255	pCfsUfgAfgCfuCfcAfuUfcAfcCfaAfc(invdT) TsdT

El cambio de un nucleótido protuberante en 3' (invdT) de un único nucleótido en ambas hebras a un diseño de ARNip asimétrico con un nucleótido protuberante (invdT) en 3' en la hebra codificante y un nucleótido protuberante dTsdT en la hebra no codificante, pero patrón de modificación por lo demás constante, conduce a una reducción de FVII en suero más pronunciada y una duración significativamente prolongada de este efecto en primates no humanos (véase la Figura 6a). Esta observación está soportada por un consecuencia biológica esperada, concretamente 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 inactivación *in vivo* de ARNip con conectores de ARN escindibles

En la Tabla 14 se comparó la eficacia *in vivo* basada en la inhibición de la proteína FVII en suero usando colesterol o el conjugado de ARNip de GalNAc-palmitoilo en el mismo contexto de secuencia en ratones. El experimento *in vivo* se realizó como se describe en el Ejemplo 42. La inhibición de FVII disminuyó fuertemente para el ARNip conjugado con colesterol que no contenía 2'-OH-nucleótido en comparación con los homólogos conjugados con GalNAc-palmitoilo (SEQ ID NO par 179/166 frente a 179/190, SEQ ID NO par 257/264 frente a SEQ ID NO par 179/262, SEQ ID NO par 257/263 frente a SEQ ID NO par 179/163 y SEQ ID NO par 257/166 frente a SEQ ID NO par 179/166). A diferencia de un ARNip que contenía 2'-OH, el conjugado de colesterol conduce a mayor inhibición de FVII en comparación con el derivado de GalNAc-palmitoilo (SEQ ID NO par 180/168 frente a SEQ ID NO par 258/168).

Los ligandos de molécula pequeña GalNAc-palmitoilo y colesterol usados en el experimento *in vivo* descrito están conectados al ARNip mediante un conector no escindible al extremo 5' de la hebra codificante. En caso de que la hebra codificante presente 2'-OH-nucleótidos el ligando todavía puede escindirse por nucleasas (por ejemplo, DNasa II en el compartimento endosómico o lisosómico). La reacción de escisión libera el ARNip libre que entonces se libera en el citoplasma por la actividad perturbadora endosómica del polímero de administración.

Para ARNip que carece de un 2'-OH-nucleótido en la hebra codificante, los ligandos están establemente conectados al dúplex, ya que ningún mecanismo enzimático (nucleasa/proteasa/esterasa, etc.) o químico provoca la escisión del ligando. Por tanto, ARNip conjugado con colesterol completamente estable puede ser atrapado en membranas celulares debido a la interacción de membrana del ligando lipófilo colesterol. Incluso altas concentraciones del ARNip en el tejido no son suficientes para la eficaz liberación del ARNip en el citoplasma. A diferencia, el ARNip conjugado con GalNAc-palmitoilo menos lipófilo puede ser liberado en el citoplasma, debido a una interacción menos pronunciada con membranas celulares. Por este motivo, un conjugado de ARNip de GalNAc-palmitoilo no escindible estable es más eficaz en comparación con un conjugado de colesterol con el mismo ARNip.

El desarrollo de construcciones de conector escindible ayudaría a evadir la cuestión del atrapamiento en la membrana de ARNip establemente conjugado con colesterol. El uso de química de conector de disulfuro se describe como una posibilidad atractiva para introducir un sitio de escisión definido. Sin embargo, la escisión está limitada a reducir orgánulos dentro de la célula (PNAS, 2006, 103, 13872). Como se espera que la escisión sea lenta en el compartimento endosómico/lisosómico, la mayoría del ARNip conjugado con colesterol-disulfuro puede todavía ser atrapado en membranas como se describe para los conjugados de colesterol no escindibles.

Tabla 14

Conjugado	SEQ ID NO par	SEQ ID NO	Secuencia 5'->3'	% de actividad de FVII en suero
	179/166	179	GalNAc-NHC6-pGfcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf(invdT)	27
		166	puGfaGfuUfgGfcAfcGfcCfuUfuGfc(invdT)	
	179/190	179	GalNAc-NHC6-pGfcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf(invdT)	51

Conjugado	SEQ ID NO par	SEQ ID NO	Secuencia 5'->3'	% de actividad de FVII en suero
GalNAc	179/262	190	pusGfaGfuUfgGfcAfcGfcCfuUfuGfc(invdt)	17
		179	GalNAc-NHC6-pGfcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf(invdt)	
		262	pUfsGfaGfuUfpGfcAfcGfcCfuUfuGfc(invdt)	
	179/263	179	GalNAc-NHC6-pGfcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf(invdt)	13
		263	psdTdGfaGfuUfgGfcAfcGfcCfuUfuGfc(invdt)	
	180/168	180	GalNAc-NHC6-pGcAAAGGcGuGccAAcucAdTsdT	86
168		UGAGUUGGcACGCCUUUGCdTsdT		
Colesterol	257/166	257	Chol-pGfcAfaAfpGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf(invdt)	48
		166	puGfaGfuUfgGfcAfcGfcCfuUfuGfc(invdt)	
	257/190	257	Chol-pGfcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf(invdt)	93
	257/264	190	pusGfaGfuUfgGfcAfcGfcCfuUfuGfc(invdt)	63
		257	Chol-pGfcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf(invdt)	
		264	pUfsGfaGfuUfgGfcAfcGfcCfuUfuGfc(invdt)	
	257/263	257	Chol-pGfcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf(invdt)	41
		263	psdTdGfaGfuUfgGfcAfcGfcCfuUfuGfc(invdt)	
	258/168	258	Chol-pGcAAAGGcGuGccAAcucAdTsdT	50
168		UGAGUUGGcACGCCUUUGCdTsdT		

Además de la química del conector escindible de disulfuro bien establecida, otra posibilidad es la generación de sitios de escisión definidos usando 2'-OH-nucleótidos en ciertas posiciones. La introducción de 2'-OH-nucleótidos en posiciones selectivas es un nuevo enfoque para lograr la escisión de los conjugados de hebras de ARN. Los 2'-OH-nucleótidos pueden tanto implementarse añadiendo nucleótidos protuberantes monocatenarios con al menos un 2'-OH-nucleótido en el extremo 3' o 5' de la hebra de ARN como usando 2'-OH-nucleótidos dentro de la región de dúplex de un ARNip. La actividad enzimática de las nucleasas presentes en el endosoma / lisosoma se escinde selectivamente en estas posiciones. En un primer diseño, el colesterol se conectó a la hebra codificante mediante un nucleótido protuberante monocatenario que contenía 3 2'-OH-nucleótidos (AUC) en el extremo 5'.

Se muestran ARNip conjugados con colesterol que comparan diversas químicas de conector escindible en la Tabla 15. Todos los ARNip tienen el contexto de secuencia idéntica, solo se alteró la química de conector. El colesterol se conectó a la hebra codificante mediante el nucleótido protuberante monocatenario que comprende tres 2'-OH-nucleótidos (AUC) al extremo 5'. Cuando se co-administra con un polímero de administración, este ARNip (SEQ ID NO par 260/263) conduce a un 77 % de modulación por disminución de FVII en suero en ratones, en comparación con solo el 60 % si se usa el ARNip idéntico con un colesterol establemente unido (SEQ ID NO par 257/263). El mismo ARNip con un colesterol conjugado mediante un conector según la fórmula la al extremo 5' de hebra codificante (SEQ ID NO par 261/263) conduce a un 93 % de reducción de actividad de FVII en suero. Todos los resultados se lograron por co-administración de 15 mg/kg de un polímero de administración con 2,5 mg/kg del ARNip conjugado con colesterol en ratones.

Estos resultados indican que el uso de un conector escindible mejora la potencia *in vivo* de ARNip que no contienen 2'-OH-nucleótido. El conector escindible puede tanto comprender nucleótidos que contienen 2'-OH, un motivo de escisión de dipéptido como una química de conector de disulfuro. Todas las construcciones de conector escindible mejoran la potencia *in vivo* en una configuración de co-administración de un ARNip conjugado con colesterol como polímero de administración de liberación endosómica lenta.

Tabla 15 Comparación *in vivo* de diversas químicas de conector para ARNip conjugado con colesterol

SEQ ID NO	Secuencia de la hebra codificante (5'-3')	SEQ ID NO	Secuencia de la hebra no codificante (5'-3')	% de actividad de FVII en suero
257	Chol-pGfcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf(invdt)	263	psdTdGfaGfuUfgGfcAfcGfcCfuUfuGfc(invdt)	40
259	Chol-C6SSC6-pGfcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf(invdt)	263	psdTdGfaGfuUfgGfcAfcGfcCfuUfuGfc(invdt)	22
260	Chol-AUC-pGfcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf(invdt)	263	psdTdGfaGfuUfgGfcAfcGfcCfuUfuGfc(invdt)	23
261	Chol-Cathepsin-(NHC6)-pGfcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf(invdt)	263	psdTdGfaGfuUfgGfcAfcGfcCfuUfuGfc(invdt)	7

Ejemplo 51: Estabilidad en suero *in vitro* de ARNip con conectores escindibles

Se evaluó la estabilidad del conector escindible en un ensayo de estabilidad *in vitro*. Las hebras codificantes conjugadas con colesterol se incubaron en 90 % de suero de ratón a 37 °C durante diversos momentos de tiempo. La reacción de incubación se detuvo mediante la adición de proteinasa K en un tampón que contenía dodecilsulfato de sodio (SDS). El tratamiento degrada todas las proteínas y enzimas sin interferir con la integridad de la hebra de ARN. Se inyectaron 25 µl de esta solución directamente en un sistema de AEX-HPLC conectado a un detector de UV a 260 nm. Se realizó AEX-HPLC en una columna Dionex DNA Pac200 (4 x 250 mm) a 75 °C usando un tampón Tris 20 mM que contenía 50 % de ACN a pH=8. NaBr 800 mM en eluyente B sirve de sal eluyente. Se empleó un gradiente del 25 al 62 % de B en 18 minutos.

El ARN monocatenario que contiene colesterol eluye de la columna de HPLC como un pico ancho a 260 nm. Después de la escisión del colesterol se observan picos simétricos afilados a tiempo de retención más bajo. La tasa de escisión del colesterol se determinó por la siguiente ecuación (PA = Área del pico):

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

Se mostró *in vitro* que el nucleótido protuberante de 3 nt nucleótidos (AUC) se escinde cuantitativamente en menos de 1 h en 90 % de suero de ratón. La escisión se produce 3' con respecto a los dos nucleótidos de pirimidina en el nucleótido protuberante, conduciendo a dos metabolitos de escisión distintos (las áreas de los picos de los metabolitos se resumen para la evaluación de datos). A diferencia, el conector que contiene dipéptido según la fórmula 1a, el disulfuro y el colesterol establemente unido son completamente estables en suero de ratón.

Ejemplo 52: Distribución en tejido de ARNip con conectores escindibles

Estos resultados indican que el uso de un conector escindible mejora la potencia *in vivo* de ARNip que no contiene 2'-OH-nucleótido. El conector escindible puede tanto comprender nucleótidos que contienen 2'-OH, un motivo de escisión de dipéptido como una química de conector de disulfuro. Todas las construcciones de conector escindible mejoran la potencia *in vivo* en una configuración de co-administración de un ARNip conjugado con colesterol con un polímero de administración de liberación endosómica lenta.

Brevemente, la cuantificación de ARNip se basa en la hibridación de un sonda de PNA fluorescentemente marcada (Atto-425) (Atto425-OO-GCAAAGGCGTGCCAACT, obtenida de Panagene Inc, Corea) complementaria a la hebra codificante del dúplex de ARNip, seguido de separación basada en AEX-HPLC. La cuantificación se hizo por detección de fluorescencia contra una curva de calibración externa que se generó a partir de una serie de dilución de los dos ARNip de FVII usados en el experimento *in vivo* (véase el Ejemplo 42). Para muestras de plasma entre 0,2 y 2 µl y para tejido se inyectaron alícuotas de ~ 1 mg en el sistema de HPLC.

En la Tabla 16 se muestran los resultados del análisis de tejidos de hígado. Cuando se analizó el contenido de ARNip se encontró que la hebra codificante que estaba presente en tejido de hígado se escindía cuantitativamente del colesterol si se usaba tanto el motivo de conector di-peptídico como el nucleótido protuberante de 5' de 3 nt con la secuencia de conector sin modificar AUC. A diferencia, solo el 15 % del ARNip unido al disulfuro que está presente en el hígado se escinde del colesterol en el plazo de las primeras 48 horas después de la dosis y nada del colesterol establemente unido se escinde del ARNip.

Cuando se compararon las cantidades absolutas de ARNip libre de colesterol en tejido de hígado se encontraron cantidades similares para el conector de disulfuro y para el conector de AUC de ARN, que se correlacionaban bien con actividad en suero de FVII igual 48 horas después de la dosis. La actividad de FVII más baja lograda con el colesterol-ARNip asociado a dipéptido se correlaciona completamente con la cantidad absoluta más alta del ARNip libre de colesterol escindido.

La cantidad total de conjugado de colesterol-ARNip equipado con un conector (AUC) sobre la hebra codificante administrada en el hígado es ~ 6 veces más baja en comparación con el colesterol establemente unido o unido al disulfuro y ~ 3 veces más baja en comparación con el colesterol-ARNip conjugado con dipéptido. La reducida presencia en tejido puede atribuirse al hecho de que el conector de AUC no solo es un sustrato para nucleasas intracelulares, sino también para nucleasas presentes en la circulación como se muestra en la incubación *in vitro* con suero de ratón. Cuando el ligando colesterol se escinde del ARNip ya en circulación, el ARNip resultante tiene tendencia a eliminación renal y es rápidamente eliminado en la orina sin administración en tejido.

Tabla 16:

SEQ ID NO	Secuencia de la hebra codificante (5'-3')	SEQ ID NO	Secuencia de la hebra no codificante (5'-3')	ARNip total en hígado [ng/g]	% de ligando escindido codificante en el hígado
257	Chol- pGfcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcU fcA(iinvdT)	263	psdTdGfaGfuUfgGfcAfcGfcCfuUfuGfc(iinvdT)	5837	0
259	Chol-C6SSC6- GfcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUf cA(iinvdT)	263	psdTdGfaGfuUfgGfcAfcGfcCfuUfuGfc(iinvdT)	4357	14,8
260	Chol-AUC- GfcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUf cA(iinvdT)	263	psdTdGfaGfuUfgGfcAfcGfcCfuUfuGfc(iinvdT)	912	96,1
261	Chol-Cathepsin-(NHC6)- pGfcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcU fcA(iinvdT)	263	psdTdGfaGfuUfgGfcAfcGfcCfuUfuGfc(iinvdT)	2760	99,8

Ejemplo 53: Actividad de inactivación *in vivo* de ARNip con conectores de ARN escindibles

5 Se realizó el experimento *in vivo* como se ha descrito en el Ejemplo 50 en ratones usando conjugados de colesterol-ARNip. En el Ejemplo 50, el colesterol se conectó a la hebra codificante mediante un nucleótido protuberante monocatenario que contenía 3 2'-OH-nucleótidos (AUC) en el extremo 5' (SEQ ID NO par 260/263), que mostró baja estabilidad en suero como se describe en el Ejemplo 51. Esto conduce a una concentración en tejido claramente reducida en comparación con las químicas de conector estable en suero como se describe en el Ejemplo 52. La combinación de solo uno o dos 2'-OH-nucleótidos seleccionados junto con 2'-OMe-nucleótidos dentro del conector conduce a estabilidad en suero más alta, pero mantiene la sensibilidad contra nucleasas presentes en el endosoma / lisosoma. La actividad enzimática de las nucleasas presentes en el endosoma / lisosoma se escinde selectivamente en las posiciones de los 2'-OH-nucleótidos.

15 Los ARNip conjugados con colesterol que comparan diversos motivos de conectores de nucleótidos escindibles se resumen en la Tabla 17. Todos los ARNip tienen el contexto de secuencia idéntica, solo se alteró la química de conector. El colesterol se conectó al extremo 5' de la hebra codificante mediante el nucleótido protuberante monocatenario que comprendía tres o cuatro nucleótidos al, con números variables de 2'-OH y 2'-OMe-nucleótidos. Cuando se co-administra con un polímero de administración, todos los ARNip conducen a modulación por disminución de FVII en suero en ratones. Los ARNip (SEQ ID NO par 276/282) conducen al 87 % de reducción de la actividad de FVII en suero 48 horas y 95 % a las 168 horas después de la dosis. Los ARNip (SEQ ID NO par 277/282) conducen al 79 % de reducción de la actividad de FVII en suero 48 horas y 97 % 168 horas después de la dosis. Todos los resultados se lograron por co-administración de 15 mg/kg de un polímero de administración con 2,5 mg/kg del ARNip conjugado con colesterol en ratones.

Tabla 17 Comparación *in vivo* de diversos motivos de conectores de nucleótidos para ARNip conjugados con colesterol

SEQ ID NO	Secuencia de la hebra codificante (5'-3')	SEQ ID NO	Secuencia de la hebra no codificante (5'-3')	% de actividad de FVII en suero (48 y 168 h p.d.)
276	Chol-uAu-GfcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf(invdT)	282	pdTsGfaCfuUfgGfcAfcGfcCfuUfuGfdT	13 y 5
277	Chol-uGu-GfcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf(invdT)	282	pdTsGfaCfuUfgGfcAfcGfcCfuUfuGfdT	21 y 3
278	Chol-uAuu-GfcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf(invdT)	282	pdTsGfaCfuUfgGfcAfcGfcCfuUfuGfdT	19 y 9
279	Chol-uGuu-GfcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf(invdT)	282	pdTsGfaCfuUfgGfcAfcGfcCfuUfuGfdT	20 y 6
280	Chol-uuAG-GfcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf(invdT)	282	pdTsGfaCfuUfgGfcAfcGfcCfuUfuGfdT	46 y 18
281	Chol-uAGu-GfcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf(invdT)	282	pdTsGfaCfuUfgGfcAfcGfcCfuUfuGfdT	21 y 6

Estos resultados indican que el uso de un conector de nucleótidos que es estable en suero y escindible en endosoma / lisosoma mejora además la potencia *in vivo* de ARNip en comparación con ARNip con un conector lábil en suero. Todas las construcciones de conector escindible mejoran la potencia *in vivo* en una configuración de co-administración de un ARNip conjugado con colesterol con un polímero de administración de liberación endosómica lenta.

5

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

Tabla 18: Secuencias centrales

SEQ ID NO	Secuencia de la hebra codificante (5'-3')	SEQ ID NO	Secuencia de la hebra no codificante (5'-3')
1	ACAUGAAGCAGCACGACUU	2	AAGUCGUGCUGCUUCAUGU
3	GCCCGACAACCACUACCU	4	CAGGUAGUGGUUGUCGGGC
5	CGAGAAGCGCGAUCACAUG	6	CAUGUGAUCGCGCUUCUCG
7	AUAUCAUGGCCGACAAGCA	8	UGCUUGUCGGCCAUGAUAU
9	ACAAGCUGGAGUACAACUA	10	UAGUUGUACUCCAGCUUGU
11	GCAGCUCGCCGACCACUAC	12	GUAGUGGUCGGCGAGCUGC
13	CGUCCAGGAGCGCACCAUC	14	GAUGGUGCGCUCCUGGACG
15	GCUGGAGUUCGUGACCGCC	16	GCGGUCACGAACUCCAGC
17	CCACCCUGACCUACGGCGU	18	ACGCCGUAGGUCAGGGUGG
19	CGACUUAAGGAGGACGGC	20	GCCGUCCUCCUUGAAGUCG
21	UUCAAGAUCCGCCACAACA	22	UGUUGUGGCGGAUCUUGAA
23	GGCAACUACAAGACCCGCG	24	CGCGGGUCUUGUAGUUGCC
25	CCGGCAAGCUGCCGUGGCC	26	GGCACGGGCAGCUUGCCGG
27	UGCCCAUCCUGGUCGAGCU	28	AGCUCGACCAGGAUGGGCA
29	CAAGUUCAGCGUGUCCGGC	30	GCCGGACACGCUGAACUUG
151	GGAAUCUUAUUAUUUGAUCCAA	152	UUGGAUCAAAUUAAGAUUCCCU
155	GGAUGAAGUGGAGAUUAGU	156	ACUAAUCUCCACUUCAUCC
161	GCAAAGGCGUGCCAACUCA	162	UGAGUUGGCACGCCUUUGC
161	GCAAAGGCGUGCCAACUCA	178	TGAGUUGGCACGCCUUUGC
163	GAUCAUCUCAAGUCUJAC	164	GUAAGACUUGAGAUGAUCC
171	UGACCACAGUCGGAUJAAA	172	UUUAAUCCGACUGUGGJCA
247	GUJGGUGAAUGGAGCUCAG	248	CUGAGCUCCAUUCACCAAC
249	GGUCCUGUUGUJGGUGAAU	250	AUUCACCAACAACAGGACC
256	UAUGCAAAGGCGUGCCAACUCA	178	TGAGUUGGCACGCCUUUGC
271	UGUGCAAAGGCGUGCCAACUCA	178	TGAGUUGGCACGCCUUUGC
272	UAUUGCAAAGGCGUGCCAACUCA	178	TGAGUUGGCACGCCUUUGC
273	UGUJGCAAAGGCGUGCCAACUCA	178	TGAGUUGGCACGCCUUUGC
274	UUAGGCAAAGGCGUGCCAACUCA	178	TGAGUUGGCACGCCUUUGC
275	UAGUGCAAAGGCGUGCCAACUCA	178	TGAGUUGGCACGCCUUUGC

10



Tabla 19. Mapeo de las secuencias centrales y la secuencia modificada

Secuencias centrales				Secuencias modificadas			
SEQ ID NO	Secuencia de la hebra codificante (5'-3')	SEQ ID NO	Secuencia de la hebra no codificante (5'-3')	SEQ ID NO	Secuencia de la hebra codificante (5'-3')	SEQ ID NO	Secuencia de la hebra no codificante (5'-3')
1	ACAUGAA GCAGCAC GACUU	2	AAGUCGUGCUG CUUCAUGU	31	ACAUGAAGC AGCACGACU UdTdT	32	AAGUCGU/GCUGC UUCAUGUdTdT
1	ACAUGAA GCAGCAC GACUU	2	AAGUCGUGCUG CUUCAUGU	61	AfcAfmGfaAfgC faCfcAfcGfaCfu UfdTsdT	62	paAfpUfcGfuGfcUfg CfuUfcAfuGfudTsdT
1	ACAUGAA GCAGCAC GACUU	2	AAGUCGUGCUG CUUCAUGU	91	dAcdAudGadAg dCadGcdAcdCa dCudTdTsdT	92	padAgedTcdGudGcdT gdCudTcdAudGudTs dT
1	ACAUGAA GCAGCAC GACUU	2	AAGUCGUGCUG CUUCAUGU	121	AfrcAfdTGfda AfdGcdAGfdC AfdCGfdACfdT UfdTsdT	122	pdAAfdaGfdaGfdT GfdCufdGcdTufd CAfdTGfdTsdT
3	GCCGGAC AACCACU ACCUG	4	CAGGUAGUGGU UGUCGGGC	33	GCCCGACAAAC CACUACCUGb TdT	34	CAGGUAGUGGUU GUCGGCCdTdT
3	GCCGGAC AACCACU ACCUG	4	CAGGUAGUGGU UGUCGGGC	63	GfcCfcGfaCfaAf cCfaCfuAfcCfu GfdTsdT	64	pcAfgGfuAfgUfgGfu UfgUfcGfgGfcdTsdT
3	GCCGGAC AACCACU ACCUG	4	CAGGUAGUGGU UGUCGGGC	93	dGcdCcdGadCa dAcdCadCudAc dCudGdTsdT	94	pcdAgedCudAfdTgd GudTgdTcdGgdGcd TsdT
3	GCCGGAC AACCACU ACCUG	4	CAGGUAGUGGU UGUCGGGC	123	GfdCCfdCGfdA CfdAAfdCCfdA CfdTAdfCCfdT GfdTsdT	124	pdCAfdGGfdTAdG UfdGGfdTUfdGUfd CGfdGGfdCdTsdT
5	CGAGAAG CGCGAUC ACAUG	6	CAUGUGAUCGC GCUUCUCG	35	CGAGAAGCG CGAUCACAU GdTdT	36	CAUGUGAUCGCG CUUCUCGdTdT
5	CGAGAAG CGCGAUC ACAUG	6	CAUGUGAUCGC GCUUCUCG	65	CfgAfgAfaGfcG fcCfaUfcAfcAfu GfdTsdT	66	pcAfuCfuGfaUfcCfc GfcUfuCfuCfcdTsdT
5	CGAGAAG CGCGAUC ACAUG	6	CAUGUGAUCGC GCUUCUCG	95	dCgdAgsAadGc dGcdGadTcdAc dAudGdTsdT	96	pcdAudGudGadTcd GcdGcdTudCudCgd TsdT
5	CGAGAAG CGCGAUC ACAUG	6	CAUGUGAUCGC GCUUCUCG	125	CfdGfdGfdA GfdCGfdCGfdA UfdCAfdCAfdT GfdTsdT	126	pdCAfdTfdTGfdA UfdCGfdCGfdCUfd TCfdTcdGdTsdT
7	AUAUCAU GGCGGAC AAGCA	8	UGCUUGUCGGC CAUGAUU	37	AUAUCAUGG CCGACAAGCA fdTdT	38	UGCUUGUCGGCC AUGAUAdTdT

Secuencias centrales			Secuencias modificadas				
SEQ ID NO	Secuencia de la hebra codificante (5'-3')	SEQ ID NO	Secuencia de la hebra no codificante (5'-3')	SEQ ID NO	Secuencia de la hebra no codificante (5'-3')		
7	AUAUCAU GGCGAC AAGCA	8	UGCUGUCGGC CAUGAUU	67	AfuAfuCfuUfgG fcCfcAfcAfaCfc AfdTsdT	68	puGfcUfuGfuCfcGfc CfaUfgAfuAfuTsdT
7	AUAUCAU GGCGAC AAGCA	8	UGCUGUCGGC CAUGAUU	97	dAudAudCadTg dGcdCgdAcdAa dGcdAdTsdT AfdTsdT	98	puGcdTudGudCgd GcdCadTgdAudAud TsdT
7	AUAUCAU GGCGAC AAGCA	8	UGCUGUCGGC CAUGAUU	127	AfdTsdT UfdGfdCfdA UfdGfdCfdG AfdCAfdAGfdC AfdTsdT	128	pdTGTGfdUfdTfdT CfdGGfdCCfdAUfd GAfdTfdTsdT
9	ACAAGCU GGAGUAC AACUA	10	UAGUUGUACUC CAGCUUGU	39	ACAAGCUGG AGUACAACU AdTsdT	40	UAGUUGUACUCC AGCUUUGUfdTsdT
9	ACAAGCU GGAGUAC AACUA	10	UAGUUGUACUC CAGCUUGU	69	AfcAfaGfcUfgG faGfuAfcAfaCfu AfdTsdT	70	puAfgUfuGfuAfcUfc CfaGfcUfuGfuTsdT
9	ACAAGCU GGAGUAC AACUA	10	UAGUUGUACUC CAGCUUGU	99	dAcdAudGcdTg dGadGndAcdAa dCudAdTsdT	100	puAgdTudGudAcd TcdCadGcdTudGudT sdT
9	ACAAGCU GGAGUAC AACUA	10	UAGUUGUACUC CAGCUUGU	129	AfdCAfdAGfdC UfdGGfdAGfdT AfdCAfdACfdT AfdTsdT	130	pdTfdTfdTfdTfdT AfdCUfdCCfdAGfd CUfdTfdTsdT
11	GCAGCUC GCCGACC ACUAC	12	GUAGUGGUCGG CGAGCUGC	41	GCAGCUCGCC GACCACUAc TsdT	42	GUAGUGGUCGCC GAGCUCGfdTsdT
11	GCAGCUC GCCGACC ACUAC	12	GUAGUGGUCGG CGAGCUGC	71	GfcAfgCfuCfcG fcGfaCfcAfcUfa CfdTsdT	72	pgUfaGfuGfuUfcGfg CfcAfcCfuGfdTsdT
11	GCAGCUC GCCGACC ACUAC	12	GUAGUGGUCGG CGAGCUGC	101	dCcdAgdCudCg dCcdGadCcdAc dPaadCfdTsdT	102	pgdTadGudGgdTcdG gdCgdAgdCudGcdTs dT
11	GCAGCUC GCCGACC ACUAC	12	GUAGUGGUCGG CGAGCUGC	131	GfdCAfdGfdT CfdGfdCfdA CfdCAfdCfdA CfdTsdT	132	pdGUfdAGfdTfdG UfdCGfdGfdGfdA GCfdTfdGfdCfdTsdT
13	CGUCCAG GAGCGCA CCUAC	14	GAUGGUGCGCU CCUGGACG	43	CGUCCAGGA GCCGACCAUC dTsdT	44	GAUGGUGCGCUC CUGGACGfdTsdT
13	CGUCCAG GAGCGCA CCUAC	14	GAUGGUGCGCU CCUGGACG	73	CfgUfcCfaGfgA fgCfcCfaCfcAfu CfdTsdT	74	pgAfuGfgUfgCfcCfu CfcUfcGfaCfdTsdT

Secuencias centrales				Secuencias modificadas			
SEQ ID NO	Secuencia de la hebra codificante (5'-3')	SEQ ID NO	Secuencia de la hebra no codificante (5'-3')	SEQ ID NO	Secuencia de la hebra codificante (5'-3')	SEQ ID NO	Secuencia de la hebra no codificante (5'-3')
13	CGUCCAG GAGCGCA CCAUC	14	GAUGGUGGCU CCUGGACG	103	dGgdTcdCadGg dAgdCgdCadCc dAudCdTsdT	104	pgdAudCgdTgdCgd CudCcdTgdCadCgd TsdT
13	CGUCCAG GAGCGCA CCAUC	14	GAUGGUGGCU CCUGGACG	133	CfdGUfdCCfdA GfdGfdGCCfdG CfdACfdCAfdT CfdTsdT	134	pdGAdTcdGfdUfdG CfdGfdTcdCUfdG GfdACfdfdTsdT
15	GUUGGAG UUCGUGA CCGCC	16	GGCGGUCACGA ACUCCAGC	45	GCUGAGUU CGUGACC GCC dTdT	46	GGCGGUCACGAA CUCCAGCdTdT
15	GUUGGAG UUCGUGA CCGCC	16	GGCGGUCACGA ACUCCAGC	75	GfdUfgGfdGfdU fdGfdGfdCfdGfd CfdTsdT	76	pgGfdGfdUfdAfdGfd AfdUfdCfdGfdTsdT
15	GUUGGAG UUCGUGA CCGCC	16	GGCGGUCACGA ACUCCAGC	105	dGcdTgdGadGfu dTcdGudGadCcc dGcdCdTsdT	106	pgdGcdUgdTcdAcd GadAcdTcdCadGcdT sdT
15	GUUGGAG UUCGUGA CCGCC	16	GGCGGUCACGA ACUCCAGC	135	GfdCUfdGGfdA GfdTUfdCCfdT GfdACfdCGfdC CfdTsdT	136	pdGGfdCfdGfdUfdC AfdUCfdAAfdUfd CCfdAGfdCdTsdT
15	GUUGGAG UUCGUGA CCGCC	16	GGCGGUCACGA ACUCCAGC	200	gseUfgGfdGfdU cGfdGfdCfdGfd Cfd(invdT)	213	pdGsGfdGfdUfdAfd GfdAfdUfdCfdGfdT sdT
15	GUUGGAG UUCGUGA CCGCC	16	GGCGGUCACGA ACUCCAGC	201	gcUfgGfdGfdUf cGfdGfdCfdGfd Cfd(invdT)	214	dGsGfdGfdUfdAfdGfd aAfdUfdCfdGfdTsd T
15	GUUGGAG UUCGUGA CCGCC	16	GGCGGUCACGA ACUCCAGC	202	gseUfgGfdGfdUf cGfdGfdCfdGfd CfdTsdT	213	pdGsGfdGfdUfdAfd GfdAfdUfdCfdGfdT sdT
15	GUUGGAG UUCGUGA CCGCC	16	GGCGGUCACGA ACUCCAGC	203	gcUfgGfdGfdUf cGfdGfdCfdGfd CfdTsdT	214	dGsGfdGfdUfdAfdGfd aAfdUfdCfdGfdTsd T
15	GUUGGAG UUCGUGA CCGCC	16	GGCGGUCACGA ACUCCAGC	204	GfdUfgGfdGfdU fdGfdGfdCfdGfd Cfd(invdT)	215	pGfdGfdGfdUfdAfdGfd faAfdUfdCfdGfdTsd T
15	GUUGGAG UUCGUGA CCGCC	16	GGCGGUCACGA ACUCCAGC	205	GfdUfgGfdGfdU fdGfdGfdCfdGfd Cfd(invdT)	216	GfdGfdGfdUfdAfdGfd aAfdUfdCfdGfdTsd T
15	GUUGGAG UUCGUGA CCGCC	16	GGCGGUCACGA ACUCCAGC	206	GfdUfgGfdGfdU fdGfdGfdCfdGfd CfdTsdT	215	pGfdGfdGfdUfdAfdGfd faAfdUfdCfdGfdTsd T

Secuencias centrales			Secuencias modificadas				
SEQ ID NO	Secuencia de la hebra codificante (5'-3')	SEQ ID NO	Secuencia de la hebra no codificante (5'-3')	SEQ ID NO	Secuencia de la hebra no codificante (5'-3')		
15	GCUGGAG UUCGUGA CCGCC	16	GGCGGUCACGA ACUCCAGC	200	gscUfgGfaGfuU cGfuGfaCfcGfc Cf(invdT)	217	pdGsGfcGfgUfcAfc GfaAfcUfcCfaGfc(in vdT)
15	GCUGGAG UUCGUGA CCGCC	16	GGCGGUCACGA ACUCCAGC	207	GfcUfgGfaGfuU fcCfuGfaCfcGfc CfdT(invdT)	218	pGfsGfcGfgUfcAfcG faAfcUfcCfaGfc(i nvdT)
15	GCUGGAG UUCGUGA CCGCC	16	GGCGGUCACGA ACUCCAGC	208	gscUfgGfaGfuU cGfuGfaCfcGfc CfdT(invdT)	219	pdGsGfcGfgUfcAfc GfaAfcUfcCfaGfc(i nvdT)
15	GCUGGAG UUCGUGA CCGCC	16	GGCGGUCACGA ACUCCAGC	205	GfscUfgGfaGfu UfcCfuGfaCfcG fcCf(invdT)	220	GfsGfcGfgUfcAfcGf aAfcUfcCfaGfc(invd T)
15	GCUGGAG UUCGUGA CCGCC	16	GGCGGUCACGA ACUCCAGC	201	geUfgGfaGfuUf cGfuGfaCfcGfc Cf(invdT)	221	dGsGfcGfgUfcAfcGf aAfcUfcCfaGfc(invd T)
15	GCUGGAG UUCGUGA CCGCC	16	GGCGGUCACGA ACUCCAGC	209	GfscUfgGfaGfu UfcCfuGfaCfcG fcCfdTsdT	216	GfsGfcGfgUfcAfcGf aAfcUfcCfaGfc(i nvdT)
15	GCUGGAG UUCGUGA CCGCC	16	GGCGGUCACGA ACUCCAGC	210	GfscUfgGfaGfu UfcCfuGfaCfcG fcCfdT(invdT)	222	GfsGfcGfgUfcAfcGf aAfcUfcCfaGfc(i nvdT)
15	GCUGGAG UUCGUGA CCGCC	16	GGCGGUCACGA ACUCCAGC	211	geUfgGfaGfuUf cGfuGfaCfcGfc CfdT(invdT)	223	dGsGfcGfgUfcAfcGf aAfcUfcCfaGfc(i nvdT)
15	GCUGGAG UUCGUGA CCGCC	16	GGCGGUCACGA ACUCCAGC	204	GfcUfgGfaGfuU fcCfuGfaCfcGfc Cf(invdT)	224	pGfsGfcGfgUfcAfcG faAfcUfcCfaGfc(inv dT)
15	GCUGGAG UUCGUGA CCGCC	16	GGCGGUCACGA ACUCCAGC	45	GCUGGAGU CGUGACCCGCC dTdT	46	GGCGGUCACGAA CUCCAGCfdT
15	GCUGGAG UUCGUGA CCGCC	16	GGCGGUCACGA ACUCCAGC	212	GcuGGAguucG uGAeccGccdTsd T	225	GGCGGUCACGAA CUCcAGCdTsdT
17	CCACCCU GACCUAC GGCGU	18	ACGCCGUAGGU CAGGGUGG	47	CCACCCUGAC CUACGGCCGULd TdT	48	ACGCCGUAGGU AGGGUGGdTdT
17	CCACCCU GACCUAC GGCGU	18	ACGCCGUAGGU CAGGGUGG	77	CfcAfcCfcUfgAf cCfuAfcGfcCfcG UfdTsdT	78	paCfcGfcGfuAfgGfu CfaGfgGfuGfdTsdT
17	CCACCCU GACCUAC GGCGU	18	ACGCCGUAGGU CAGGGUGG	107	dCdAcCdCdTgd AcCdAcCdGgd CgdTdTsdT	108	padCgdCdGudAgt GudCadGgdGudGgd TsdT

Secuencias centrales			Secuencias modificadas				
SEQ ID NO	Secuencia de la hebra codificante (5'-3')	SEQ ID NO	Secuencia de la hebra codificante (5'-3')	SEQ ID NO	Secuencia de la hebra codificante (5'-3')		
17	CCACCCU GACCUAC GCCGU	18	ACGCCGUAGGU CAGGGUUG	137	CfAcAfcCfC UfdGfAfdCCfdT AfdCGfdGfdG UfdTsdT	138	pdAcfdGfdGfdT AfdGGfdTCfdAGfd GGfdTGfdGfdTsdT
19	CGACUUC AAGGAGG ACGGC	20	GCCGUCCUCCU UGAAGUCG	49	CGACUCAA GGAGGACGG CdTdT	50	GCCGUCCUCCU GAAGUCGfdT
19	CGACUUC AAGGAGG ACGGC	20	GCCGUCCUCCU UGAAGUCG	79	CfGfAfdUfdCfA fGfAfdGfAfdGfG CfdTsdT	80	pgCfdGfdCfdUfdCfd UfdGfAfdGfdCfdTsdT
19	CGACUUC AAGGAGG ACGGC	20	GCCGUCCUCCU UGAAGUCG	109	dCgdAcfdTudCa dAgdGadGgdAc dGgdCdTsdT	110	PgdCfdGudCfdTsdC udTgdAadGudCfdTsd dT
19	CGACUUC AAGGAGG ACGGC	20	GCCGUCCUCCU UGAAGUCG	139	CfdGfAfdCfdT CfdAfdGfdGfdA GfdGfAfdCGfdG CfdTsdT	140	pdGfdGfdGfdTCfdC UfdCCfdTUfdGfdAfd AGfdTCfdGfdTsdT
21	UUCAGA UCCGCCA CAACA	22	UGUUGUGGCGG AUCUUGAA	51	UUCAGAUC CGCCACAACA dTdT	52	UGUUGUGGCGGA UCUUGAAAdTdT
21	UUCAGA UCCGCCA CAACA	22	UGUUGUGGCGG AUCUUGAA	81	UfuCfaAfgAfuC fcGfcCfaCfaAfc AfdTsdT	82	puCfuUfgUfgCfcCfc AfuCfuUfgAfdTsdT
21	UUCAGA UCCGCCA CAACA	22	UGUUGUGGCGG AUCUUGAA	111	dTudCadAgdAu dCfdGfdCfdCad AcfdAdTsdT	112	puTGfdTUfdGfdGcd GgdAudCfdTgdAad TsdT
21	UUCAGA UCCGCCA CAACA	22	UGUUGUGGCGG AUCUUGAA	141	UfdTCfdAAfdG AfdTCfdCGfdC CfdACfdAAfdC AfdTsdT	142	pdTGfdTUfdGfdG GfdCGfdGfdTCfdT UfdGfdAfdAdTsdT
23	GGCAACU ACAAGAC CCGCG	24	CGCGGUCUUG UAGUUGCC	53	GGCAACUAC AAGACCCGCG dTdT	54	CGCGGUCUUGU AGUUGCCdTdT
23	GGCAACU ACAAGAC CCGCG	24	CGCGGUCUUG UAGUUGCC	83	GfgCfaAfdUfaCf aAfdAfdCfdCfdGfc GfdTsdT	84	psGfdGfdGfdCfdUfdG UfaGfdUfdCfdTsdT
23	GGCAACU ACAAGAC CCGCG	24	CGCGGUCUUG UAGUUGCC	113	dCgdCadAcfdTa dCadAfdAcfdCc dGfdGfdTsdT	114	pdCfdCfdGfdGudCfd TgdTadCfdTgdCfdT sdT
23	GGCAACU ACAAGAC CCGCG	24	CGCGGUCUUG UAGUUGCC	143	GfdCfdAAfdC UfdACfdAAfdG AfdCCfdCGfdC GfdTsdT	144	pdCGfdCfdGfdGfdT CfdTUfdGfdAfdGfd TUfdGfdCfdTsdT

Secuencias centrales				Secuencias modificadas			
SEQ ID NO	Secuencia de la hebra codificante (5'-3')	SEQ ID NO	Secuencia de la hebra no codificante (5'-3')	SEQ ID NO	Secuencia de la hebra codificante (5'-3')	SEQ ID NO	Secuencia de la hebra no codificante (5'-3')
25	CCGGCAA GCUGCCC GUGCC	26	GGCACGGGCAG CUUGCCGG	55	CCGGCAAGCU GCCCGUGCCU TdT	56	GGCACGGGCAGC UUGCCGGTdT
25	CCGGCAA GCUGCCC GUGCC	26	GGCACGGGCAG CUUGCCGG	85	CfcGfcCfaAfgCf uGfcCfcGfuGfc CfdTsdT	86	pgGfcAfcGfgGfcAfg CfuUfgCfcGfadTsdT
25	CCGGCAA GCUGCCC GUGCC	26	GGCACGGGCAG CUUGCCGG	115	dCcdGgdCadAg dCudGcdCcdGu dGcdCdTsdT	116	pgdGcdAcdGgdGcd AgdCudTgdCcdGgd TsdT
25	CCGGCAA GCUGCCC GUGCC	26	GGCACGGGCAG CUUGCCGG	145	CfcCGfcaGcfaA AfdGcdTgfdC CfcCGfdTgfdC CfdTsdT	146	pdGGfdCAfdCCfdG GfdCAfdGcdTufd GCfdCGfdTsdT
27	UGCCCAU CCUGGUC GAGCU	28	AGCUCGACCAG GAUGGCA	57	UGCCCAUCCU GGUCGAGCud TdT	58	AGCUCGACCAGG AUGGGCAtdT
27	UGCCCAU CCUGGUC GAGCU	28	AGCUCGACCAG GAUGGCA	87	UfgCfcCfaUfcCf uGfgUfcGfaGfc UfdTsdT	88	paGfcUfcGfaCfcAfg GfaUfgGfgCfadTsdT
27	UGCCCAU CCUGGUC GAGCU	28	AGCUCGACCAG GAUGGCA	117	dTgdCcdCadTcd CudGgdTcdGad GcdTdTsdT	118	padGcdTcdGadCcdA gdGadTgdGgdCcdTfs dT
27	UGCCCAU CCUGGUC GAGCU	28	AGCUCGACCAG GAUGGCA	147	UfdCGfcaGfdC UfdTsdT	148	pdAGfdCUfdCCfdA CfdCAfdGGfdAUfd GGfdGcdAdTsdT
29	CAAGUUC AGCGUGU CCGGC	30	GCCGGACACGC UGAACUUG	59	CAAGUUCAG CGUGUCCGGC dTdT	60	GCCGGACACGCU GAAUUUGTdT
29	CAAGUUC AGCGUGU CCGGC	30	GCCGGACACGC UGAACUUG	89	CfaAfuCfaG fcGfuCfcGfcGfg CfdTsdT	90	pgCfcGfgAfcGfc UfgAfaCfuUfgdTsdT
29	CAAGUUC AGCGUGU CCGGC	30	GCCGGACACGC UGAACUUG	119	dCadAgdTudCa dGcdGudCudCc dGcdCdTsdT	120	pgdCcdGgdAcdAcd GcdTgdAadCudTgd TsdT
29	CAAGUUC AGCGUGU CCGGC	30	GCCGGACACGC UGAACUUG	149	CfaAfaGufdT CfdAGfdCGfdT GfaTcfcaGfdG CfdTsdT	150	pdGcdCfdGfdGfdC AfdCCfdCUfdAfd ACfdTufdGdTsdT
151	GGAUUCU UAUAUUU GAUCCAA	152	UUGGAUCAAU AUAAGAUUCCC U	153	GGAUUAuuAu AuuuGAUCsAs A	154	uuGGAUcAAuuAu AAGAuUCsesU

Secuencias centrales			Secuencias modificadas				
SEQ ID NO	Secuencia de la hebra codificante (5'-3')	SEQ ID NO	Secuencia de la hebra no codificante (5'-3')	SEQ ID NO	Secuencia de la hebra no codificante (5'-3')		
151	GGAAUCU UAUAUUU GAUCCAA	152	UUUGGAUCAAAU AUAAGAUAUCCCU U	265	Chol- pGGAAUCuuuAu AuuuGAUCCcAs A	154	uuGGAUcAAuuAu AAGAuUCCsesU
155	GGAUGAA GUGGAGA UUAGU	156	ACUAAUCUCCA CUUCAUCC	157	GGAUAGAAGuG GAGAnuAGudT sdT	158	ACuAAUCUCCACU UcAUCCdTsdT
155	GGAUGAA GUGGAGA UUAGU	156	ACUAAUCUCCA CUUCAUCC	160	(NH2C6)GfgAfu GfaAfgUfgGfaG faUfuAfgUff(inv dT)	159	pasChuAfaUfcUfcCfa CfuUfcAfuCfc(invdT )
155	GGAUGAA GUGGAGA UUAGU	156	ACUAAUCUCCA CUUCAUCC	226	gsgAfuGfaAfgU fgGfaGfaUfuAfg UfdTsdT	266	pdAsChuAfaUfcUfcC faCfuUfcAfuCfedTsd T
155	GGAUGAA GUGGAGA UUAGU	156	ACUAAUCUCCA CUUCAUCC	227	gsgAfuGfaAfgU fgGfaGfaUfuAfg Uff(invdT)	266	pdAsChuAfaUfcUfcC faCfuUfcAfuCfedTsd T
155	GGAUGAA GUGGAGA UUAGU	156	ACUAAUCUCCA CUUCAUCC	228	GfgAfuGfaAfg UfgGfaGfaUfuA fgUfdTsdT	267	pAfsChuAfaUfcUfcC faCfuUfcAfuCfedTsd T
155	GGAUGAA GUGGAGA UUAGU	156	ACUAAUCUCCA CUUCAUCC	229	GfgAfuGfaAfg UfgGfaGfaUfuA fgUfdT(invdT)	268	pAfsChuAfaUfcUfcC faCfuUfcAfuCfedT(i nvdT)
155	GGAUGAA GUGGAGA UUAGU	156	ACUAAUCUCCA CUUCAUCC	230	gsgAfuGfaAfgUf gGfaGfaUfuAfg UfdTsdT	238	dAsChuAfaUfcUfcCf aChuUfcAfuCfedTsd T
155	GGAUGAA GUGGAGA UUAGU	156	ACUAAUCUCCA CUUCAUCC	231	GfgAfuGfaAfg UfgGfaGfaUfuA fgUff(invdT)	267	pAfsChuAfaUfcUfcC faCfuUfcAfuCfedTsd T
155	GGAUGAA GUGGAGA UUAGU	156	ACUAAUCUCCA CUUCAUCC	232	gsgAfuGfaAfgUf gGfaGfaUfuAfg Uff(invdT)	238	dAsChuAfaUfcUfcCf aChuUfcAfuCfedTsd T
155	GGAUGAA GUGGAGA UUAGU	156	ACUAAUCUCCA CUUCAUCC	233	GfgAfuGfaAfgU fgGfaGfaUfuAfg UfdT(invdT)	239	AfsChuAfaUfcUfcCf aChuUfcAfuCfedT(in vdT)
155	GGAUGAA GUGGAGA UUAGU	156	ACUAAUCUCCA CUUCAUCC	234	GfgAfuGfaAfgU fgGfaGfaUfuAfg Uff(invdT)	240	AfsChuAfaUfcUfcCf aChuUfcAfuCfedTsd T
155	GGAUGAA GUGGAGA UUAGU	156	ACUAAUCUCCA CUUCAUCC	231	GfgAfuGfaAfg UfgGfaGfaUfuA fgUff(invdT)	241	pAfsChuAfaUfcUfcC faCfuUfcAfuCfc(inv dT)

Secuencias centrales			Secuencias modificadas				
SEQ ID NO	Secuencia de la hebra codificante (5'-3')	SEQ ID NO	Secuencia de la hebra codificante (5'-3')	SEQ ID NO	Secuencia de la hebra no codificante (5'-3')		
155	GGAUGAA GUGGAGA UUAGU	156	ACUAAUCUCCA CUUCAUCC	234	GfgAfuGfaAfgU fgGfaGfaUfuAfg Uf(invdT)	159	pasCfuAfaUfcCfa CfuUfcAfuCfc(invdT)
155	GGAUGAA GUGGAGA UUAGU	156	ACUAAUCUCCA CUUCAUCC	235	ggAfuGfaAfgU fgGfaGfaUfuAfg UfdT(invdT)	242	pdAsCfuAfaUfcC faCfuUfcAfuCfdT(i invdT)
155	GGAUGAA GUGGAGA UUAGU	156	ACUAAUCUCCA CUUCAUCC	236	GfgAfuGfaAfgU fgGfaGfaUfuAfg UfdTsdT	240	AfsCfuAfaUfcCf aCfuUfcAfuCfdTsd T
155	GGAUGAA GUGGAGA UUAGU	156	ACUAAUCUCCA CUUCAUCC	227	gsgAfuGfaAfgU fgGfaGfaUfuAfg Uf(invdT)	243	pdAsCfuAfaUfcC faCfuUfcAfuCfc(inv dT)
155	GGAUGAA GUGGAGA UUAGU	156	ACUAAUCUCCA CUUCAUCC	237	ggAfuGfaAfgUf gGfaGfaUfuAfg UfdT(invdT)	244	dAsCfuAfaUfcCf aCfuUfcAfuCfdT(in vdT)
155	GGAUGAA GUGGAGA UUAGU	156	ACUAAUCUCCA CUUCAUCC	232	ggAfuGfaAfgUf gGfaGfaUfuAfg Uf(invdT)	245	dAsCfuAfaUfcCf aCfuUfcAfuCfc(inv T)
155	GGAUGAA GUGGAGA UUAGU	156	ACUAAUCUCCA CUUCAUCC	234	GfgAfuGfaAfgU fgGfaGfaUfuAfg Uf(invdT)	246	AfsCfuAfaUfcCf aCfuUfcAfuCfc(inv T)
155	GGAUGAA GUGGAGA UUAGU	156	ACUAAUCUCCA CUUCAUCC	157	GGAuGAAAGuG GAGAuAAGuGsdT	158	ACuAAUCUCcACU UcAUCCdTsdT
161	GCAAAGG CGUGCCA ACUCA	162	UGAGUUGGCAC GCCUUUGC	165	(NH2C6)GfcAfa AfgGfcGfuGfc faAfcUfcAfg(inv T)	166	puGfaGfaUfgGfcAfc GfcCfuUfuGfc(inv dT)
161	GCAAAGG CGUGCCA ACUCA	162	UGAGUUGGCAC GCCUUUGC	167	(NH2C6)GcAA AGGcGuGccAA cucAdTsdT	168	UGAGUUGGcACG CCUUUGCdTsdT
161	GCAAAGG CGUGCCA ACUCA	162	UGAGUUGGCAC GCCUUUGC	179	GalNAc- (NHC6)- pGfcAfaAfgGfc GfuGfcCfaAfcU fcAfg(invdT)	166	puGfaGfaUfgGfcAfc GfcCfuUfuGfc(inv dT)
161	GCAAAGG CGUGCCA ACUCA	162	UGAGUUGGCAC GCCUUUGC	180	GalNAc- (NHC6)- pGcAAAGGcGu GccAAcucAdT's dT	168	UGAGUUGGcACG CCUUUGCdTsdT



Secuencias centrales				Secuencias modificadas			
SEQ NO	Secuencia de la hebra codificante (5'-3')	SEQ ID NO	Secuencia de la hebra no codificante (5'-3')	SEQ NO	Secuencia de la hebra codificante (5-3)	SEQ ID NO	Secuencia de la hebra no codificante (5-3)
161	GCAAAGG CGUGCCA ACUCA	162	UGAGUUGGCAC GCCUUUGC	181	GfcaAfaAfgGfcG fuGfcCfaAfcUfc Af(invdt)	185	pUfscGfaGfuUfgGfcA fcGfcCfuUfuGfc(inv dT)
161	GCAAAGG CGUGCCA ACUCA	178	TGAGUUGGCAC GCCUUUGC	181	GfcaAfaAfgGfcG fuGfcCfaAfcUfc Af(invdt)	186	psdTdGaGfuUfgGfc AfcGfcCfuUfuGfc(in vdT)
161	GCAAAGG CGUGCCA ACUCA	178	TGAGUUGGCAC GCCUUUGC	181	GfcaAfaAfgGfcG fuGfcCfaAfcUfc Af(invdt)	187	psdTsdGfaGfuUfgGfc AfcGfcCfuUfuGfc(in vdT)
161	GCAAAGG CGUGCCA ACUCA	178	TGAGUUGGCAC GCCUUUGC	181	GfcaAfaAfgGfcG fuGfcCfaAfcUfc Af(invdt)	188	pdTsdGaGfuUfgGfc AfcGfcCfuUfuGfc(in vdT)
161	GCAAAGG CGUGCCA ACUCA	178	TGAGUUGGCAC GCCUUUGC	181	GfcaAfaAfgGfcG fuGfcCfaAfcUfc Af(invdt)	189	pdTsdGfaGfuUfgGfc AfcGfcCfuUfuGfc(in vdT)
161	GCAAAGG CGUGCCA ACUCA	162	UGAGUUGGCAC GCCUUUGC	181	GfcaAfaAfgGfcG fuGfcCfaAfcUfc Af(invdt)	190	pusGfaGfuUfgGfcAf cGfcCfuUfuGfc(inv T)
161	GCAAAGG CGUGCCA ACUCA	162	UGAGUUGGCAC GCCUUUGC	181	GfcaAfaAfgGfcG fuGfcCfaAfcUfc Af(invdt)	166	puGfaGfuUfgGfcAfc GfcCfuUfuGfc(invdt )
161	GCAAAGG CGUGCCA ACUCA	162	UGAGUUGGCAC GCCUUUGC	181	GfcaAfaAfgGfcG fuGfcCfaAfcUfc Af(invdt)	191	psUfGfaGfuUfgGfcA fcGfcCfuUfuGfc(inv dT)
161	GCAAAGG CGUGCCA ACUCA	162	UGAGUUGGCAC GCCUUUGC	181	GfcaAfaAfgGfcG fuGfcCfaAfcUfc Af(invdt)	192	UfsGfaGfuUfgGfcAf cGfcCfuUfuGfc(inv T)
161	GCAAAGG CGUGCCA ACUCA	162	UGAGUUGGCAC GCCUUUGC	181	GfcaAfaAfgGfcG fuGfcCfaAfcUfc Af(invdt)	193	psUfscGfaGfuUfgGfc AfcGfcCfuUfuGfc(in vdT)
161	GCAAAGG CGUGCCA ACUCA	178	TGAGUUGGCAC GCCUUUGC	181	GfcaAfaAfgGfcG fuGfcCfaAfcUfc Af(invdt)	194	psdTsdGaGfuUfgGfc AfcGfcCfuUfuGfc(in vdT)
161	GCAAAGG CGUGCCA ACUCA	162	UGAGUUGGCAC GCCUUUGC	181	GfcaAfaAfgGfcG fuGfcCfaAfcUfc Af(invdt)	195	usGfaGfuUfgGfcAfc GfcCfuUfuGfc(invdt )
161	GCAAAGG CGUGCCA ACUCA	162	UGAGUUGGCAC GCCUUUGC	181	GfcaAfaAfgGfcG fuGfcCfaAfcUfc Af(invdt)	196	uGfaGfuUfgGfcAfc GfcCfuUfuGfc(invdt )
161	GCAAAGG CGUGCCA ACUCA	178	TGAGUUGGCAC GCCUUUGC	181	GfcaAfaAfgGfcG fuGfcCfaAfcUfc Af(invdt)	197	dTsdGfaGfuUfgGfcAf cGfcCfuUfuGfc(inv T)

Secuencias centrales			Secuencias modificadas				
SEQ ID NO	Secuencia de la hebra codificante (5'-3')	SEQ ID NO	Secuencia de la hebra codificante (5'-3')	SEQ ID NO	Secuencia de la hebra no codificante (5'-3')		
161	GCAAAGG CGUGCCA ACUCA	178	TGAGUUGGCAC GCCUUUGC	181	GfcAfaAfgGfcG fuGfcCfaAfcUfc Af(invdt)	198	psdT'GfaGfuUfgGfc AfcGfcCfuUfuGfc(in vdT)
161	GCAAAGG CGUGCCA ACUCA	178	TGAGUUGGCAC GCCUUUGC	181	GfcAfaAfgGfcG fuGfcCfaAfcUfc Af(invdt)	199	dTsdGaGfuUfgGfcA fcGfcCfuUfuGfc(inv dT)
161	GCAAAGG CGUGCCA ACUCA	162	UGAGUUGGCAC GCCUUUGC	183	Chol- Af(invdt) pGfcAfaAfgGfc GfuGfcCfaAfcU fcAf(invdt)	190	pusGfaGfuUfgGfcAf cGfcCfuUfuGfc(inv T)
161	GCAAAGG CGUGCCA ACUCA	162	UGAGUUGGCAC GCCUUUGC	181	GfcAfaAfgGfcG fuGfcCfaAfcUfc Af(invdt)	196	uGfaGfuUfgGfcAfc GfcCfuUfuGfc(invdt )
161	GCAAAGG CGUGCCA ACUCA	162	UGAGUUGGCAC GCCUUUGC	181	GfcAfaAfgGfcG fuGfcCfaAfcUfc Af(invdt)	195	usGfaGfuUfgGfcAfc GfcCfuUfuGfc(invdt )
161	GCAAAGG CGUGCCA ACUCA	162	UGAGUUGGCAC GCCUUUGC	181	GfcAfaAfgGfcG fuGfcCfaAfcUfc Af(invdt)	192	UfsGfaGfuUfgGfcAf cGfcCfuUfuGfc(inv T)
161	GCAAAGG CGUGCCA ACUCA	178	TGAGUUGGCAC GCCUUUGC	181	GfcAfaAfgGfcG fuGfcCfaAfcUfc Af(invdt)	197	dTsdGfaGfuUfgGfcAf cGfcCfuUfuGfc(inv T)
161	GCAAAGG CGUGCCA ACUCA	178	TGAGUUGGCAC GCCUUUGC	181	GfcAfaAfgGfcG fuGfcCfaAfcUfc Af(invdt)	199	dTsdGaGfuUfgGfcA fcGfcCfuUfuGfc(inv dT)
161	GCAAAGG CGUGCCA ACUCA	162	UGAGUUGGCAC GCCUUUGC	182	GcAAAGGcGu CccA.AcccAdTs dT	168	UGAGUUGGcACG CCUUUGCdTsdt
161	GCAAAGG CGUGCCA ACUCA	162	UGAGUUGGCAC GCCUUUGC	184	GfcAfaAfgGfcG fuGfcCfaAfcUfc A	168	UGAGUUGGcACG CCUUUGCdTsdt
161	GCAAAGG CGUGCCA ACUCA	162	UGAGUUGGCAC GCCUUUGC	179	GalNAc- (NHC6)- pGfcAfaAfgGfc GfuGfcCfaAfcU fcAf(invdt)	166	puGfaGfuUfgGfcAfc GfcCfuUfuGfc(inv dT)
161	GCAAAGG CGUGCCA ACUCA	162	UGAGUUGGCAC GCCUUUGC	179	GalNAc- (NHC6)- pGfcAfaAfgGfc GfuGfcCfaAfcU fcAf(invdt)	190	pusGfaGfuUfgGfcAf cGfcCfuUfuGfc(inv T)

Secuencias centrales				Secuencias modificadas			
SEQ ID NO	Secuencia de la hebra codificante (5'-3')	SEQ ID NO	Secuencia de la hebra no codificante (5'-3')	SEQ ID NO	Secuencia de la hebra codificante (5'-3')	SEQ ID NO	Secuencia de la hebra no codificante (5'-3')
161	GCAAAGG CGUGCCA ACUCA	162	UGAGUUGGCAC GCCUUUGC	179	GalNAc-(NHC6)-pGfcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf(invdT)	185	pUfsGfaGfuUfgGfcAfcGfcCfuUfuGfc(invdT)
161	GCAAAGG CGUGCCA ACUCA	178	TGAGUUGGCAC GCCUUUGC	179	GalNAc-(NHC6)-pGfcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf(invdT)	186	psdTdGfaGfuUfgGfcAfcGfcCfuUfuGfc(invdT)
161	GCAAAGG CGUGCCA ACUCA	162	UGAGUUGGCAC GCCUUUGC	179	GalNAc-(NHC6)-pGfcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf(invdT)	166	puGfaGfuUfgGfcAfcGfcCfuUfuGfc(invdT)
161	GCAAAGG CGUGCCA ACUCA	162	UGAGUUGGCAC GCCUUUGC	179	GalNAc-(NHC6)-pGfcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf(invdT)	190	pusGfaGfuUfgGfcAfcGfcCfuUfuGfc(invdT)
161	GCAAAGG CGUGCCA ACUCA	162	UGAGUUGGCAC GCCUUUGC	179	GalNAc-(NHC6)-pGfcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf(invdT)	262	pUfsGfaGfuUfgGfcAfcGfcCfuUfuGfc(invdT)
161	GCAAAGG CGUGCCA ACUCA	178	TGAGUUGGCAC GCCUUUGC	179	GalNAc-(NHC6)-pGfcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf(invdT)	263	psdTdGfaGfuUfgGfcAfcGfcCfuUfuGfc(invdT)
161	GCAAAGG CGUGCCA ACUCA	162	UGAGUUGGCAC GCCUUUGC	257	Chol-pGfcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf(invdT)	166	puGfaGfuUfgGfcAfcGfcCfuUfuGfc(invdT)
161	GCAAAGG CGUGCCA ACUCA	162	UGAGUUGGCAC GCCUUUGC	257	Chol-pGfcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf(invdT)	190	pusGfaGfuUfgGfcAfcGfcCfuUfuGfc(invdT)
161	GCAAAGG CGUGCCA ACUCA	162	UGAGUUGGCAC GCCUUUGC	257	Chol-pGfcAfaAfgGfcGfuGfcCfaAfcUfcAf(invdT)	264	pUfsGfaGfuUfgGfcAfcGfcCfuUfuGfc(invdT)

Secuencias centrales			Secuencias modificadas				
SEQ ID NO	Secuencia de la hebra codificante (5'-3')	SEQ ID NO	Secuencia de la hebra no codificante (5'-3')	SEQ ID NO	Secuencia de la hebra no codificante (5'-3')		
161	GCAAAGG CGUGCCA ACUCA	178	TGAGUUGGCAC GCCUUUGC	257	Chol- pGfcAfaAfgGfc GfuGfcCfaAfeU fcAf(invdT)	263	psdTdGfaGfuUfgGfc AfcGfcCfuUfuGfc(in vdT)
161	GCAAAGG CGUGCCA ACUCA	162	UGAGUUGGCAC GCCUUUGC	258	Chol- pGcAAAGGcGtu GccAAcucAdTs dT	168	UGAGUUGGCcACG CCUUUGCdTsdt
161	GCAAAGG CGUGCCA ACUCA	178	TGAGUUGGCAC GCCUUUGC	257	Chol- pGfcAfaAfgGfc GfuGfcCfaAfeU fcAf(invdT)	263	psdTdGfaGfuUfgGfc AfcGfcCfuUfuGfc(in vdT)
161	GCAAAGG CGUGCCA ACUCA	178	TGAGUUGGCAC GCCUUUGC	259	Chol-C6SSCG- pGfcAfaAfgGfc GfuGfcCfaAfeU fcAf(invdT)	263	psdTdGfaGfuUfgGfc AfcGfcCfuUfuGfc(in vdT)
161	GCAAAGG CGUGCCA ACUCA	178	TGAGUUGGCAC GCCUUUGC	260	Chol-AUC- pGfcAfaAfgGfc GfuGfcCfaAfeU fcAf(invdT)	263	psdTdGfaGfuUfgGfc AfcGfcCfuUfuGfc(in vdT)
161	GCAAAGG CGUGCCA ACUCA	178	TGAGUUGGCAC GCCUUUGC	261	Chol-Cathepsin- (NHC6)- pGfcAfaAfgGfc GfuGfcCfaAfeU fcAf(invdT)	263	psdTdGfaGfuUfgGfc AfcGfcCfuUfuGfc(in vdT)
161	GCAAAGG CGUGCCA ACUCA	178	TGAGUUGGCAC GCCUUUGC	257	Chol- pGfcAfaAfgGfc GfuGfcCfaAfeU fcAf(invdT)	263	psdTdGfaGfuUfgGfc AfcGfcCfuUfuGfc(in vdT)
161	GCAAAGG CGUGCCA ACUCA	178	TGAGUUGGCAC GCCUUUGC	259	Chol-C6SSCG- pGfcAfaAfgGfc GfuGfcCfaAfeU fcAf(invdT)	263	psdTdGfaGfuUfgGfc AfcGfcCfuUfuGfc(in vdT)
161	GCAAAGG CGUGCCA ACUCA	178	TGAGUUGGCAC GCCUUUGC	260	Chol-AUC- pGfcAfaAfgGfc GfuGfcCfaAfeU fcAf(invdT)	263	psdTdGfaGfuUfgGfc AfcGfcCfuUfuGfc(in vdT)
161	GCAAAGG CGUGCCA ACUCA	178	TGAGUUGGCAC GCCUUUGC	261	Chol-Cathepsin- (NHC6)- pGfcAfaAfgGfc GfuGfcCfaAfeU fcAf(invdT)	263	psdTdGfaGfuUfgGfc AfcGfcCfuUfuGfc(in vdT)

Secuencias centrales			Secuencias modificadas				
SEQ ID NO	Secuencia de la hebra codificante (5'-3')	SEQ ID NO	Secuencia de la hebra codificante (5'-3')	SEQ ID NO	Secuencia de la hebra no codificante (5'-3')		
163	GGAUCAU CUCAAGU CUUAC	164	GUUAGACUUGA GAUGAUCC	169	(NH2C6)GGAUf CfAUfCfUfCfA AGUfCfUfUfAC fAfsdT	170	GUfAAGACfUfUfG AGAUfGAUfCfCfd TsdT
171	UGACCAC AGUCGGA UUAAA	172	UUUAAUCCGAC UGUGGUCA	173	(NH2C6)UfGfAfc CfAcfAcfUfCfGfGf aUfUfAfaAf(invd T)	174	pusUfUfAfaUfCfGfAf cUfGfUfGfUfCfA(invd T)
171	UGACCAC AGUCGGA UUAAA	172	UUUAAUCCGAC UGUGGUCA	175	(NH2C6)uGAacc AcAGucGGAUuu AAAdTsdT	176	puUuAAUCCGACU GUGGucAdTsdT
171	UGACCAC AGUCGGA UUAAA	172	UUUAAUCCGAC UGUGGUCA	175	(NH2C6)uGAacc AcAGucGGAUuu AAAdTsdT	177	UUuAAUCCGACU GUGGUcAdTsdT
247	GUUGGUG AAUGGAG CUCAG	248	CUGAGCUCCAU UCACCAAC	251	(NH2C6)GfUfUfG GfUfGfAfuGfGfA fGfUfCfAcfGf(invd T)	252	pCfsUfGfAfgCfUfCfA fuUfCfAfcCfAfc(inv dT)
247	GUUGGUG AAUGGAG CUCAG	248	CUGAGCUCCAU UCACCAAC	251	(NH2C6)GfUfUfG GfUfGfAfuGfGfA fGfUfCfAcfGf(inv dT)	255	pCfsUfGfAfgCfUfCfA fuUfCfAfcCfAfcAdTsd T
249	GGUCCUG UUGUUGG UGAAU	250	AUUCACCAACA ACAGGACC	253	(NH2C6)GfGfUfC CfUfGfUfGfUfUfG fGfUfGfAfaUf(inv dT)	254	pAfsUfUfCfAcfAfc faAfcAfgCfAcfAdTsd T
256	UAUGCAA AGGCGUG CCAAACU A	178	TGAGUUGGCAC GCCUUUGC	276	Chol-uAu- GfcAfaAfgGfcG fuGfcCfaAfcUfc Af(invdT)	282	pdTsGfaGfuUfGfGfc AfcGfcCfuUfuGfcdT sdT
271	UGUGCAA AGGCGUG CCAAACU A	178	TGAGUUGGCAC GCCUUUGC	277	Chol-uGu- GfcAfaAfgGfcG fuGfcCfaAfcUfc Af(invdT)	282	pdTsGfaGfuUfGfGfc AfcGfcCfuUfuGfcdT sdT
272	UAUGCA AAGCGGU GCCAACU CA	178	TGAGUUGGCAC GCCUUUGC	278	Chol-uAuu- GfcAfaAfgGfcG fuGfcCfaAfcUfc Af(invdT)	282	pdTsGfaGfuUfGfGfc AfcGfcCfuUfuGfcdT sdT
273	UGUUGCA AAGCGGU GCCAACU CA	178	TGAGUUGGCAC GCCUUUGC	279	Chol-uGuu- GfcAfaAfgGfcG fuGfcCfaAfcUfc Af(invdT)	282	pdTsGfaGfuUfGfGfc AfcGfcCfuUfuGfcdT sdT

Secuencias centrales			Secuencias modificadas				
SEQ ID NO	Secuencia de la hebra codificante (5'-3')	SEQ ID NO	Secuencia de la hebra codificante (5'-3')	SEQ ID NO	Secuencia de la hebra no codificante (5'-3')		
274	UUAGGCA AAGCGU GCCAACU CA	178	TGAGUUGGCAC GCCUUUGC	280	Chol-uuAG- GfcAfaAfgGfcG fuGfcCfaAfcUfc Af(invdT)	282	pdTsGfaGfuUfgGfc AfcGfcCfuUfuGfcdJ sdT
275	UAGGCA AAGCGU GCCAACU CA	178	TGAGUUGGCAC GCCUUUGC	281	Chol-uuAGu- GfcAfaAfgGfcG fuGfcCfaAfcUfc Af(invdT)	282	pdTsGfaGfuUfgGfc AfcGfcCfuUfuGfcdT sdT

# ES 2 605 990 T3

<110> F. Hoffmann-La Roche AG

<120> Conjugados de molécula pequeña para la administración intracelular de ácidos nucleicos

5 <130> 27175 WO

<150> US 61/427845  
<151> 29-12-2010

10 <160> 282

<210> 1  
<211> 19  
<212> ARN  
15 <213> Secuencia artificial

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

20 <400> 1  
acaugaagca gcacgacuu 19

<210> 2  
<211> 19  
25 <212> ARN  
<213> Secuencia artificial

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

30 <400> 2  
aagucgugcu gcucaugu 19

<210> 3  
<211> 19  
35 <212> ARN  
<213> Secuencia artificial

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

40 <400> 3  
gcccgacaac cacuaccug 19

45 <210> 4  
<211> 19  
<212> ARN  
<213> Secuencia artificial

50 <220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: cadena antisentido de ARNbc

<400> 4  
55 cagguagugg uugucgggc 19

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

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

<400> 5  
65 cgagaagcgc gaucacaug 19

# ES 2 605 990 T3

5  
<210> 6  
<211> 19  
<212> ARN  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: cadena antisentido de ARNbc  
<400> 6  
caugugaucg cgcucucg 19

10  
<210> 7  
<211> 19  
<212> ARN  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: cadena sentido de ARNbc  
<400> 7  
auaucauggc cgacaagca 19

15  
<210> 8  
<211> 19  
<212> ARN  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: cadena antisentido de ARNbc  
<400> 8  
ugcuugucgg ccaugauau 19

20  
<210> 9  
<211> 19  
<212> ARN  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: cadena sentido de ARNbc  
<400> 9  
acaagcugga guacaacua 19

25  
<210> 10  
<211> 19  
<212> ARN  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: cadena antisentido de ARNbc  
<400> 10  
uaguuguacu ccagcuugu 19

30  
<210> 11  
<211> 19  
<212> ARN  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: cadena sentido de ARNbc  
<400> 11  
gcagcucgcc gaccacuac 19

35  
<210> 12  
<211> 19  
<212> ARN  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: cadena sentido de ARNbc  
<400> 12  
gacgucgccc gaccacuac 19

40  
<210> 13  
<211> 19  
<212> ARN  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: cadena sentido de ARNbc  
<400> 13  
gacgucgccc gaccacuac 19

45  
<210> 14  
<211> 19  
<212> ARN  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: cadena sentido de ARNbc  
<400> 14  
gacgucgccc gaccacuac 19

50  
<210> 15  
<211> 19  
<212> ARN  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: cadena sentido de ARNbc  
<400> 15  
gacgucgccc gaccacuac 19

55  
<210> 16  
<211> 19  
<212> ARN  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: cadena sentido de ARNbc  
<400> 16  
gacgucgccc gaccacuac 19

60  
<210> 17  
<211> 19  
<212> ARN  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: cadena sentido de ARNbc  
<400> 17  
gacgucgccc gaccacuac 19

65  
<210> 18  
<211> 19  
<212> ARN  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: cadena sentido de ARNbc  
<400> 18  
gacgucgccc gaccacuac 19



# ES 2 605 990 T3

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

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

10 <400> 12  
guaguggucg gcgagcugc 19

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

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

20 <400> 13  
cguccaggag cgcaccauc 19

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

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

30 <400> 14  
gauggugcgc uccuggacg 19

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

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

40 <400> 15  
gcuggaguuc gugaccgcc 19

45 <210> 16  
<211> 19  
<212> ARN  
<213> Secuencia artificial

50 <220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: cadena antisentido de ARNbc

55 <400> 16  
ggcggucacg aacuccagc 19

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

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

65 <400> 17  
ccaccugac cuacggcgu 19

# ES 2 605 990 T3

5  
<210> 18  
<211> 19  
<212> ARN  
<213> Secuencia artificial  
  
<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: cadena antisentido de ARNbc  
  
10  
<400> 18  
acgccguagg ucagggugg 19  
  
<210> 19  
<211> 19  
<212> ARN  
15  
<213> Secuencia artificial  
  
<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: cadena sentido de ARNbc  
  
20  
<400> 19  
cgacuucaag gaggacggc 19  
  
<210> 20  
<211> 19  
25  
<212> ARN  
<213> Secuencia artificial  
  
<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: cadena antisentido de ARNbc  
  
30  
<400> 20  
gccguccucc uugaagucg 19  
  
<210> 21  
<211> 19  
35  
<212> ARN  
<213> Secuencia artificial  
  
<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: cadena sentido de ARNbc  
  
40  
<400> 21  
uucaagaucc gccacaaca 19  
  
45  
<210> 22  
<211> 19  
<212> ARN  
<213> Secuencia artificial  
  
50  
<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: cadena antisentido de ARNbc  
  
55  
<400> 22  
uguuguggcg gaucuugaa 19  
  
<210> 23  
<211> 19  
60  
<212> ARN  
<213> Secuencia artificial  
  
<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: cadena sentido de ARNbc  
  
65  
<400> 23  
ggcaacuaca agaccgcg 19

# ES 2 605 990 T3

5  
<210> 24  
<211> 19  
<212> ARN  
<213> Secuencia artificial  
  
<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: cadena antisentido de ARNbc  
  
10  
<400> 24  
cgcgggucuu guaguugcc 19  
  
<210> 25  
<211> 19  
<212> ARN  
15  
<213> Secuencia artificial  
  
<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: cadena sentido de ARNbc  
  
20  
<400> 25  
ccggcaagcu gcccgugcc 19  
  
<210> 26  
<211> 19  
25  
<212> ARN  
<213> Secuencia artificial  
  
<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: cadena antisentido de ARNbc  
  
30  
<400> 26  
ggcacgggca gcuugccgg 19  
  
<210> 27  
<211> 19  
35  
<212> ARN  
<213> Secuencia artificial  
  
<220>  
40  
<223> Descripción de la secuencia artificial: cadena sentido de ARNbc  
  
<400> 27  
ugcccauccu ggucgagcu 19  
  
45  
<210> 28  
<211> 19  
<212> ARN  
<213> Secuencia artificial  
  
50  
<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: cadena antisentido de ARNbc  
  
<400> 28  
55  
agcucgacca ggaugggca 19  
  
<210> 29  
<211> 19  
<212> ARN  
60  
<213> Secuencia artificial  
  
<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: cadena sentido de ARNbc  
  
65  
<400> 29  
caaguucagc guguccggc 19

# ES 2 605 990 T3

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

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

10  
<400> 30  
gccggacacg cugaacuug 19

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

<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: cadena sentido 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 = "nucleósido correspondiente a 2'-hidroxi"

30  
<400> 31  
acaugaagca gcacgacuut t 21

35  
<210> 32  
<211> 21  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: cadena antisentido 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 = "nucleósido correspondiente a 2'-hidroxi"

50  
<400> 32  
aagucgugcu gcuucaugut t 21

55  
<210> 33  
<211> 21  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

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

60  
<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 = "nucleósido correspondiente a 2'-hidroxi"  
 5  
 <400> 33  
 gcccgacaac cacuaccugt t 21  
 <210> 34  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 10  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena antisentido 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 = "nucleósido correspondiente a 2'-hidroxi"  
 25  
 <400> 34  
 cagguagugg uugucgggct t 21  
 <210> 35  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 30  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena sentido 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 = "nucleósido correspondiente a 2'-hidroxi"  
 45  
 <400> 35  
 cgagaagcgc gaucacaugt t 21  
 <210> 36  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 50  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena antisentido 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  
 65

<223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-hidroxi"  
 <400> 36  
 5 caugugaucg cgcuucucgt t 21  
 <210> 37  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 10 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena sentido de ARNbc  
 <220>  
 15 <221> base\_modificada  
 <222> 1  
 <223> /mod\_base = "nucleósido: carece de grupo 5'-fosfato"  
 <220>  
 20 <221> base\_modificada  
 <222> 1..19  
 <223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-hidroxi"  
 <400> 37  
 25 auaucauggc cgacaagcat t 21  
 <210> 38  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 30 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena antisentido de ARNbc  
 <220>  
 35 <221> base\_modificada  
 <222> 1  
 <223> /mod\_base = "nucleósido: carece de grupo 5'-fosfato"  
 <220>  
 40 <221> base\_modificada  
 <222> 1..19  
 <223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-hidroxi"  
 <400> 38  
 45 ugcuugucgg ccaugauaut t 21  
 <210> 39  
 <211> 21  
 50 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 55 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena sentido de ARNbc  
 <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 = "nucleósido correspondiente a 2'-hidroxi"  
 65 <400> 39

## ES 2 605 990 T3

5      acaagcugga guacaacuat t      21  
       <210> 40  
       <211> 21  
       <212> ADN  
       <213> Secuencia artificial  
       <220>  
 10      <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena antisentido de ARNbc  
       <220>  
       <221> base\_modificada  
       <222> 1  
 15      <223> /mod\_base = "nucleósido: carece de grupo 5'-fosfato"  
       <220>  
       <221> base\_modificada  
       <222> 1..19  
 20      <223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-hidroxi"  
       <400> 40  
       uaguuguacu ccagcuugut t      21  
       <210> 41  
 25      <211> 21  
       <212> ADN  
       <213> Secuencia artificial  
       <220>  
 30      <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena sentido de ARNbc  
       <220>  
       <221> base\_modificada  
       <222> 1  
 35      <223> /mod\_base = "nucleósido: carece de grupo 5'-fosfato"  
       <220>  
       <221> base\_modificada  
       <222> 1..19  
 40      <223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-hidroxi"  
       <400> 41  
       gcagcuggcc gaccacuact t      21  
       <210> 42  
 45      <211> 21  
       <212> ADN  
       <213> Secuencia artificial  
       <220>  
 50      <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena antisentido de ARNbc  
       <220>  
       <221> base\_modificada  
       <222> 1  
 55      <223> /mod\_base = "nucleósido: carece de grupo 5'-fosfato"  
       <220>  
       <221> base\_modificada  
       <222> 1..19  
 60      <223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-hidroxi"  
       <400> 42  
       guaguggucg gcgagcugct t      21  
 65      <210> 43

# ES 2 605 990 T3

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

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

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

<220>  
<221> base\_modificada  
15 <222> 1..19  
<223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-hidroxi"

<400> 43  
20 cguccaggag cgcaccauct t 21

<210> 44  
<211> 21  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

25 <220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: cadena antisentido de ARNbc

<220>  
<221> base\_modificada  
30 <222> 1  
<223> /mod\_base = "nucleósido: carece de grupo 5'-fosfato"

<220>  
<221> base\_modificada  
35 <222> 1..19  
<223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-hidroxi"

<400> 44  
40 gauggugcgc uccuggacgt t 21

<210> 45  
<211> 21  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

45 <220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: cadena sentido 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 = "nucleósido correspondiente a 2'-hidroxi"

<400> 45  
60 gcuggaguuc gugaccgct t 21

<210> 46  
<211> 21  
<212> ADN  
65 <213> Secuencia artificial



## ES 2 605 990 T3

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

5 <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 = "nucleósido correspondiente a 2'-hidroxi"

15 <400> 46  
ggcggucacg aacuccagct t 21

20 <210> 47  
<211> 21  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: cadena sentido 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 = "nucleósido correspondiente a 2'-hidroxi"

35 <400> 47  
ccaccugac cuacggcgut t 21

40 <210> 48  
<211> 21  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: cadena antisentido 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 = "nucleósido correspondiente a 2'-hidroxi"

55 <400> 48  
acgccguagg ucagggugt t 21

60 <210> 49  
<211> 21  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

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

5  
 <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 = "nucleósido correspondiente a 2'-hidroxi"

15  
 <400> 49  
 cgacuucaag gaggacggct t 21

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

25  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena antisentido de ARNbc

30  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1  
 <223> /mod\_base = "nucleósido: carece de grupo 5'-fosfato"

35  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1..19  
 <223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-hidroxi"

40  
 <400> 50  
 gccguccucc uugaagucgt t 21

45  
 <210> 51  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

50  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena sentido 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 = "nucleósido correspondiente a 2'-hidroxi"

65  
 <400> 51  
 uucaagaucc gccacaacat t 21

70  
 <210> 52  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

75  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena antisentido de ARNbc

80  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1

<223> /mod\_base = "nucleósido: carece de grupo 5'-fosfato"  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 5 <222> 1..19  
 <223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-hidroxi"  
 <400> 52  
 10 uguuguggcg gaucuugaat t 21  
 <210> 53  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 15 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena sentido de ARNbc  
 <220>  
 20 <221> base\_modificada  
 <222> 1  
 <223> /mod\_base = "nucleósido: carece de grupo 5'-fosfato"  
 <220>  
 25 <221> base\_modificada  
 <222> 1..19  
 <223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-hidroxi"  
 <400> 53  
 30 ggcaacuaca agaccgcgct t 21  
 <210> 54  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 35 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena antisentido de ARNbc  
 <220>  
 40 <221> base\_modificada  
 <222> 1  
 <223> /mod\_base = "nucleósido: carece de grupo 5'-fosfato"  
 <220>  
 45 <221> base\_modificada  
 <222> 1..19  
 <223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-hidroxi"  
 <400> 54  
 50 cgcgguuuu guaguugcct t 21  
 <210> 55  
 <211> 21  
 55 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena sentido de ARNbc  
 60 <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 = "nucleósido correspondiente a 2'-hidroxi"

5

<400> 55  
 ccggcaagcu gcccgugcct t 21

<210> 56  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena antisentido 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 = "nucleósido correspondiente a 2'-hidroxi"

25

<400> 56  
 ggcacgggca gcuugccggt t 21

30

<210> 57  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

35

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

<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 = "nucleósido correspondiente a 2'-hidroxi"

45

<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 antisentido de ARNbc

<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 = "nucleósido correspondiente a 2'-hidroxi"

65

ES 2 605 990 T3

<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 sentido 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 = "nucleósido correspondiente a 2'-hidroxi"

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 antisentido 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 = "nucleósido correspondiente a 2'-hidroxi"

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 sentido 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 = "nucleósido correspondiente a 2'-O-etilo"

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

<223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-desoxi-2'-fluoro"  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 5 <222> 21  
 <223> /mod\_base = "5'-fosforotioato timidina"  
 <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 antisentido de ARNbc  
 <220>  
 20 <221> base\_modificada  
 <222> 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19  
 <223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-O-metilo"  
 <220>  
 25 <221> base\_modificada  
 <222> 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-desoxi-2'-fluoro"  
 <220>  
 30 <221> base\_modificada  
 <222> 21  
 <223> /mod\_base = "5'-fosforotioato timidina"  
 <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 sentido 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 = "nucleósido correspondiente a 2'-O-metilo"  
 55 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19  
 <223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-desoxi-2'-fluoro"  
 60 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 21  
 <223> /mod\_base = "5'-fosforotioato timidina"  
 65 <400> 63  
 gcccgacaac cacuaccugt t 21

5  
 <210> 64  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

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

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

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

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

25  
 <400> 64  
 cagguagugg uugucgggct t 21

30  
 <210> 65  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena sentido 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 = "nucleósido correspondiente a 2'-O-metilo"

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

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

55  
 <400> 65  
 cgagaagcgc gaucacaugt t 21

60  
 <210> 66  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

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

65  
 <220>

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

5

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

10

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

15

<400> 66  
 caugugaucg cgcuucucgt t 21

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

20

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena sentido 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 = "nucleósido correspondiente a 2'-O-metilo"

35

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

40

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

45

<400> 67  
 auaucauggc cgacaagcat t 21

50

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

55

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

60

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

65

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



ES 2 605 990 T3

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 21  
 <223> /mod\_base = "5'-fosforotioato timidina"  
 5  
 <400> 68  
 ugcuugucgg ccaugauaut t 21  
 <210> 69  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 10  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena sentido 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 = "nucleósido correspondiente a 2'-O-metilo"  
 25  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19  
 <223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-desoxi-2'-fluoro"  
 30  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 21  
 <223> /mod\_base = "5'-fosforotioato timidina"  
 35  
 <400> 69  
 acaagcugga guacaacuat t 21  
 <210> 70  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 40  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena antisentido de ARNbc  
 45  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19  
 <223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-O-metilo"  
 50  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-desoxi-2'-fluoro"  
 55  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 21  
 <223> /mod\_base = "5'-fosforotioato timidina"  
 60  
 <400> 70  
 uaguuguacu ccagcuugut t 21  
 <210> 71  
 65

ES 2 605 990 T3

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

5

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena sentido 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 = "nucleósido correspondiente a 2'-O-etilo"

15

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

20

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

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 antisentido de ARNbc

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

40

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

45

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

50

<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 sentido de ARNbc

65

<220>  
 <221> base\_modificada

## ES 2 605 990 T3

<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 = "nucleósido correspondiente a 2'-O-metilo"

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

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

20  
<400> 73  
cguccaggag cgcaccauct t 21

<210> 74  
<211> 21  
<212> ADN  
25 <213> Secuencia artificial

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

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

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

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

45  
<400> 74  
gauggugcgc uccuggacgt t 21

<210> 75  
<211> 21  
50 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: cadena sentido 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 = "nucleósido correspondiente a 2'-O-metilo"

65  
<220>

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

5

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

10

<400> 75  
 gcuggaguuc gugaccgct t 21

<210> 76  
 <211> 21

15

<212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

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

20

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

25

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

30

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

35

<400> 76  
 ggcggucacg aacuccagct t 21

40

<210> 77  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena sentido 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 = "nucleósido correspondiente a 2'-O-metilo"

55

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

60

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

65

## ES 2 605 990 T3

<400> 77  
 ccaccugac cuacggcgt t                    21

5        <210> 78  
          <211> 21  
          <212> ADN  
          <213> Secuencia artificial

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

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

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

25       <220>  
          <221> base\_modificada  
          <222> 21  
          <223> /mod\_base = "5'-fosforotioato timidina"

30       <400> 78  
          acgccguagg ucagggugt t            21

35       <210> 79  
          <211> 21  
          <212> ADN  
          <213> Secuencia artificial

40       <220>  
          <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena sentido 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 = "nucleósido correspondiente a 2'-O-metilo"

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

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

65       <400> 79  
          cgacucaag gaggacggt t            21

70       <210> 80  
          <211> 21  
          <212> ADN  
          <213> Secuencia artificial

75       <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: cadena antisentido de ARNbc  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 5 <222> 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19  
 <223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-O-metilo"  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 10 <222> 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-desoxi-2'-fluoro"  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 15 <222> 21  
 <223> /mod\_base = "5'-fosforotioato timidina"  
 <400> 80  
 20 gccguccucc uugaagucgt t 21  
 <210> 81  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 25 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena sentido 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 = "nucleósido correspondiente a 2'-O-metilo"  
 <220>  
 40 <221> base\_modificada  
 <222> 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19  
 <223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-desoxi-2'-fluoro"  
 <220>  
 45 <221> base\_modificada  
 <222> 21  
 <223> /mod\_base = "5'-fosforotioato timidina"  
 <400> 81  
 50 uucaagaucc gccacaacat t 21  
 <210> 82  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 55 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena antisentido de ARNbc  
 60 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19  
 <223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-O-metilo"  
 65 <220>  
 <221> base\_modificada

## ES 2 605 990 T3

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

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

10  
 <400> 82  
 uguuguggcg gaucuugaat t      21

15  
 <210> 83  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

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

20  
 <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 = "nucleósido correspondiente a 2'-O-metilo"

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

35  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 21  
 <223> /mod\_base = "5'-fosforotioato timidina"

40  
 <400> 83  
 ggcaacuaca agaccgcgt t      21

45  
 <210> 84  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

50  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena antisentido de ARNbc

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

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

65  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 21  
 <223> /mod\_base = "5'-fosforotioato timidina"

<400> 84

## ES 2 605 990 T3

cgcgggucuu guaguugcct t      21

<210> 85  
<211> 21  
5 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial

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

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

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

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

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

<400> 85  
ccggcaagcu gcccgucct t      21

<210> 86  
35 <211> 21  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

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

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

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

<220>  
<221> base\_modificada  
<222> 21  
55 <223> /mod\_base = "5'-fosforotioato timidina"

<400> 86  
ggcacgggca gcuugccgt t      21

<210> 87  
60 <211> 21  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
65 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena sentido 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 = "nucleósido correspondiente a 2'-O-metilo"

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

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

25  
 <400> 87  
 ugcccauccu ggucgagcut t 21

30  
 <210> 88  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

35  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena antisentido de ARNbc

40  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19  
 <223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-O-metilo"

45  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-desoxi-2'-fluoro"

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

55  
 <400> 88  
 agcucgacca ggaugggcat t 21

60  
 <210> 89  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

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

70  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1  
 <223> /mod\_base = "nucleósido: carece de grupo 5'-fosfato"

75  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-O-metilo"

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

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

15  
 <400> 89  
 caaguucagc guguccggt t 21

20  
 <210> 90  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

25  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena antisentido de ARNbc

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

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

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

45  
 <400> 90  
 gccggacacg cugaacuugt t 21

50  
 <210> 91  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

55  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena sentido de ARNbc

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 = "nucleósido correspondiente a 2'-O-metilo"

70  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17  
 <223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-desoxi"

75  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 21  
 <223> /mod\_base = "5'-fosforotioato timidina"

ES 2 605 990 T3

<400> 91  
 acaugaagca gcaagacutt t 21

5 <210> 92  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

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

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

20 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 2, 6, 8, 12, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-desoxi"

25 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 21  
 <223> /mod\_base = "5'-fosforotioato timidina"

<400> 92  
 aagtcgugct gcutcaugt t 21

30 <210> 93  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

35 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena sentido 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 = "nucleósido correspondiente a 2'-O-metilo"

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

55 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 21  
 <223> /mod\_base = "5'-fosforotioato timidina"

<400> 93  
 gcccgacaac cacuaccugt t 21

60 <210> 94  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

65 <220>

## ES 2 605 990 T3

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

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

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

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

<400> 94  
20 cagguagtgg utgtcgggct t 21

<210> 95  
<211> 21  
<212> ADN  
25 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: cadena sentido 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 = "nucleósido correspondiente a 2'-O-metilo"

<220>  
40 <221> base\_modificada  
<222> 1, 3, 5, 7, 9, 11, 15, 17, 19  
<223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-desoxi"

<220>  
45 <221> base\_modificada  
<222> 21  
<223> /mod\_base = "5'-fosforotioato timidina"

<400> 95  
50 cgagaagcgc gatcacaugt t 21

<210> 96  
<211> 21  
<212> ADN  
55 <213> Secuencia artificial

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

<220>  
60 <221> base\_modificada  
<222> 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19  
<223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-O-metilo"

<220>  
65 <221> base\_modificada

<222> 2, 4, 6, 10, 12, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-desoxi"  
  
 5 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 21  
 <223> /mod\_base = "5'-fosforotioato timidina"  
  
 10 <400> 96  
 caugugatcg cgctucucgt t 21  
  
 <210> 97  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 15 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena sentido de ARNbc  
  
 20 <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 = "nucleósido correspondiente a 2'-O-metilo"  
  
 30 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1, 3, 5, 9, 11, 13, 15, 17, 19  
 <223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-desoxi"  
  
 35 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 21  
 <223> /mod\_base = "5'-fosforotioato timidina"  
  
 40 <400> 97  
 auaucatggc cgacaagcat t 21  
  
 <210> 98  
 <211> 21  
 45 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena antisentido de ARNbc  
  
 50 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19  
 <223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-O-metilo"  
  
 55 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 2, 6, 8, 10, 12, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-desoxi"  
  
 60 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 21  
 <223> /mod\_base = "5'-fosforotioato timidina"  
  
 65 <400> 98

ES 2 605 990 T3

ugctugucgg ccatgauaut t 21

5 <210> 99  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena sentido 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 = "nucleósido correspondiente a 2'-O-metilo"

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

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

<400> 99  
 acaagctgga guacaacuat t 21

35 <210> 100  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

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

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

50 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 2, 6, 8, 12, 14, 18  
 <223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-desoxi"

55 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 21  
 <223> /mod\_base = "5'-fosforotioato timidina"

<400> 100  
 uagtuguact ccagctugut t 21

60 <210> 101  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

65 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena sentido 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 = "nucleósido correspondiente a 2'-O-metilo"

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

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

25  
 <400> 101  
 gcagcugcc gaccactact t 21

30  
 <210> 102  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

35  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena antisentido de ARNbc

40  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19  
 <223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-O-metilo"

45  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 4, 6, 10, 12, 14, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-desoxi"

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

55  
 <400> 102  
 gtaguggtcg gcgagcugct t 21

60  
 <210> 103  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

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

70  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1  
 <223> /mod\_base = "nucleósido: carece de grupo 5'-fosfato"

75  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-O-metilo"

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

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

15  
 <400> 103  
 cgtccaggag cgcaccauct t 21

20  
 <210> 104  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

25  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena antisentido de ARNbc

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

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

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

45  
 <400> 104  
 gauggtgctgc ucctggacgt t 21

50  
 <210> 105  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

55  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena sentido de ARNbc

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 = "nucleósido correspondiente a 2'-O-metilo"

70  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1, 5, 7, 11, 13, 15, 17, 19  
 <223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-desoxi"

75  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 21  
 <223> /mod\_base = "5'-fosforotioato timidina"



## ES 2 605 990 T3

<400> 105  
 gctggagutc gugaccgcct t 21

5 <210> 106  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

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

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

20 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 2, 4, 8, 10, 12, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-desoxi"

25 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 21  
 <223> /mod\_base = "5'-fosforotioato timidina"

<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 sentido 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 = "nucleósido correspondiente a 2'-O-metilo"

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

55 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 21  
 <223> /mod\_base = "5'-fosforotioato timidina"

<400> 107  
 ccaccctgac cuacggcggt t 21

60 <210> 108  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

65 <220>

## ES 2 605 990 T3

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

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

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

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

<400> 108  
20 acgccguagg ucagggugt t 21

<210> 109  
<211> 21  
<212> ADN  
25 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: cadena sentido 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 = "nucleósido correspondiente a 2'-O-metilo"

<220>  
40 <221> base\_modificada  
<222> 1, 3, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19  
<223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-desoxi"

<220>  
45 <221> base\_modificada  
<222> 21  
<223> /mod\_base = "5'-fosforotioato timidina"

<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 antisentido de ARNbc

<220>  
60 <221> base\_modificada  
<222> 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19  
<223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-O-metilo"

<220>  
65 <221> base\_modificada

<222> 2, 4, 6, 10, 14, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-desoxi"  
  
 5 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 21  
 <223> /mod\_base = "5'-fosforotioato timidina"  
  
 10 <400> 110  
 gccgucctcc utgaagucgt t 21  
  
 <210> 111  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 15 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena sentido de ARNbc  
  
 20 <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 = "nucleósido correspondiente a 2'-O-metilo"  
  
 30 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19  
 <223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-desoxi"  
  
 35 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 21  
 <223> /mod\_base = "5'-fosforotioato timidina"  
  
 40 <400> 111  
 tucaagaucc gccacaacat t 21  
  
 <210> 112  
 <211> 21  
 45 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena antisentido de ARNbc  
  
 50 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19  
 <223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-O-metilo"  
  
 55 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 2, 8, 10, 12, 14, 18  
 <223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-desoxi"  
  
 60 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 21  
 <223> /mod\_base = "5'-fosforotioato timidina"  
  
 65 <400> 112

ES 2 605 990 T3

5 ugutgtggcg gaucutgaat t 21  
 <210> 113  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena sentido de ARNbc  
 10 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1  
 <223> /mod\_base = "nucleósido: carece de grupo 5'-fosfato"  
 15 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-O-metilo"  
 20 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1, 3, 5, 9, 11, 13, 15, 17, 19  
 <223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-desoxi"  
 25 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 21  
 <223> /mod\_base = "5'-fosforotioato timidina"  
 30 <400> 113  
 ggcaactaca agaccgcgt t 21  
 35 <210> 114  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 40 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena antisentido de ARNbc  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19  
 45 <223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-O-metilo"  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 2, 4, 6, 8, 14, 18  
 50 <223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-desoxi"  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 21  
 55 <223> /mod\_base = "5'-fosforotioato timidina"  
 <400> 114  
 cgcgggucut gtagutgcct t 21  
 60 <210> 115  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 65 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena sentido 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 = "nucleósido correspondiente a 2'-O-metilo"

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

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

25  
 <400> 115  
 ccggcaagcu gcccgucct t 21

30  
 <210> 116  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

35  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena antisentido de ARNbc

40  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19  
 <223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-O-metilo"

45  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 2, 4, 6, 8, 10, 12, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-desoxi"

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

55  
 <400> 116  
 ggcacgggca gcutgccggt t 21

60  
 <210> 117  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

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

70  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1  
 <223> /mod\_base = "nucleósido: carece de grupo 5'-fosfato"

75  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-O-metilo"

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

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

15  
 <400> 117  
 tgcccatccu ggtcgagctt t 21

20  
 <210> 118  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

25  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena antisentido de ARNbc

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

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

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

45  
 <400> 118  
 agctcgacca ggatgggcat t 21

50  
 <210> 119  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

55  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena sentido de ARNbc

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 = "nucleósido correspondiente a 2'-O-metilo"

70  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1, 3, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19  
 <223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-desoxi"

75  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 21  
 <223> /mod\_base = "5'-fosforotioato timidina"

## ES 2 605 990 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 antisentido de ARNbc

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

20  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 2, 4, 6, 8, 10, 14, 16  
 <223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-desoxi"

25  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 21  
 <223> /mod\_base = "5'-fosforotioato timidina"

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 sentido 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 = "nucleósido correspondiente a 2'-desoxi"

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

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

65  
 <400> 121  
 acatgaagca gcacgactut t 21

<210> 122  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>

## ES 2 605 990 T3

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

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

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

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

<400> 122  
20 aagucgtgcu gctucagt t 21

<210> 123  
<211> 21  
<212> ADN  
25 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: cadena sentido 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, 16  
<223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-desoxi"

<220>  
40 <221> base\_modificada  
<222> 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19  
<223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-desoxi-2'-fluoro"

<220>  
45 <221> base\_modificada  
<222> 21  
<223> /mod\_base = "5'-fosforotioato timidina"

<400> 123  
50 gcccgacaac cactacctgt t 21

<210> 124  
<211> 21  
<212> ADN  
55 <213> Secuencia artificial

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

<220>  
60 <221> base\_modificada  
<222> 1, 3, 7, 9, 13, 15, 17, 19  
<223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-desoxi"

<220>  
65 <221> base\_modificada



## ES 2 605 990 T3

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

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

10  
 <400> 124  
 caggttagugg tugucgggct t                      21

<210> 125  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 15 <213> Secuencia artificial

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

20  
 <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  
 <223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-desoxi"

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

35  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 21  
 <223> /mod\_base = "5'-fosforotioato timidina"

40  
 <400> 125  
 cgagaagcgc gaucacatgt t                      21

<210> 126  
 <211> 21  
 45 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

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

50  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1, 7, 9, 11, 13, 19  
 <223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-desoxi"

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

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

65  
 <400> 126

ES 2 605 990 T3

catgtgaucg cgcutctcgt t 21

5 <210> 127  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

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

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

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

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

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

<400> 127  
 atatcauggc cgacaagcat t 21

35 <210> 128  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

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

45 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 3, 9, 11, 13, 15  
 <223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-desoxi"

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

55 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 21  
 <223> /mod\_base = "5'-fosforotioato timidina"

<400> 128  
 tgcutgtcgg ccaugatatt t 21

60 <210> 129  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

65 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena sentido 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, 14, 16  
 <223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-desoxi"

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

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

25  
 <400> 129  
 acaagcugga gtacaactat t 21

30  
 <210> 130  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

35  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena antisentido de ARNbc

40  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 3, 9, 11, 13, 15  
 <223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-desoxi"

45  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-desoxi-2'-fluoro"

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

55  
 <400> 130  
 tagutgtacu ccagcutgtt t 21

60  
 <210> 131  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

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

70  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1  
 <223> /mod\_base = "nucleósido: carece de grupo 5'-fosfato"

75  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 2, 4, 8, 10, 12, 14, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-desoxi"

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

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

15  
 <400> 131  
 gcagctgcc gaccacuact t 21

20  
 <210> 132  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

25  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena antisentido de ARNbc

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

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

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

45  
 <400> 132  
 guagtggucg gcgagctgct t 21

50  
 <210> 133  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

55  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena sentido de ARNbc

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

70  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19  
 <223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-desoxi-2'-fluoro"

75  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 21  
 <223> /mod\_base = "5'-fosforotioato timidina"

## ES 2 605 990 T3

<400> 133  
 cguccaggag cgcacatct t 21

5  
 <210> 134  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

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

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

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

25  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 21  
 <223> /mod\_base = "5'-fosforotioato timidina"

30  
 <400> 134  
 gatggugcgc tccuggacgt t 21

35  
 <210> 135  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

40  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena sentido 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, 10, 14, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-desoxi"

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

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

65  
 <400> 135  
 gcuggagtuc gtgaccgcct t 21

<210> 136  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>

## ES 2 605 990 T3

<233> Descripción de la secuencia artificial: cadena antisentido de ARNbc

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

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

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

<400> 136  
20 ggcggucacg aacuccagct t 21

<210> 137  
<211> 21  
<212> ADN  
25 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: cadena sentido 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, 14, 16, 18  
<223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-desoxi"

<220>  
40 <221> base\_modificada  
<222> 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19  
<223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-desoxi-2'-fluoro"

<220>  
45 <221> base\_modificada  
<222> 21  
<223> /mod\_base = "5'-fosforotioato timidina"

<400> 137  
50 ccaccugac ctacggcgut t 21

<210> 138  
<211> 21  
<212> ADN  
55 <213> Secuencia artificial

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

<220>  
60 <221> base\_modificada  
<222> 1, 3, 5, 9, 13, 15, 19  
<223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-desoxi"

<220>  
65 <221> base\_modificada

## ES 2 605 990 T3

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

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

10  
 <400> 138  
 acgccgtagg tcagggtggt t 21

15  
 <210> 139  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

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

20  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1  
 <223> /mod\_base = "nucleósido: carece de grupo 5'-fosfato"

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

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

35  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 21  
 <223> /mod\_base = "5'-fosforotioato timidina"

40  
 <400> 139  
 cgacutcaag gaggacggct t 21

45  
 <210> 140  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

50  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena antisentido de ARNbc

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

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

65  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 21  
 <223> /mod\_base = "5'-fosforotioato timidina"

<400> 140

ES 2 605 990 T3

gccgtccucc tugaagtcgt t 21

5 <210> 141  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

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

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

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

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

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

<400> 141  
 utcaagatcc gccacaacat t 21

35 <210> 142  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

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

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

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

55 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 21  
 <223> /mod\_base = "5'-fosforotioato timidina"

<400> 142  
 tgtugggcg gatctugaat t 21

60 <210> 143  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

65 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena sentido 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 = "nucleósido correspondiente a 2'-desoxi"

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

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

25  
 <400> 143  
 ggcaacuaca agacccgcgt t 21

30  
 <210> 144  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

35  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena antisentido de ARNbc

40  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1, 3, 5, 11, 13, 17, 19  
 <223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-desoxi"

45  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-desoxi-2'-fluoro"

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

55  
 <400> 144  
 cgcggtctt guagtugcct t 21

60  
 <210> 145  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

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

70  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1  
 <223> /mod\_base = "nucleósido: carece de grupo 5'-fosfato"

75  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 2, 4, 6, 8, 12, 14, 18  
 <223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-desoxi"

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

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

15  
 <400> 145  
 ccggcaagct gcccgctgcct t 21

20  
 <210> 146  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

25  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena antisentido de ARNbc

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

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

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

45  
 <400> 146  
 ggcacgggca gctugccggt t 21

50  
 <210> 147  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

55  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena sentido de ARNbc

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, 12, 14, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-desoxi"

70  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19  
 <223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-desoxi-2'-fluoro"

75  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 21  
 <223> /mod\_base = "5'-fosforotioato timidina"

ES 2 605 990 T3

<400> 147  
 ugcccaucct ggucgagcut t 21

5  
 <210> 148  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

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

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

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

25  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 21  
 <223> /mod\_base = "5'-fosforotioato timidina"

30  
 <400> 148  
 agcucgacca ggaugggcat t 21

35  
 <210> 149  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

40  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena sentido 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, 8, 10, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-desoxi"

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

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

65  
 <400> 149  
 caagutcagc ggtccggct t 21

<210> 150  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>

## ES 2 605 990 T3

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

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

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

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

<400> 150  
20 gccggacacg cugaactugt t 21

<210> 151  
<211> 21  
<212> ARN  
25 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: cadena sentido de ARNbc que se dirige a apoB

<220>  
30 <221> base\_modificada  
<222> 1  
<223> /mod\_base = "nucleósido: carece de grupo 5'-fosfato"

<400> 151  
35 ggaauuuau auuugauc a 21

<210> 152  
<211> 23  
<212> ARN  
40 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: cadena antisentido de ARNbc que se dirige a apoB

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

<400> 152  
50 uuggaucaaa uauaagauuc ccu 23

<210> 153  
<211> 21  
55 <212> ARN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
60 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena sentido de ARNbc  
que se dirige a apoB

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

5  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 7, 8, 10, 12, 13, 14, 19  
 <223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-O-metilo"

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

15  
 <400> 153  
 ggaauuuau auuugaucca a 21

20  
 <210> 154  
 <211> 23  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

25  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena antisentido de ARNbc que se dirige a apoB

30  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1  
 <223> /mod\_base = "nucleósido: carece de grupo 5'-fosfato"

35  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1, 2, 7, 11, 13, 18, 21  
 <223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-O-metilo"

40  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 23  
 <223> /mod\_base = "corresponding base 5'-monofosforotioato"

45  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 22  
 <223> /mod\_base = "2'-O-metil corresponding base 5'-monofosforotioato"

50  
 <400> 154  
 uuggaucaaa uauaagauuc ccu 23

55  
 <210> 155  
 <211> 19  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

60  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena sentido de ARNbc que se dirige a aha1

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

70  
 <400> 155  
 ggaugaagug gagauuagu 19

75  
 <210> 156  
 <211> 19  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

## ES 2 605 990 T3

<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: cadena antisentido de ARNbc que se dirige a aha1

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

10 <400> 156  
acuaaucucc acucaucc 19

<210> 157  
<211> 21  
15 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: cadena sentido de ARNbc que se dirige a aha1

20 <220>  
<221> base\_modificada  
<222> 1  
<223> /mod\_base = "nucleósido: carece de grupo 5'-fosfato"

25 <220>  
<221> base\_modificada  
<222> 4, 9, 15, 16, 19  
<223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-O-metilo"

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

35 <220>  
<221> base\_modificada  
<222> 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 12, 13, 14, 17, 18  
<223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-hidroxi"

40 <400> 157  
ggaugaagug gagauuagut t 21

<210> 158  
45 <211> 21  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: cadena antisentido de ARNbc que se dirige a aha1

50 <220>  
<221> base\_modificada  
55 <222> 1  
<223> /mod\_base = "nucleósido: carece de grupo 5'-fosfato"

<220>  
<221> base\_modificada  
60 <222> 3, 10, 15  
<223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-O-metilo"

<220>  
<221> base\_modificada  
65 <222> 21  
<223> /mod\_base = "5'-fosforotioato timidina"

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 13, 14, 16, 17, 18, 19  
 <223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-hidroxi"  
 5  
 <400> 158  
 acuaaucucc acucaucct t 21  
 <210> 159  
 10 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 15 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena sentido de ARNbc que se dirige a aha1  
 <220>  
 20 <221> base\_modificada  
 <222> 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19  
 <223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-O-metilo"  
 <220>  
 25 <221> base\_modificada  
 <222> 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-desoxi-2'-fluoro"  
 <220>  
 30 <221> base\_modificada  
 <222> 2  
 <223> /mod\_base = "base correspondiente a 2'-desoxi-2'-fluoro"  
 5'-monofosforotioato"  
 <220>  
 35 <221> base\_modificada  
 <222> 20  
 <223> /mod\_base = "desoxitimidina con enlaces 3'-3'"  
 <400> 159  
 40 acuaaucucc acucaucct 20  
 <210> 160  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 45 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena antisentido de ARNbc que se dirige a aha1  
 50 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1  
 <223> /mod\_base = "nucleósido: carece de grupo 5'-fosfato"  
 55 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1  
 <223> /mod\_base = "base con enlazador de 5'-hexil amino(NH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>)"  
 60 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-O-metilo"  
 65 <220>  
 <221> base\_modificada

## ES 2 605 990 T3

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

5  
<220>  
<221> base\_modificada  
<222> 20  
<223> /mod\_base = "desoxitimidina con enlaces 3'-3'"

10  
<400> 160  
ggaugaagug gagauuagut 20

15  
<210> 161  
<211> 19  
<212> ARN  
<213> Secuencia artificial

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

20  
<400> 161  
gcaaaggcgu gccaacuca 19

25  
<210> 162  
<211> 19  
<212> ARN  
<213> Secuencia artificial

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

35  
<400> 162  
ugaguuggca cgccuuugc 19

40  
<210> 163  
<211> 19  
<212> ARN  
<213> Secuencia artificial

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

50  
<400> 163  
ggaucaucuc aagucuuac 19

55  
<210> 164  
<211> 19  
<212> ARN  
<213> Secuencia artificial

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

65  
<400> 164  
guaagacuug agaugauc 19

70  
<210> 165  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

75  
<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: cadena sentido de ARNbc

80  
<220>  
<221> base\_modificada  
<222> 1



<223> /mod\_base = "nucleósido: carece de grupo 5'-fosfato"  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 5 <222> 1  
 <223> /mod\_base = "base con enlazador de 5'-hexil amino(NH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>)"  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 10 <222> 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-O-metilo"  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 15 <222> 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19  
 <223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-desoxi-2'-fluoro"  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 20 <222> 20  
 <223> /mod\_base = "desoxitimidina con enlaces 3'-3"  
 <400> 165  
 25 gcaaaggcgu gccaacucat 20  
 <210> 166  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 30 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena antisentido de ARNbc  
 <220>  
 35 <221> base\_modificada  
 <222> 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19  
 <223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-O-metilo"  
 <220>  
 40 <221> base\_modificada  
 <222> 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-desoxi-2'-fluoro"  
 <220>  
 45 <221> base\_modificada  
 <222> 20  
 <223> /mod\_base = "desoxitimidina con enlaces 3'-3"  
 <400> 166  
 50 ugaguuggca cgccuuugct 20  
 <210> 167  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 55 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena sentido de ARNbc  
 60 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1  
 <223> /mod\_base = "nucleósido: carece de grupo 5'-fosfato"  
 65 <220>  
 <221> base\_modificada

## ES 2 605 990 T3

<222> 1  
<223> /mod\_base = "base con enlazador de 5'-hexil amino(NH2C6)"

5  
<220>  
<221> base\_modificada  
<222> 2, 8, 10, 12, 13, 16, 17, 18  
<223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-O-metilo"

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

15  
<220>  
<221> base\_modificada  
<222> 1, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 11, 14, 15, 19  
<223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-hidroxi"

20  
<400> 167  
gcaaaggcgu gccaacucat t 21

25  
<210> 168  
<211> 21  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

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

30  
<220>  
<221> base\_modificada  
<222> 1  
<223> /mod\_base = "nucleósido: carece de grupo 5'-fosfato"

35  
<220>  
<221> base\_modificada  
<222> 9  
<223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-O-metilo"

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

45  
<220>  
<221> base\_modificada  
<222> 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19  
<223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-hidroxi"

50  
<400> 168  
ugaguuggca cgccuuugct t 21

55  
<210> 169  
<211> 21  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

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

60  
<220>  
<221> base\_modificada  
<222> 1  
<223> /mod\_base = "nucleósido: carece de grupo 5'-fosfato"

65  
<220>

<221> base\_modificada  
 <222> 1  
 <223> /mod\_base = "base con enlazador de 5'-hexil amino(NH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>)"

5

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 4, 5, 7, 8, 9, 10, 14, 15, 16, 17, 19  
 <223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-desoxi-2'-fluoro"

10

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

15

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1, 2, 3, 6, 11, 12, 13, 18  
 <223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-hidroxi"

20

<400> 169  
 ggaucaucuc aagucuuact t 21

<210> 170  
 <211> 21

25

<212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

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

30

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

35

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 2, 7, 8, 9, 14, 17, 18, 19  
 <223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-desoxi-2'-fluoro"

40

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

45

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1, 3, 4, 5, 6, 10, 11, 12, 13, 15, 16  
 <223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-hidroxi"

50

<400> 170  
 gaaagacuug agaugaucct t 21

<210> 171  
 <211> 19

55

<212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena sentido de ARNbc que se dirige a PTPN1

60

<400> 171  
 ugaccacagu cggauuaaa 19

65

<210> 172

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

5

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena antisentido de ARNbc que se dirige a PTPN1

<400> 172  
 10 uuuuauccga cugugguca 19

<210> 173  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 15 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena sentido de ARNbc que se dirige a PTPN1

20

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

25

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1  
 <223> /mod\_base = "base con enlazador de 5'-hexil amino(NH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>)"

30

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

35

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

40

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 20  
 <223> /mod\_base = "desoxitimidina con enlaces 3'-3'"

45

<400> 173  
 ugaccacagu cggauuaaat 20

50

<210> 174  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena antisentido de ARNbc que se dirige a PTPN1

55

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

60

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

65

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 2  
 <223> /mod\_base = "base correspondiente a 2'-desoxi-2'-fluoro"  
 5 5'-monofosforotioato"

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 20  
 10 <223> /mod\_base = "desoxitimidina con enlaces 3'-3'"

<400> 174  
 uuuaauccga cuguggucat 20

15 <210> 175  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena sentido de ARNbc  
 que se dirige a PTPN1

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 = "base con enlazador de 5'-hexil amino(NH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>)"

35 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1, 4, 5, 7, 10, 11, 15, 16  
 <223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-O-metilo"

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

45 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 2, 3, 6, 8, 9, 12, 13, 14, 17, 18, 19  
 <223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-hidroxi"

50 <400> 175  
 ugaccacagu cggauuaaat t 21

55 <210> 176  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena antisentido de ARNbc que se dirige a PTPN1

60 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1, 3, 17, 18  
 <223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-O-metilo"

65 <220>  
 <221> base\_modificada

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

5 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 19  
 <223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-hidroxi"

10 <400> 176  
 uuuaauccga cuguggucat t 21

15 <210> 177  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena antisentido de ARNbc que se dirige a PTPN1

20 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1  
 <223> /mod\_base = "nucleósido: carece de grupo 5'-fosfato"

25 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 3, 18  
 <223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-O-etilo"

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

35 <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 = "nucleósido correspondiente a 2'-hidroxi"

40 <400> 177  
 uuuaauccga cuguggucat t 21

45 <210> 178  
 <211> 19  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

50 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena antisentido de ARNbc

55 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 2..19  
 <223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-hidroxi"

<400> 178  
 tgaguuggca cgccuuugc 19

60 <210> 179  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

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

ES 2 605 990 T3

5  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1  
 <223> /mod\_base = "5'-N-Acetilgalactosamina (GalNac) unida mediante enlazador de hexil amino (NHC6)"

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

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

20  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 20  
 <223> /mod\_base = "desoxitimidina con enlaces 3'-3'"

25  
 <400> 179  
 gcaaaggcgu gccaacucat 20

30  
 <210> 180  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

35  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena sentido de ARNbc

40  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1  
 <223> /mod\_base = "5'-N-Acetilgalactosamina (GalNac) unida mediante enlazador de hexil amino (NHC6)"

45  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 2, 8, 10, 12, 13, 16, 17, 18  
 <223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-O-metilo"

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

55  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 11, 14, 15, 19  
 <223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-hidroxi"

60  
 <400> 180  
 gcaaaggcgu gccaacucat t 21

65  
 <210> 181  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

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

65  
 <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 = "nucleósido correspondiente a 2'-O-metilo"

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

15  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 20  
 <223> /mod\_base = "desoxitimidina con enlaces 3'-3'"

20  
 <400> 181  
 gcaaaggcgu gccaacucat 20

25  
 <210> 182  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

30  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena sentido 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, 8, 10, 12, 13, 16, 17, 18  
 <223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-O-metilo"

45  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 21  
 <223> /mod\_base = "5'-fosforotioato timidina"

50  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 11, 14, 15, 19  
 <223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-hidroxi"

55  
 <400> 182  
 gcaaaggcgu gccaacucat t 21

60  
 <210> 183  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

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

70  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1  
 <223> /mod\_base = "Compuesto de 5'-colesterol de fórmula II"

75  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-O-metilo"



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

10  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 20  
 <223> /mod\_base = "desoxitimidina con enlaces 3'-3'"

15  
 <400> 183  
 gcaaaggcgu gccaacucat 20

20  
 <210> 184  
 <211> 19  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

25  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena sentido de ARNbc

30  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1  
 <223> /mod\_base = "nucleósido: carece de grupo 5'-fosfato"

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

40  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17  
 <223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-desoxi-2'-fluoro"

45  
 <400> 184  
 gcaaaggcgu gccaacuca 19

50  
 <210> 185  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

55  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena antisentido de ARNbc

60  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19  
 <223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-O-metilo"

65  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-desoxi-2'-fluoro"

70  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 2  
 <223> /mod\_base = "base correspondiente a 2'-desoxi-2'-fluoro"  
 5'-monofosforotioato"

75  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 20

<223> /mod\_base = "desoxitimidina con enlaces 3'-3'"  
 <400> 185  
 ugaguuggca cgccuuugct 20  
 5  
 <210> 186  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 10  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena antisentido de ARNbc  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19  
 <223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-O-metilo"  
 15  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 2  
 <223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-desoxi"  
 20  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-desoxi-2'-fluoro"  
 25  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1  
 <223> /mod\_base = "5'-fosforotioato timidina"  
 30  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 20  
 <223> /mod\_base = "desoxitimidina con enlaces 3'-3'"  
 35  
 <400> 186  
 tgaguuggca cgccuuugct 20  
 40  
 <210> 187  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 45  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena antisentido de ARNbc  
 50  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19  
 <223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-O-metilo"  
 55  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-desoxi-2'-fluoro"  
 60  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 2  
 <223> /mod\_base = "base correspondiente a 2'-desoxi-2'-fluoro"  
 5'-monofosforotioato"  
 65

## ES 2 605 990 T3

5  
<220>  
<221> base\_modificada  
<222> 1  
<223> /mod\_base = "5'-fosforotioato timidina"

10  
<220>  
<221> base\_modificada  
<222> 20  
<223> /mod\_base = "desoxitimidina con enlaces 3'-3'"

15  
<400> 187  
tgaguuggca cgccuuugct 20

20  
<210> 188  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

25  
<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: cadena antisentido de ARNbc

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

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

40  
<220>  
<221> base\_modificada  
<222> 2  
<223> /mod\_base = "5'-tio 5'-desoxi"

45  
<220>  
<221> base\_modificada  
<222> 20  
<223> /mod\_base = "desoxitimidina con enlaces 3'-3'"

50  
<400> 188  
tgaguuggca cgccuuugct 20

55  
<210> 189  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

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

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

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

75  
<220>  
<221> base\_modificada  
<222> 2  
<223> /mod\_base = "base correspondiente a 2'-desoxi-2'-fluoro"

5'-monofosforotioato"

5 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 20  
 <223> /mod\_base = "desoxitimidina con enlaces 3'-3'"

10 <400> 189  
 tgaguuggca cgccuuugct 20

15 <210> 190  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

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

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

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

30 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 2  
 <223> /mod\_base = "base correspondiente a 2'-desoxi-2'-fluoro"  
 5'-monofosforotioato"

35 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 20  
 <223> /mod\_base = "desoxitimidina con enlaces 3'-3'"

40 <400> 190  
 ugaguuggca cgccuuugct 20

45 <210> 191  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

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

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

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

60 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1  
 <223> /mod\_base = "base correspondiente a 2'-desoxi-2'-fluoro"  
 5'-monofosforotioato"

65

5  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 20  
 <223> /mod\_base = "desoxitimidina con enlaces 3'-3'"

10  
 <400> 191  
 ugaguuggca cgccuuugct 20

15  
 <210> 192  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

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

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

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

35  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-desoxi-2'-fluoro"

40  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 2  
 <223> /mod\_base = "base correspondiente a 2'-desoxi-2'-fluoro"  
 5'-monofosforotioato"

45  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 20  
 <223> /mod\_base = "desoxitimidina con enlaces 3'-3'"

50  
 <400> 192  
 ugaguuggca cgccuuugct 20

55  
 <210> 193  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

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

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

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

75  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1, 2

<223> /mod\_base = "base correspondiente a 2'-desoxi-2'-fluoro" 5'-monofosforotioato"  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 5 <222> 20  
 <223> /mod\_base = "desoxitimidina con enlaces 3'-3'"  
 <400> 193  
 10 ugaguuggca cgccuuugct 20  
 <210> 194  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 15 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena antisentido de ARNbc  
 <220>  
 20 <221> base\_modificada  
 <222> 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19  
 <223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-O-metilo"  
 <220>  
 25 <221> base\_modificada  
 <222> 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-desoxi-2'-fluoro"  
 <220>  
 30 <221> base\_modificada  
 <222> 2  
 <223> /mod\_base = "5'-thio 5'-desoxi"  
 <220>  
 35 <221> base\_modificada  
 <222> 1  
 <223> /mod\_base = "5'-fosforotioato timidina"  
 <220>  
 40 <221> base\_modificada  
 <222> 20  
 <223> /mod\_base = "desoxitimidina con enlaces 3'-3'"  
 <400> 194  
 45 tgaguuggca cgccuuugct 20  
 <210> 195  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 50 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena antisentido de ARNbc  
 <220>  
 55 <221> base\_modificada  
 <222> 1  
 <223> /mod\_base = "nucleósido: carece de grupo 5'-fosfato"  
 <220>  
 60 <221> base\_modificada  
 <222> 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19  
 <223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-O-metilo"  
 <220>  
 65 <221> base\_modificada

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

5

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 2  
 <223> /mod\_base = "base correspondiente a 2'-desoxi-2'-fluoro"  
 5'-monofosforotioato"

10

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 20  
 <223> /mod\_base = "desoxitimidina con enlaces 3'-3'"

15

<400> 195  
 ugaguuggca cgccuuugct 20

<210> 196  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

20

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena antisentido 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, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19  
 <223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-O-metilo"

35

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

40

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 20  
 <223> /mod\_base = "desoxitimidina con enlaces 3'-3'"

45

<400> 196  
 ugaguuggca cgccuuugct 20

50

<210> 197  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

55

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

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 = "nucleósido correspondiente a 2'-O-metilo"

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

10  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 2  
 <223> /mod\_base = "base correspondiente a 2'-desoxi-2'-fluoro"  
 5'-monofosforotioato"

15  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 20  
 <223> /mod\_base = "desoxitimidina con enlaces 3'-3'"

20  
 <400> 197  
 tgaguuggca cgccuuugct 20

25  
 <210> 198  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

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

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

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

45  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1  
 <223> /mod\_base = "5'-fosforotioato timidina"

50  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 20  
 <223> /mod\_base = "desoxitimidina con enlaces 3'-3'"

55  
 <400> 198  
 tgaguuggca cgccuuugct 20

60  
 <210> 199  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

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

70  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1  
 <223> /mod\_base = "nucleósido: carece de grupo 5'-fosfato"

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



<223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-O-metilo"  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 5 <222> 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-desoxi-2'-fluoro"  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 10 <222> 2  
 <223> /mod\_base = "5'-thio 5'-desoxi"  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 15 <222> 20  
 <223> /mod\_base = "desoxitimidina con enlaces 3'-3"  
 <400> 199  
 20 tgaguuggca cgccuuugct 20  
 <210> 200  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 25 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena sentido de ARNbc  
 que se dirige a EGFP  
 30 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1  
 <223> /mod\_base = "nucleósido: carece de grupo 5'-fosfato"  
 35 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-O-metilo"  
 40 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19  
 <223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-desoxi-2'-fluoro"  
 45 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 2  
 <223> /mod\_base = "2'-O-metil corresponding base 5'-monofosforotioato"  
 50 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 20  
 <223> /mod\_base = "desoxitimidina con enlaces 3'-3"  
 55 <400> 200  
 gcuggaguuc gugaccgcct 20  
 <210> 201  
 <211> 20  
 60 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena sentido de ARNbc  
 65 que se dirige a EGFP

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

10  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-O-metilo"

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

20  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 20  
 <223> /mod\_base = "desoxitimidina con enlaces 3'-3'"

25  
 <400> 201  
 gcuggaguuc gugaccgct 20

30  
 <210> 202  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

35  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena sentido de ARNbc que se dirige a EGFP

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

45  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-O-metilo"

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

55  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 2  
 <223> /mod\_base = "2'-O-metil corresponding base 5'-monofosforotioato"

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

65  
 <400> 202  
 gcuggaguuc gugaccgct t 21

<210> 203  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: cadena sentido de ARNbc que se dirige a EGFP

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

10 <220>  
<221> base\_modificada  
<222> 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18  
<223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-O-metilo"

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

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

25 <400> 203  
gcuggaguuc gugaccgct t 21

30 <210> 204  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

35 <220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: cadena sentido de ARNbc que se dirige a EGFP

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 = "nucleósido correspondiente a 2'-O-metilo"

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

55 <220>  
<221> base\_modificada  
<222> 20  
<223> /mod\_base = "desoxitimidina con enlaces 3'-3'"

60 <400> 204  
gcuggaguuc gugaccgct 20

65 <210> 205  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: cadena sentido de ARNbc que se dirige a EGFP

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

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

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

20  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 2  
 <223> /mod\_base = "2'-O-metil corresponding base 5'-monofosforotioato"

25  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 20  
 <223> /mod\_base = "desoxitimidina con enlaces 3'-3'"

30  
 <400> 205  
 gcuggaguuc gugaccgct 20

35  
 <210> 206  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

40  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena sentido de ARNbc que se dirige a EGFP

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 = "nucleósido correspondiente a 2'-O-metilo"

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

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

65  
 <400> 206  
 gcuggaguuc gugaccgct t 21

70  
 <210> 207  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

75  
 <220>

## ES 2 605 990 T3

<223> Descripción de la secuencia artificial: cadena sentido de ARNbc que se dirige a EGFP

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 = "nucleósido correspondiente a 2'-O-metilo"

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

20 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 21  
 <223> /mod\_base = "desoxitimidina con enlaces 3'-3'"

25 <400> 207  
 gcuggaguuc gugaccgct t            21

<210> 208  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 30 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena sentido de ARNbc que se dirige a EGFP

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

40 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-O-metilo"

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

50 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 2  
 <223> /mod\_base = "2'-O-metil corresponding base 5'-monofosforotioato"

55 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 21  
 <223> /mod\_base = "desoxitimidina con enlaces 3'-3'"

60 <400> 208  
 gcuggaguuc gugaccgct t            21

<210> 209  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 65

## ES 2 605 990 T3

<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: cadena sentido de ARNbc  
que se dirige a EGFP

5

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

10

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

15

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

20

<220>  
<221> base\_modificada  
<222> 2  
<223> /mod\_base = "2'-O-metil corresponding base 5'-monofosforotioato"

25

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

30

<400> 209  
gcuggaguuc gugaccgct t        21

35

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

40

<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: cadena sentido de ARNbc  
que se dirige a EGFP

45

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

50

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

55

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

60

<220>  
<221> base\_modificada  
<222> 2  
<223> /mod\_base = "2'-O-metil corresponding base 5'-monofosforotioato"

65

<220>  
<221> base\_modificada  
<222> 21

<223> /mod\_base = "desoxitimidina con enlaces 3'-3'"  
 <400> 210  
 gcuggaguuc gugaccgct t      21  
 5  
 <210> 211  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 10  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena sentido de ARNbc  
 que se dirige a EGFP  
 15  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1  
 <223> /mod\_base = "nucleósido: carece de grupo 5'-fosfato"  
 20  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-O-metilo"  
 25  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19  
 <223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-desoxi-2'-fluoro"  
 30  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 21  
 <223> /mod\_base = "desoxitimidina con enlaces 3'-3'"  
 35  
 <400> 211  
 gcuggaguuc gugaccgct t      21  
 <210> 212  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 40  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena sentido de ARNbc  
 que se dirige a EGFP  
 45  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1  
 <223> /mod\_base = "nucleósido: carece de grupo 5'-fosfato"  
 50  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 2, 3, 8, 9, 10, 12, 15, 16, 18, 19  
 <223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-O-metilo"  
 55  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 21  
 <223> /mod\_base = "5'-fosforotioato timidina"  
 60  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1, 4, 5, 6, 7, 11, 13, 14, 17  
 <223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-hidroxi"  
 65

## ES 2 605 990 T3

<400> 212  
gcuggaguuc gugaccgct t 21

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

10  
<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: cadena antisentido de ARNbc que se dirige a EGFP

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

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

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

30  
<220>  
<221> base\_modificada  
<222> 2  
<223> /mod\_base = "base correspondiente a 2'-desoxi-2'-fluoro"  
5'-monofosforotioato"

35  
<220>  
<221> base\_modificada  
<222> 21  
<223> /mod\_base = "5'-fosforotioato timidina"

40  
<400> 213  
ggcggucacg aacuccagct t 21

45  
<210> 214  
<211> 21  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

50  
<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: cadena antisentido de ARNbc que se dirige a EGFP

55  
<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 = "nucleósido correspondiente a 2'-O-metilo"

65  
<220>  
<221> base\_modificada  
<222> 1  
<223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-desoxi"

<220>



## ES 2 605 990 T3

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

5 <220>  
<221> base\_modificada  
<222> 2  
<223> /mod\_base = "base correspondiente a 2'-desoxi-2'-fluoro"  
5'-monofosforotioato"

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

15 <400> 214  
ggcggucacg aacuccagct t 21

20 <210> 215  
<211> 21  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

25 <220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: cadena antisentido de ARNbc  
que se dirige a EGFP

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

35 <220>  
<221> base\_modificada  
<222> 1, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18  
<223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-desoxi-2'-fluoro"

40 <220>  
<221> base\_modificada  
<222> 2  
<223> /mod\_base = "base correspondiente a 2'-desoxi-2'-fluoro"  
5'-monofosforotioato"

45 <220>  
<221> base\_modificada  
<222> 21  
<223> /mod\_base = "5'-fosforotioato timidina"

50 <400> 215  
ggcggucacg aacuccagct t 21

55 <210> 216  
<211> 21  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

60 <220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: cadena antisentido de ARNbc  
que se dirige a EGFP

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

<220>

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

5

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-desoxi-2'-fluoro"

10

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 2  
 <223> /mod\_base = "base correspondiente a 2'-desoxi-2'-fluoro"  
 5'-monofosforotioato"

15

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

20

<400> 216  
 ggcgguacag aacuccagct t 21

25

<210> 217  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

30

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena antisentido de ARNbc  
 que se dirige a EGFP

35

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

40

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

45

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

50

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 2  
 <223> /mod\_base = "base correspondiente a 2'-desoxi-2'-fluoro"  
 5'-monofosforotioato"

55

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 20  
 <223> /mod\_base = "desoxitimidina con enlaces 3'-3'"

60

<400> 217  
 ggcgguacag aacuccagct 20

65

<210> 218  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

# ES 2 605 990 T3

<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: cadena antisentido de ARNbc que se dirige a EGFP

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

10 <220>  
<221> base\_modificada  
<222> 1, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18  
<223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-desoxi-2'-fluoro"

15 <220>  
<221> base\_modificada  
<222> 2  
<223> /mod\_base = "base correspondiente a 2'-desoxi-2'-fluoro"  
5'-monofosforotioato"

20 <220>  
<221> base\_modificada  
<222> 21  
<223> /mod\_base = "desoxitimidina con enlaces 3'-3'"

25 <400> 218  
ggcggucacg aacuccagct t 21

30 <210> 219  
<211> 21  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

35 <220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: cadena antisentido de ARNbc que se dirige a EGFP

40 <220>  
<221> base\_modificada  
<222> 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19  
<223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-O-metilo"

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

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

55 <220>  
<221> base\_modificada  
<222> 2  
<223> /mod\_base = "base correspondiente a 2'-desoxi-2'-fluoro"  
5'-monofosforotioato"

60 <220>  
<221> base\_modificada  
<222> 21  
<223> /mod\_base = "desoxitimidina con enlaces 3'-3'"

65 <400> 219  
ggcggucacg aacuccagct t 21

<210> 220  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 5  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena antisentido de ARNbc  
 que se dirige a EGFP  
 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 = "nucleósido correspondiente a 2'-O-metilo"  
 20  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-desoxi-2'-fluoro"  
 25  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 2  
 <223> /mod\_base = "base correspondiente a 2'-desoxi-2'-fluoro"  
 5'-monofosforotioato"  
 30  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 20  
 <223> /mod\_base = "desoxitimidina con enlaces 3'-3"  
 35  
 <400> 220  
 ggcggucacg aacuccagct 20  
 40  
 <210> 221  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena antisentido de ARNbc  
 que se dirige a EGFP  
 45  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1  
 <223> /mod\_base = "nucleósido: carece de grupo 5'-fosfato"  
 50  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19  
 <223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-O-metilo"  
 55  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1  
 <223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-desoxi"  
 60  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-desoxi-2'-fluoro"  
 65

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 2  
 <223> /mod\_base = "base correspondiente a 2'-desoxi-2'-fluoro"  
 5 5'-monofosforotioato"

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 20  
 10 <223> /mod\_base = "desoxitimidina con enlaces 3'-3'"

<400> 221  
 ggccggucacg aacuccagct 20

15 <210> 222  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena antisentido de ARNbc  
 que se dirige a EGFP

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

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

35 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-desoxi-2'-fluoro"

40 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 2  
 <223> /mod\_base = "base correspondiente a 2'-desoxi-2'-fluoro"  
 5'-monofosforotioato"

45 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 21  
 <223> /mod\_base = "desoxitimidina con enlaces 3'-3'"

50 <400> 222  
 ggccggucacg aacuccagct t 21

<210> 223  
 <211> 21  
 55 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena antisentido de ARNbc  
 que se dirige a EGFP

60 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1  
 65 <223> /mod\_base = "nucleósido: carece de grupo 5'-fosfato"

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

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

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

20  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 2  
 <223> /mod\_base = "base correspondiente a 2'-desoxi-2'-fluoro"  
 5'-monofosforotioato"

25  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 21  
 <223> /mod\_base = "desoxitimidina con enlaces 3'-3'"

30  
 <400> 223  
 ggccggucacg aacuccagct t 21

35  
 <210> 224  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

40  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena antisentido de ARNbc  
 que se dirige a EGFP

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

50  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-desoxi-2'-fluoro"

55  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 2  
 <223> /mod\_base = "base correspondiente a 2'-desoxi-2'-fluoro"  
 5'-monofosforotioato"

60  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 20  
 <223> /mod\_base = "desoxitimidina con enlaces 3'-3'"

65  
 <400> 224  
 ggccggucacg aacuccagct 20

<210> 225  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

ES 2 605 990 T3

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena antisentido de ARNbc que se dirige a EGFP

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

10 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 7, 16  
 <223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-O-metilo"

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

20 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 17, 18, 19  
 <223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-hidroxi"

25 <400> 225  
 ggccggucacg aacuccagct t 21

<210> 226  
 <211> 21

30 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena sentido de ARNbc que se dirige a aha1

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

40 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-O-metilo"

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

50 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 2  
 <223> /mod\_base = "2'-O-metil corresponding base 5'-monofosforotioato"

55 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 21  
 <223> /mod\_base = "5'-fosforotioato timidina"

60 <400> 226  
 ggauagaagug gagauuagut t 21

65 <210> 227  
 <211> 20

<212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

5  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena sentido de ARNbc que se dirige a aha1

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

15  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-O-metilo"

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

25  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 2  
 <223> /mod\_base = "2'-O-metil corresponding base 5'-monofosforotioato"

30  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 20  
 <223> /mod\_base = "desoxitimidina con enlaces 3'-3'"

35  
 <400> 227  
 ggauagaagug gagauuagut            20

40  
 <210> 228  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

45  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena sentido de ARNbc que se dirige a aha1

50  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1  
 <223> /mod\_base = "nucleósido: carece de grupo 5'-fosfato"

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

60  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19  
 <223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-desoxi-2'-fluoro"

65  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 2  
 <223> /mod\_base = "2'-O-metil corresponding base 5'-monofosforotioato"

<220>  
 <221> base\_modificada



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

5

<400> 228  
 ggaugaagug gagauuagut t 21

<210> 229  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena sentido de ARNbc  
 que se dirige a aha1

15

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

20

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

25

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

30

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 2  
 <223> /mod\_base = "2'-O-metil corresponding base 5'-monofosforotioato"

35

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 21  
 <223> /mod\_base = "desoxitimidina con enlaces 3'-3'"

40

<400> 229  
 ggaugaagug gagauuagut t 21

45

<210> 230  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena sentido de ARNbc  
 que se dirige a aha1

50

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

55

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-O-metilo"

60

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

65

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

10  
 <400> 230  
 ggaugaagug gagauuagut t 21  
 <210> 231  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

15  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena sentido de ARNbc que se dirige a aha1

20  
 <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 = "nucleósido correspondiente a 2'-O-metilo"

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

35  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 2  
 <223> /mod\_base = "2'-O-metil corresponding base 5'-monofosforotioato"

40  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 20  
 <223> /mod\_base = "desoxitimidina con enlaces 3'-3'"

45  
 <400> 231  
 ggaugaagug gagauuagut 20  
 <210> 232  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

50  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena sentido de ARNbc que se dirige a aha1

55  
 <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 = "nucleósido correspondiente a 2'-O-metilo"

65  
 <220>  
 <221> base\_modificada

## ES 2 605 990 T3

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

5  
<220>  
<221> base\_modificada  
<222> 20  
<223> /mod\_base = "desoxitimidina con enlaces 3'-3'"

10  
<400> 232  
ggaugaagug gagauuagut        20

<210> 233  
<211> 21  
<212> ADN  
15 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: cadena sentido de ARNbc  
20 que se dirige a aha1

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

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

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

<220>  
<221> base\_modificada  
<222> 21  
40 <223> /mod\_base = "desoxitimidina con enlaces 3'-3'"

<400> 233  
ggaugaagug gagauuagut t        21

45 <210> 234  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: cadena sentido de ARNbc  
50 que se dirige a aha1

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

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

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

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 20  
 <223> /mod\_base = "desoxitimidina con enlaces 3'-3'"

5

<400> 234  
 ggaugaagug gagauuagut 20

<210> 235  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena sentido de ARNbc que se dirige a aha1

15

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

20

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-O-metilo"

25

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

30

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 2  
 <223> /mod\_base = "2'-O-metil corresponding base 5'-monofosforotioato"

35

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 21  
 <223> /mod\_base = "desoxitimidina con enlaces 3'-3'"

40

<400> 235  
 ggaugaagug gagauuagut t 21

45

<210> 236  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

50

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena sentido de ARNbc que se dirige a aha1

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 = "nucleósido correspondiente a 2'-O-metilo"

65

<220>  
 <221> base\_modificada

## ES 2 605 990 T3

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

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

10  
<400> 236  
ggaugaagug gagauuagut t 21

<210> 237  
<211> 21  
<212> ADN  
15 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: cadena sentido de ARNbc  
que se dirige a aha1  
20

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

<220>  
<221> base\_modificada  
<222> 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18  
<223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-O-metilo"  
30

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

<220>  
<221> base\_modificada  
<222> 21  
<223> /mod\_base = "desoxitimidina con enlaces 3'-3'"  
40

<400> 237  
ggaugaagug gagauuagut t 21

<210> 238  
45 <211> 21  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: cadena antisentido de ARNbc  
que se dirige a aha1  
50

<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 = "nucleósido correspondiente a 2'-O-metilo"  
60

<220>  
<221> base\_modificada  
<222> 1  
<223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-desoxi"  
65

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

10  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 2  
 <223> /mod\_base = "base correspondiente a 2'-desoxi-2'-fluoro"  
 5'-monofosforotioato"

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

20  
 <400> 238  
 acuaaucucc acuucauct t 21

25  
 <210> 239  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

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 = "nucleósido correspondiente a 2'-O-metilo"

40  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-desoxi-2'-fluoro"

45  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 2  
 <223> /mod\_base = "base correspondiente a 2'-desoxi-2'-fluoro"  
 5'-monofosforotioato"

50  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 21  
 <223> /mod\_base = "desoxitimidina con enlaces 3'-3'"

55  
 <400> 239  
 acuaaucucc acuucauct t 21

60  
 <210> 240  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

65  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena antisentido de ARNbc  
 que se dirige a aha1

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

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

15  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-desoxi-2'-fluoro"

20  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 2  
 <223> /mod\_base = "base correspondiente a 2'-desoxi-2'-fluoro"  
 5'-monofosforotioato"

25  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 21  
 <223> /mod\_base = "5'-fosforotioato timidina"

30  
 <400> 240  
 acuaaucucc acucaucct t 21

35  
 <210> 241  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

40  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19  
 <223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-O-metilo"

45  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-desoxi-2'-fluoro"

50  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 2  
 <223> /mod\_base = "base correspondiente a 2'-desoxi-2'-fluoro"  
 5'-monofosforotioato"

55  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 20  
 <223> /mod\_base = "desoxitimidina con enlaces 3'-3'"

60  
 <400> 241  
 acuaaucucc acucaucct 20

65  
 <210> 242  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

```

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: cadena antisentido de ARNbc
que se dirige a aha1

5    <220>
    <221> base_modificada
    <222> 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19
    <223> /mod_base = "nucleósido correspondiente a 2'-O-metilo"

10   <220>
    <221> base_modificada
    <222> 1
    <223> /mod_base = "nucleósido correspondiente a 2'-desoxi"

15   <220>
    <221> base_modificada
    <222> 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18
    <223> /mod_base = "nucleósido correspondiente a 2'-desoxi-2'-fluoro"

20   <220>
    <221> base_modificada
    <222> 2
    <223> /mod_base = "base correspondiente a 2'-desoxi-2'-fluoro"
    5'-monofosforotioato"

25   <220>
    <221> base_modificada
    <222> 21
    <223> /mod_base = "desoxitimidina con enlaces 3'-3'"

30   <400> 242
    acuaaucucc acucaucct t           21

35   <210> 243
    <211> 20
    <212> ADN
    <213> Secuencia artificial

40   <220>
    <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena antisentido de ARNbc
    que se dirige a aha1

45   <220>
    <221> base_modificada
    <222> 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19
    <223> /mod_base = "nucleósido correspondiente a 2'-O-metilo"

50   <220>
    <221> base_modificada
    <222> 1
    <223> /mod_base = "nucleósido correspondiente a 2'-desoxi"

55   <220>
    <221> base_modificada
    <222> 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18
    <223> /mod_base = "nucleósido correspondiente a 2'-desoxi-2'-fluoro"

60   <220>
    <221> base_modificada
    <222> 2
    <223> /mod_base = "base correspondiente a 2'-desoxi-2'-fluoro"
    5'-monofosforotioato"

65   <220>
    <221> base_modificada
    <222> 20

```



<223> /mod\_base = "desoxitimidina con enlaces 3'-3'"  
 <400> 243  
 acuaaucucc acucaucct 20  
 5  
 <210> 244  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 10  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena antisentido de ARNbc  
 que se dirige a aha1  
 15  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1  
 <223> /mod\_base = "nucleósido: carece de grupo 5'-fosfato"  
 20  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19  
 <223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-O-metilo"  
 25  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1  
 <223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-desoxi"  
 30  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-desoxi-2'-fluoro"  
 35  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 2  
 <223> /mod\_base = "base correspondiente a 2'-desoxi-2'-fluoro"  
 5'-monofosforotioato"  
 40  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 21  
 <223> /mod\_base = "desoxitimidina con enlaces 3'-3'"  
 45  
 <400> 244  
 acuaaucucc acucaucct t 21  
 50  
 <210> 245  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena antisentido de ARNbc  
 que se dirige a aha1  
 55  
 <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 = "nucleósido correspondiente a 2'-O-metilo"  
 65

5  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1  
 <223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-desoxi"

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

15  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 2  
 <223> /mod\_base = "base correspondiente a 2'-desoxi-2'-fluoro"  
 5'-monofosforotioato"

20  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 20  
 <223> /mod\_base = "desoxitimidina con enlaces 3'-3'"

25  
 <400> 245  
 acuaaucucc acucaucct 20

30  
 <210> 246  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

35  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena antisentido de ARNbc que se dirige a aha1

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

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

50  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-desoxi-2'-fluoro"

55  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 2  
 <223> /mod\_base = "base correspondiente a 2'-desoxi-2'-fluoro"  
 5'-monofosforotioato"

60  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 20  
 <223> /mod\_base = "desoxitimidina con enlaces 3'-3'"

65  
 <400> 246  
 acuaaucucc acucaucct 20

<210> 247  
 <211> 19  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

## ES 2 605 990 T3

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

5 <400> 247  
 guuggugaau ggagcucag 19

10 <210> 248  
 <211> 19  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

15 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena antisentido de ARNbc

20 <400> 248  
 cugagcucca uucaccaac 19

25 <210> 249  
 <211> 19  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

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

35 <400> 249  
 gguccuguug uuggugaau 19

40 <210> 250  
 <211> 19  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

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

50 <400> 250  
 auucaccaac aacaggacc 19

55 <210> 251  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

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

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

70 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1  
 <223> /mod\_base = "base con enlazador de 5'-hexil amino(NH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>)"

75 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-O-metilo"

80 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19  
 <223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-desoxi-2'-fluoro"

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 20  
 <223> /mod\_base = "desoxitimidina con enlaces 3'-3'"

5

<400> 251  
 guuggugaau ggagcucagt            20

<210> 252  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10

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

15

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

20

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-desoxi-2'-fluoro"

25

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 2  
 <223> /mod\_base = "base correspondiente a 2'-desoxi-2'-fluoro"  
 5'-monofosforotioato"

30

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 20  
 <223> /mod\_base = "desoxitimidina con enlaces 3'-3'"

35

<400> 252  
 cugagcucca uucaccaact            20

40

<210> 253  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

45

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena sentido 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  
 <223> /mod\_base = "base con enlazador de 5'-hexil amino(NH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>)"

60

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

65

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

<223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-desoxi-2'-fluoro"  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 5 <222> 20  
 <223> /mod\_base = "desoxitimidina con enlaces 3'-3'"

<400> 253  
 gguccuguug uuggugaaut 20  
 10 <210> 254  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 15 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena antisentido de ARNbc

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

<220>  
 25 <221> base\_modificada  
 <222> 1, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-desoxi-2'-fluoro"

<220>  
 30 <221> base\_modificada  
 <222> 2  
 <223> /mod\_base = "base correspondiente a 2'-desoxi-2'-fluoro"  
 5'-monofosforotioato"

<220>  
 35 <221> base\_modificada  
 <222> 21  
 <223> /mod\_base = "5'-fosforotioato timidina"

<400> 254  
 40 auucaccaac aacaggacct t 21

<210> 255  
 <211> 21  
 45 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 50 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena antisentido de ARNbc

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

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18  
 60 <223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-desoxi-2'-fluoro"

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 2  
 65 <223> /mod\_base = "base correspondiente a 2'-desoxi-2'-fluoro"  
 5'-monofosforotioato"

ES 2 605 990 T3

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 21  
 <223> /mod\_base = "5'-fosforotioato timidina"  
 5  
 <400> 255  
 cugagcucca uucaccaact t 21  
 <210> 256  
 <211> 19  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 10  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena antisentido de ARNbc  
 15  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 2..19  
 <223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-hidroxi"  
 20  
 <400> 256  
 tgaguuggca cgccuuugc 19  
 25  
 <210> 257  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 30  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena sentido de ARNbc  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1  
 <223> /mod\_base = "Compuesto de 5'-colesterol de fórmula II"  
 35  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-O-metilo"  
 40  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19  
 <223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-desoxi-2'-fluoro"  
 45  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 20  
 <223> /mod\_base = "desoxitimidina con enlaces 3'-3'"  
 50  
 <400> 257  
 gcaaaggcgu gccaacucat 20  
 55  
 <210> 258  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 60  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena sentido de ARNbc  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1  
 65

## ES 2 605 990 T3

<223> /mod\_base = "Compuesto de 5'-colesterol de fórmula II"  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 5 <222> 2, 8, 10, 12, 13, 16, 17, 18  
 <223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-O-metilo"  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 10 <222> 21  
 <223> /mod\_base = "5'-fosforotioato timidina"  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 15 <222> 1, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 11, 14, 15, 19  
 <223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-hidroxilo"  
 <400> 258  
 20 gcaaaggcgu gccaacucat t 21  
 <210> 259  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 25 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena sentido de ARNbc  
 <220>  
 30 <221> base\_modificada  
 <222> 1  
 <223> /mod\_base = "Compuesto de 5'-colesterol de fórmula II unida mediante C6SSC6"  
 <220>  
 35 <221> base\_modificada  
 <222> 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-O-metilo"  
 <220>  
 40 <221> base\_modificada  
 <222> 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19  
 <223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-desoxi-2'-fluoro"  
 <220>  
 45 <221> base\_modificada  
 <222> 20  
 <223> /mod\_base = "desoxitimidina con enlaces 3'-3'"  
 <400> 259  
 50 gcaaaggcgu gccaacucat 20  
 <210> 260  
 <211> 23  
 <212> ADN  
 55 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena sentido de ARNbc  
 <220>  
 60 <221> base\_modificada  
 <222> 1  
 <223> /mod\_base = "Compuesto de 5'-colesterol de fórmula II"  
 <220>  
 65 <221> base\_modificada

<222> 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21  
 <223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-O-metilo"

5  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22  
 <223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-desoxi-2'-fluoro"

10  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 23  
 <223> /mod\_base = "desoxitimidina con enlaces 3'-3'"

15  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1..3  
 <223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-hidroxi"

20  
 <400> 260  
 aucgcaaagg cgugccaacu cat                    23

25  
 <210> 261  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

30  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1  
 <223> /mod\_base = "catepsina ligada a 5' mediante compuesto de colesterol de fórmula II y enlazador de hexil amino (NHC6)"

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

40  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19  
 <223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-desoxi-2'-fluoro"

45  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 20  
 <223> /mod\_base = "desoxitimidina con enlaces 3'-3'"

50  
 <400> 261  
 gcaaaggcgu gccaacucat                    20

55  
 <210> 262  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

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

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



5  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-desoxi-2'-fluoro"

10  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 2  
 <223> /mod\_base = "base correspondiente a 2'-desoxi-2'-fluoro"  
 5'-monofosforotioato"

15  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 20  
 <223> /mod\_base = "desoxitimidina con enlaces 3'-3'"

20  
 <400> 262  
 ugaguuggca cgccuuugct 20

25  
 <210> 263  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

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

35  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20  
 <223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-O-metilo"

40  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 2  
 <223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-desoxi"

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

50  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1  
 <223> /mod\_base = "5'-fosforotioato timidina"

55  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 21  
 <223> /mod\_base = "desoxitimidina con enlaces 3'-3'"

60  
 <400> 263  
 tgaguuggca cgccuuugct 20

65  
 <210> 264  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

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

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

<223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-O-metilo"  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 5 <222> 1, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-desoxi-2'-fluoro"  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 10 <222> 2  
 <223> /mod\_base = "base correspondiente a 2'-desoxi-2'-fluoro"  
 5'-monofosforotioato"  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 15 <222> 20  
 <223> /mod\_base = "desoxitimidina con enlaces 3'-3'"  
 <400> 264  
 20 ugaguuggca cgccuuugct 20  
 <210> 265  
 <211> 21  
 <212> ARN  
 25 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena sentido de ARNbc  
 que se dirige a apoB  
 30 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1  
 <223> /mod\_base = "Compuesto de 5'-colesterol de fórmula II"  
 35 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 7, 8, 10, 12, 13, 14, 19  
 <223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-O-metilo"  
 40 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 21  
 <223> /mod\_base = "corresponding base 5'-monofosforotioato"  
 45 <400> 265  
 ggaauuuau auuugaucca a 21  
 <210> 266  
 50 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena antisentido de ARNbc  
 que se dirige a aha1  
 55 <220>  
 <221> base\_modificada  
 60 <222> 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19  
 <223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-O-metilo"  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 65 <222> 1  
 <223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-desoxi"

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

10  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 2  
 <223> /mod\_base = "base correspondiente a 2'-desoxi-2'-fluoro"  
 5'-monofosforotioato"

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

20  
 <400> 266  
 acuaaucucc acucaucct t 21

25  
 <210> 267  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

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

35  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-desoxi-2'-fluoro"

40  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 2  
 <223> /mod\_base = "base correspondiente a 2'-desoxi-2'-fluoro"  
 5'-monofosforotioato"

45  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 21  
 <223> /mod\_base = "5'-fosforotioato timidina"

50  
 <400> 267  
 acuaaucucc acucaucct t 21

55  
 <210> 268  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

60  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena antisentido de ARNbc  
 que se dirige a aha1

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

5  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18  
 <223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-desoxi-2'-fluoro"

10  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 2  
 <223> /mod\_base = "base correspondiente a 2'-desoxi-2'-fluoro"  
 5'-monofosforotioato"

15  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 21  
 <223> /mod\_base = "desoxitimidina con enlaces 3'-3'"

20  
 <400> 268  
 acuaaucucc acucaucct t 21

25  
 <210> 269  
 <211> 17  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

30  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Sonda de PNA para la detección de SEQ  
 ID NO. 182 (cadena con sentido)

35  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1  
 <223> /mod\_base = "Atto425 conjugado mediante enlazador de serina doble (Panagen)"

40  
 <400> 269  
 tgagttggca cgcttt 17

45  
 <210> 270  
 <211> 17  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

50  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Sonda de PNA para la detección de SEQ  
 ID NO. 168 (cadena antisentido)

55  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1  
 <223> /mod\_base = "Atto425 conjugado mediante enlazador de serina doble (Panagen)"

60  
 <400> 270  
 gcaaaggcgt gccact 17

65  
 <210> 271  
 <211> 22  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

70  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena sentido de ARNbc  
 que se dirige a FVII

75  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1  
 <223> /mod\_base = "nucleósido: carece de grupo 5'-fosfato"

## ES 2 605 990 T3

<400> 271  
ugugcaaagg cgugccaacu ca 22

5 <210> 272  
<211> 23  
<212> ARN  
<213> Secuencia artificial

10 <220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: cadena sentido de ARNbc  
que se dirige a FVII

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

20 <400> 272  
uauugcaaag gcgugccaac uca 23

25 <210> 273  
<211> 23  
<212> ARN  
<213> Secuencia artificial

30 <220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: cadena sentido de ARNbc  
que se dirige a FVII

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

40 <400> 273  
uguugcaaag gcgugccaac uca 23

45 <210> 274  
<211> 23  
<212> ARN  
<213> Secuencia artificial

50 <220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: cadena sentido de ARNbc  
que se dirige a FVII

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

60 <400> 274  
uuaggcaaag gcgugccaac uca 23

65 <210> 275  
<211> 23  
<212> ARN  
<213> Secuencia artificial

70 <220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: cadena sentido de ARNbc  
que se dirige a FVII

75 <220>  
<221> base\_modificada  
<222> 1

<223> /mod\_base = "nucleósido: carece de grupo 5'-fosfato"  
 <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 antisentido de ARNbc que se dirige a FVII  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1  
 <223> /mod\_base = "nucleósido: carece de grupo 5'-fosfato"  
 15  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1  
 <223> /mod\_base = "Compuesto de 5'-colesterol de fórmula II"  
 20  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21  
 <223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-O-metilo"  
 25  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22  
 <223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-desoxi-2'-fluoro"  
 30  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 23  
 <223> /mod\_base = "desoxitimidina con enlaces 3'-3'"  
 35  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 2  
 <223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-hidroxi"  
 40  
 <400> 276  
 uaugcaaagg cgugccaacu cat 23  
 45  
 <210> 277  
 <211> 23  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 50  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena antisentido de ARNbc que se dirige a 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 5'-colesterol de fórmula II"  
 65  
 <220>

<221> base\_modificada  
 <222> 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21  
 <223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-O-metilo"

5

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22  
 <223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-desoxi-2'-fluoro"

10

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 23  
 <223> /mod\_base = "desoxitimidina con enlaces 3'-3'"

15

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

20

<400> 277  
 ugugcaaagg cgugccaacu cat 23

<210> 278  
 <211> 24

25

<212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena antisentido de ARNbc que se dirige a FVII

30

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

35

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1  
 <223> /mod\_base = "Compuesto de 5'-colesterol de fórmula II"

40

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22  
 <223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-O-metilo"

45

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23  
 <223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-desoxi-2'-fluoro"

50

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 24  
 <223> /mod\_base = "desoxitimidina con enlaces 3'-3'"

55

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

60

<400> 278  
 uauugcaaag gcgugccaac ucat 24

65

<210> 279  
 <211> 24

<212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

5 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena antisentido de ARNbc que se dirige a FVII

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

15 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1  
 <223> /mod\_base = "Compuesto de 5'-colesterol de fórmula II"

20 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22  
 <223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-O-metilo"

25 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23  
 <223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-desoxi-2'-fluoro"

30 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 24  
 <223> /mod\_base = "desoxitimidina con enlaces 3'-3'"

35 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 2  
 <223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-hidroxi"

40 <400> 279  
 uguugcaaag gcgugccaac ucat 24

45 <210> 280  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

50 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1  
 <223> /mod\_base = "nucleósido: carece de grupo 5'-fosfato"

55 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1  
 <223> /mod\_base = "Compuesto de 5'-colesterol de fórmula II"

60 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1, 2, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22  
 <223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-O-metilo"

65 <220>  
 <221> base\_modificada



## ES 2 605 990 T3

<222> 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23  
 <223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-desoxi-2'-fluoro"

5

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 24  
 <223> /mod\_base = "desoxitimidina con enlaces 3'-3'"

10

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 3.4  
 <223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-hidroxi"

15

<400> 280  
 uuagcacaag gcgugccaac ucat                      24

20

<210> 281  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

25

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena antisentido de ARNbc que se dirige a FVII

30

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

35

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1  
 <223> /mod\_base = "Compuesto de 5'-colesterol de fórmula II"

40

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22  
 <223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-O-metilo"

45

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23  
 <223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-desoxi-2'-fluoro"

50

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 24  
 <223> /mod\_base = "desoxitimidina con enlaces 3'-3'"

55

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 2..3  
 <223> /mod\_base = "nucleósido correspondiente a 2'-hidroxi"

60

<400> 281  
 uagugcacaag gcgugccaac ucat                      24

65

<210> 282  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cadena antisentido de ARNbc que se dirige a FVII

# ES 2 605 990 T3

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

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

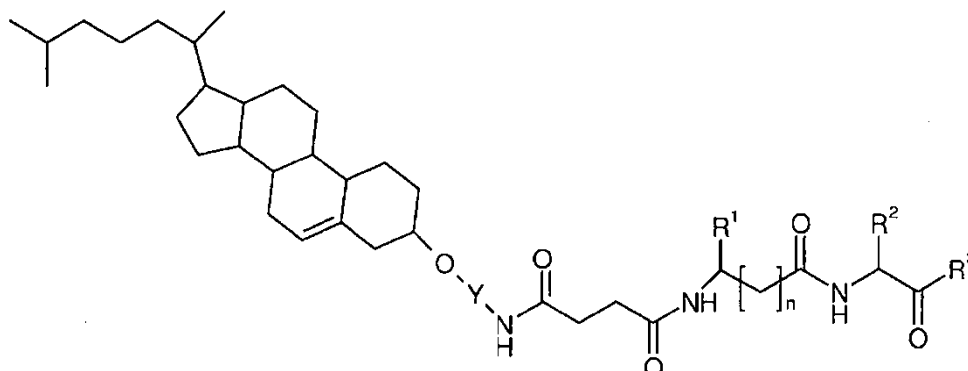
15 <220>  
<221> base\_modificada  
<222> 2  
<223> /mod\_base = "base correspondiente a 2'-desoxi-2'-fluoro"  
5'-monofosforotioato"

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

<400> 282  
tgaguuggca cgccuuugct t 21

## REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula



5 (I),

para su uso en la administración *in vivo* de ácidos nucleicos, en la que

Y es un grupo conector seleccionado de  $-(CH_2)_3-$  o  $-C(O)-N-(CH_2-CH_2-O)_p-CH_2-CH_2-$ ;

R<sup>1</sup> es -alquilo (C<sub>1-6</sub>);

-(CH<sub>2</sub>)-naftilo; o

-(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-fenilo, cuyo fenilo está sin sustituir o hasta cuatro veces sustituido con un sustituyente independientemente seleccionado de

-NO<sub>2</sub>,

-CN,

Halógeno,

-O-(CH<sub>2</sub>)-fenilo,

-O-alquilo (C<sub>1-6</sub>), 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 de fenilo están sin sustituir o independientemente sustituidos con -O-alquilo (C<sub>1-4</sub>);

-(CH<sub>2</sub>)<sub>k</sub>-C(O)-NH<sub>2</sub>;

-(CH<sub>2</sub>)<sub>k</sub>-fenilo;

-alquilo (C<sub>1-6</sub>), que está sin sustituir o sustituido una vez con -S-CH<sub>3</sub>;

R<sup>3</sup> es -NH-fenilo, cuyo fenilo está adicionalmente sustituido con un sustituyente independientemente seleccionado de

-(CH<sub>2</sub>)-OH; o

-(CH<sub>2</sub>)-O-C(O)-O-(4-nitro-fenilo);

k es 1, 2, 3, 4, 5 o 6;

m es 1, 2, 3 o 4;

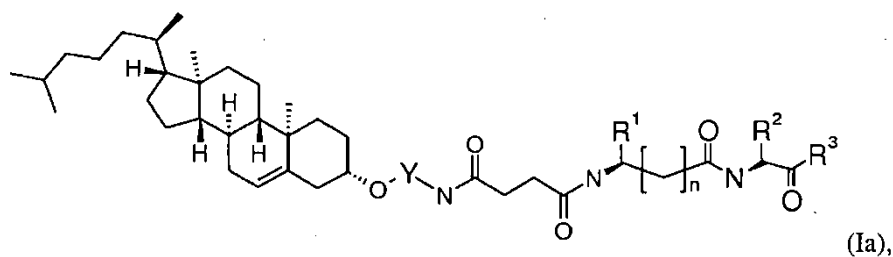
n es 0 o 1; y

p es un número entero de 1 a 20; y en la que

dicho compuesto está covalentemente unido al ácido nucleico, y en la que

los grupos R<sup>2</sup> y R<sup>3</sup>, junto con los átomos a los que están unidos, forman un sustrato que es susceptible a escisión por catepsina B.

2. El compuesto para su uso según la reivindicación 1, en el que el compuesto de fórmula (I) tiene la conformación como se muestra en fórmula (Ia)



(Ia),

3. El compuesto para su uso según la reivindicación 1 o 2, en el que Y de los compuestos de fórmula (I) o (Ia) es  $-(CH_2)_3-$ .

4. El compuesto para su uso según la reivindicación 3, en el que el sustituyente de los compuestos de fórmula (I) o (Ia)

Y es  $-(CH_2)_3-$ ;

$R^2$  es  $-(CH_2)_k-N-C(Ph)_3$ , cuyos anillos de fenilo están sin sustituir o independientemente sustituidos con  $-O$ -alquilo ( $C_{1-4}$ ); y

$R^3$  es  $-NH$ -fenilo, cuyo grupo fenilo está adicionalmente sustituido con  $-(CH_2)-O-C(O)-O-(4$ -nitro-fenilo);

n es 0; y

$R^1$  y k tienen los significados dados en la reivindicación 1.

5. El compuesto para su uso según las reivindicaciones 1 o 2, en el que sustituyente Y de los compuestos de fórmula (I) o (Ia) es  $-C(O)-N-(CH_2-CH_2-O)_p-CH_2-CH_2-$ ;

6. El compuesto para su uso según la reivindicación 5, en el que el sustituyente de los compuestos de fórmula (I) o (Ia)

Y es  $-C(O)-N-(CH_2-CH_2-O)_p-CH_2-CH_2-$ ;

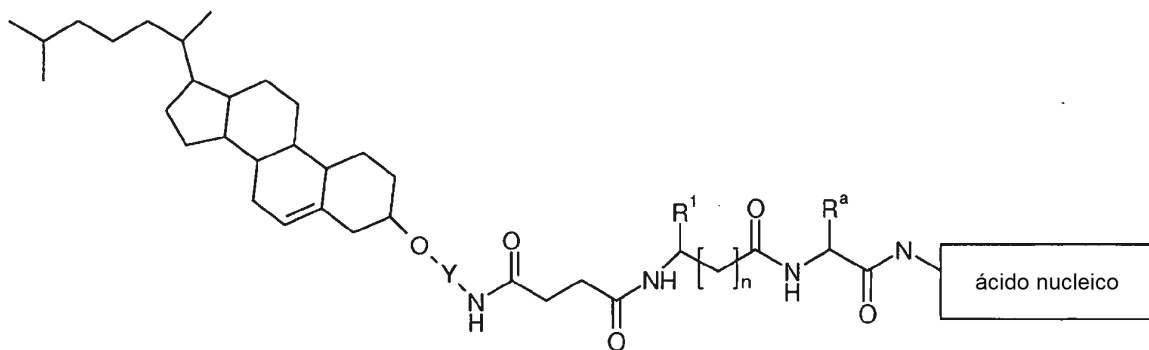
$R^2$  es  $-(CH_2)_k-N-C(Ph)_3$ , cuyos anillos de fenilo están sin sustituir o independientemente sustituidos con  $-O$ -alquilo ( $C_{1-4}$ ); y

$R^3$  es  $-NH$ -fenilo, cuyo grupo fenilo está adicionalmente sustituido con  $-(CH_2)-O-C(O)-O-(4$ -nitro-fenilo);

n es 0; y

$R^1$ , k y p tienen los significados dados en la reivindicación 1.

7. Un compuesto de la fórmula



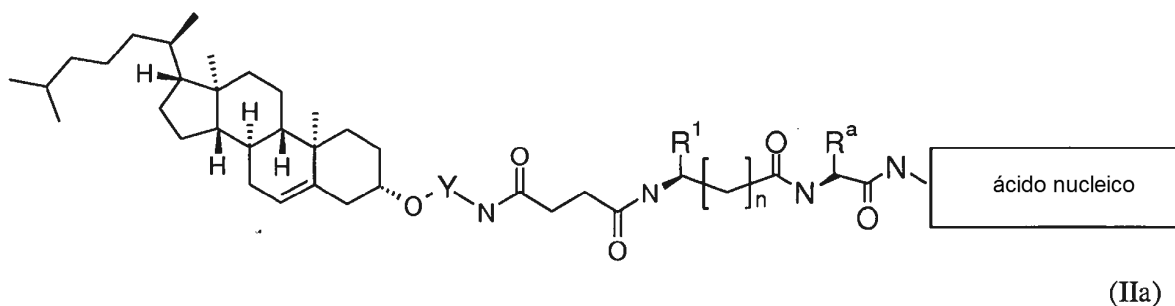
(II),

en la que

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

$R^1$  y k tienen los significados dados para la fórmula (I) en la reivindicación 1.

8. El compuesto de la reivindicación 7, que tiene la conformación como se muestra en la fórmula (IIa)



5 en la que

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

$R^1$  y  $k$  tienen los significados dados para la fórmula (I) en la reivindicación 1.

10 9. El compuesto de la reivindicación 7 u 8, en el que el ácido nucleico es un oligonucleótido que comprende una hebra no codificante con el patrón de modificación 5'-(w)- (Z1)- (Z2)- (Z3) $n_a$ -3' y una hebra codificante con el patrón de modificación 5'- (Z3) $n_s$ -3', en las que w es independientemente un 5'-fosfato o 5'-fosfotioato o H, Z1 es independientemente un nucleótido modificado en 2', Z2 es independientemente un 2'-desoxi-nucleótido o nucleótido modificado con 2'-flúor, Z3 es independientemente un nucleótido modificado en 2',  $n_a$  es 8-23 y  $n_s$  es 8-25.

20 10. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, en el que el ácido nucleico es un ARNip.

11. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9 para la co-administración con un polímero de administración.

25 12. Una composición farmacéutica que comprende los compuestos de cualquiera de las reivindicaciones 8 a 12.

Fig. 1

[apoB] por ELISA normalizada a RD-02788

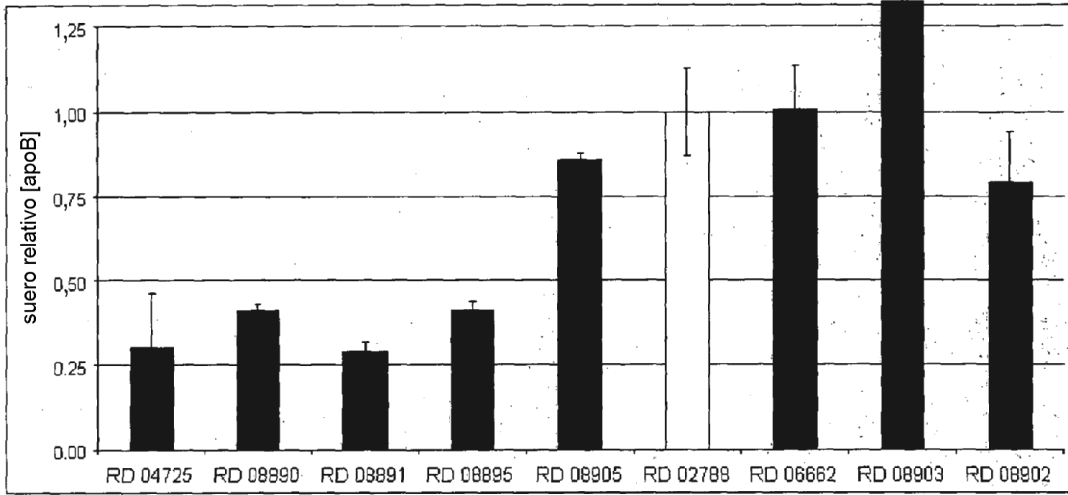


Fig. 2

[apoB] por ELISA normalizada a RD-02788

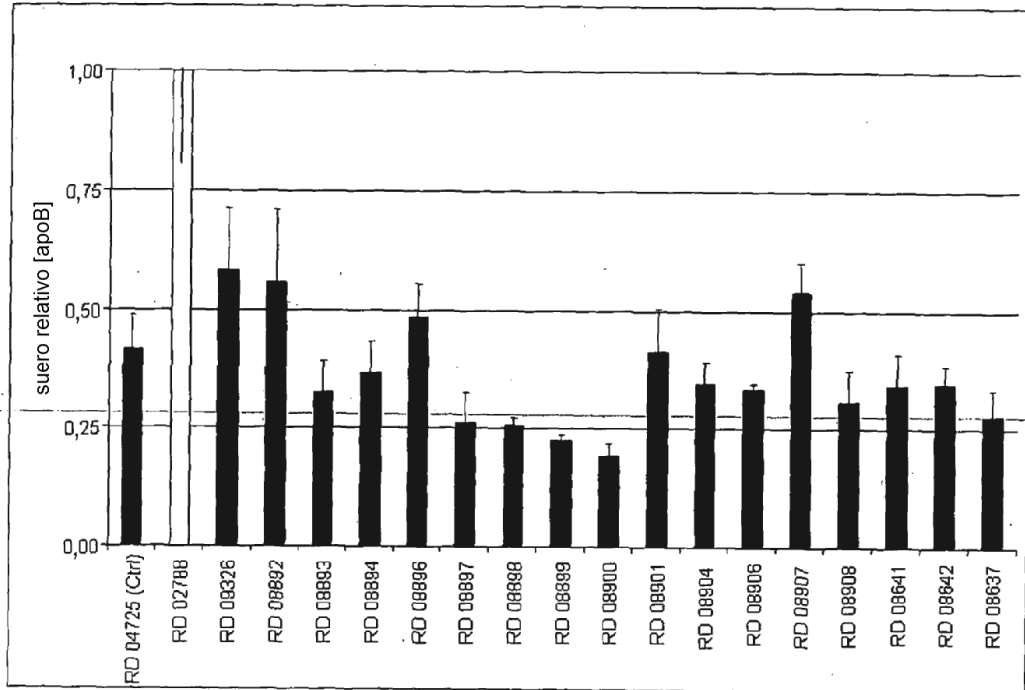


Fig. 3

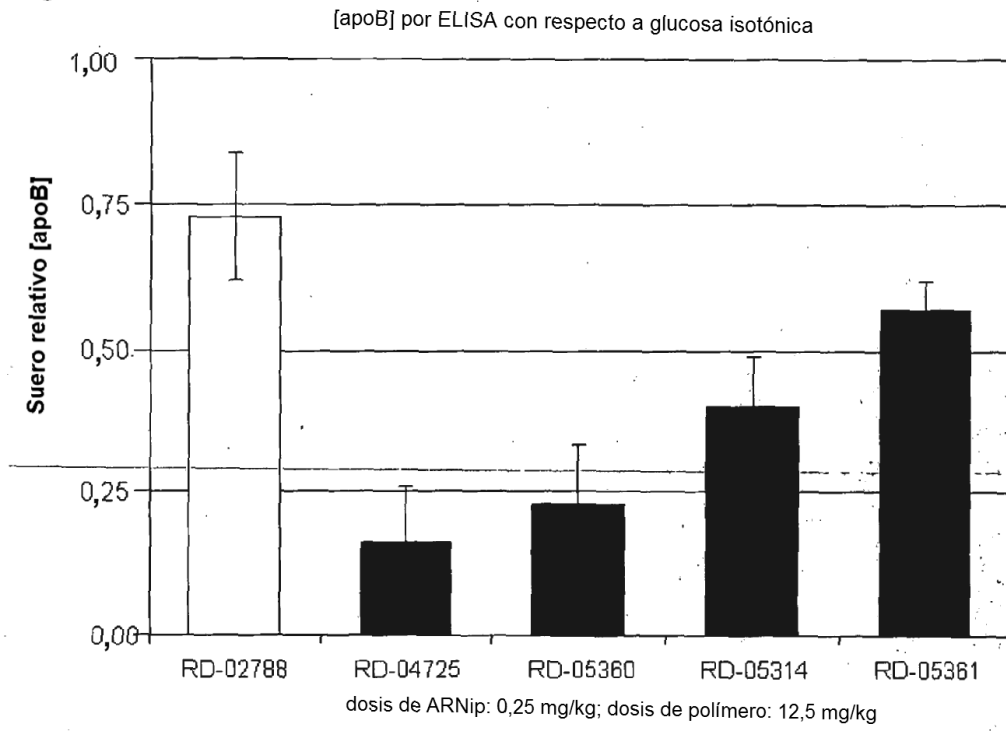




Fig. 4

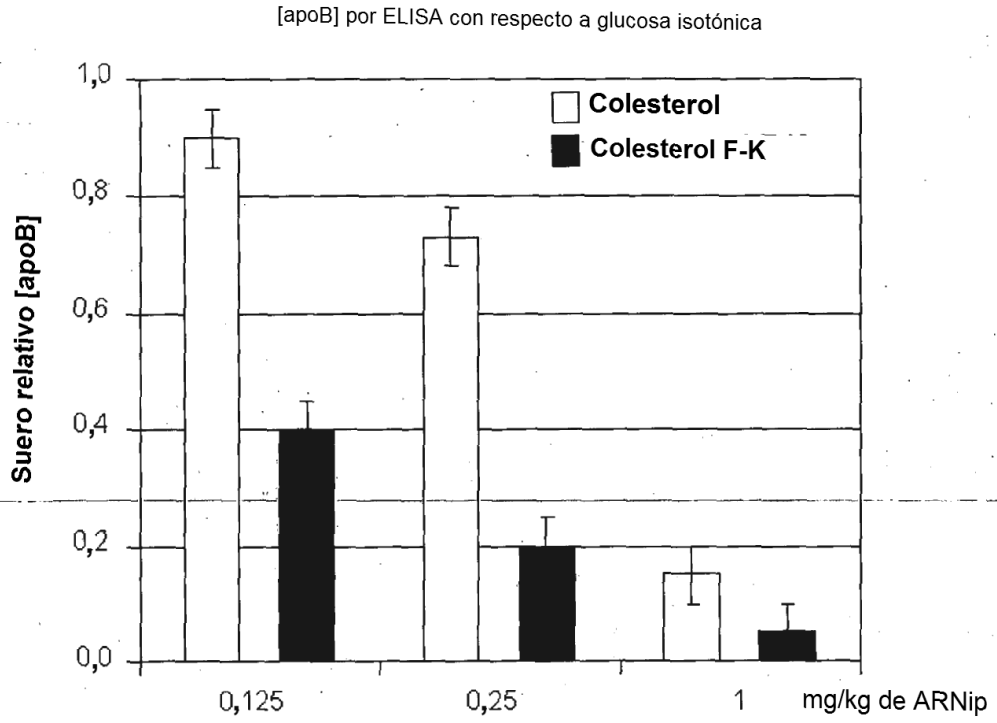


Fig. 5 a)

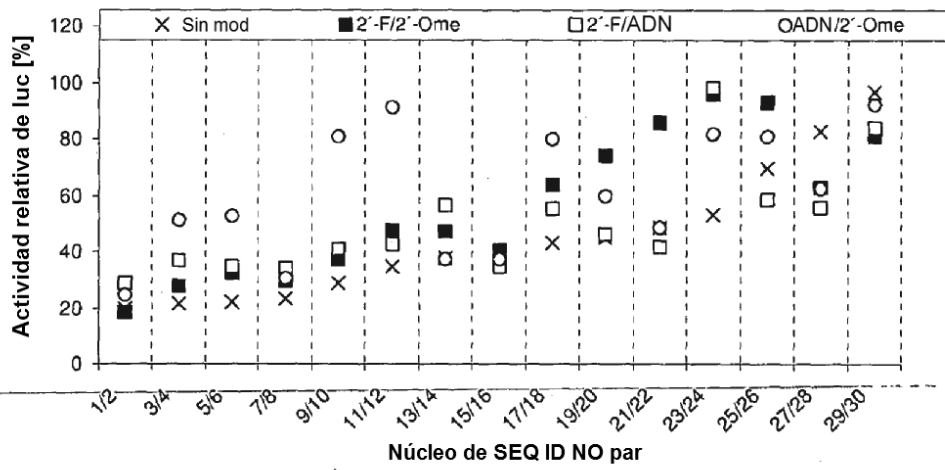


Fig. 5 b)

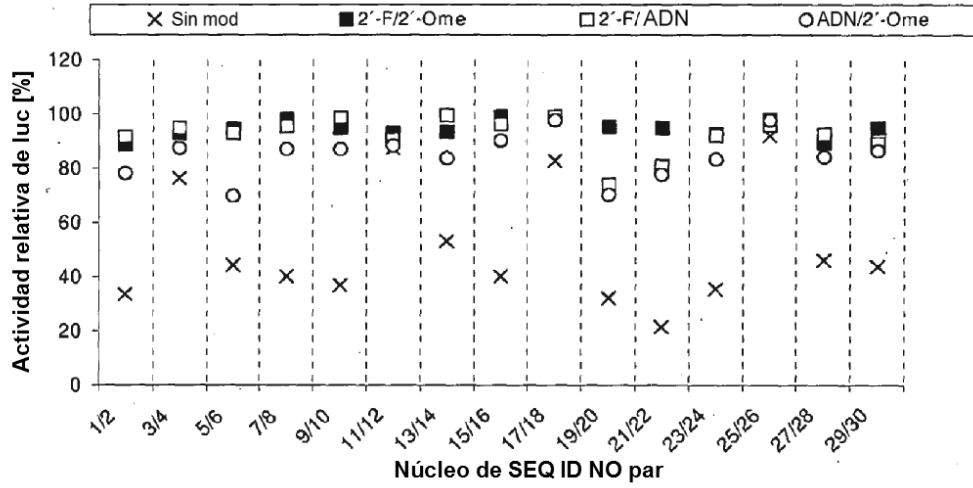


Fig. 6 a)

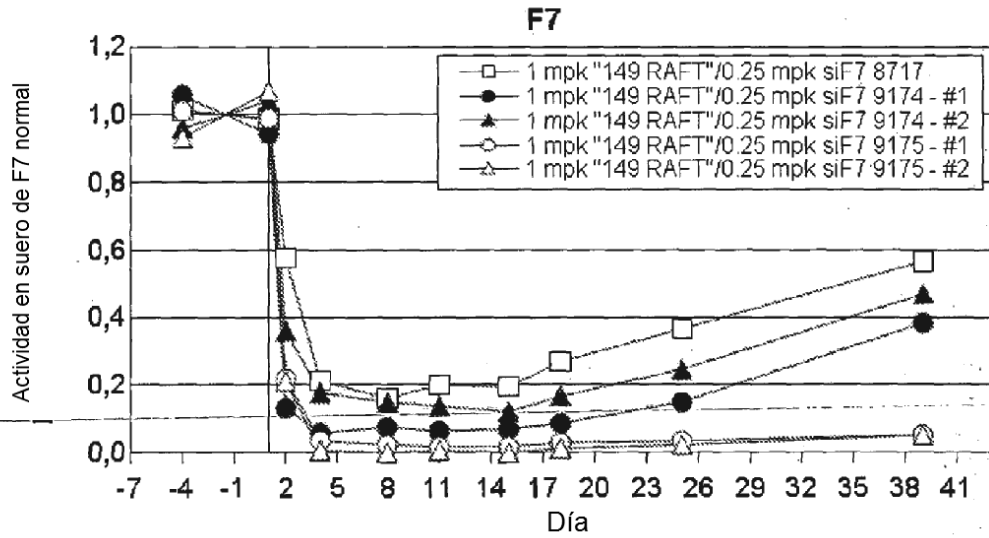


Fig. 6 b)

