

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 640 260**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/113** (2010.01)

**A61K 31/713** (2006.01)

**A61P 43/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.04.2013 PCT/US2013/036006**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.10.2013 WO13155204**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.04.2013 E 13721433 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.06.2017 EP 2836595**

54 Título: **Composiciones y métodos para inhibir la expresión del Gen alas1**

30 Prioridad:

**10.04.2012 US 201261622288 P**

**15.03.2013 US 201313835613**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**02.11.2017**

73 Titular/es:

**ALNYLAM PHARMACEUTICALS, INC. (50.0%)**

**300 Third Street**

**Cambridge, MA 02142, US y**

**ICAHN SCHOOL OF MEDICINE AT MOUNT SINAI**

**(50.0%)**

72 Inventor/es:

**BETTENCOURT, BRIAN;**

**FITZGERALD, KEVIN;**

**QUERBES, WILLIAM;**

**YASUDA, MAKIKO y**

**DESNICK, ROBERT, J.**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

ES 2 640 260 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

Composiciones y métodos para inhibir la expresión del Gen alas1

La invención se define mediante las reivindicaciones. Esta se refiere a la inhibición específica de la expresión del gen ALAS1.

5 Las porfirias hereditarias constituyen una familia de trastornos provocados por la actividad deficiente de enzimas específicas en la vía biosintética del grupo hemo, que también se denomina en la presente vía de las porfirinas. La deficiencia de las enzimas de la vía de las porfirinas conlleva una producción insuficiente del grupo hemo y una acumulación de porfirinas y precursores de estas, que son tóxicos para los tejidos en concentraciones elevadas.

10 Entre las porfirias heredadas, la porfiria intermitente aguda (AIP, por sus siglas en inglés, p. ej., AIP dominante autosómica), la porfiria variegata (VP, por sus siglas en inglés, p. ej., VP dominante autosómica), coproporfirina hereditaria (coproporfirina o HCP, por sus siglas en inglés, p. ej., HCP dominante autosómica) y la porfiria por deficiencia de ácido 5'-aminolevulínico (también conocido como ácido δ-aminolevulínico o ALA) deshidratasa (ADP, por sus siglas en inglés, p. ej., ADP recesiva autosómica) se clasifican como porfirias hepáticas agudas y se manifiestan mediante ataques neurológicos agudos que pueden resultar mortales. Los ataques agudos se caracterizan por síntomas del sistema nervioso central, autonómico y periférico, que incluyen dolor abdominal intenso, hipertensión, taquicardias, estreñimiento, debilidad motriz, parálisis y convulsiones. Si no se tratan debidamente, pueden provocar tetraplegia, deficiencia respiratoria y defunción. Varios factores, que incluyen los fármacos que inducen el citocromo P450, la dieta y los cambios hormonales, pueden precipitar los ataques agudos mediante el incremento de la actividad de la ácido 5'-aminolevulínico-sintasa 1 hepática (ALAS1), que es la primera enzima, y a la vez la enzima limitante de la velocidad, de la vía biosintética del grupo hemo. En las porfirias agudas, p. ej., AIP, VP, HCP y ADP, las deficiencias enzimáticas respectivas provocan la producción y la acumulación hepática de una o más sustancias (p. ej., porfirinas y/o precursores de porfirinas, p. ej., ALA y/o PBG) que pueden ser neurotóxicas y que pueden provocar la aparición de ataques agudos. Remítase, p. ej., a Balwani, M y Desnick, R.J., Blood, 120:4496-4504, 2012.

25 La terapia actual para los ataques neurológicos agudos consiste en la administración intravenosa de hemina (Panhematin®, Lundbeck o Normosang®, Orphan Europe), que proporciona el grupo hemo exógeno para la inhibición por retroalimentación negativa de ALAS1 y, por consiguiente, reduce la producción de ALA y PBG. La hemina se utiliza para el tratamiento durante un ataque agudo y para la prevención de ataques, particularmente en mujeres con porfirias agudas que experimentan ataques frecuentes con los cambios hormonales durante sus ciclos menstruales. Aunque generalmente los pacientes responden bien, su efecto es lento, normalmente lleva de dos a cuatro días o más normalizar las concentraciones de ALA y PBG en orina hasta niveles normales. Debido a que la hemina intravenosa se metaboliza rápidamente, normalmente son necesarias de tres a cuatro infusiones para tratar o prevenir eficazmente un ataque agudo. Además, las infusiones repetidas pueden provocar una sobrecarga de hierro y flebitis, las cuales pueden dificultar el acceso venoso periférico. Aunque el trasplante de hígado ortotrófico es curativo, este procedimiento presenta una morbilidad y una mortalidad significativas y la disponibilidad de donantes de hígado es limitada. Por consiguiente, se necesita una estrategia terapéutica alternativa que sea más eficaz, que actúe rápido y que sea segura. Sería particularmente favorable si un tratamiento de este tipo se pudiera suministrar mediante una administración subcutánea, ya que esto eliminaría la necesidad de infusiones y de una hospitalización prolongada.

40 La AIP, también denominada deficiencia de porfobilinógeno-desaminasa (PBGD) o deficiencia de hidroximetilbilano-sintasa (HMBS), es la porfiria hepática aguda más común. Es un trastorno dominante autosómico provocado por mutaciones en el gen *HMBS* que dan como resultado una actividad reducida, p. ej., seminormal de la enzima. Previamente, se ha generado por recombinación homóloga un modelo en ratones de AIP que presenta ~30% de actividad HMBS de origen natural. Del mismo modo que los pacientes humanos, estos ratones incrementan la actividad ALAS1 hepática y acumulan grandes cantidades de ALA y PBG urinarias y en plasma cuando se les administran fármacos porfirinogénicos tales como el fenobarbital. Por lo tanto, sirven como un modelo excelente para evaluar la eficacia de agentes terapéuticos novedosos para las porfirias hepáticas agudas.

50 Yin et al. (Science 318, 1786-1789 (2007)) describen Rev-erb, un hemossensor que coordina las vías metabólicas y circadianas. Schultz et al. (Silence 2, 3 (2011)) describen que los efectos secundarios dominan un cribado de iARN a gran escala para moduladores de la vía de TGF- $\beta$ . Estall et al. (PNAS 106, 22510-22515 (2009)) describen que PGC-1 regula de forma negativa la expresión hepática de FGF21. El documento WO 2007/131274 describe ácidos ribonucleicos interferentes cortos para tratar enfermedades alérgicas. El documento EP 1 752 536 describe un polinucleótido que provoca interferencia de ARN.

55 La presente invención se refiere a un ácido ribonucleico bicatenario (ARNbc) para inhibir la expresión de ALAS1, donde el ARNbc comprende:

- (i) una hebra antisentido complementaria respecto a al menos los nucleótidos 871-889 de la SEQ ID NO:1;
- (ii) una hebra sentido que comprende al menos 15 nucleótidos contiguos de la SEQ ID NO:1295; y

(iii) un ligando de uno o más derivados de tipo N-acetilgalactosamina (GalNAc).

La divulgación describe métodos y composiciones de ARNi para modular la expresión de un gen ALAS1. La expresión de un gen ALAS1 se reduce o inhibe utilizando un ARNi específico para ALAS1. Tal inhibición puede ser útil en el tratamiento de trastornos relacionados con la expresión de ALAS1 tales como las porfirias.

5 Por consiguiente, en la presente se describen composiciones y métodos que producen la escisión mediada por el complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC, por sus siglas en inglés) de transcritos de ARN del gen ALAS1, por ejemplo, en una célula o en un sujeto (p. ej., en un mamífero tal como un sujeto humano). También se describen composiciones y métodos para tratar un trastorno relacionado con la expresión de un gen ALAS1, tal como una porfiria, p. ej., anemia sideroblástica relacionada con X (XLSA, por sus siglas en inglés), porfiria debida a la deficiencia de ALA-deshidratasa (porfiria de Doss o ADP, por sus siglas en inglés), porfiria intermitente aguda (AIP, por sus siglas en inglés), porfiria eritropoyética congénita (CEP, por sus siglas en inglés), porfiria cutánea tardía (PCT), coproporfiria hereditaria (coproporfiria o HCP), porfiria variegata (VP), protoporfiria eritropoyética (EPP, por sus siglas en inglés) o eritroporfiria transitoria de la infancia. El trastorno puede ser una porfiria hepática aguda, p. ej., una porfiria debida a la deficiencia de ALA-deshidratasa (ADP), AIP, HCP o VP. El trastorno puede ser una porfiria debida a la deficiencia de ALA-deshidratasa (ADP) o AIP.

En algunas realizaciones, la porfiria es una porfiria hepática, p. ej., una porfiria seleccionada entre porfiria intermitente aguda (AIP), coproporfiria hereditaria (HCP), porfiria variegata (VP), porfiria debida a la deficiencia de ALA-deshidratasa (ADP) y porfiria hepatoeritropoyética. La porfiria puede ser una porfiria hepática dominante homocigótica (p. ej., AIP, HCP o VP dominante homocigótica) o una porfiria hepatoeritropoyética. La porfiria puede ser una porfiria dual.

Las expresiones "ARNi", "iARN", "agente de ARNi" o "agente de iARN", tal como se utilizan en la presente, se refieren a un agente que contiene ARN, tal como se define este término en la presente, y el cual media la escisión dirigida de un transcrito de ARN, p. ej., mediante una vía del complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC). Un ARNi, tal como se describe en la presente, ejerce la inhibición de la expresión de ALAS1 en una célula o mamífero.

Los ARNi incluidos en las composiciones que se exponen en la presente engloban un ARNbc que tiene una hebra de ARN (la hebra antisentido) que tiene una región, p. ej., una región con una longitud de 30 nucleótidos o inferior, generalmente de 19-24 nucleótidos, que es sustancialmente complementaria respecto a al menos parte de un transcrito de ARNm de un gen ALAS1 (p. ej., un gen ALAS1 humano o de ratón) (también denominado en la presente "ARNi específico para ALAS1"). Como alternativa o de forma combinada, los ARNi engloban un ARNbc que tiene una hebra de ARN (la hebra antisentido) que tiene una región con una longitud de 30 nucleótidos o inferior, generalmente de 19-24 nucleótidos, que es sustancialmente complementaria respecto a al menos parte de un transcrito de ARNm de un gen ALAS1 (p. ej., una variante humana 1 o 2 de un gen ALAS1) (también denominado en la presente "ARNi específico para ALAS1").

El ARNi (p. ej., ARNbc) descrito en la presente puede comprender una hebra antisentido que tiene una región que es sustancialmente complementaria respecto a una región de un ALAS1 humano. El gen ALAS1 humano puede presentar la secuencia de NM\_000688.4 (SEQ ID NO:1) o NM\_000688.5 (SEQ ID NO:382).

Un ARNi puede englobar un ARNbc que tiene una hebra de ARN (la hebra antisentido) que tiene una región que es sustancialmente complementaria respecto a una porción de un ARNm de ALAS1 de acuerdo con cualquiera de las Tablas 2, 3, 6, 7, 8, 9, 14, 15, 18 o 20. El ARNi puede englobar un ARNbc que tiene una hebra de ARN (la hebra antisentido) que tiene una región que es sustancialmente complementaria respecto a una porción de un ARNm de ALAS1, p. ej., un ARNm de ALAS1 humano (p. ej., un ARNm de ALAS1 humano como el que se proporciona en la SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO:382).

Un ARNi para inhibir la expresión de un gen ALAS1 incluye al menos dos secuencias que son complementarias entre sí. El ARNi incluye una hebra sentido que tiene una primera secuencia y una hebra antisentido que tiene una segunda secuencia. La hebra antisentido incluye una secuencia de nucleótidos que es sustancialmente complementaria respecto a al menos parte de un ARNm que codifica un transcrito de ALAS1, y la región de complementariedad tiene una longitud de 30 nucleótidos o inferior, y de al menos 15 nucleótidos. Generalmente, el ARNi tiene una longitud de 19-24 nucleótidos.

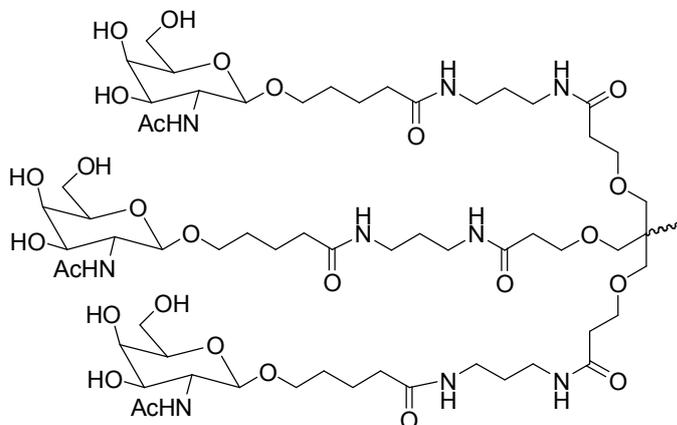
El ARNi puede tener una longitud de 19-21 nucleótidos. El ARNi puede tener una longitud de 19-21 nucleótidos y se encuentra en una formulación lipídica, p. ej., una formulación de nanopartículas lipídicas (LNP, por sus siglas en inglés) (p. ej., una formulación LNP11).

El ARNi puede tener una longitud de 21-23 nucleótidos. El ARNi puede tener una longitud de 21-23 nucleótidos y se encuentra en forma de conjugado, p. ej., conjugado con uno o más derivados de tipo GalNAc según se describe en la presente.

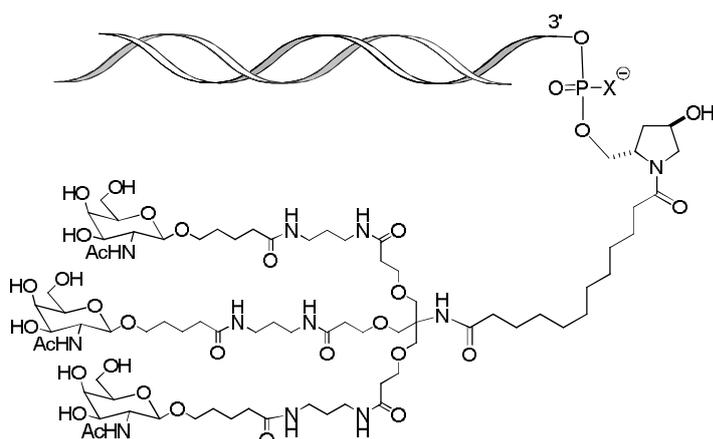
- 5 El ARNi puede tener una longitud comprendida entre aproximadamente 15 y aproximadamente 25 nucleótidos o una longitud comprendida entre aproximadamente 25 y aproximadamente 30 nucleótidos. Un ARNi que tenga ALAS1 como diana, cuando entra en contacto con una célula que expresa ALAS1, inhibe la expresión de un gen ALAS1 al menos un 10%, al menos un 20%, al menos un 25%, al menos un 30%, al menos un 35% o al menos un 40% o más, tal como se evalúa utilizando un método como los que se describen en la presente. El ARNi que tiene ALAS1 como diana se puede formular en una partícula de ácido nucleico-lípido estable (SNALP, por sus siglas en inglés).
- 10 Un ARNi (p. ej., un ARNbc) que se expone en la presente incluye una primera secuencia de un ARNbc que se selecciona a partir del grupo constituido por las secuencias sentido de las Tablas 2, 3, 6, 7, 8, 9, 14 y 15 y una segunda secuencia que se selecciona a partir del grupo constituido por las secuencias antisentido correspondientes de las Tablas 2, 3, 6, 7, 8, 9, 14 y 15.
- 15 Un ARNi (p. ej., un ARNbc) que se expone en la presente incluye una primera secuencia de un ARNbc que se selecciona a partir del grupo constituido por las secuencias sentido de las Tablas 2, 3, 6, 7, 8, 9, 14, 15, 18 y 20 y una segunda secuencia que se selecciona a partir del grupo constituido por las secuencias antisentido correspondientes de las Tablas 2, 3, 6, 7, 8, 9, 14, 15, 18 y 20. Un ARNi (p. ej., un ARNbc) que se expone en la presente puede tener las secuencias sentido y/o antisentido seleccionadas entre las de AD-58882, AD-58878, AD-58886, AD-58877, AD-59115, AD-58856, AD-59129, AD-59124, AD-58874, AD-59125, AD-59105, AD-59120, AD-59122, AD-59106, AD-59126 y AD-59107 tal como se describe en los Ejemplos. El ARNi (p. ej., ARNbc) puede tener las secuencias sentido y/o antisentido seleccionadas entre las de AD-58882, AD-58878, AD-58886, AD-58877, AD-59115, AD-58856 y AD-59129.
- 20 Las moléculas de ARNi que se exponen en la presente pueden incluir nucleótidos de origen natural o pueden incluir al menos un nucleótido modificado, que incluye, sin carácter limitante, un nucleótido con una modificación de tipo 2'-O-metilo, un nucleótido con un grupo 5'-fosforotioato y un nucleótido terminal unido a un derivado de tipo colestero. Como alternativa, el nucleótido modificado se puede seleccionar a partir del grupo constituido por: un nucleótido con una modificación de tipo 2'-desoxi-2'-fluoro, un nucleótido con una modificación de tipo 2'-desoxi, un nucleótido bloqueado, un nucleótido que no sea básico, un nucleótido con una modificación de tipo 2'-amino, un nucleótido con una modificación de tipo 2'-alquilo, un nucleótido de tipo morfolino, un fosforamidato y un nucleótido que comprende una base que no sea natural. Una secuencia modificada de este tipo se puede basar, p. ej., en una primera secuencia de dicho ARNi seleccionada a partir del grupo constituido por las secuencias sentido de la Tabla 2 y una segunda secuencia seleccionada a partir del grupo constituido por las secuencias antisentido correspondientes de la Tabla 2.
- 25
- 30 Un ARNi (p. ej., un ARNbc) que se expone en la presente puede comprender una hebra sentido que comprende una secuencia seleccionada a partir del grupo constituido por la SEQ ID NO:330, SEQ ID NO:334, SEQ ID NO:342, SEQ ID NO:344, SEQ ID NO:346, SEQ ID NO:356, SEQ ID NO:358, SEQ ID NO:362, SEQ ID NO:366, SEQ ID NO:376 y SEQ ID NO:380.
- 35 Un ARNi (p. ej., un ARNbc) que se expone en la presente puede comprender una hebra antisentido que comprende una secuencia seleccionada a partir del grupo constituido por la SEQ ID NO:331, SEQ ID NO:335, SEQ ID NO:343, SEQ ID NO:345, SEQ ID NO:347, SEQ ID NO:357, SEQ ID NO:359, SEQ ID NO:363, SEQ ID NO:367, SEQ ID NO:377 y SEQ ID NO:381.
- 40 Un ARNi (p. ej., un ARNbc) que se expone en la presente puede comprender una hebra sentido que comprende una secuencia seleccionada a partir del grupo constituido por la SEQ ID NO:140, SEQ ID NO:144, SEQ ID NO:152, SEQ ID NO:154, SEQ ID NO:156, SEQ ID NO:166, SEQ ID NO:168, SEQ ID NO:172, SEQ ID NO:176, SEQ ID NO:186 y SEQ ID NO:190. Un ARNi (p. ej., un ARNbc) que se expone en la presente puede comprender una hebra antisentido que comprende una secuencia seleccionada a partir del grupo constituido por la SEQ ID NO:141, SEQ ID NO:145, SEQ ID NO:153, SEQ ID NO:155, SEQ ID NO:157, SEQ ID NO:167, SEQ ID NO:169, SEQ ID NO:173, SEQ ID NO:177, SEQ ID NO:187 y SEQ ID NO:191.
- 45
- 50 Un ARNi según se describe en la presente puede tener como diana una variante de un transcrito de ARN de ALAS1 de origen natural y, en otra realización, el ARNi tienen como diana un transcrito mutado (p. ej., un ARN de ALAS1 portador de una variante alélica). Por ejemplo, un ARNi puede tener como diana una variante polimórfica tal como un polimorfismo de un único nucleótido (SNP, por sus siglas en inglés) de ALAS1. El ARNi puede tener como diana tanto un transcrito de ALAS1 mutado como uno de origen natural. El ARNi puede tener como diana una variante de un transcrito particular de ALAS1 (p. ej., la variante 1 de ALAS1 humano). El agente de ARNi puede tener como diana múltiples variantes del transcrito (p. ej., tanto la variante 1 como la variante 2 de ALAS1 humano).
- Un ARNi puede tener como diana una región no codificante de un transcrito de ARN de ALAS1 tal como la región no traducida 5' o 3' de un transcrito.
- 55 Un ARNi según se describe en la presente se encuentra en forma de conjugado, p. ej., un conjugado con un carbohidrato, el cual puede actuar como un resto y/o ligando de direccionamiento, según se describe en la presente. El conjugado puede estar unido al extremo 3' de la hebra sentido del ARNbc. El conjugado puede estar unido mediante un conector, p. ej., mediante un conector ramificado bivalente o trivalente.

El conjugado puede comprender uno o más derivados de tipo *N*-acetilgalactosamina (GalNAc). Tal conjugado también se denomina en la presente conjugado de tipo GalNAc. El conjugado puede dirigir el agente de iARN hacia una célula particular, p. ej., una célula hepática, p. ej., un hepatocito. Los derivados de tipo GalNAc se pueden unir mediante un conector, p. ej., un conector ramificado bivalente o trivalente. El conjugado puede ser

5

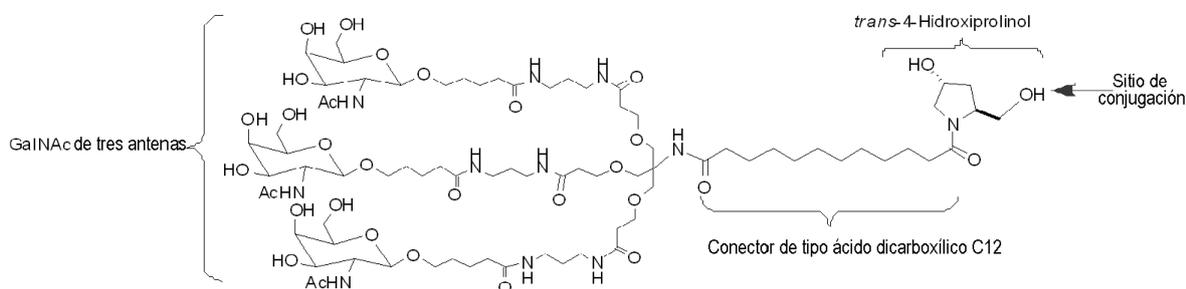


El agente de iARN puede estar unido al conjugado de tipo carbohidrato mediante un conector, p. ej., un conector como el que se muestra en la siguiente representación esquemática, donde X es O o S



X puede ser O. X puede ser S.

10 En algunas realizaciones, el agente de iARN se conjuga a L96 según se define en la Tabla 1 y se muestra a continuación

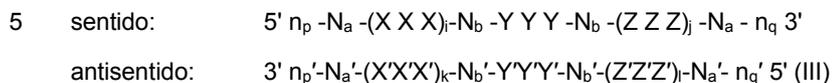


15

En un aspecto, se proporciona en la presente una composición farmacéutica para inhibir la expresión de un gen ALAS1 en un organismo, generalmente un sujeto humano. La composición incluye normalmente uno o más de los ARNi descritos en la presente y un portador o vehículo de suministro farmacéuticamente aceptable. La composición se puede utilizar para tratar una porfiria, p. ej., AIP.

Se describe un ácido ribonucleico bicatenario (ARNbc) para inhibir la expresión de ALAS1, donde dicho ARNbc comprende una hebra sentido y una hebra antisentido con una longitud de 15-30 pares de bases y la hebra antisentido es complementaria respecto a al menos 15 nucleótidos contiguos de la SEQ ID NO: 1 o 382.

Se describe un ARNi bicatenario (ARNbc) que comprende una hebra sentido complementaria respecto a una hebra antisentido, donde dicha hebra antisentido comprende una región de complementariedad respecto a un transcrito de ARN de ALAS1, donde cada hebra tiene de aproximadamente 14 a aproximadamente 30 nucleótidos, donde dicho agente de iARN bicatenario se representa mediante la fórmula (III):



donde:

i, j, k, y l son cada uno independientemente 0 o 1;

p, p', q y q' son cada uno independientemente 0-6;

10 cada  $N_a$  y  $N_{a'}$  representa independientemente una secuencia oligonucleotídica que comprende 0-25 nucleótidos, los cuales están modificados o no modificados, o combinaciones de estos, comprendiendo cada secuencia al menos dos nucleótidos modificados de forma diferente;

cada  $N_b$  y  $N_{b'}$  representa independientemente una secuencia oligonucleotídica que comprende 0-10 nucleótidos, los cuales están modificados o no modificados, o combinaciones de estos;

15 cada  $n_p$ ,  $n_{p'}$ ,  $n_q$  y  $n_{q'}$  representa independientemente un nucleótido protuberante;

XXX, YYY, ZZZ, X'X'X', Y'Y'Y' y Z'Z'Z' representan cada uno independientemente un motivo de tres modificaciones idénticas en tres nucleótidos consecutivos;

las modificaciones en  $N_b$  difieren de la modificación en Y y las modificaciones en  $N_{b'}$  difieren de la modificación en Y'.

La hebra sentido puede estar conjugada con al menos un ligando.

20 Se describe que i es 1; j es 1; o tanto i como j son 1.

Se describe que k es 1; l es 1; o tanto k como l son 1.

Se describe que XXX es complementario respecto a X'X'X', YYY es complementario respecto a Y'Y'Y' y ZZZ es complementario respecto a Z'Z'Z'.

Se describe que el motivo Y'Y'Y' se encuentra en las posiciones 11, 12 y 13 de la hebra antisentido del extremo 5'.

25 Se describe que Y' es 2'-O-metilo.

Se describe que la región dúplex tiene una longitud de 15-30 pares de nucleótidos.

Se describe que la región dúplex tiene una longitud de 17-23 pares de nucleótidos.

Se describe que la región dúplex tiene una longitud de 19-21 pares de nucleótidos.

Se describe que la región dúplex tiene una longitud de 21-23 pares de nucleótidos.

30 Se describe que las modificaciones de los nucleótidos se seleccionan a partir del grupo constituido por LNA, HNA, CeNA, 2'-metoxietilo, 2'-O-alquilo, 2'-O-alilo, 2'-C-alilo, 2'-fluoro, 2'-desoxi, 2'-hidroxilo y combinaciones de estas.

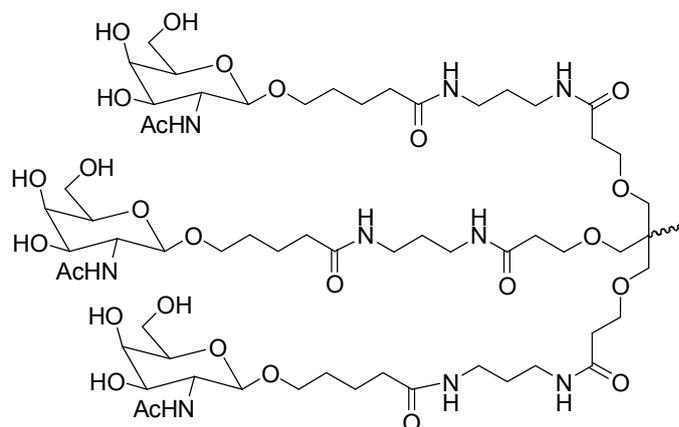
Se describe que las modificaciones de los nucleótidos son 2'-O-metilo, 2'-fluoro o ambas.

Se describe que el ligando comprende un carbohidrato.

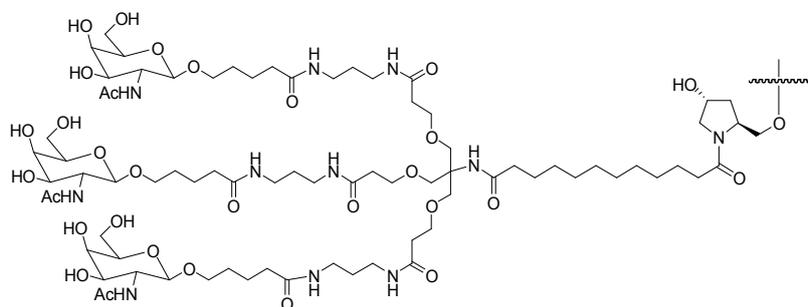
Se describe que el ligando está unido mediante un conector.

35 Se describe que el conector es un conector ramificado bivalente o trivalente.

Se describe que el ligando es



Se describe que el ligando y el conector son como se muestran en la Fórmula XXIV:



Se describe que el ligando está unido al extremo 3' de la hebra sentido.

- 5 El ARNbc puede tener (p. ej., comprender) una secuencia de nucleótidos seleccionada a partir del grupo de secuencias proporcionadas en las Tablas 2 y 3. El ARNbc puede tener una secuencia de nucleótidos seleccionada a partir del grupo de secuencias proporcionadas en las Tablas 2, 3, 6, 7, 8 y 9. El ARNbc puede tener una secuencia de nucleótidos seleccionada a partir del grupo de secuencias proporcionadas en las Tablas 2, 3, 6, 7, 8, 9, 14 y 15. El ARNbc puede tener una secuencia de nucleótidos seleccionada a partir del grupo de secuencias proporcionadas en las Tablas 2, 3, 6, 7, 8, 9, 14, 15, 18 y 20. El ARNbc puede tener una secuencia de nucleótidos que se describe en la Tabla 18. El ARNbc puede tener una secuencia de nucleótidos seleccionada a partir del grupo de secuencias proporcionadas en las Tablas 14 y 15.

El ARNbc puede tener una secuencia de nucleótidos seleccionada a partir del grupo de secuencias proporcionadas en las Tablas 3 y 8.

- 15 En un aspecto adicional, un ARNi proporcionado en la presente es un ácido ribonucleico bicatenario (ARNbc) para inhibir la expresión de ALAS1, donde dicho ARNbc comprende una hebra sentido y una hebra antisentido, comprendiendo la hebra antisentido una región de complementariedad respecto a un transcrito de ARN de ALAS1, donde la hebra antisentido comprende al menos 15 nucleótidos contiguos que no difieren en más de 3 nucleótidos de una de las secuencias antisentido enumeradas en cualquiera de las Tablas 2, 3, 6, 7, 8, 9, 14, 15, 18 o 20. Las secuencias sentido y antisentido se pueden seleccionar entre las de los dúplex AD-58882, AD-58878, AD-58886, AD-58877, AD-59115, AD-58856, AD-59129, AD-59124, AD-58874, AD-59125, AD-59105, AD-59120, AD-59122, AD-59106, AD-59126 y AD-59107 según se describe en la presente en los Ejemplos. Las secuencias sentido y antisentido se pueden seleccionar entre las de los dúplex AD-58882, AD-58878, AD-58886, AD-58877, AD-59115, AD-58856 y AD-59129. Las secuencias sentido y antisentido pueden ser las del dúplex AD-58632. Las secuencias sentido y antisentido se pueden seleccionar entre las de los dúplex AD-59453, AD-59395, AD-59477 y AD-59492. Las secuencias sentido y antisentido pueden ser las de un dúplex descrito en la presente que suprime la expresión del ARNm de ALAS1 al menos un 50%, 60%, 70%, 80%, 85% o 90%, p. ej., según se evalúa utilizando un ensayo descrito en los Ejemplos que se proporcionan en la presente.

En algunas realizaciones, el ARNbc comprende al menos un nucleótido modificado.

- 30 En algunas realizaciones, al menos uno de los nucleótidos modificados se selecciona a partir del grupo constituido por: un nucleótido con una modificación de tipo 2'-O-metilo, un nucleótido que comprende un grupo 5'-fosforotioato y un nucleótido terminal unido a un derivado de tipo colesterilo o un grupo de tipo bisdecilamida del ácido dodecanoico.

- 5 En algunas realizaciones, el nucleótido modificado se selecciona a partir del grupo constituido por: un nucleótido con una modificación de tipo 2'-desoxi-2'-fluoro, un nucleótido con una modificación de tipo 2'-desoxi, un nucleótido bloqueado, un nucleótido que no sea básico, un nucleótido con una modificación de tipo 2'-amino, un nucleótido con una modificación de tipo 2'-alquilo, un nucleótido de tipo morfolino, un fosforamidato y un nucleótido que comprende una base que no sea natural.
- Se describe que la región de complementariedad tiene una longitud de al menos 17 nucleótidos.
- Se describe que la región de complementariedad tiene una longitud comprendida entre 19 y 21 nucleótidos.
- Se describe que la región de complementariedad tiene una longitud de 19 nucleótidos.
- Se describe que cada hebra tiene una longitud que no es superior a 30 nucleótidos.
- 10 Se describe que al menos una hebra comprende una protuberancia 3' de al menos 1 nucleótido.
- Se describe que al menos una hebra comprende una protuberancia 3' de al menos 2 nucleótidos.
- Se describe que un ARNbc descrito en la presente comprende además un ligando.
- Se describe que el ligando es un ligando de tipo GalNAc.
- Se describe que el ligando dirige el ARNbc hacia los hepatocitos.
- 15 Se describe que el ligando está conjugado con el extremo 3' de la hebra sentido del ARNbc.
- Se describe que la región de complementariedad está constituida por una secuencia antisentido seleccionada a partir de la Tabla 2 o la Tabla 3. Se describe que la región de complementariedad está constituida por una secuencia antisentido seleccionada a partir de las Tablas 2, 3, 6, 7, 8, 9, 14 o 15. Se describe que la región de complementariedad está constituida por una secuencia antisentido seleccionada a partir de las Tablas 2, 3, 6, 7, 8, 9, 14, 15, 18 o 20. Se describe que la región de complementariedad está constituida por una secuencia antisentido seleccionada entre las de AD-58882, AD-58878, AD-58886, AD-58877, AD-59115, AD-58856, AD-59129, AD-59124, AD-58874, AD-59125, AD-59105, AD-59120, AD-59122, AD-59106, AD-59126 o AD-59107 tal como se describe en la presente en los Ejemplos. Se describe que la región de complementariedad está constituida por la secuencia antisentido del dúplex AD-58632. En algunas realizaciones, la región de complementariedad está constituida por una secuencia antisentido seleccionada entre las de AD-59453, AD-59395, AD-59477 y AD-59492. Se describe que la región de complementariedad está constituida por una secuencia antisentido seleccionada a partir de un dúplex descrito en la presente que suprime la expresión del ARNm de ALAS1 al menos un 50%, 60%, 70%, 80%, 85% o 90%, p. ej., según se evalúa utilizando un ensayo descrito en los Ejemplos que se proporcionan en la presente.
- 20 Se describe que el ARNbc comprende una hebra sentido constituida por una secuencia de hebra sentido seleccionada a partir de la Tabla 2 o la Tabla 3, y una hebra antisentido constituida por una secuencia antisentido seleccionada a partir de la Tabla 2 o la Tabla 3.
- 25 Se describe que el ARNbc comprende una hebra sentido constituida por una secuencia de hebra sentido seleccionada a partir de las Tablas 2, 3, 6, 7, 8, 9, 14 o 15, y una hebra antisentido constituida por una secuencia antisentido seleccionada a partir de las Tablas 2, 3, 6, 7, 8, 9, 14 o 15. En algunas realizaciones, el ARNbc comprende un par de secuencias sentido y antisentido correspondientes seleccionadas a partir de las de los dúplex descritos en las Tablas 2, 3, 6, 7, 8, 9, 14 y 15.
- 30 Se describe que el ARNbc comprende una hebra sentido constituida por una secuencia de hebra sentido seleccionada a partir de las Tablas 2, 3, 6, 7, 8, 9, 14, 15, 18 o 20, y una hebra antisentido constituida por una secuencia antisentido seleccionada a partir de las Tablas 2, 3, 6, 7, 8, 9, 14, 15, 18 o 20. Se describe que el ARNbc comprende un par de secuencias sentido y antisentido correspondientes seleccionadas a partir de las de los dúplex descritos en las Tablas 2, 3, 6, 7, 8, 9, 14, 15, 18 y 20.
- 35 En un aspecto, la invención proporciona una célula que contiene al menos uno de los ARNbc de la invención. La célula es generalmente una célula de mamífero tal como una célula humana. La célula puede ser una célula eritroide. La célula puede ser una célula hepática (p. ej., un hepatocito).
- 40 En un aspecto, se proporciona en la presente una composición farmacéutica para inhibir la expresión de un gen ALAS1, comprendiendo la composición un ARNbc de la invención.
- 45 En relación con las composiciones farmacéuticas descritas en la presente, el ARNi (p. ej., ARNbc) se puede administrar en una solución no tamponada. La solución no tamponada puede ser solución salina o agua.
- 50 En relación con las composiciones farmacéuticas descritas en la presente, el ARNi (p. ej., ARNbc) se puede administrar con una solución tampón. La solución tampón puede comprender acetato, citrato, prolamina, carbonato o

fosfato o cualquier combinación de estos. La solución tampón puede ser una solución salina tamponada con fosfato (PBS).

En relación con las composiciones farmacéuticas descritas en la presente, el ARNi (p. ej., ARNbc) se puede dirigir hacia los hepatocitos.

- 5 En relación con las composiciones farmacéuticas descritas en la presente, la composición se puede administrar por vía intravenosa.

En relación con las composiciones farmacéuticas descritas en la presente, la composición se puede administrar por vía subcutánea.

- 10 Una composición farmacéutica puede comprender un ARNi (p. ej., ARNbc) descrito en la presente que comprende un ligando (p. ej., un ligando de tipo GalNAc) que dirige el ARNi (p. ej., ARNbc) hacia los hepatocitos.

Una composición farmacéutica puede comprender un ARNi (p. ej., ARNbc) descrito en la presente que comprende un ligando (p. ej., un ligando de tipo GalNAc) y la composición farmacéutica se administra por vía subcutánea. El ligando puede dirigir el ARNi (p. ej., ARNbc) hacia los hepatocitos.

- 15 Una composición farmacéutica, p. ej., una composición descrita en la presente, puede incluir una formulación lipídica. El agente de iARN puede ser una formulación LNP, p. ej., una formulación MC3. La formulación LNP puede dirigir el agente de iARN hacia una célula particular, p. ej., una célula hepática, p. ej., un hepatocito. La formulación lipídica puede ser una formulación LNP11. La composición se puede administrar por vía intravenosa.

- 20 La composición farmacéutica se puede formular para ser administrada de acuerdo con una pauta posológica descrita en la presente, p. ej., no más de una vez cada cuatro semanas, no más de una vez cada tres semanas, no más de una vez cada dos semanas o no más de una vez por semana. La administración de la composición farmacéutica se puede mantener durante un mes o más, p. ej., uno, dos, tres o seis meses, o un año o más.

- 25 Una composición que contiene un ARNi que se expone en la invención, es decir un ARNbc que tiene ALAS1 como diana, se puede administrar con un agente terapéutico que no sea un ARNi tal como un agente conocido por tratar una porfiria (p. ej., AIP) o un síntoma de una porfiria (p. ej., dolor). Una composición que contiene un ARNi que se expone en la invención, es decir un ARNbc que tiene AIP como diana, se puede administrar junto con un régimen terapéutico que no sea un ARNi tal como hemina o glucosa (p. ej., una infusión de glucosa (p. ej., glucosa IV)). Por ejemplo, un ARNi que se expone en la invención se puede administrar antes, después o de forma simultánea con glucosa, dextrosa o un tratamiento similar que sirva para restablecer el equilibrio energético (p. ej., nutrición parenteral total). Un ARNi que se expone en la invención también se puede administrar antes, después o de forma  
30 simultánea con la administración de un producto de tipo hemo (p. ej., hemina, arginato de hemo o albumina que contenga hemo) y opcionalmente también se puede administrar combinado con glucosa (p. ej., glucosa IV) o similares.

- 35 Normalmente, la glucosa administrada para el tratamiento de una porfiria se administra por vía intravenosa (IV). La administración de glucosa por vía intravenosa se denomina en la presente "glucosa IV". Sin embargo, también se contemplan opciones alternativas en las cuales la glucosa se administre por otros medios.

Un ARNi de ALAS1 se puede administrar a un paciente y a continuación se administra el agente o régimen terapéutico que no sea un ARNi (p. ej., glucosa y/o un producto de tipo hemo) al paciente (o viceversa). El ARNi de ALAS1 y el agente terapéutico o régimen terapéutico que no sea un ARNi se pueden administrar de forma simultánea.

- 40 En la presente se describe un método para inhibir la expresión de ALAS1 en una célula, comprendiendo el método: (a) introducir en la célula un ARNi (p. ej., un ARNbc) descrito en la presente y (b) mantener la célula del paso (a) durante un tiempo suficiente para obtener la degradación del transcrito de ARNm del gen ALAS1, de este modo se inhibe la expresión del gen ALAS1 en la célula.

- 45 En la presente se describe un método para reducir o inhibir la expresión de un gen ALAS1 en una célula (p. ej., una célula eritroide o una célula hepática tal como, p. ej., un hepatocito). El método incluye:

- (a) introducir en la célula un ácido ribonucleico bicatenario (ARNbc), donde el ARNbc incluye al menos dos secuencias que son complementarias entre sí. El ARNbc tiene una hebra sentido que tiene una primera secuencia y una hebra antisentido que tiene una segunda secuencia; la hebra antisentido tiene una región de complementariedad que es sustancialmente complementaria respecto a al menos una parte de un ARNm que codifica ALAS1, y donde la región de complementariedad tiene una longitud de 30 nucleótidos o inferior, es decir, 15-30 nucleótidos, y generalmente tiene una longitud de 19-24 nucleótidos, y donde el ARNbc, cuando entra en contacto con una célula que expresa ALAS1, inhibe la expresión del gen ALAS1 al menos un 10%, p. ej., al menos un 20%, al menos un 30%, al menos un 40% o más; y
- 50

(b) mantener la célula del paso (a) durante un tiempo suficiente para obtener la degradación del transcrito de ARNm del gen ALAS1, de este modo se reduce o inhibe la expresión de un gen ALAS1 en la célula.

En relación con los métodos anteriores para inhibir la expresión de ALAS1 en una célula, la célula se trata *ex vivo*, *in vitro* o *in vivo*. La célula puede ser un hepatocito.

- 5 La célula puede estar presente en un sujeto que necesita tratar, prevenir y/o gestionar un trastorno relacionado con la expresión de ALAS1.

El trastorno puede ser una porfiria. La porfiria puede ser una porfiria intermitente aguda o una porfiria debida a la deficiencia de ALA-deshidratasa.

- 10 En algunas realizaciones, la porfiria es una porfiria hepática, p. ej., una porfiria seleccionada entre porfiria intermitente aguda (AIP), coproporfiria hereditaria (HCP), porfiria variegata (VP), porfiria debida a la deficiencia de ALA-deshidratasa (ADP) y porfiria hepatoeritropoyética. La porfiria puede ser una porfiria hepática dominante homocigótica (p. ej., AIP, HCP o VP dominante homocigótica) o una porfiria hepatoeritropoyética. La porfiria puede ser una porfiria dual.

La expresión de ALAS1 se puede inhibir al menos un 30%.

- 15 El ARNi (p. ej., ARNbc) puede presentar una  $CI_{50}$  comprendida en el intervalo de 0.01-1 nM.

La célula (p. ej., el hepatocito) puede ser una célula de mamífero (p. ej., una célula humana, de primate no humano o de roedor).

La célula se puede tratar *ex vivo*, *in vitro* o *in vivo* (p. ej., la célula está presente en un sujeto (p. ej., un paciente que necesita tratar, prevenir y/o gestionar un trastorno relacionado con la expresión de ALAS1)).

- 20 El sujeto puede ser un mamífero (p. ej., un ser humano) que corre el riesgo de parecer una porfiria o al cual se le ha diagnosticado una porfiria, p. ej., anemia sideroblástica relacionada con X (XLSA), porfiria debida a la deficiencia de ALA-deshidratasa (porfiria de Doss o ADP), porfiria intermitente aguda (AIP), porfiria eritropoyética congénita (CEP), porfiria cutánea tardía (PCT), coproporfiria hereditaria (coproporfiria o HCP), porfiria variegata (VP), protoporfiria eritropoyética (EPP) o eritroporfiria transitoria de la infancia. El trastorno puede ser una porfiria hepática aguda, p. ej., una porfiria debida a la deficiencia de ALA-deshidratasa (ADP), AIP, HCP o VP. El trastorno puede ser una porfiria debida a la deficiencia de ALA-deshidratasa (ADP) o AIP.

- 30 En algunas realizaciones, la porfiria es una porfiria hepática, p. ej., una porfiria seleccionada entre porfiria intermitente aguda (AIP), coproporfiria hereditaria (HCP), porfiria variegata (VP), porfiria debida a la deficiencia de ALA-deshidratasa (ADP) y porfiria hepatoeritropoyética. La porfiria puede ser una porfiria hepática dominante homocigótica (p. ej., AIP, HCP o VP dominante homocigótica) o una porfiria hepatoeritropoyética. La porfiria puede ser una porfiria dual.

El ARNbc introducido puede reducir o inhibir la expresión de un gen ALAS1 en la célula.

- 35 El ARNbc introducido puede reducir o inhibir la expresión de un gen ALAS1, o el nivel de una o más porfirinas o precursores de porfirinas (p. ej., ácido  $\delta$ -aminolevulínico (ALA), porfopilinógeno (PBG), hidroximetilbilano (HMB), uroporfirinógeno I o III, coproporfirinógeno I o III, protoporfirinógeno IX y protoporfirina IX) o productos o metabolitos de porfirinas, al menos un 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50% o más en comparación con una referencia (p. ej., una célula no tratada o una célula tratada con un ARNbc de control que no actúe sobre la diana). Sin pretender vincularse a ninguna teoría, ALAS1 es la primera enzima de la vía de las porfirinas. Por lo tanto, es probable que la reducción de la expresión del gen ALAS1 reduzca el nivel de uno o más precursores de porfirinas, porfirinas o productos o metabolitos de porfirinas.

- 40 En otros aspectos, la divulgación proporciona métodos para tratar, prevenir o gestionar procesos patológicos relacionados con la expresión de ALAS1 (p. ej., procesos patológicos en los que participan porfirinas, precursores de porfirinas o defectos en la vía de las porfirinas tales como, por ejemplo, las porfirias). El método puede incluir administrar a un sujeto, p. ej., un paciente que necesite tal tratamiento, prevención o gestión, una cantidad eficaz (p. ej., terapéutica o profilácticamente eficaz) de uno o más de los ARNi que se exponen en la presente.

En la presente se describe un método para tratar y/o prevenir un trastorno relacionado con la expresión de ALAS1 que comprende administrar a un sujeto que necesite tal tratamiento una cantidad terapéuticamente eficaz de un ARNi (p. ej., un ARNbc) descrito en la presente o una composición que comprenda un ARNi (p. ej., un ARNbc) descrito en la presente.

- 50 En la presente se describe un método para tratar y/o prevenir una porfiria que comprende administrar a un sujeto que necesite tal tratamiento un ácido ribonucleico bicatenario (ARNbc), donde dicho ARNbc comprende una hebra sentido y una hebra antisentido con una longitud de 15-30 pares de bases y la hebra antisentido es complementaria respecto a al menos 15 nucleótidos contiguos de la SEQ ID NO:1 o la SEQ ID NO:382.

El sujeto (p. ej., el paciente) puede padecer una porfiria. El sujeto (p. ej., el paciente) puede correr el riesgo de desarrollar una porfiria. La administración del ARNi que tiene ALAS1 como diana puede aliviar o reducir la gravedad de al menos un síntoma de un trastorno relacionado con ALAS1 en el paciente.

5 El sujeto puede ser un mamífero (p. ej., un ser humano) que corre el riesgo de parecer o al cual se le ha diagnosticado un trastorno relacionado con la expresión de ALAS1, p. ej., una porfiria, p. ej., anemia sideroblástica relacionada con X (XLSA), porfiria debida a la deficiencia de ALA-deshidratasa (porfiria de Doss), porfiria intermitente aguda (AIP), porfiria eritropoyética congénita (CEP), porfiria cutánea tardía (PCT), coproporfiria hereditaria (coproporfiria o HCP), porfiria variegata (VP), protoporfiria eritropoyética (EPP) o eritroporfiria transitoria de la infancia. La porfiria puede ser una porfiria hepática aguda, p. ej., una porfiria debida a la deficiencia de ALA-deshidratasa (ADP), AIP, HCP o VP. El trastorno puede ser una porfiria debida a la deficiencia de ALA-deshidratasa (ADP) o AIP.

15 El sujeto puede padecer o correr el riesgo de desarrollar una porfiria. La porfiria puede ser una porfiria hepática, p. ej., una porfiria seleccionada entre porfiria intermitente aguda (AIP), coproporfiria hereditaria (HCP), porfiria variegata (VP), porfiria debida a la deficiencia de ALA-deshidratasa (ADP) y porfiria hepatoeritropoyética. La porfiria puede ser una porfiria hepática dominante homocigótica (p. ej., AIP, HCP o VP dominante homocigótica) o una porfiria hepatoeritropoyética. La porfiria puede ser una porfiria dual.

20 Una porfiria, un síntoma de porfiria, un pródromo o un ataque de porfiria puede ser inducido por la exposición a un factor precipitante, según se describe en la presente. El factor precipitante puede ser la exposición a un agente químico. El factor precipitante puede ser un fármaco, p. ej., un fármaco con receta o un fármaco sin receta. El factor precipitante puede ser el ciclo menstrual, p. ej., una fase particular del ciclo menstrual, p. ej., la fase luteínica.

Se describe que el ARNi (p. ej., ARNbc) o la composición que comprende el ARNi se administra después de un ataque agudo de porfiria.

Se describe que el ARNi (p. ej., ARNbc) o la composición que comprende el ARNi se administra durante un ataque agudo de porfiria.

25 Se describe que el ARNi (p. ej., ARNbc) o la composición que comprende el ARNi se administra profilácticamente para prevenir un ataque agudo de porfiria.

Se describe que el ARNi (p. ej., ARNbc) se formula como una formulación LNP.

Se describe que el ARNi (p. ej., ARNbc) se encuentra en forma de un conjugado de tipo GalNAc.

Se describe que el ARNi (p. ej., ARNbc) se administra con una dosis de 0.05-50 mg/kg.

30 Se describe que el ARNi (p. ej., ARNbc) se administra con una concentración de 0.01 mg/kg-5 mg/kg de peso corporal del sujeto.

Se describe que el ARNi (p. ej., ARNbc) se formula como una formulación LNP y se administra con una dosis de 0.05-5 mg/kg.

35 Se describe que el ARNi (p. ej., ARNbc) se encuentra en forma de un conjugado de tipo GalNAc y se administra con una dosis de 0.5-50 mg/kg.

Se describe que el método reduce el nivel de una porfirina o de un precursor de una porfirina en el sujeto.

Se describe que el nivel se reduce al menos un 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% o 90%. En una realización, el nivel se reduce al menos un 30%.

Se describe que el precursor de porfirina es ácido δ-aminolevulínico (ALA) o porfopilinógeno (PBG).

40 Se describe que el ARNi (p. ej., ARNbc) presenta una  $CI_{50}$  comprendida en el intervalo de 0.01-1 nM.

Un método descrito en la presente

- (i) mejora un síntoma asociado con un trastorno relacionado con ALAS1 (p. ej., una porfiria),
- (ii) inhibe la expresión de ALAS1 en el sujeto,
- (iii) reduce el nivel de un precursor de porfirina (p. ej., ALA o PBG) o una porfirina en el sujeto,
- 45 (iv) reduce la frecuencia de ataques agudos de síntomas asociados con una porfiria en el sujeto, o
- (v) reduce la incidencia de ataques agudos de síntomas asociados con una porfiria en el sujeto cuando el sujeto se expone a un factor precipitante (p. ej., la fase premenstrual o la fase luteínica).

- Se describe que el método mejora el dolor y/o una neuropatía progresiva.
- Se describe que el ARNi (p. ej., ARNbc) o la composición que comprende el ARNi se administra de acuerdo con una pauta posológica.
- 5 Se describe que el ARNi (p. ej., ARNbc) o la composición que comprende el ARNi se administra antes de un ataque agudo de porfiria o después de este. Se describe que el ARNi se administra antes de un ataque agudo de porfiria.
- Se describe que el ARNi (p. ej., ARNbc) o la composición que comprende el ARNi se administra durante un pródromo. Se describe que el pródromo se caracteriza por dolor abdominal, náusea, síntomas psicológicos (p. ej., ansiedad), inquietud y/o insomnio.
- 10 Se describe que el ARNi (p. ej., ARNbc) o la composición que comprende el ARNi se administra durante una fase particular del ciclo menstrual, p. ej., durante la fase luteínica.
- Se describe que el método mejora o previene ataques cíclicos de porfiria, p. ej., reduciendo la intensidad, duración o frecuencia de los ataques. Se describe que los ataques cíclicos se asocian con un factor precipitante. Se describe que el factor precipitante es el ciclo menstrual, p. ej., una fase particular del ciclo menstrual, p. ej., la fase luteínica.
- 15 Se describe que el sujeto presenta un nivel elevado de ALA y/o PBG. Se describe que el sujeto padece o corre el riesgo de desarrollar una porfiria, p. ej., una porfiria hepática. Se describe que el sujeto no presenta síntomas. Se describe que el sujeto es portador de una alteración genética (p. ej., una mutación génica) asociada con una porfiria, según se describe en la presente.
- 20 Se describe que el sujeto padece o corre el riesgo de desarrollar una porfiria y sufre dolor (p. ej., dolor crónico, p. ej., dolor neuropático crónico) y/o una neuropatía (p. ej., una neuropatía progresiva). Se describe que el sujeto no padece ataques agudos pero sufre dolor (p. ej., dolor crónico, p. ej., dolor neuropático crónico) y/o una neuropatía (p. ej., una neuropatía progresiva). Se describe que el dolor es dolor abdominal.
- Se describe que el sujeto (a) presenta un nivel elevado de ALA y/o PBG y (b) sufre dolor (p. ej., dolor crónico, p. ej., dolor neuropático crónico) y/o una neuropatía (p. ej., una neuropatía progresiva). Se describe que el dolor es dolor abdominal.
- 25 Se describe que el sujeto presenta un nivel en plasma y/o un nivel en orina de ALA y/o PBG que es elevado. Se describe que el nivel elevado de ALA y/o PBG viene acompañado de otros síntomas, p. ej., dolor (p. ej., dolor crónico, p. ej., dolor neuropático crónico) y/o una neuropatía (p. ej., una neuropatía progresiva). Se describe que el dolor es dolor abdominal. Se describe que el sujeto no presenta síntomas. Se describe que el sujeto tiene una mutación genética asociada con una porfiria, p. ej., una mutación según se describe en la presente.
- 30 Se describe que el sujeto presenta un nivel (p. ej., un nivel en plasma o un nivel en orina) de un precursor de porfirina, p. ej., ALA y/o PBG, que es elevado, p. ej., el nivel es superior a un valor de referencia, o superior o igual a un valor de referencia. Se describe que el nivel es superior al valor de referencia. Se describe que el valor de referencia se encuentra dos desviaciones estándar por encima del nivel medio de una muestra de individuos sanos. Se describe que el valor de referencia es un límite de referencia superior.
- 35 Se describe que el sujeto presenta un nivel en plasma y/o un nivel en orina de ALA y/o PBG superior a, o superior o igual a, 2 veces, 3 veces, 4 veces o 5 veces el valor del límite de referencia superior. La expresión "límite de referencia superior", tal como se utiliza en la presente, se refiere a un nivel que representa el límite superior del intervalo de confianza del 95% para una muestra de referencia, p. ej., una muestra de individuos sanos o normales (p. ej., de origen natural), p. ej., individuos que no son portadores de ninguna mutación genética asociada con una porfiria y/o individuos que no padecen ninguna porfiria. Se describe que el sujeto presenta un nivel en orina de ALA y/o PBG superior a 2-4 veces el valor del límite de referencia superior. Se describe que el sujeto presenta un nivel en orina de ALA y/o PBG superior a 4 veces el valor del límite de referencia superior.
- 40 Se describe que el valor de referencia para PBG en plasma es de 0.12  $\mu\text{mol/L}$ . Se describe que el sujeto es un ser humano y presenta un nivel de PBG en plasma superior a, o superior o igual a, 0.12  $\mu\text{mol/L}$ , 0.24  $\mu\text{mol/L}$ , 0.36  $\mu\text{mol/L}$ , 0.48  $\mu\text{mol/L}$  o 0.60  $\mu\text{mol/L}$ . Se describe que el sujeto es un ser humano y presenta un nivel de PBG en plasma superior a, o superior o igual a, 0.48  $\mu\text{mol/L}$ .
- 45 Se describe que el valor de referencia para PBG en orina es de 1.2 mmol/mol de creatinina. Se describe que el sujeto es un ser humano y presenta un nivel de PBG en orina superior a, o superior o igual a, 1.2 mmol/mol de creatinina, 2.4 mmol/mol de creatinina, 3.6 mmol/mol de creatinina, 4.8 mmol/mol de creatinina o 6.0 mmol/mol de creatinina. Se describe que el sujeto es un ser humano y presenta un nivel de PBG en orina superior a, o superior o igual a, 4.8 mmol/mol de creatinina.
- 50 Se describe que el valor de referencia para ALA en plasma es de 0.12  $\mu\text{mol/L}$ . Se describe que el sujeto es un ser humano y presenta un nivel de ALA en plasma superior a, o superior o igual a, 0.12  $\mu\text{mol/L}$ , 0.24  $\mu\text{mol/L}$ , 0.36

- μmol/L, 0.48 μmol/L o 0.60 μmol/L. Se describe que el sujeto es un ser humano y presenta un nivel de ALA en plasma superior a, o superior o igual a, 0.48 μmol/L.
- 5 Se describe que el valor de referencia para ALA en orina es de 3.1 mmol/mol de creatinina. Se describe que el sujeto es un ser humano y presenta un nivel de ALA en orina superior a, o superior o igual a, 3.1 mmol/mol de creatinina, 6.2 mmol/mol de creatinina, 9.3 mmol/mol de creatinina, 12.4 mmol/mol de creatinina o 15.5 mmol/mol de creatinina.
- 10 Se describe que el método reduce un nivel elevado de ALA y/o PBG. Se describe que el método reduce el dolor (p. ej., dolor crónico, p. ej., dolor neuropático crónico) y/o una neuropatía (p. ej., una neuropatía progresiva). Se describe que el dolor es dolor abdominal. En algunas realizaciones, el dolor es dolor neuropático (p. ej., dolor asociado con la neuropatía progresiva de porfirias agudas). La reducción del dolor puede incluir, p. ej., la prevención del dolor, el retraso del inicio del dolor, la reducción de la frecuencia del dolor y/o la reducción de la intensidad del dolor.
- 15 Se describe que el método mejora o previene ataques agudos de porfiria, p. ej., reduciendo la intensidad, duración o frecuencia de los ataques.
- Se describe que el método reduce o previene lesiones nerviosas.
- Se describe que el método previene el deterioro (p. ej., previene el desarrollo de anomalías) de medidas clínicas o provoca una mejora de estas, p. ej., medidas clínicas de la función muscular y/o nerviosa, p. ej., EMG y/o velocidades de conducción nerviosa.
- 20 Se describe que el método es eficaz para reducir el nivel de ALA y/o PBG (p. ej., el nivel en plasma u orina de ALA y/o PBG). Se describe que el método es eficaz para producir una reducción predeterminada del nivel elevado de ALA y/o PBG.
- 25 Se describe que la reducción predeterminada es una reducción hasta un valor que es inferior o igual a un valor de referencia. Se describe que el valor de referencia es un límite de referencia superior. Se describe que el valor de referencia es el valor que corresponde a dos desviaciones estándar por encima del nivel medio de una muestra de referencia.
- Se describe que el ARNi (p. ej., ARNbc) o la composición que comprende el ARNi se administra repetidamente, p. ej., de acuerdo con una pauta posológica.
- 30 Se describe que el ARNi (p. ej., ARNbc) o la composición que comprende el ARNi se administra profilácticamente a un sujeto que corre el riesgo de desarrollar una porfiria. Se describe que el ARNi (p. ej., ARNbc) o la composición que comprende el ARNi se administra profilácticamente empezando en la pubertad. Se describe que el sujeto es portador de una mutación genética asociada con una porfiria y/o presenta un nivel elevado de ALA y/o PBG (p. ej., un nivel elevado en plasma u orina de ALA y/o PBG). Se describe que la mutación hace que el individuo sea susceptible de padecer un ataque agudo (p. ej., tras la exposición a un factor precipitante, p. ej., un fármaco, el seguimiento de un régimen u otro factor precipitante, p. ej., un factor precipitante como los que se describen en la presente).
- 35 Se describe que la mutación se asocia con unos niveles elevados de una porfirina o un precursor de porfirina (p. ej., ALA y/o PBG). Se describe que la mutación se asocia con dolor crónico (p. ej., dolor neuropático crónico) y/o una neuropatía (p. ej., una neuropatía progresiva).
- 40 Se describe que la mutación es una mutación en el gen ALAS1. Se describe que la mutación es una mutación en el promotor del gen ALAS1 o en regiones en dirección 5' o dirección 3' del gen ALAS1. Se describe que la mutación es una mutación en factores de transcripción u otros genes que interaccionan con ALAS1. Se describe que la mutación es una mutación en un gen que codifica una enzima en la vía biosintética del grupo hemo.
- 45 Se describe que el ARNi (p. ej., ARNbc) o la composición que comprende el ARNi se administra por vía subcutánea. Se describe que el ARNi se encuentra en forma de un conjugado de tipo GalNAc. En algunas realizaciones, el ARNi (p. ej., el ARNbc) se administra con una dosis de 0.5-50 mg/kg.
- 50 En la presente se describe un método para tratar a un sujeto con un nivel elevado de ALA y/o PBG, comprendiendo el método administrar al sujeto un ácido ribonucleico bicatenario (ARNbc), donde dicho ARNbc comprende una hebra sentido y una hebra antisentido con una longitud de 15-30 pares de bases y la hebra antisentido es complementaria respecto a al menos 15 nucleótidos contiguos de la SEQ ID NO:1 o la SEQ ID NO:382.
- En la presente se describe un método para tratar a un sujeto con un nivel elevado de ALA y/o PBG, comprendiendo el método administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un ARNbc o una composición que comprenda un ARNbc, según se describe en la presente.
- Se describe que los métodos descritos en la presente son eficaces para reducir el nivel de ALA y/o PBG. Se describe que el nivel de ALA y/o PBG se reduce de modo tal que sea inferior a, o inferior o igual a, un valor de referencia, p. ej., un límite de referencia superior. En otro aspecto, la invención proporciona métodos para reducir el

nivel de una porfirina o un precursor de porfirina en una célula (p. ej., una célula eritroide o una célula hepática tal como, p. ej., un hepatocito). Se describe que la célula se trata *ex vivo*, *in vitro* o *in vivo* (p. ej., la célula está presente en un sujeto (p. ej., un paciente que necesita tratar, prevenir y/o gestionar un trastorno relacionado con la expresión de ALAS1)). El método incluye poner en contacto la célula con una cantidad eficaz de uno o más de los ARNi que tienen ALAS1 como diana, p. ej., uno o más de los ARNi descritos en la presente, de este modo se reduce el nivel de una porfirina o un precursor de porfirina en la célula; o se reduce el nivel de una porfirina o un precursor de porfirina en otras células, tejidos o fluidos del sujeto en el cual se encuentra localizada la célula; con relación al nivel antes de la puesta en contacto. Tales métodos se pueden utilizar para tratar (p. ej., mejorar la gravedad) de trastornos relacionados con la expresión de ALAS1, tales como las porfirias, p. ej., AIP o una porfiria debida a la deficiencia de ALA-deshidratasa.

Se describe que el paso de puesta en contacto se realiza *ex vivo*, *in vitro* o *in vivo*. Por ejemplo, la célula puede estar presente en un sujeto, p. ej., un mamífero (p. ej., un ser humano) que corre el riesgo de padecer o al cual se le ha diagnosticado una porfiria. Se describe que la porfiria es una porfiria hepática aguda. Se describe que la porfiria es una porfiria hepática, p. ej., una porfiria seleccionada entre porfiria intermitente aguda (AIP), coproporfiria hereditaria (HCP), porfiria variegata (VP), porfiria debida a la deficiencia de ALA-deshidratasa (ADP) y porfiria hepatoeritropoyética. Se describe que la porfiria es una porfiria hepática dominante homocigótica (p. ej., AIP, HCP o VP dominante homocigótica) o una porfiria hepatoeritropoyética. Se describe que la porfiria es una porfiria dual.

Se describe un método para reducir el nivel de una porfirina o un precursor de porfirina (p. ej., ALA o PBG) en una célula, que comprende poner en contacto la célula con un ARNi (p. ej., un ARNbc), según se describe en la presente, en una cantidad eficaz para reducir el nivel de la porfirina o el precursor de porfirina en la célula. Se describe que la célula es un hepatocito. Se describe que la porfirina o el precursor de porfirina es ácido  $\delta$ -aminolevulínico (ALA), porfopilinógeno (PBG), hidroximetilbilano (HMB), uroporfirinógeno I o III, coproporfirinógeno I o III, protoporfirinógeno IX o protoporfirina IX. Se describe que el precursor de porfirina es ALA o PBG.

Se describe que la célula es una célula eritroide. Se describe que adicional, la célula es una célula hepática (p. ej., un hepatocito).

Se describe un vector que codifica al menos una hebra de un ARNi (p. ej., un ARNbc) según se describe en la presente.

Se describe un vector que codifica al menos una hebra de un ARNbc, donde dicho ARNbc comprende una región de complementariedad respecto a al menos una parte de un ARNm que codifica ALAS1, donde dicho ARNbc tiene una longitud de 30 pares de bases o inferior y donde dicho ARNbc tiene como diana la escisión de dicho ARNm.

Se describe que la región de complementariedad tiene una longitud de al menos 15 nucleótidos.

Se describe que la región de complementariedad tiene una longitud de 19-21 nucleótidos. En un aspecto, la invención proporciona un vector para inhibir la expresión de un gen ALAS1 en una célula. Se describe que el vector comprende un ARNi según se describe en la presente. Se describe que el vector incluye al menos una secuencia reguladora unida operablemente a una secuencia de nucleótidos que codifica al menos una hebra de un ARNi según se describe en la presente. Se describe que el vector comprende al menos una hebra de un ARNi de ALAS1.

Se describe una célula que comprende un vector según se describe en la presente. En la presente se describe una célula que contiene un vector para inhibir la expresión de un gen ALAS1 en una célula. El vector incluye una secuencia reguladora unida operablemente a una secuencia de nucleótidos que codifica al menos una hebra de uno de los ARNi que se describen en la presente. La célula puede ser una célula hepática (p. ej., un hepatocito). La célula puede ser una célula eritroide.

La invención se expone en las reivindicaciones.

La FIG. 1 representa la vía biosintética del grupo hemo.

La FIG. 2 resume ciertas porfirias asociadas con errores genéticos en el metabolismo del grupo hemo.

La FIG. 3 representa la variante 1 de un transcrito de la secuencia de ARNm de ALAS1 humano (Ref. Sec. NM\_000688.4 (GI:40316942, registro con fecha de 19 de noviembre de 2011), SEQ ID NO: 1).

La FIG. 4 representa la variante 2 de un transcrito de la secuencia de ARNm de ALAS1 humano (Ref. Sec. NM\_000688.5 (GI: 362999011, registro con fecha de 1 de abril de 2012), SEQ ID NO: 382).

La FIG. 5 muestra la dosis-respuesta del ARNip AD-53558 para la supresión del ARNm de ALAS1 de ratón (ALAS1r) con relación a un control de PBS. También se muestran los resultados para un control de luciferasa (LUC) AD-1955.

La FIG. 6 muestra la dosis-respuesta del ARNip AD-53558 para la supresión del ARNm de ALAS1 en ratas con relación a un control de PBS. También se muestran los resultados para un control de luciferasa (LUC) AD-1955.

La FIG. 7 muestra la durabilidad de la supresión del ARNm de ALAS1 de ratón (ALAS1r) por parte del ARNip AD-53558 con relación a un control de PBS.

5 La FIG. 8 muestra las medias  $\pm$  desviaciones estándar de los niveles de ALA en plasma (en  $\mu\text{M}$ ) en el punto de referencia y después de un tratamiento con fenobarbital en los grupos experimentales (ARNip de ALAS1) y de control (ARNip de LUC).

La FIG. 9 muestra los niveles de ALA en plasma (en  $\mu\text{M}$ ) de animales individuales en el punto de referencia y después del tratamiento con fenobarbital en animales que recibieron tratamiento con ARNip de ALAS1 y control (ARNip de LUC).

10 La FIG. 10 muestra las medias  $\pm$  desviaciones estándar de los niveles de PBG en plasma (en  $\mu\text{M}$ ) en el punto de referencia y después de un tratamiento con fenobarbital en animales que recibieron tratamiento con ARNip de ALAS1 y control (ARNip de LUC).

La FIG. 11 muestra los niveles de PBG en plasma (en  $\mu\text{M}$ ) de animales individuales en el punto de referencia y después del tratamiento con fenobarbital en animales que recibieron tratamiento con ARNip de ALAS1 y control (ARNip de LUC).

15 La FIG. 12 muestra el nivel de ARNm de ALAS1r relativo en el hígado en el punto de referencia y después de un tratamiento con fenobarbital en animales experimentales representativos seleccionados (ARNip de ALAS1) y de control (PBS).

La FIG. 13 muestra los efectos de tres ARNip de ALAS1r conjugados con GalNAc sobre la expresión de ALAS1r (en comparación con un control de PBS) en tejido hepático de ratón.

20 La FIG. 14 muestra los niveles de ALA y PBG en plasma en función del tiempo después de la administración de fenobarbital y el tratamiento con ARNip de ALAS1 o ARNip de LUC como control.

La FIG. 15 muestra los efectos de un ARNip de ALAS1 conjugado con GalNAc sobre los niveles de ALA en plasma y PBG en plasma en el modelo de inducción con fenobarbital de AIP en ratón.

25 El ARNi dirige la degradación de ARNm específica según la secuencia mediante un proceso conocido como interferencia por ARN (iARN). En la presente se describen ARNi y métodos para utilizarlos con el fin de inhibir la expresión de un gen ALAS1 en una célula o un mamífero, donde el ARNi tiene como diana un gen ALAS1. También se proporcionan composiciones y métodos para trastornos relacionados con la expresión de ALAS1 tales como las porfirias (p. ej., porfiria debida a la deficiencia de ALA-deshidratasa (porfiria de Doss o ADP), porfiria intermitente aguda, porfiria eritropoyética congénita, porfiria cutánea tardía, coproporfiria hereditaria (coproporfiria), porfiria variegata, protoporfiria eritropoyética (EPP), anemia sideroblástica relacionada con X (XLSA) y eritroporfiria transitoria de la infancia).

30

Las porfirias son trastornos heredados o adquiridos que pueden ser provocados por una actividad reducida o potenciada de enzimas específicas de la vía biosintética del grupo hemo, que también se denomina en la presente vía de las porfirinas (remítase a la FIG. 1). Las porfirinas son los precursores principales del grupo hemo. Las porfirinas y los precursores de porfirinas incluyen ácido  $\delta$ -aminolevulínico (ALA), porfopilinógeno (PBG), hidroximetilbilano (HMB), uroporfirinógeno I o III, coproporfirinógeno I o III, protoporfirinógeno IX y protoporfirina IX. El grupo hemo es una parte esencial de la hemoglobina, mioglobina, catalasas, peroxidasas y citocromos, incluyendo estos últimos los citocromos hepáticos P450 y respiratorios. El grupo hemo se sintetiza en la mayoría de las células humanas o en todas ellas. Aproximadamente un 85% del grupo hemo se produce en células eritroides, principalmente para la hemoglobina. La mayor parte del grupo hemo remanente se produce en el hígado, un 80% del cual se utiliza para la síntesis de los citocromos. La deficiencia de enzimas específicas de la vía de las porfirinas conlleva una producción insuficiente del grupo hemo y también una acumulación de porfirinas y/o precursores de porfirinas, que son tóxicos para la función de células u órganos en concentraciones elevadas.

35

40

Las porfirias se pueden manifestar con complicaciones neurológicas ("agudas"), problemas de la piel ("cutáneos") o ambos. Las porfirias se pueden clasificar en función del sitio principal de la sobreproducción y acumulación de porfirinas o sus precursores. En las porfirias hepáticas, las porfirinas y los precursores de porfirinas se sobreproducen principalmente en el hígado, mientras que en las porfirias eritropoyéticas, las porfirinas se sobreproducen en las células eritroides en el hueso. Las porfirias agudas o hepáticas conllevan la disfunción del sistema nervioso y manifestaciones neurológicas que pueden afectar tanto al sistema nervioso central como al periférico, lo cual provoca síntomas tales como, por ejemplo, dolor (p. ej., dolor abdominal y/o dolor neuropático crónico), vómitos, neuropatía (p. ej., neuropatía aguda, neuropatía progresiva), debilidad muscular, convulsiones, problemas mentales (p. ej., alucinaciones, depresión-ansiedad, paranoia), arritmias cardíacas, taquicardia, estreñimiento y diarrea. Las porfirias cutáneas o eritropoyéticas afectan principalmente a la piel y provocan síntomas tales como fotosensibilidad, la cual puede ser dolorosa, ampollas, necrosis, picores, hinchazón y un mayor crecimiento del pelo en áreas tales como la frente. La infección posterior de las lesiones de la piel puede provocar la pérdida de tejidos y huesos, así como también cicatrices, desfiguración y pérdida de dedos (p. ej., de las manos y de

45

50

55

los pies). La mayoría de las porfirias están provocadas por mutaciones que codifican enzimas de la vía biosintética del grupo hemo. En la FIG. 2 se proporciona un resumen de las porfirias asociadas con errores genéticos en el metabolismo del grupo hemo.

- 5 No todas las porfirias son genéticas. Por ejemplo, los pacientes con una enfermedad hepática pueden desarrollar una porfiria como resultado de la disfunción hepática y se ha descrito una forma transitoria de eritroporfiria (eritroporfiria transitoria de la infancia) en la infancia (remítase a Crawford, R.I. *et al.*, *J Am Acad Dermatol.* agosto de 1995; 33(2 Pt 2):333-6.) Los pacientes con PCT pueden adquirir una actividad deficiente de la uroporfirinógeno-descarboxilasa (URO-D), debido a la formación de una enzima ORO-D con una actividad enzimática inferior a la normal (remítase a Phillips *et al. Blood*, 98:3179-3185, 2001).
- 10 La porfiria intermitente aguda (AIP) (también denominada deficiencia de porfobilinógeno (PBG)-desaminasa o deficiencia de hidroximetilbilano-sintasa (HMBS)) es el tipo más común de porfiria hepática aguda. Otros tipos de porfirias hepáticas agudas incluyen la coproporfiria hereditaria (HCP), porfiria variegata (VP) y porfiria debida a la deficiencia de ALA-deshidratasa (ADP). Las porfirias hepáticas agudas se describen, p. ej., en Balwani, M y Desnick, R.J., *Blood*, 120:4496-4504, 2012.
- 15 Normalmente, AIP es una enfermedad dominante autosómica que se caracteriza por una deficiencia de la enzima porfobilinógeno-desaminasa (PBG-desaminasa); esta enzima también se conoce como hidroximetilbilano-sintasa (HMB-sintasa o HMBS). La PBG-desaminasa es la tercera enzima de la vía biosintética del grupo hemo (remítase a la FIG. 1) y cataliza la condensación cabeza con cola de cuatro moléculas de porfobilinógeno para obtener el tetrapirrol lineal hidroximetilbilano (HMB). Como alternativa, se han descrito variantes de transcritos de corte y empalme que codifican diferentes isoformas de la PBG-desaminasa. Las mutaciones en el gen de la PBG-
- 20 desaminasa se asocian con la AIP. Tales mutaciones pueden provocar una reducción de las cantidades de PBG-desaminasa y/o una reducción de la actividad de la PBG-desaminasa (los individuos afectados normalmente presentan una reducción de ~50% en la actividad de la PBG-desaminasa).
- 25 Existen al menos dos modelos diferentes de la patofisiología de AIP y otras porfirias hepáticas agudas (remítase, por ejemplo, a Lin CS-Y *et al.*, *Clinical Neurophysiology*, 2011; 122:2336-44). De acuerdo con un modelo, la reducción de la producción del grupo hemo como resultado de la deficiencia de la PBG-desaminasa provoca una deficiencia energética y degeneración axónica. De acuerdo con el otro modelo, actualmente más favorecido, la acumulación de precursores de porfirinas (p. ej., ALA y PBG) provoca neurotoxicidad.
- 30 Se ha establecido que la AIP presenta una prevalencia de incluso 1 en 10 000 en ciertas poblaciones (p. ej., en el norte de Suecia; remítase a Floderus Y *et al. Clin Genet.* 2002;62:288-97). Se estima que la prevalencia en la población general en los Estados Unidos y Europa, excluido el Reino Unido, es desde aproximadamente 1 en 10 000 hasta 1 en 20 000. La enfermedad clínica se manifiesta en sí únicamente en aproximadamente un 10-15% de los individuos que son portadores de las mutaciones que se sabe que están asociadas con la AIP. Sin embargo, la penetrancia es de incluso un 40% en individuos con ciertas mutaciones (p. ej., la mutación W198X). Normalmente, la
- 35 AIP es latente antes de la pubertad. Los síntomas son más comunes en mujeres que en hombres. Probablemente la prevalencia de la enfermedad se subestima debido a su penetrancia incompleta y a los periodos prolongados de latencia. En los Estados Unidos, se estima que existen aproximadamente 2000 pacientes que han sufrido al menos un ataque. Se estima que existen aproximadamente 150 casos recurrentes activos en Francia, Suecia, el Reino Unido y Polonia; estos pacientes son principalmente mujeres jóvenes, con una edad media de 30. Remítase, p. ej., a Elder *et al.*, *J Inher Metab Dis.*, publicado en línea el 1 de noviembre de 2012.
- 40 La AIP afecta, por ejemplo, al sistema nervioso central, autonómico, periférico y visceral. Los síntomas de la AIP son variables e incluyen síntomas gastrointestinales (p. ej., dolor abdominal intenso y poco localizado, náusea/vómitos, estreñimiento, diarrea, íleo), síntomas urinarios (disuria, retención/incontinencia urinaria u orina oscura), síntomas neurológicos (p. ej., neuropatía sensorial, neuropatía motriz (p. ej., que afecta a los nervios craneales y/o que provoca debilidad en los brazos o las piernas), convulsiones, dolor neuropático (p. ej., dolor asociado con una neuropatía progresiva, p. ej., dolor neuropático crónico), síntomas neuropsiquiátricos (p. ej., confusión mental, ansiedad, agitación, alucinación, histeria, delirio, apatía, depresión, fobias, psicosis, insomnio, somnolencia, coma), participación del sistema nervioso autonómico (que provoca, p. ej., síntomas cardiovasculares tales como taquicardia, hipertensión y/o arritmias, así como también otros síntomas tales como, p. ej., un incremento de los
- 45 niveles de catecolamina en circulación, sudoración, inquietud y/o temblores), deshidratación y anomalías electrolíticas. Los síntomas más comunes son dolor abdominal y taquicardia. Además, los pacientes presentan frecuentemente dolor neuropático crónico y desarrollan una neuropatía progresiva. Los pacientes con ataques recurrentes a menudo presentan un pródromo. Se puede producir una parálisis permanente después de un ataque grave. La recuperación de ataques graves que no se tratan inmediatamente puede llevar semanas o meses. Un
- 50 ataque agudo puede resultar mortal, p. ej., debido a la parálisis de músculos respiratorios o a un paro cardiovascular provocado por el desequilibrio de los electrolitos (remítase, p. ej., a Thunell S. *Hydroxymethylbilane Synthase Deficiency.* 27 de septiembre de 2005 [actualizado el 1 de septiembre de 2011]. En: Pagon RA, Bird TD, Dolan CR *et al.*, editores. GeneReviews™ [Internet]. Seattle (WA): Universidad de Washington, Seattle; 1993- (en lo sucesivo en la presente Thunell (1993)). Antes de la existencia de tratamientos con hemina, hasta un 20% de los pacientes con
- 55 AIP fallecían a causa de la enfermedad.
- 60

En los individuos que son portadores de genes para la AIP, el riesgo de cáncer hepatocelular es mayor. En aquellos que padecen ataques recurrentes, el riesgo de cáncer hepatocelular es particularmente grave: después de la edad de 50, el riesgo es casi 100 veces mayor que en la población general.

5 Los ataques de porfiria aguda se pueden precipitar debido a factores endógenos o exógenos. Los mecanismos mediante los cuales tales factores inducen ataques pueden incluir, por ejemplo, un incremento de la demanda de las enzimas P450 hepáticas y/o una inducción de la actividad de ALAS1 en el hígado. Un incremento de la demanda de las enzimas P450 hepáticas provoca una reducción del grupo hemo hepático libre, de este modo se induce la síntesis de ALAS1 hepático.

10 Los factores precipitantes incluyen ayuno (u otras formas de ingesta calórica reducida o inadecuada, debido a dietas extremas, atletismo de fondo, etc.), estrés metabólico (p. ej., infecciones, cirugía, viajes aéreos internacionales y estrés psicológico), hormonas endógenas (p. ej., progesterona), fumar cigarrillos, agentes químicos exógenos liposolubles (que incluyen, p. ej., agentes químicos presentes en el humo del tabaco, ciertos fármacos recetados, disolventes orgánicos, biocidas, componentes de bebidas alcohólicas), factores endocrinos (p. ej., hormonas reproductivas (las mujeres pueden experimentar exacerbaciones durante el periodo premenstrual), estrógenos sintéticos, progesteronas, estimulantes de la ovulación y terapia de reemplazo hormonal). Remítase, por ejemplo, a Thunell (1993).

20 Se han contraindicado más de 1000 fármacos para las porfirias hepáticas agudas (p. ej., AIP, HCP, ADP y VP), que incluyen, por ejemplo, alcohol, barbitúricos, Carbamazepina, Carisoprodol, Clonazepam (dosis elevadas), Danazol, Diclofenac y posiblemente otros NSAID (siglas en inglés referentes a los antiinflamatorios no esteroideos), hongos Ergot, estrógenos, Eticlorvinol, Glutetimida, Griseofulvina, Mefenitoína, Meprobamato (también mebutamato y tibutamato), Metiprilón, Metodopramida, Fenitoína, Primidona, progesterona y progestinas sintéticas, Pirazinamida, Pirazolonas (aminopirina y antipirina), Rifampina, Succinimidas (etosuximida y metsuximida), antibióticos de tipo sulfonamida y ácido valproico.

25 Los signos objetivo de la AIP incluyen un cambio de color de la orina durante un ataque agudo (la orina puede aparecer de color rojo o rojo parduzco) y un incremento de las concentraciones de PBG y ALA en la orina durante un ataque agudo. La evaluación genética molecular ha identificado mutaciones en el gen de la PBG-desaminasa (también conocida como HMBS) en más de un 98% de individuos afectados. Thunell (1993).

30 El diagnóstico diferencial de las porfirias puede implicar la determinación del tipo de porfiria midiendo niveles individuales de porfirinas o precursores de porfirinas (p. ej., ALA, PBG) en la orina, las heces y/o el plasma (p. ej., mediante cromatografía y fluorometría) durante un ataque. El diagnóstico de la AIP se puede confirmar estableciendo que la actividad de la PBG-desaminasa en eritrocitos corresponda a un 50% del nivel normal o menos. En pacientes y miembros familiares de riesgo se pueden llevar a cabo evaluaciones del ADN en busca de mutaciones. El diagnóstico de la AIP se confirma normalmente mediante una evaluación del ADN para identificar una mutación génica causal específica (p. ej., una mutación en HMBS).

35 Normalmente, el tratamiento de ataques agudos requiere hospitalización para controlar y tratar los síntomas agudos, que incluyen, p. ej., dolor abdominal, convulsiones, deshidratación/hiponatremia, náuseas/vómitos, taquicardia/hipertensión, retención urinaria/íleo. Por ejemplo, el dolor abdominal se puede tratar, p. ej., con analgésicos narcóticos, las convulsiones se pueden tratar con precauciones para las convulsiones y posiblemente medicamentos (aunque muchos de los medicamentos contra las convulsiones están contraindicados), las náuseas/vómitos se pueden tratar, p. ej., con fenotiazinas y la taquicardia/hipertensión se puede tratar, p. ej., con bloqueadores beta. El tratamiento puede incluir la retirada de medicamentos no seguros, la monitorización de la función respiratoria, así como también del estado neurológico y la fuerza muscular. Los ataques moderados (p. ej., los que no presentan paresia ni hiponatremia) se pueden tratar con al menos 300 g de glucosa al 10% intravenosa por día, aunque cada vez con más frecuencia se proporciona hemina inmediatamente. Los ataques graves se deberían tratar tan pronto como sea posible con hemina intravenosa (3-4 mg/kg diariamente durante 4-14 días) y con glucosa IV mientras se espera que la hemina IV haga efecto. Normalmente, los ataques se tratan con hemina IV durante 4 días y con glucosa IV mientras se espera a que se administre la hemina IV.

50 La hemina (Panhematin® o hemina para inyección, previamente conocida como hematina) es el único producto de tipo hemo aprobado para ser utilizado en los Estados Unidos y fue el primer fármaco aprobado según el *Orphan Drug Act*. Panhematin® es hemina obtenida a partir de glóbulos rojos procesados (PRBC, por sus siglas en inglés) y consiste en Protoporfirina IX que contiene un ión de hierro férrico (Hemo B) con un ligando de tipo cloruro. El grupo hemo actúa limitando la síntesis hepática y/o medular de la porfirina. El mecanismo exacto mediante el cual la hemina produce una mejora de los síntomas en pacientes con episodios agudos de las porfirias hepáticas no ha sido elucidado; sin embargo, es probable que su acción sea debida a la inhibición (por retroalimentación) de la ácido δ-aminolevulínico (ALA)-sintasa, la enzima que limita la velocidad de la vía biosintética de las porfirinas/del grupo hemo. Remítase a la etiqueta del producto Panhematin®, Lundbeck, Inc., octubre de 2010. La inhibición de la ALA-sintasa debería provocar una reducción de la producción de ALA y PBG, así como también de las porfirinas y los intermedios de porfirinas.

55

- Las desventajas de la hemina incluyen el retraso de su impacto sobre los síntomas clínicos y el hecho de que no es capaz de prevenir la recurrencia de los ataques. Las reacciones adversas asociadas con la administración de hemina pueden incluir tromboflebitis, anticoagulación, trombocitopenia, insuficiencia renal o sobrecarga de hierro, la cual es particularmente probable en pacientes que requieren múltiples programas de tratamiento con hemina para ataques recurrentes. Para prevenir la flebitis, se necesita una sonda venosa permanente de acceso en pacientes con ataques recurrentes. Los efectos secundarios que se registran de forma poco habitual incluyen fiebre, dolor, malestar, hemólisis, anafilaxis e insuficiencia circulatoria. Remítase a Anderson, K.E., *Approaches to Treatment and Prevention of Human Porphyrias*, en *The Porphyrin Handbook: Medical Aspects of Porphyrins*, editado por Karl M. Kadish, Kevin M. Smith, Roger Guillard (2003) (en lo sucesivo en la presente Anderson).
- 5
- 10 Resulta difícil preparar el grupo hemo en una forma estable para la administración intravenosa. Este es insoluble a un pH neutro pero se puede preparar como el hidróxido de hemo a un pH de 8 o superior. Anderson. Panhematin es un preparado de hemina liofilizada. Cuando la hemina liofilizada se solubiliza para la administración intravenosa, se forman rápidamente productos de degradación; estos productos de degradación son los responsables de que se produzca un efecto anticoagulante transitorio y flebitis en el punto de la infusión. Anderson. La albúmina que
- 15 contiene hemo y el arginato de hemo (Normosang, la versión europea de la hemina) son más estables y, potencialmente, pueden provocar menos tromboflebitis. Sin embargo, el uso del arginato de hemo no está aprobado en los Estados Unidos. Panhematin se puede estabilizar solubilizándolo para infusión en albúmina humana al 30% en lugar de en agua estéril; sin embargo, la albúmina añade efectos de expansión del volumen intravascular e incrementa el costo del tratamiento, así como también el riesgo de patógenos ya que se aísla a partir de sangre humana. Remítase, p. ej., a Anderson.
- 20
- El tratamiento con éxito de un ataque agudo no evita ni retrasa su reaparición. Existe la duda de si la hemina en sí puede desencadenar ataques recurrentes debido a la inducción de la hemo-oxigenasa. A pesar de ello, en algunas áreas (especialmente Francia), se está tratando a mujeres jóvenes con múltiples ataques recurrentes con hemina semanalmente con el objetivo de alcanzar la profilaxis.
- 25
- La experiencia limitada con trasplantes de hígado sugiere que, cuando tienen éxito, suponen un tratamiento eficaz para la AIP. Se han producido aproximadamente 12 trasplantes en pacientes humanos en Europa, con efectos curativos o variados. El trasplante de hígado puede restablecer la excreción normal de ALA y PBG y evitar los ataques agudos. Remítase, p. ej., a Dar, F.S. *et al. Hepatobiliary Pancreat. Dis. Int.*, 9(1):93-96 (2010). Además, si el hígado de un paciente con AIP se trasplanta en otro paciente ("trasplante dominó"), el paciente que recibe el
- 30 trasplante puede desarrollar AIP.
- Entre los efectos clínicos a largo plazo de las porfirias agudas, se encuentra el dolor neuropático crónico que puede ser el resultado de una neuropatía progresiva debida a los efectos neurotóxicos, p. ej., de niveles elevados de precursores de porfirinas (p. ej., ALA y/o PBG). Los pacientes pueden sufrir dolor neuropático antes de un ataque agudo o durante este. Los pacientes de edad más avanzada pueden experimentar un incremento del dolor neuropático con la edad, para el cual se recetan normalmente varios fármacos narcóticos. Se han registrado anomalías en el electromiograma y una reducción de los tiempos de conducción en pacientes con porfirias hepáticas agudas. Cabe destacar que ratones con AIP (deficiencia de PBG-desaminasa) no inducidos ni tratados desarrollan una neuropatía motriz progresiva que se ha demostrado que provoca la degeneración y la pérdida progresivas del axón del nervio de los cuádriceps debido a los niveles constitutivamente elevados de precursores de porfirinas (ALA y PBG), a la deficiencia del grupo hemo y/o porfirinas (Lindberg *et al.*, *J. Clin. Invest.*, 103(8): 1127–1134, 1999). En pacientes con porfiria aguda (p. ej., ADP, AIP, HCP o VP), los niveles de precursores de porfirinas (ALA y PBG) son a menudo elevados en pacientes sin síntomas y en pacientes con síntomas entre ataques. Por lo tanto, cabe esperar que la reducción de los precursores de porfirinas y el restablecimiento de la biosíntesis normal del grupo hemo mediante la reducción del nivel de actividad y/o expresión de ALAS1 evite y/o minimice el desarrollo de una neuropatía progresiva y crónica. Un tratamiento, p. ej., un tratamiento crónico (p. ej., un tratamiento periódico con ARNi según se describe en la presente, p. ej., un tratamiento de acuerdo con una pauta posológica según se describe en la presente, p. ej., un tratamiento semanal o cada dos semanas) puede reducir de forma continuada la expresión de ALAS1 en pacientes con porfiria aguda que presentan niveles elevados de precursores de porfirinas, porfirinas, productos de porfirinas o sus metabolitos. Tal tratamiento se puede proporcionar según convenga para
- 35
- 40
- 45
- 50 prevenir o reducir la frecuencia o la gravedad de los síntomas de un paciente individual (p. ej., dolor y/o neuropatía) y/o para reducir el nivel de un precursor de porfirina, porfirina, producto o metabolito de porfirina.
- Es necesario identificar agentes terapéuticos novedosos que se puedan utilizar para el tratamiento de las porfirias. Según se ha discutido anteriormente, los tratamientos existentes tales como la hemina presentan numerosas desventajas. Por ejemplo, el impacto de la hemina sobre los síntomas clínicos presenta un retraso, la hemina es cara y puede presentar efectos secundarios (p. ej., tromboflebitis, anticoagulación, trombocitopenia, sobrecarga de hierro, insuficiencia renal). Los agentes terapéuticos novedosos, tales como los que se describen en la presente, pueden resolver estas desventajas y atender las necesidades no cubiertas de los pacientes, por ejemplo, actuando más rápidamente, no induciendo flebitis, proporcionando la comodidad de una administración subcutánea, evitando con éxito ataques recurrentes, evitando o mejorando el dolor (p. ej., dolor neuropático crónico) y/o una neuropatía progresiva, y/o no provocando ciertos efectos adversos asociados con la hemina (p. ej., sobrecarga de hierro, incremento del riesgo de padecer un cáncer hepatocelular).
- 55
- 60

La presente descripción proporciona métodos y composiciones de ARNi para modular la expresión de un gen ALAS1. En ciertas realizaciones, la expresión de ALAS1 se reduce o inhibe utilizando un ARNi específico para ALAS1, de este modo se obtiene una reducción de la expresión de un gen ALAS1. La reducción de la expresión de un gen ALAS1 puede reducir el nivel de uno o más precursores de porfirinas, porfirinas, o productos o metabolitos de porfirinas. La reducción de la expresión de un gen ALAS1, así como también reducciones relacionadas del nivel de uno o más precursores de porfirinas y/o porfirinas, puede ser útil en el tratamiento de trastornos relacionados con la expresión de ALAS1, p. ej., las porfirias.

Los ARNi de las composiciones que se exponen en la presente incluyen una hebra de ARN (la hebra antisentido) que tiene una región con una longitud de 30 nucleótidos o inferior, es decir, una longitud de 15-30 nucleótidos, generalmente una longitud de 19-24 nucleótidos, donde dicha región es sustancialmente complementaria respecto a al menos parte de un transcrito de ARNm de un gen ALAS1 (también se denomina en la presente "ARNi específico para ALAS1"). El uso de un ARNi de este tipo permite la degradación dirigida de los ARNm de genes que participan en patologías asociadas con la expresión de ALAS1 en mamíferos, p. ej., porfirias tales como la porfiria debida a la deficiencia de ALA-deshidratasa (porfiria de Doss) o la porfiria intermitente aguda. Unas dosis muy bajas de ARNi específicos para ALAS1 pueden mediar de forma específica y eficaz la iARN, lo cual provoca una inhibición significativa de la expresión de un gen ALAS1. Los ARNi que tienen como diana ALAS1 pueden mediar de forma específica y eficaz la iARN, lo cual provoca una inhibición significativa de la expresión de un gen ALAS1, p. ej., en ensayos basados en células. De este modo, los métodos y las composiciones que incluyen estos ARNi son útiles para tratar procesos patológicos relacionados con la expresión de ALAS1, tales como las porfirias (p. ej., anemia sideroblástica relacionada con X (XLSA), porfiria debida a la deficiencia de ALA-deshidratasa (porfiria de Doss), porfiria intermitente aguda (AIP), porfiria eritropoyética congénita, porfiria cutánea tardía, coproporfiria hereditaria (coproporfiria), porfiria variegata, protoporfiria eritropoyética (EPP) y eritroporfiria transitoria de la infancia).

La siguiente descripción describe cómo preparar y utilizar composiciones que contienen ARNi para inhibir la expresión de un gen ALAS1, así como también composiciones y métodos para tratar enfermedades y trastornos provocados o modulados por la expresión de este gen. Las realizaciones de las composiciones farmacéuticas que se exponen en la invención incluyen un ARNi que tiene una hebra antisentido que comprende una región con una longitud de 30 nucleótidos o inferior, generalmente una longitud de 19-24 nucleótidos, donde dicha región es sustancialmente complementaria respecto a al menos parte de un transcrito de ARN de un gen ALAS1, junto con un portador farmacéuticamente aceptable. Las realizaciones de composiciones que se exponen en la invención también incluyen un ARNi que tiene una hebra antisentido que tiene una región de complementariedad con una longitud de 30 nucleótidos o inferior, generalmente una longitud de 19-24 nucleótidos, y que es sustancialmente complementaria respecto a al menos parte de un transcrito de ARN de un gen ALAS1.

Por consiguiente, en algunos aspectos, se describen composiciones farmacéuticas que contienen un ARNi de ALAS1 y un portador farmacéuticamente aceptable, métodos para utilizar las composiciones con el fin de inhibir la expresión de un gen ALAS1 y métodos para utilizar las composiciones farmacéuticas con el fin de tratar trastornos relacionados con la expresión de ALAS1.

## I. Definiciones

Para una mayor comodidad, a continuación se proporciona el significado de ciertos términos y expresiones que se utilizan en la memoria descriptiva, los ejemplos y las reivindicaciones adjuntas. En el caso de que exista una discrepancia aparente entre el uso de un término en otras partes de esta memoria descriptiva y su definición proporcionada en esta sección, la definición de esta sección deberá prevalecer.

Las letras "G," "C," "A," "T" y "U" se refieren en general, cada una de ellas, a un nucleótido que contiene guanina, citosina, adenina, timidina y uracilo como base, respectivamente. Sin embargo, se sobreentenderá que el término "ribonucleótido" o "nucleótido" también se puede referir a un nucleótido modificado, según se detalla adicionalmente más adelante, o a un resto de reemplazo alternativo. El experto es consciente de que los restos de guanina, citosina, adenina y uracilo se pueden reemplazar por otros restos sin alterar de forma sustancial las propiedades de apareamiento de bases de un oligonucleótido que comprenda un nucleótido que contenga tal resto de reemplazo. Por ejemplo, sin carácter limitante, un nucleótido que comprenda inosina como su base podrá aparearse con nucleótidos que contengan adenina, citosina o uracilo. Por lo tanto, los nucleótidos que contengan uracilo, guanidina o adenina se podrán reemplazar en las secuencias de nucleótidos del ARNbc que se expone en la invención por un nucleótido que contenga, por ejemplo, inosina. En otro ejemplo, los restos de adenina y citosina en cualquier posición del oligonucleótido se pueden reemplazar por restos de guanina y uracilo, respectivamente, para formar un apareamiento de bases Wobble G-U con el ARNm diana. Las secuencias que contienen tales restos de reemplazo son adecuadas para las composiciones y los métodos que se exponen en la invención.

El término "ALAS1" (también conocido como ALAS-1;  $\delta$ -aminolevulinato-sintasa 1;  $\delta$ -ALA-sintasa 1; ácido 5'-aminolevulinico-sintasa 1; ALAS-H; ALASH; ALAS-N; ALAS3; EC2.3.1.37; 5-aminolevulinato-sintasa, no específica, mitocondrial; ALAS; MIG4; OTTHUMP00000212619; OTTHUMP00000212620; OTTHUMP00000212621; OTTHUMP00000212622; proteína 4 inductora de migración; EC 2.3.1 ), tal como se utilizó en la presente, se refiere a una enzima mitocondrial codificada en el núcleo que es la primera enzima, y normalmente la enzima limitante de la velocidad, de la vía biosintética del grupo hemo en mamíferos. ALAS1 cataliza la condensación de la glicina con

succinil-CoA para formar el ácido  $\delta$ -aminolevulínico (ALA). El gen ALAS1 humano se expresa de forma ubicua, se encuentra en el cromosoma 3p21.1 y normalmente codifica una secuencia de 640 aminoácidos. Por el contrario, el gen ALAS-2, que codifica una isozima, se expresa solamente en los eritrocitos, se encuentra en el cromosoma Xp11.21 y normalmente codifica una secuencia de 550 aminoácidos. La expresión "proteína ALAS1", tal como se utiliza en la presente, se refiere a cualquier variante proteica de ALAS1 de cualquier especie (p. ej., de un ser humano, ratón, primate no humano), así como también a cualesquiera mutantes y fragmentos de esta que conserven actividad de ALAS1. De forma similar, la expresión "transcrito de ALAS1" se refiere a cualquier variante de un transcrito de ALAS1 de cualquier especie (p. ej., de un ser humano, ratón, primate no humano). Se puede consultar un transcrito de ARNm de la variante 1 de ALAS1 humano en NM\_000688.4 (FIG. 3; SEQ ID NO:1). Se puede consultar otra versión, un transcrito de ARNm de la variante 2 de ALAS1 humano, en NM\_000688.5 (FIG. 4; SEQ ID NO:382). El nivel de la proteína ALAS1 codificada madura está regulado por el grupo hemo: unos niveles elevados del grupo hemo reducen la expresión de la enzima madura en las mitocondrias, mientras que unos niveles bajos del grupo hemo incrementan su expresión. Se han identificado múltiples variantes de corte y empalme alternativas que codifican la misma proteína.

Las expresiones "ARNi", "iARN", "agente de ARNi" o "agente de iARN", tal como se utilizan en la presente, se refieren a un agente que contiene ARN, tal como se define este término en la presente, y el cual media la escisión dirigida de un transcrito de ARN, p. ej., mediante una vía del complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC). Un ARNi, tal como se describe en la presente, ejerce la inhibición de la expresión de ALAS1. La inhibición de la expresión de ALAS1 se puede evaluar basándose en la reducción del nivel del ARNm de ALAS1 o la reducción del nivel de la proteína ALAS1. La expresión "secuencia diana", tal como se utiliza en la presente, se refiere a una porción contigua de la secuencia de nucleótidos de una molécula de ARNm formada durante la transcripción de un gen ALAS1, incluido el ARNm que es un producto del procesamiento de ARN de un producto de transcripción primario. La porción diana de la secuencia tendrá una longitud que sea al menos suficiente para que sirva como sustrato para la escisión dirigida por el ARNi en esa porción o cerca de ella. Por ejemplo, la secuencia diana tendrá una longitud generalmente de 9-36 nucleótidos, p. ej., una longitud de 15-30 nucleótidos, incluidos todos los subintervalos comprendidos entre estos valores. A modo de ejemplos no limitantes, la secuencia diana puede tener 15-30 nucleótidos, 15-26 nucleótidos, 15-23 nucleótidos, 15-22 nucleótidos, 15-21 nucleótidos, 15-20 nucleótidos, 15-19 nucleótidos, 15-18 nucleótidos, 15-17 nucleótidos, 18-30 nucleótidos, 18-26 nucleótidos, 18-23 nucleótidos, 18-22 nucleótidos, 18-21 nucleótidos, 18-20 nucleótidos, 19-30 nucleótidos, 19-26 nucleótidos, 19-23 nucleótidos, 19-22 nucleótidos, 19-21 nucleótidos, 19-20 nucleótidos, 20-30 nucleótidos, 20-26 nucleótidos, 20-25 nucleótidos, 20-24 nucleótidos, 20-23 nucleótidos, 20-22 nucleótidos, 20-21 nucleótidos, 21-30 nucleótidos, 21-26 nucleótidos, 21-25 nucleótidos, 21-24 nucleótidos, 21-23 nucleótidos o 21-22 nucleótidos.

La expresión "hebra que comprende una secuencia", tal como se utiliza en la presente, se refiere a un oligonucleótido que comprende una cadena de nucleótidos descrita por la secuencia a la cual se hace referencia utilizando la nomenclatura estándar de nucleótidos.

El término "complementariedad", tal como se utiliza en la presente y a menos que se indique de otro modo, cuando se utiliza para describir una primera secuencia de nucleótidos en relación con una segunda secuencia de nucleótidos, se refiere a la capacidad de un oligonucleótido o polinucleótido que comprende la primera secuencia de nucleótidos para hibridarse y formar una estructura de tipo dúplex en ciertas condiciones con un oligonucleótido o polinucleótido que comprenda la segunda secuencia de nucleótidos, como sobreentenderá un experto. Tales condiciones pueden ser, por ejemplo, condiciones rigurosas, donde las condiciones rigurosas pueden incluir: NaCl 400 mM, PIPES 40 mM de pH 6.4, EDTA 1 mM, 50 °C o 70 °C durante 12-16 horas y a continuación un lavado. Se pueden aplicar otras condiciones tales como las condiciones fisiológicamente relevantes que se pueden encontrar dentro de un organismo. El experto será capaz de determinar el conjunto de condiciones que sean más adecuadas para una prueba de complementariedad de dos secuencias de acuerdo con la aplicación final de los nucleótidos hibridados.

Las secuencias complementarias dentro de un ARNi, p. ej., dentro de un ARNbc que se describe en la presente, incluyen el apareamiento de bases del oligonucleótido o polinucleótido que comprende una primera secuencia de nucleótidos con un oligonucleótido o polinucleótido que comprende una segunda secuencia de nucleótidos a lo largo de la longitud completa de una o ambas secuencias de nucleótidos. En la presente, se puede decir que tales secuencias son "totalmente complementarias" entre sí. Sin embargo, cuando en la presente se dice que la primera secuencia es "sustancialmente complementaria" con respecto a una segunda secuencia, las dos secuencias pueden ser totalmente complementarias o pueden formar uno o dos, pero generalmente no más de 5, 4, 3 o 2, pares de bases con apareamientos erróneos cuando se hibridan para un dúplex de hasta 30 pares de bases, a la vez que mantienen la capacidad de hibridarse en las condiciones más relevantes para su aplicación final, p. ej., la inhibición de la expresión génica mediante una vía de RISC. Sin embargo, cuando dos oligonucleótidos se diseñan para que formen, cuando se hibriden, una o más protuberancias de una hebra, tales protuberancias no se deberán considerar como apareamientos erróneos con respecto a la determinación de la complementariedad. Por ejemplo, se puede decir que un ARNbc que comprenda un oligonucleótido con una longitud de 21 nucleótidos y otro oligonucleótido con una longitud de 23 nucleótidos, donde el oligonucleótido más largo comprende una secuencia de 21 nucleótidos que es totalmente complementaria respecto al oligonucleótido más corto, es "totalmente complementario" a los efectos descritos en la presente.

Las secuencias "complementarias", tal como se utilizan en la presente, también pueden incluir, o estar formadas totalmente por, pares de bases que no sean de Watson-Crick y/o pares de bases formados a partir de nucleótidos modificados y no naturales, siempre que se cumplan los requisitos anteriores respecto a su capacidad para hibridarse. Los pares de bases que no son de Watson-Crick incluyen, sin carácter limitante, el apareamiento de bases de Hoogstein o Wobble G:U.

Las expresiones "complementario/a", "totalmente complementario/a" y "sustancialmente complementario/a" en la presente se pueden utilizar con respecto a la coincidencia de bases entre la hebra sentido y la hebra antisentido de un ARNbc, o entre la hebra antisentido de un agente de ARNi y una secuencia diana, como se comprenderá a partir del contexto de su uso.

Un polinucleótido que sea "sustancialmente complementario respecto a al menos parte de" un ARN mensajero (ARNm), tal como se utiliza en la presente, se refiere a un polinucleótido que es sustancialmente complementario respecto a una porción contigua del ARNm de interés (p. ej., un ARNm que codifica una proteína ALAS1). Por ejemplo, un polinucleótido es complementario respecto a al menos una parte de un ARNm de ALAS1 si la secuencia es sustancialmente complementaria respecto a una porción no interrumpida de un ARNm que codifica ALAS1. Por ejemplo, un polinucleótido es complementario respecto a al menos una parte de un ARNm de ALAS1 si la secuencia es sustancialmente complementaria respecto a una porción no interrumpida de un ARNm que codifica ALAS1.

La expresión "ARN bicatenario" o "ARNbc", tal como se utiliza en la presente, se refiere a un ARNi que incluye una molécula de ARN o un complejo de moléculas con una región dúplex hibridada que comprende dos hebras de ácido nucleico antiparalelas y sustancialmente complementarias, que se dirá que tienen orientaciones "sentido" y "antisentido" respecto al ARN diana. La región dúplex puede tener cualquier longitud que permita una degradación específica de un ARN diana deseado, p. ej., mediante una vía de RISC, pero normalmente tendrá una longitud comprendida en un intervalo de 9 a 36 pares de bases, p. ej., una longitud de 15-30 pares de bases. Considerando un dúplex entre 9 y 36 pares de bases, el dúplex puede tener cualquier longitud dentro de este intervalo, por ejemplo, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 o 36 pares de bases y cualquier subintervalo comprendido entre estos valores, que incluye, sin carácter limitante, 15-30 pares de bases, 15-26 pares de bases, 15-23 pares de bases, 15-22 pares de bases, 15-21 pares de bases, 15-20 pares de bases, 15-19 pares de bases, 15-18 pares de bases, 15-17 pares de bases, 18-30 pares de bases, 18-26 pares de bases, 18-23 pares de bases, 18-22 pares de bases, 18-21 pares de bases, 18-20 pares de bases, 19-30 pares de bases, 19-26 pares de bases, 19-23 pares de bases, 19-22 pares de bases, 19-21 pares de bases, 19-20 pares de bases, 20-30 pares de bases, 20-26 pares de bases, 20-25 pares de bases, 20-24 pares de bases, 20-23 pares de bases, 20-22 pares de bases, 20-21 pares de bases, 21-30 pares de bases, 21-26 pares de bases, 21-25 pares de bases, 21-24 pares de bases, 21-23 pares de bases o 21-22 pares de bases. Los ARNbc generados en la célula mediante el procesamiento con Dicer y enzimas similares tienen generalmente una longitud comprendida en el intervalo de 19-22 pares de bases. Una hebra de la región dúplex de un ARNbc comprende una secuencia que es sustancialmente complementaria respecto a una región de un ARN diana. Las dos hebras que forman la estructura dúplex pueden ser de una única molécula de ARN que tenga al menos una región autocomplementaria o se pueden formar a partir de dos o más moléculas de ARN diferentes. Cuando la región dúplex se forma a partir de dos hebras de una única molécula, la molécula puede tener una región dúplex separada por una única cadena aislada de nucleótidos (que se denomina en la presente "bucle de horquilla") entre el extremo 3' de una hebra y el extremo 5' de la otra hebra respectiva que forma la estructura de dúplex. El bucle de horquilla puede comprender al menos un nucleótido no apareado; el bucle de horquilla puede comprender al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7, al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 20, al menos 23 o más nucleótidos no apareados. Cuando las dos hebras sustancialmente complementarias de un ARNbc comprenden moléculas de ARN diferentes, estas moléculas no tienen que estar necesariamente conectadas covalentemente, pero pueden estarlo. Cuando las dos hebras están conectadas covalentemente por medios que no sean un bucle de horquilla, la estructura conectora se denomina "conector". En la presente también se utiliza el término "ARNip" para referirse a un ARNbc según se ha descrito anteriormente.

El agente de ARNi puede ser un "ARNip monocatenario" que se introduce en una célula u organismo para inhibir un ARNm diana. Los agentes que son ARNi monocatenarios se unen a la endonucleasa de RISC Argonauta 2, que a continuación escinde el ARNm diana. Los ARNip monocatenarios contienen generalmente 15-30 nucleótidos y están modificados químicamente. El diseño y la evaluación de ARNip monocatenarios se describe en la Patente de EE. UU. N.º 8.101.348 y en Lima *et al.*, (2012) *Cell* 150: 883-894, los contenidos completos de cada uno de los cuales se incorporan a la presente por referencia. Cualquiera de las secuencias de nucleótidos antisentido descritas en la presente (p. ej., las secuencias proporcionadas en las Tablas 2, 3, 6, 7, 8, 9, 14, 15, 18 y 20) se pueden utilizar como un ARNip monocatenario según se describe en la presente o se pueden modificar químicamente mediante los métodos descritos en Lima *et al.*, (2012) *Cell* 150:883-894.

En otro aspecto, el agente de ARN es una "molécula de ARN antisentido monocatenaria". Una molécula de ARN antisentido monocatenaria es complementaria respecto a una secuencia dentro del ARNm diana. Las moléculas de ARN antisentido monocatenarias pueden inhibir la traducción de un modo estequiométrico apareando sus bases con el ARNm y obstruyendo físicamente la maquinaria de traducción, remítase a Dias, N. *et al.*, (2002) *Mol Cancer Ther* 1:347-355. Como alternativa, las moléculas antisentido monocatenarias inhiben un ARNm diana hibridándose con la

diana y escindiendo la diana a través de un evento de escisión de tipo RNasaH. La molécula de ARN antisentido monocatenaria puede tener una longitud comprendida entre aproximadamente 10 y aproximadamente 30 nucleótidos y puede tener una secuencia que sea complementaria respecto a una secuencia diana. Por ejemplo, la molécula de ARN antisentido monocatenaria puede comprender una secuencia que tenga al menos

5 aproximadamente 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más nucleótidos contiguos de cualquiera de las secuencias de nucleótidos antisentido descritas en la presente, p. ej., las secuencias proporcionadas en cualquiera de las Tablas 2, 3, 6, 7, 8, 9, 14, 15, 18 y 20.

El experto reconocerá que la expresión "molécula de ARN" o "molécula de ácido ribonucleico" engloba, no solo las moléculas de ARN tal como se expresan o encuentran en la naturaleza, sino también análogos y derivados de ARN que comprenden uno o más análogos o derivados de ribonucleótidos/ribonucleósidos según se describen en la presente o como se conocen en la técnica. En términos estrictos, un "ribonucleósido" incluye una base nucleosídica y un azúcar de tipo ribosa, y un "ribonucleótido" es un ribonucleósido con uno, dos o tres restos de tipo fosfato. Sin embargo, los términos "ribonucleósido" y "ribonucleótido" se pueden considerar equivalentes según se utilizan en la presente. El ARN se puede modificar en la estructura de la base nucleotídica o en la estructura del esqueleto ribosa-fosfato, p. ej., según se describe en la presente más adelante. Sin embargo, las moléculas que comprenden análogos o derivados de ribonucleósidos deben conservar la capacidad para formar un dúplex. A modo de ejemplos no limitantes, una molécula de ARN también puede incluir al menos un ribonucleósido modificado, que incluye, sin carácter limitante, un nucleósido con una modificación de tipo 2'-O-metilo, un nucleósido que comprende un grupo 5'-fosforotioato, un nucleósido terminal unido a un derivado de tipo colesteroil o un grupo de tipo bisdecilamida del ácido dodecanoico, un nucleósido bloqueado, un nucleósido que no sea básico, un nucleósido con una modificación de tipo 2'-desoxi-2'-fluoro, un nucleósido con una modificación de tipo 2'-amino, un nucleósido con una modificación de tipo 2'-alquilo, un nucleósido de tipo morfolino, un nucleósido que comprende una base que no sea natural o un fosforamidoato, o cualquier combinación de estos. Como alternativa, una molécula de ARN puede comprender al menos dos ribonucleósidos modificados, al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7, al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 15, al menos 20 o más, hasta la longitud completa de la molécula de ARNbc. Las modificaciones no tienen que ser necesariamente las mismas para cada uno de esta pluralidad de ribonucleósidos modificados en una molécula de ARN. En una realización, los ARN modificados contemplados para ser utilizados en los métodos y las composiciones que se describen en la presente son ácidos nucleicos peptídicos (PNA, por sus siglas en inglés) que tienen la capacidad de formar la estructura de dúplex requerida y que permiten o median la degradación específica de un ARN diana, p. ej., mediante una vía de RISC.

10  
15  
20  
25  
30

En un aspecto, un ribonucleósido modificado incluye un desoxirribonucleósido. En un caso de este tipo, un agente de ARNi puede comprender uno o más desoxinucleósidos, que incluyen, por ejemplo, una o más protuberancias de desoxinucleósidos, o uno o más desoxinucleósidos dentro de la porción bicatenaria del ARNbc. Sin embargo, resulta obvio de por sí que una molécula de ADN bicatenaria no se englobará bajo ninguna circunstancia en el término "ARNi".

35

En un aspecto, un agente de interferencia por ARN incluye un ARN monocatenario que interacciona con una secuencia de ARN diana para dirigir la escisión del ARN diana. Sin pretender vincularse a ninguna teoría, el ARN bicatenario largo que es introducido en células es fragmentado para obtener ARNip por una endonucleasa de Tipo III conocida como Dicer (Sharp *et al.*, *Genes Dev.* 2001, 15:485). Dicer, una enzima similar a la ribonucleasa III, procesa el ARNbc para obtener ARN interferentes pequeños de 19-23 pares de bases con protuberancias 3' de dos bases características (Bernstein *et al.*, (2001) *Nature* 409:363). A continuación, los ARNip se incorporan en un complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC), donde una o más helicasas deshacen el dúplex de ARNip, lo cual permite que la hebra antisentido complementaria guíe el reconocimiento de la diana (Nykanen *et al.*, (2001) *Cell* 107:309). Tras la unión al ARNm diana adecuado, una o más endonucleasas del RISC escinden la diana para inducir el silenciamiento (Elbashir *et al.*, (2001) *Genes Dev.* 15:188). Por lo tanto, en un aspecto, la divulgación se refiere a un ARN monocatenario que propicia la formación de un complejo RISC para ejercer el silenciamiento del gen diana.

40  
45

La expresión "protuberancia de nucleótidos", tal como se utiliza en la presente, se refiere a al menos un nucleótido no apareado que sobresale de la estructura del dúplex de un ARNi, p. ej., un ARNbc. Por ejemplo, cuando un extremo 3' de una hebra de un ARNbc se extiende más allá del extremo 5' de la otra hebra, o viceversa, se produce una protuberancia de nucleótidos. Un ARNbc puede comprender una protuberancia de al menos un nucleótido; como alternativa, la protuberancia puede comprender al menos dos nucleótidos, al menos tres nucleótidos, al menos cuatro nucleótidos, al menos cinco nucleótidos o más. Una protuberancia de nucleótidos puede comprender o estar constituida por un análogo de nucleótido/nucleósido, que incluye un desoxinucleótido/nucleósido. La o las protuberancias se pueden encontrar en la hebra sentido, la hebra antisentido o cualquier combinación de estas. Además, el o los nucleótidos de una protuberancia pueden estar presentes en el extremo 5', el extremo 3' o ambos extremos de la hebra sentido o antisentido de un ARNbc.

50  
55

La hebra antisentido de un ARNbc puede tener una protuberancia de 1-10 nucleótidos en el extremo 3' y/o el extremo 5'. La hebra sentido de un ARNbc puede tener una protuberancia de 1-10 nucleótidos en el extremo 3' y/o el extremo 5'. Uno o más de los nucleótidos de la protuberancia se pueden reemplazar por un nucleósido-tiofosfato.

60

Las expresiones "romo" o "de extremos romos", tal como se utilizan en la presente para hacer referencia a un ARNbc, se refieren a que no hay nucleótidos ni análogos de nucleótidos no apareados en un extremo terminal determinado de un ARNbc, es decir, no hay protuberancias de nucleótidos. Uno o ambos extremos de un ARNbc pueden ser romos. Cuando ambos extremos de un ARNbc son romos, se dice que el ARNbc es de extremos romos.

5 Para que no haya lugar a dudas, un ARNbc "de extremos romos" es un ARNbc que es romo en ambos extremos, es decir, que no tiene protuberancia de nucleótidos en ninguno de los extremos de la molécula. En la mayoría de los casos, una molécula de este tipo será bicatenaria en toda su longitud.

La expresión "hebra antisentido" o "hebra guía" se refiere a la hebra de un ARNi, p. ej., un ARNbc, que incluye una región que es sustancialmente complementaria respecto a una secuencia diana. La expresión "región de complementariedad", tal como se utiliza en la presente, se refiere a la región de la hebra antisentido que es sustancialmente complementaria respecto a una secuencia, por ejemplo, una secuencia diana, según se define en la presente. Cuando la región de complementariedad no es totalmente complementaria respecto a la secuencia diana, los apareamientos erróneos se pueden producir en las regiones internas o terminales de la molécula. En general, los apareamientos erróneos más tolerados se encuentran en las regiones terminales, p. ej., en los 5, 4, 3 o 2 nucleótidos de los extremos 5' y/o 3'.

La expresión "hebra sentido" o "hebra pasajera", tal como se utiliza en la presente, se refiere a la hebra de un ARNi que incluye una región que es sustancialmente complementaria respecto a una región de la hebra antisentido, según se define este término en la presente.

El término "SNALP" (por sus siglas en inglés), tal como se utiliza en la presente, se refiere a una partícula de ácido nucleico-lípido estable. Una SNALP representa una vesícula de lípidos que recubre un interior acuoso reducido que comprende un ácido nucleico tal como un ARNi o un plásmido a partir del cual se transcribe un ARNi. Las SNALP se describen, p. ej., en las Publicaciones de Solicitud de Patente de EE. UU. N.<sup>os</sup> 20060240093, 20070135372, y en la Solicitud Internacional N.<sup>o</sup> WO 2009082817.

La expresión "se introduce en una célula", cuando hace referencia a un ARNi, se refiere a que se facilita o se lleva a cabo su captación o absorción en la célula, según sobreentienden los expertos en la técnica. La absorción o captación de un ARNi se puede producir a través de procesos celulares activos o difusos sin ayuda, o mediante dispositivos o agentes auxiliares. El significado de este término no se limita a células *in vitro*; un ARNi también se puede "introducir en una célula", donde la célula sea parte de un organismo vivo. En un caso de este tipo, la introducción en la célula incluirá el suministro al organismo. Por ejemplo, para un suministro *in vivo*, el ARNi se pueden inyectar en un punto tisular o se puede administrar por vía sistémica. El suministro *in vivo* también se puede llevar a cabo mediante un sistema de suministro de  $\beta$ -glucano tal como los que se describen en las Patentes de EE. UU. N.<sup>os</sup> 5.032.401 y 5.607.677, y en la Publicación de EE. UU. N.<sup>o</sup> 2005/0281781. La introducción *in vitro* en una célula incluye métodos conocidos en la técnica tales como la electroporación y lipofección. Existen otras estrategias conocidas en la técnica o que se describen en la presente más adelante.

La expresión "modular la expresión de", tal como se utiliza en la presente, se refiere a una "inhibición" al menos parcial o una "activación" parcial de la expresión de un gen ALAS1 en una célula tratada con una composición de ARNi según se describe en la presente en comparación con la expresión de ALAS1 en una célula de control. Una célula de control incluye una célula no tratada o una célula tratada con un ARNi de control que no actúe sobre la diana.

Las expresiones "activar", "potenciar", "aumentar la expresión de", "incrementar la expresión de" y similares, siempre que hagan referencia a un gen ALAS1, se refieren en la presente a la activación al menos parcial de la expresión de un gen ALAS1, que se manifiesta por un incremento de la cantidad de ARNm de ALAS1, el cual se puede aislar o detectar a partir de una primera célula o grupo de células en las cuales se transcriba un gen ALAS1 y que se han o hayan tratado de un modo tal que se incremente la expresión de un gen ALAS1, en comparación con una segunda célula o grupo de células sustancialmente idénticas a la primera célula o grupo de células pero que no se han o hayan tratado de ese modo (células de control).

La expresión de un gen ALAS1 se puede activar al menos aproximadamente un 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45% o 50% mediante la administración de un ARNi según se describe en la presente. Un gen ALAS1 se puede activar al menos aproximadamente un 60%, 70% u 80% mediante la administración de un ARNi que se expone en la invención. La expresión de un gen ALAS1 se puede activar al menos aproximadamente un 85%, 90% o 95% o más mediante la administración de un ARNi según se describe en la presente. La expresión del gen ALAS1 se puede incrementar al menos 1 vez, al menos 2 veces, al menos 5 veces, al menos 10 veces, al menos 50 veces, al menos 100 veces, al menos 500 veces, al menos 1000 veces o más en células tratadas con un ARNi según se describe en la presente en comparación con la expresión en una célula no tratada. La activación de la expresión por parte de ARNbc pequeños se describe, por ejemplo, en Li *et al.*, 2006 *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103:17337-42, y en US20070111963 y US2005226848.

Las expresiones "silenciar", "inhibir la expresión de", "reducir la expresión de", "suprimir la expresión de" y similares, siempre que hagan referencia a un gen ALAS1, se refieren en la presente a la supresión al menos parcial de la expresión de un gen ALAS1, según se evalúa, p. ej., en función de la expresión del ARNm de ALAS1, la expresión

de la proteína ALAS1 u otro parámetro relacionado funcionalmente con la expresión del gen ALAS1 (p. ej., las concentraciones de ALA o PBG en plasma u orina). Por ejemplo, la inhibición de la expresión de ALAS1 se puede manifestar por una reducción de la cantidad de ARNm de ALAS1 que se puede aislar o detectar a partir de una primera célula o grupo de células en las que se transcriba un gen ALAS1 y que se han o hayan tratado de un modo tal que se inhíba la expresión de un gen ALAS1, en comparación con un control. El control puede ser una segunda célula o grupo de células sustancialmente idénticas a la primera célula o grupo de células, con la excepción de que la segunda célula o grupo de células no se han tratado del mismo modo (células de control). El grado de inhibición se expresa normalmente como un porcentaje de un nivel de control, p. ej.,

$$\frac{(\text{ARNm en células de control}) - (\text{ARNm en células tratadas})}{(\text{ARNm en células de control})} \cdot 100\%$$

Como alternativa, el grado de inhibición se puede proporcionar en términos de una reducción de un parámetro que esté relacionado funcionalmente con la expresión del gen ALAS1, p. ej., la cantidad de proteína codificada por un gen ALAS1 o el nivel de una o más porfirinas. La reducción de un parámetro relacionado funcionalmente con la expresión del gen ALAS1 se puede expresar de forma similar como un porcentaje de un nivel de control. En principio, el silenciamiento de un gen ALAS1 se puede determinar en cualquier célula que exprese ALAS1, ya sea constitutivamente o mediante una modificación genómica, y mediante cualquier ensayo adecuado. Sin embargo, cuando se necesite una referencia para determinar si un ARNi determinado inhibe la expresión del gen ALAS1 en cierto grado y, por consiguiente, queda englobado en la presente invención, los ensayos proporcionados en los Ejemplos más adelante deberán servir como una referencia de este tipo.

Por ejemplo, en ciertos casos, la expresión de un gen ALAS1 se suprime al menos aproximadamente un 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45% o 50% mediante la administración de un ARNi que se expone en la invención. Se describe que un gen ALAS1 se suprime al menos aproximadamente un 60%, 65%, 70%, 75% u 80% mediante la administración de un ARNi que se expone en la invención. Se describe que un gen ALAS1 se suprime al menos aproximadamente un 85%, 90%, 95%, 98%, 99% o más mediante la administración de un ARNi según se describe en la presente.

Los términos "tratar", "que trata", "tratamiento" y similares, tal como se utilizan en la presente en el contexto de la expresión de ALAS1, se refieren al alivio o la reducción de procesos patológicos relacionados con la expresión de ALAS1 (p. ej., procesos patológicos que implican porfirinas o defectos en la vía de las porfirinas tales como, por ejemplo, las porfirias). En el contexto de la presente invención, y siempre que se refieran a cualquiera de las diferentes condiciones mencionadas en la presente más adelante (además de los procesos patológicos relacionados con la expresión de ALAS1), los términos "tratar", "tratamiento" y similares se refieren a prevenir, aliviar o reducir al menos un síntoma asociado con tal afección, o ralentizar o revertir la evolución o la evolución anticipada de tal afección. Por ejemplo, los métodos que se exponen en la presente, cuando se emplean para tratar una porfiria, pueden servir para reducir o prevenir uno o más síntomas asociados con la porfiria (p. ej., el dolor), para reducir la gravedad o frecuencia de los ataques asociados con la porfiria, para reducir la probabilidad de que se produzca un ataque de uno o más síntomas asociados con la porfiria tras la exposición a una condición precipitante, para reducir la duración de un ataque asociado con la porfiria y/o para reducir el riesgo de desarrollar afecciones asociadas con la porfiria (p. ej., un cáncer hepatocelular o una neuropatía (p. ej., una neuropatía progresiva)). De este modo, a menos que el contexto indique claramente lo contrario, se pretende que los términos "tratar", "tratamiento" y similares engloben la profilaxis, p. ej., la prevención de trastornos y/o síntomas de trastornos relacionados con la expresión de ALAS1.

El término "inferior", en el contexto de un síntoma o marcador de una enfermedad, se refiere a una reducción estadística o clínicamente significativa de dicho nivel. La reducción puede ser, por ejemplo, de al menos un 10%, al menos un 20%, al menos un 30%, al menos un 40% o más y normalmente disminuye hasta un nivel que se acepta como perteneciente al intervalo normal para un individuo sin tal trastorno.

Las expresiones "cantidad terapéuticamente eficaz" y "cantidad profilácticamente eficaz", tal como se utilizan en la presente, se refieren a una cantidad que proporciona un beneficio terapéutico en el tratamiento, la prevención o la gestión de procesos patológicos relacionados con la expresión de ALAS1. La cantidad específica que es terapéuticamente eficaz puede ser determinada fácilmente por un médico común y puede variar dependiendo de factores conocidos en la técnica tales como, por ejemplo, el tipo de proceso patológico, el historial y la edad del paciente, la etapa del proceso patológico y la administración de otros agentes.

La expresión "composición farmacéutica", tal como se utiliza en la presente, comprende una cantidad farmacológicamente eficaz de un ARNi y un portador farmacéuticamente aceptable. La expresión "cantidad farmacológicamente eficaz", "cantidad terapéuticamente eficaz" o simplemente "cantidad eficaz", tal como se utiliza en la presente, se refiere a aquella cantidad de un ARNi que es eficaz para producir el resultado farmacológico, terapéutico o preventivo esperado. Por ejemplo, en un método para tratar un trastorno relacionado con la expresión de ALAS1 (p. ej., en un método para tratar una porfiria), una cantidad eficaz incluye una cantidad eficaz para reducir uno o más síntomas asociados con una porfiria, una cantidad eficaz para reducir la frecuencia de los ataques, una cantidad eficaz para reducir la probabilidad de que se produzca un ataque de uno o más síntomas asociados con

una porfiria tras la exposición a un factor precipitante, o una cantidad eficaz para reducir el riesgo de desarrollar afecciones asociadas con una porfiria (p. ej., una neuropatía (p. ej., una neuropatía progresiva), un cáncer hepatocelular). Por ejemplo, si un tratamiento clínico determinado se considera eficaz cuando se produce una reducción de al menos un 10% en un parámetro medible asociado con una enfermedad o trastorno, una cantidad terapéuticamente eficaz de un fármaco para el tratamiento de esta enfermedad o trastorno será la cantidad necesaria para ejercer una reducción de al menos un 10% en ese parámetro. Por ejemplo, una cantidad terapéuticamente eficaz de un ARNi que tenga ALAS1 como diana puede reducir los niveles de la proteína ALAS1 en cualquier cantidad medible, p. ej., al menos un 10%, 20%, 30%, 40% o 50%.

La expresión "portador farmacéuticamente aceptable" se refiere a un portador para la administración de un agente terapéutico. Tales portadores incluyen, sin carácter limitante, solución salina, solución tamponada, dextrosa, agua, glicerol, etanol y combinaciones de estos. El término excluye específicamente el medio de cultivo celular. Para los fármacos que se administran por vía oral, los portadores farmacéuticamente aceptables incluyen, sin carácter limitante, excipientes farmacéuticamente aceptables tales como diluyentes inertes, agentes desintegrantes, agentes aglutinantes, agentes lubricantes, agentes edulcorantes, agentes saborizantes, agentes colorantes y conservantes. Los diluyentes inertes adecuados incluyen carbonato de sodio y calcio, fosfato de sodio y calcio, y lactosa, mientras que el almidón de maíz y el ácido alginico son agentes desintegrantes adecuados. Los agentes aglutinantes pueden incluir almidón y gelatina, mientras que el agente lubricante, si está presente, será generalmente estearato de magnesio, ácido esteárico o talco. Si se desea, los comprimidos se pueden recubrir con un material tal como monoestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo, para retrasar la absorción en el aparato gastrointestinal. Los agentes incluidos en las formulaciones farmacológicas se describen con más detalle en la presente posteriormente.

El término "aproximadamente", cuando hace referencia a un número o a un intervalo, se refiere a que el número o intervalo mencionado es una aproximación dentro de la variabilidad experimental (o dentro del error experimental estadístico) y, por lo tanto, el número o intervalo numérico puede variar, por ejemplo, entre un 1% y un 15% del número o intervalo numérico mencionado.

## II. Ácido ribonucleico bicatenario (ARNbc)

En la presente se describen agentes de ARNi que inhiben la expresión de un gen ALAS1. El agente de ARNi puede incluir moléculas de ácido ribonucleico bicatenarias (ARNbc) para inhibir la expresión de un gen ALAS1 en una célula o en un sujeto (p. ej., en un mamífero, p. ej., en un ser humano que padezca una porfiria), donde el ARNbc incluye una hebra antisentido que tiene una región de complementariedad que es complementaria respecto a al menos una parte de un ARNm formado en la expresión de un gen ALAS1, y donde la región de complementariedad tiene una longitud de 30 nucleótidos o inferior, generalmente una longitud de 19-24 nucleótidos, y donde el ARNbc, cuando entra en contacto con una célula que expresa el gen ALAS1, inhibe la expresión del gen ALAS1 al menos un 10%, según se evalúa mediante, por ejemplo, un método basado en PCR o ADN ramificado (ADNr), o mediante un método basado en proteínas tal como la inmunotransferencia de Western. El agente de ARNi puede activar la expresión de un gen ALAS1 en una célula o mamífero. La expresión de un gen ALAS1 en un cultivo celular, tal como células COS, células HeLa, hepatocitos primarios, células HepG2, células cultivadas primarias, o en una muestra biológica procedente de un sujeto se puede evaluar midiendo los niveles de ARNm de ALAS1, por ejemplo, mediante un ensayo de ADNr o TaqMan, o midiendo los niveles de proteínas, por ejemplo, mediante un análisis de inmunofluorescencia, utilizando, por ejemplo, técnicas de citometría de flujo o inmunotransferencia de Western.

Un ARNbc incluye dos hebras de ARN que son suficientemente complementarias para hibridarse y formar una estructura de dúplex en las condiciones en las que se utilizará el ARNbc. Una hebra de un ARNbc (la hebra antisentido) incluye una región de complementariedad que es sustancialmente complementaria, y en general totalmente complementaria, respecto a una secuencia diana, derivada de la secuencia de un ARNm formado durante la expresión de un gen ALAS1. La otra hebra (la hebra sentido) incluye una región que es complementaria respecto a la hebra antisentido, de modo que las dos hebras se hibridan y forman una estructura de dúplex cuando se combinan en condiciones adecuadas. En general, la estructura de dúplex tiene una longitud comprendida entre 15 y 30 pares de bases inclusive, más generalmente entre 18 y 25 inclusive, aún más generalmente entre 19 y 24 inclusive, y de la forma más general entre 19 y 21 inclusive. De forma similar, la región de complementariedad respecto a la secuencia diana tiene una longitud comprendida entre 15 y 30 nucleótidos inclusive, más generalmente entre 18 y 25 inclusive, aún más generalmente entre 19 y 24 inclusive, y de la forma más general entre 19 y 21 inclusive. El ARNbc puede tener una longitud comprendida entre 15 y 20 nucleótidos o una longitud comprendida entre 25 y 30 nucleótidos inclusive. Como reconocerá el experto, la región que actúa como diana de un ARN que actúa como diana para ser escindido formará parte en la mayoría de los casos de una molécula de ARN más larga, a menudo una molécula de ARNm. Cuando sea relevante, una "parte" de una diana de ARNm es una secuencia contigua de una diana de ARNm de longitud suficiente para que sea un sustrato para la escisión dirigida por iARN (es decir, la escisión a través de una vía de RISC). Los ARNbc que tienen dúplex de tan solo 9 pares de bases pueden mediar, en algunas circunstancias, la escisión del ARN dirigida por iARN. En la mayoría de los casos, una diana tendrá una longitud de al menos 15 nucleótidos, p. ej., una longitud de 15-30 nucleótidos.

Un experto en la técnica también reconocerá que la región dúplex es una porción funcional principal de un ARNbc, p. ej., una región dúplex de 9 a 36, p. ej., de 15-30 pares de bases. De este modo, siempre que se procese hasta

obtener un dúplex funcional de, p. ej., 15-30 pares de bases que tenga como diana un ARN deseado para escindirlo, una molécula de ARN o un complejo de moléculas de ARN que tengan una región dúplex con un tamaño superior a 30 pares de bases será un ARNbc. De este modo, un experto reconocerá que un miARN será entonces un ARNbc. Un ARNbc puede no ser un miARN de origen natural. Un agente de ARNi útil para actuar sobre la expresión de ALAS1 puede no generarse en la célula diana mediante la escisión de un ARNbc más largo.

Un ARNbc según se describe en la presente puede incluir además una o más protuberancias de nucleótidos monocatenarias. El ARNbc se puede sintetizar mediante métodos estándar conocidos en la técnica, según se describe adicionalmente más adelante, p. ej., mediante el uso de un sintetizador de ADN automatizado tal como los comercializados por, por ejemplo, Biosearch, Applied Biosystems, Inc. Un gen de ALAS1 puede ser un gen de ALAS1 humano. El gen de ALAS1 puede ser un gen de ALAS1 de rata o ratón. La primera secuencia puede ser una hebra sentido de un ARNbc que incluye una secuencia sentido de la Tabla 2 o la Tabla 3, y la segunda secuencia es una hebra antisentido de un ARNbc que incluye una secuencia antisentido de la Tabla 2 o la Tabla 3. La primera secuencia puede ser una hebra sentido de un ARNbc que incluye una secuencia sentido de la Tabla 2, 3, 6, 7, 8, 9, 14 o 15, y la segunda secuencia es una hebra antisentido de un ARNbc que incluye una secuencia antisentido de la Tabla 2, 3, 6, 7, 8, 9, 14 o 15. La primera secuencia puede ser una hebra sentido de un ARNbc que incluye una secuencia sentido de la Tabla 2, 3, 6, 7, 8, 9, 14, 15, 18 o 20, y la segunda secuencia puede ser una hebra antisentido de un ARNbc que incluye una secuencia antisentido de la Tabla 2, 3, 6, 7, 8, 9, 14, 15, 18 o 20. Se pueden determinar fácilmente agentes de ARNbc alternativos que tengan como diana secuencias distintas a las de los ARNbc descritos en la presente (p. ej., en la Tabla 2 o la Tabla 3), utilizando la secuencia diana y la secuencia de ALAS1 flanqueante.

En un aspecto, un ARNbc incluirá al menos secuencias de nucleótidos sentido y antisentido, donde la hebra sentido se selecciona a partir de los grupos de secuencias que se proporcionan en las Tablas 2 y 3, y la hebra antisentido correspondiente de la hebra sentido se selecciona a partir de las Tablas 2 y 3. En un aspecto adicional, un ARNbc incluirá al menos secuencias de nucleótidos sentido y antisentido, donde la hebra sentido se selecciona a partir de los grupos de secuencias que se proporcionan en las Tablas 2, 3, 6, 7, 8, 9, 14 y 15, y la hebra antisentido correspondiente de la hebra sentido se selecciona a partir de las Tablas 2, 3, 6, 7, 8, 9, 14 y 15. En un aspecto adicional, un ARNbc incluirá al menos secuencias de nucleótidos sentido y antisentido, donde la hebra sentido se selecciona a partir de los grupos de secuencias que se proporcionan en las Tablas 2, 3, 6, 7, 8, 9, 14, 15, 18 y 20, y la hebra antisentido correspondiente de la hebra sentido se selecciona a partir de las Tablas 2, 3, 6, 7, 8, 9, 14, 15, 18 y 20. En estos aspectos, una de las dos secuencias es complementaria respecto a la otra de las dos secuencias, siendo una de las secuencias sustancialmente complementaria respecto a una secuencia de un ARNm generado mediante la expresión de un gen ALAS1. En este sentido, un ARNbc incluirá dos oligonucleótidos, donde un oligonucleótido se describe como la hebra sentido de la Tabla 2, 3, 6, 7, 8, 9, 14, 15, 18 o 20, y el segundo oligonucleótido se describe como la hebra antisentido correspondiente de la hebra sentido de la Tabla 2, 3, 6, 7, 8, 9, 14, 15, 18 o 20. Según se describe en otras partes de la presente y se sabe en la técnica, las secuencias complementarias de un ARNbc también pueden estar contenidas como regiones autocomplementarias de una única molécula de ácido nucleico, en lugar de estar en oligonucleótidos separados.

El experto es muy consciente de que los ARNbc que tienen una estructura de dúplex con una longitud comprendida entre 20 y 23, pero específicamente de 21, pares de bases se consideran particularmente eficaces a la hora de inducir la interferencia por ARN (Elbashir *et al.*, EMBO 2001, 20:6877-6888). Sin embargo, otros han observado que estructuras de dúplex de ARN más largas o más cortas también pueden ser eficaces. En las realizaciones descritas anteriormente, debido a la naturaleza de las secuencias de oligonucleótido proporcionadas en las Tablas 2, 3, 6, 7, 8, 9, 14, 15, 18 y 20, los ARNbc descritos en la presente pueden incluir al menos una hebra con una longitud de como mínimo 21 nucleótidos. Cabe esperar razonablemente que dúplex más cortos que tengan una de las secuencias de la Tabla 2, 3, 6, 7, 8, 9, 14, 15, 18 o 20 menos solamente unos pocos nucleótidos en uno o ambos extremos puedan ser similarmente eficaces en comparación con los ARNbc descritos anteriormente. Por lo tanto, se contemplan ARNbc con una secuencia parcial de al menos 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más nucleótidos contiguos de una de las secuencias de la Tabla 2, 3, 6, 7, 8, 9, 14, 15, 18 o 20 y que difieren en su capacidad para inhibir la expresión de un gen ALAS1 en no más de un 5, 10, 15, 20, 25 o 30% de inhibición en comparación con un ARNbc que comprenda toda la secuencia.

Además, los ARN proporcionados en las Tablas 2 y 3, así como también los ARN proporcionados en las Tablas 2, 3, 6, 7, 8, 9, 14, 15, 18 y 20, identifican un sitio en un transcrito de ALAS1 que es susceptible de sufrir una escisión mediada por RISC. En este sentido, la presente invención expone además ARNi que actúan dentro de una de estas secuencias. Según se utiliza en la presente, se dice que un ARNi actúa dentro de un sitio particular de un transcrito de ARN si el ARNi fomenta la escisión del transcrito en cualquier lugar dentro de ese sitio particular. Un ARNi de este tipo incluye generalmente al menos 15 nucleótidos contiguos de una de las secuencias proporcionadas en las Tablas 2, 3, 6, 7, 8, 9, 14, 15, 18 y 20 acoplados a secuencias de nucleótidos adicionales procedentes de la región contigua a la secuencia seleccionada en un gen ALAS1.

Aunque una secuencia diana tiene generalmente una longitud de 15-30 nucleótidos, existe una gran variación en la idoneidad de secuencias particulares en este intervalo para dirigir la escisión de cualquier ARN diana determinado. Varios paquetes de software y las directrices que se exponen en la presente proporcionan una guía para la

identificación de secuencias diana óptimas para cualquier diana génica determinada, pero también se puede adoptar una estrategia empírica en la cual se coloca una "ventana" o "máscara" de un tamaño determinado (a modo de ejemplo no limitante, 21 nucleótidos) de forma literal o figurada (que incluye, p. ej., *in silico*) sobre la secuencia de ARN diana para identificar secuencias en el intervalo de tamaños que puedan servir como secuencias diana.

5 Moviendo la "ventana" de la secuencia progresivamente un nucleótido hacia adelante o hacia atrás respecto a una localización de la secuencia diana inicial, se puede identificar la siguiente secuencia diana potencial, hasta que se identifica el conjunto completo de posibles secuencias para cualquier tamaño seleccionado de la diana determinada. Este proceso, acoplado con la síntesis y la evaluación sistemáticas de las secuencias identificadas (utilizando ensayos como los que se describen en la presente o se conocen en la técnica) para identificar las secuencias que  
10 presentan un comportamiento óptimo, permite identificar las secuencias de ARN que, cuando actúan como diana de un agente de ARNi, median la mejor inhibición de la expresión del gen diana. De este modo, aunque las secuencias identificadas, por ejemplo, en las Tablas 2, 3, 6, 7, 8, 9, 14, 15, 18 y 20 representan secuencias diana eficaces, se contempla que se puede conseguir una optimización adicional de la eficacia de la inhibición "desplazando la ventana" progresivamente un nucleótido hacia adelante o hacia atrás en las secuencias determinadas para  
15 identificar secuencias con unas características de inhibición iguales o mejores.

Adicionalmente, se contempla que para cualquier secuencia identificada, p. ej., en las Tablas 2, 3, 6, 7, 8, 9, 14, 15, 18 y 20, se puede conseguir una optimización adicional añadiendo o eliminando nucleótidos de forma sistemática para generar secuencias más largas o más cortas y evaluando estas secuencias y secuencias generadas desplazando una ventana del tamaño más largo o más corto hacia adelante o hacia atrás en el ARN diana a partir  
20 de ese punto. Nuevamente, el acoplamiento de esta estrategia para generar nuevas dianas candidato con la evaluación para determinar la eficacia de los ARNi basándose en estas secuencias diana en un ensayo de inhibición como los que se conocen en la técnica o como los que se describen en la presente puede proporcionar mejoras adicionales en la eficacia de la inhibición. Es más, tales secuencias optimizadas se pueden ajustar mediante, p. ej., la introducción de nucleótidos modificados como los que se describen en la presente o como los que se conocen en  
25 la técnica, la adición o la introducción de cambios en la protuberancia u otras modificaciones como las que se conocen en la técnica y/o se describen en la presente para optimizar adicionalmente la molécula (p. ej., incrementar la estabilidad en suero o la semivida en circulación, incrementar la estabilidad térmica, potenciar el suministro transmembranal, ejercer un direccionamiento hacia una localización o tipo celular particular, incrementar la interacción con las enzimas de la vía de silenciamiento, incrementar la liberación a partir de endosomas, etc.) como  
30 un inhibidor de la expresión.

Un ARNi según se describe en la presente puede contener uno o más apareamientos erróneos con la secuencia diana. En una realización, un ARNi, tal como se describe en la presente, no contiene más de 3 apareamientos erróneos. Si la hebra antisentido del ARNi contiene apareamientos erróneos con una secuencia diana, es preferible que el área de apareamiento erróneo no se encuentre localizada en el centro de la región de complementariedad. Si  
35 la hebra antisentido del ARNi contiene apareamientos erróneos con la secuencia diana, es preferible que el apareamiento erróneo esté restringido a encontrarse dentro de los últimos 5 nucleótidos considerados desde el extremo 5' o 3' de la región de complementariedad. Por ejemplo, para una hebra de ARN de un agente de ARNi de 23 nucleótidos que sea complementaria respecto a una región de un gen ALAS1, la hebra de ARN generalmente no contendrá ningún apareamiento erróneo dentro de los 13 nucleótidos centrales. Los métodos descritos en la  
40 presente o los métodos conocidos en la técnica se pueden utilizar para determinar si un ARNi que contiene un apareamiento erróneo con una secuencia diana es eficaz a la hora de inhibir la expresión de un gen ALAS1. La consideración de la eficacia de ARNi con apareamientos erróneos a la hora de inhibir la expresión de un gen ALAS1 es importante, especialmente si existe constancia de que la región de complementariedad particular de un gen ALAS1 presente una variación de la secuencia polimórfica dentro de la población.

45 Al menos un extremo de un ARNbc puede tener una protuberancia de nucleótidos monocatenaria de 1 a 4, generalmente 1 o 2, nucleótidos. Los ARNbc que tienen al menos una protuberancia de nucleótidos presentan, inesperadamente, unas propiedades inhibitorias superiores con relación a sus homólogos de extremos romos. El ARN de un ARNi, p. ej., un ARNbc, se puede modificar químicamente para mejorar su estabilidad u otras características beneficiosas. Los ácidos nucleicos que se exponen en la invención se pueden sintetizar y/o modificar  
50 mediante métodos muy establecidos en la técnica tales como los que se describen en "Current protocols in nucleic acid chemistry," Beaucage, S.L. *et al.* (Eds.), John Wiley & Sons, Inc., Nueva York, NY, EE. UU. Las modificaciones incluyen, por ejemplo, (a) modificaciones de los extremos, p. ej., modificaciones del extremo 5' (fosforilación, conjugación, uniones invertidas, etc.), modificaciones del extremo 3' (conjugación, nucleótidos de ADN, uniones invertidas, etc.) (b) modificaciones de las bases, p. ej., reemplazo por bases estabilizantes, bases desestabilizantes o bases que se apareen con bases con un mayor repertorio de parejas, eliminación de bases (nucleótidos sin bases), o bases conjugadas, (c) modificaciones del azúcar (p. ej., en la posición 2' o en la posición 4') o reemplazo  
55 del azúcar, así como también (d) modificaciones del esqueleto, que incluyen la modificación o el reemplazo de las uniones de tipo fosfodiéster. Los ejemplos específicos de compuestos de ARN útiles en esta invención incluyen, sin carácter limitante, ARN que contienen esqueletos modificados o uniones entre nucleósidos no naturales. Los ARN  
60 que tienen esqueletos modificados incluyen, entre otros, aquellos que no contienen un átomo de fósforo en el esqueleto. A los efectos de esta memoria descriptiva y según se los denomina en ocasiones en la técnica, los ARN modificados que no contienen un átomo de fósforo en su esqueleto entre los nucleósidos también se pueden

considerar oligonucleósidos. El ARN modificado puede contener un átomo de fósforo en su esqueleto entre los nucleósidos.

Los esqueletos de ARN modificados incluyen, por ejemplo, fosforotioatos, fosforotioatos quirales, fosforoditioatos, fosfotriésteres, aminoalquilfosfotriésteres, metilfosfonatos y fosfonatos con otros grupos alquilo que incluyen 3'-alquilenfosfonatos y fosfonatos quirales, fosfinatos, fosforamidatos que incluyen 3'-aminofosforamidato y aminoalquilfosforamidatos, tionofosforamidatos, tionoalquilfosfonatos, tionoalquilfosfotriésteres y boranofosfatos con uniones 3'-5' normales, análogos con uniones 2'-5' de estos y aquellos con polaridad invertida en los que los pares adyacentes de unidades de nucleósidos están unidos del siguiente modo: 3'-5' con 5'-3' o 2'-5' con 5'-2'. También se incluyen varias sales, sales mixtas y formas de ácido libre.

10 Las patentes de EE. UU. representativas que describen la preparación de las uniones que contienen fósforo anteriores incluyen, sin carácter limitante, las Pat. de EE. UU. N.<sup>os</sup> 3.687.808, 4.469.863, 4.476.301, 5.023.243, 5.177.195, 5.188.897, 5.264.423, 5.276.019, 5.278.302, 5.286.717, 5.321.131, 5.399.676, 5.405.939, 5.453.496, 5.455.233, 5.466.677, 5.476.925, 5.519.126, 5.536.821, 5.541.316, 5.550.111, 5.563.253, 5.571.799, 5.587.361, 5.625.050, 6.028.188, 6.124.445, 6.160.109, 6.169.170, 6.172.209, 6.239.265, 6.277.603, 6.326.199, 6.346.614, 6.444.423, 6.531.590, 6.534.639, 6.608.035, 6.683.167, 6.858.715, 6.867.294, 6.878.805, 7.015.315, 7.041.816, 7.273.933, 7.321.029 y la Pat. de EE. UU. RE39464.

Los esqueletos de ARN modificados que no incluyen ningún átomo de fósforo en ellos tienen esqueletos que se forman mediante uniones entre nucleósidos de tipo alquilo o cicloalquilo de cadena corta, uniones entre nucleósidos de tipo alquilo o cicloalquilo y heteroátomos mixtas, o una o más uniones entre nucleósidos heteroaromáticas o heterocíclicas de cadena corta. Estos incluyen los que tienen uniones de tipo morfolino (formadas en parte a partir de la porción del azúcar de un nucleósido); esqueletos de tipo siloxano; esqueletos de tipo sulfuro, sulfóxido y sulfona; esqueletos de tipo formacetilo y tioformacetilo; esqueletos de tipo metilenoformacetilo y tioformacetilo; esqueletos que contienen alquenos; esqueletos de tipo sulfamato; esqueletos de tipo metilenoimino y metilenoimidazino; esqueletos de tipo sulfonato y sulfonamida; esqueletos de tipo amida; y otros que tienen partes de componentes N, O, S y CH<sub>2</sub> mixtas.

Las patentes de EE. UU. representativas que describen la preparación de los oligonucleótidos anteriores incluyen, sin carácter limitante, las Pat. de EE. UU. N.<sup>os</sup> 5.034.506, 5.166.315, 5.185.444, 5.214.134, 5.216.141, 5.235.033, 5.64.562, 5.264.564, 5.405.938, 5.434.257, 5.466.677, 5.470.967, 5.489.677, 5.541.307, 5.561.225, 5.596.086, 5.602.240, 5.608.046, 5.610.289, 5.618.704, 5.623.070, 5.663.312, 5.633.360, 5.677.437 y 5.677.439.

30 En otros miméticos de ARN adecuados o contemplados para su uso en ARNi, tanto el azúcar como la unión entre nucleósidos, es decir, el esqueleto, de las unidades nucleotídicas se reemplazan por grupos novedosos. Las unidades de las bases se mantienen para la hibridación con un compuesto diana de tipo ácido nucleico adecuado. Un compuesto oligomérico de este tipo, un mimético de ARN que se ha demostrado que presenta unas propiedades de hibridación excelentes, se denomina ácido nucleico peptídico (PNA). En los compuestos de tipo PNA, el esqueleto del azúcar de un ARN se ha reemplazado por un esqueleto que contiene amidas, en particular un esqueleto de tipo aminotetiglicina. Las bases nucleotídicas se conservan y están unidas directa o indirectamente a átomos de nitrógeno aza de la porción amídica del esqueleto. Las patentes de EE. UU. representativas que describen la preparación de compuestos de tipo PNA incluyen, sin carácter limitante, las Pat. de EE. UU. N.<sup>os</sup> 5.539.082, 5.714.331 y 5.719.262. Otras descripciones de compuestos de tipo PNA se pueden encontrar, por ejemplo, en Nielsen *et al.*, *Science*, 1991, 254, 1497-1500.

Se describen ARN con esqueletos de tipo fosforotioato y oligonucleósidos con esqueletos que contienen heteroátomos, y en particular --CH<sub>2</sub>--NH--CH<sub>2</sub>--, --CH<sub>2</sub>--N(CH<sub>3</sub>)--O--CH<sub>2</sub>--[que se conoce como un esqueleto de tipo metileno(metilimino) o MMI], --CH<sub>2</sub>--O--N(CH<sub>3</sub>)--CH<sub>2</sub>--, --CH<sub>2</sub>--N(CH<sub>3</sub>)--N(CH<sub>3</sub>)--CH<sub>2</sub>-- y --N(CH<sub>3</sub>)--CH<sub>2</sub>--CH<sub>2</sub>--[donde el esqueleto de tipo fosfodiéster nativo se representa como --O--P--O--CH<sub>2</sub>--] de la Pat. de EE. UU. N.º 5.489.677 a la que se ha hecho referencia anteriormente y los esqueletos de tipo amida de la Pat. de EE. UU. N.º 5.602.240 a la que se ha hecho referencia anteriormente. En algunas realizaciones, los ARN que se exponen en la presente tienen las estructuras del esqueleto de tipo morfolino de la Pat. de EE. UU. N.º 5.036.506 a la que se ha hecho referencia anteriormente.

Los ARN modificados también pueden contener uno o más restos de azúcar sustituidos. Los ARNi, p. ej., ARNbc que se exponen en la presente pueden incluir uno de los siguientes grupos en la posición 2': OH; F; O-, S- o N-alquilo; O-, S- o N-alqueno; O-, S- o N-alquino; o O-alquil-O-alquilo, donde el alquilo, alqueno y alquino pueden ser un alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>, alqueno y alquino C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub> sustituido o no sustituido. Las modificaciones adecuadas ilustrativas incluyen O[(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>O]<sub>m</sub>CH<sub>3</sub>, O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>OCH<sub>3</sub>, O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>NH<sub>2</sub>, O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CH<sub>3</sub>, O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>ONH<sub>2</sub> y O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>ON[(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CH<sub>3</sub>]<sub>2</sub>, donde n y m están comprendidos entre 1 y aproximadamente 10. Los ARNbc pueden incluir uno de los siguientes grupos en la posición 2': alquilo inferior C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>, alquilo inferior sustituido, alcarilo, aralquilo, O-alcarilo u O-aralquilo, SH, SCH<sub>3</sub>, OCN, Cl, Br, CN, CF<sub>3</sub>, OCF<sub>3</sub>, SOCH<sub>3</sub>, SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, ONO<sub>2</sub>, NO<sub>2</sub>, N<sub>3</sub>, NH<sub>2</sub>, heterocicloalquilo, heterocicloalcarilo, aminoalquilamino, polialquilamino, sililo sustituido, un grupo que escinde ARN, un grupo marcador, un intercalador, un grupo para mejorar las propiedades farmacocinéticas de un ARNi o un grupo para mejorar las propiedades farmacodinámicas de un ARNi, y otros sustituyentes con propiedades similares. La modificación puede incluir un 2'-metoxietoxi (2'-O--CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>, también conocido como 2'-O-(2-metoxietilo) o 2'-

MOE) (Martin *et al.*, *Helv. Chim. Acta*, 1995, 78:486-504), es decir, un grupo alcoxi-alcoxi. Otra modificación ilustrativa es 2'-dimetilaminooxietoxi, es decir, un grupo  $O(CH_2)_2ON(CH_3)_2$ , también conocido como 2'-DMAOE, según se describe en los ejemplos de la presente más adelante, y 2'-dimetilaminoetoxietoxi (que también se conoce en la técnica como 2'-O-dimetilaminoetoxietilo o 2'-DMAEOE), es decir,  $2'-O-CH_2-O-CH_2-N(CH_3)_2$ , que también se describe en los ejemplos de la presente más adelante.

Otras modificaciones incluyen 2'-metoxi (2'-OCH<sub>3</sub>), 2'-aminopropoxi (2'-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>) y 2'-fluoro (2'-F). También se pueden realizar modificaciones similares en otras posiciones del ARN de un ARNi, particularmente la posición 3' del azúcar en el nucleótido terminal 3' o en ARNbc con uniones 2'-5' y la posición 5' del nucleótido terminal 5'. Los ARNi también pueden tener miméticos de azúcares tales como restos de tipo ciclobutilo en lugar del azúcar de tipo pentofuranosilo. Las patentes de EE. UU. representativas que describen la preparación de tales estructuras de azúcares modificadas incluyen, sin carácter limitante, las Pat. de EE. UU. N.<sup>os</sup> 4.981.957, 5.118.800, 5.319.080, 5.359.044, 5.393.878, 5.446.137, 5.466.786, 5.514.785, 5.519.134, 5.567.811, 5.576.427, 5.591.722, 5.597.909, 5.610.300, 5.627.053, 5.639.873, 5.646.265, 5.658.873, 5.670.633 y 5.700.920.

Un ARNi también puede incluir sustituciones o modificaciones en la base nucleotídica (a la cual se hace referencia a menudo en la técnica simplemente como "base"). Las bases nucleotídicas "naturales" o "no modificadas", según se utilizan en la presente, incluyen las bases púricas adenina (A) y guanina (G), y las bases pirimidínicas timina (T), citosina (C) y uracilo (U). Las bases nucleotídicas modificadas incluyen otras bases nucleotídicas naturales y sintéticas tales como 5-metilcitosina (5-me-C), 5-hidroximetilcitosina, xantina, hipoxantina, 2-aminoadenina, 6-metiladenina y 6-metilguanina y otros derivados alquílicos de la adenina y la guanina, 2-propiladenina y 2-propilguanina y otros derivados alquílicos de la adenina y la guanina, 2-tiouracilo, 2-tiotimina y 2-tiocitosina, 5-halouracilo y 5-halocitosina, 5-propiniluracilo y 5-propinilcitosina, 6-azouracilo, 6-azocitosina y 6-azotimina, 5-uracilo (pseudouracilo), 4-tiouracilo, 8-halo-, 8-amino-, 8-tiol-, 8-tioalquil-, 8-hidroxil-adenina y -guanina y adeninas y guaninas con otros sustituyentes en la posición 8, 5-halo-, particularmente 5-bromo-, 5-trifluorometil-uracilo y -citosina y uracilos y citosinas con otros sustituyentes en la posición 5, 7-metilguanina y 7-metiladenina, 8-azaguanina y 8-azaadenina, 7-desazaguanina y 7-desazaadenina y 3-desazaguanina y 3-desazaadenina. Otras bases nucleotídicas incluyen las que se describen en la Pat. de EE. UU. N.<sup>o</sup> 3.687.808, las que se describen en *Modified Nucleosides in Biochemistry, Biotechnology and Medicine*, Herdewijn, P. ed. Wiley-VCH, 2008; las que se describen en *The Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering*, páginas 858-859, Kroschwitz, J. L., ed. John Wiley & Sons, 1990, las que se describen en Englisch *et al.*, *Angewandte Chemie, International Edition*, 1991, 30, 613 y las que se describen en Sanghvi, Y. S., Capítulo 15, *dsRNA Research and Applications*, páginas 289-302, Crooke, S. T. y Lebleu, B., Ed., CRC Press, 1993. Algunas de estas bases nucleotídicas son particularmente útiles para incrementar la afinidad de unión de los compuestos oligoméricos que se exponen en la invención. Estas incluyen pirimidinas sustituidas en la posición 5, 6-azapirimidinas y purinas sustituidas en la posición N-2, N-6 y O-6, que incluyen 2-aminopropiladenina, 5-propiniluracilo y 5-propinilcitosina. Se ha demostrado que las sustituciones de tipo 5-metilcitosina incrementan la estabilidad del dúplex de ácido nucleico de 0.6 a 1.2 °C (Sanghvi, Y. S., Crooke, S. T. y Lebleu, B., Eds., *dsRNA Research and Applications*, CRC Press, Boca Ratón, 1993, págs. 276-278) y son sustituciones de las bases ilustrativas, aún más particularmente cuando se combinan con modificaciones del azúcar de tipo 2'-O-metoxietilo.

Las patentes de EE. UU. representativas que describen la preparación de algunas de las bases nucleotídicas modificadas mencionadas anteriormente, así como también de otras bases nucleotídicas modificadas incluyen, sin carácter limitante, la Pat. de EE. UU. mencionada anteriormente N.<sup>o</sup> 3.687.808, así como también las Pat. de EE. UU. N.<sup>os</sup> 4.845.205, 5.130.30, 5.134.066, 5.175.273, 5.367.066, 5.432.272, 5.457.187, 5.459.255, 5.484.908, 5.502.177, 5.525.711, 5.552.540, 5.587.469, 5.594.121, 5.596.091, 5.614.617, 5.681.941, 6.015.886, 6.147.200, 6.166.197, 6.222.025, 6.235.887, 6.380.368, 6.528.640, 6.639.062, 6.617.438, 7.045.610, 7.427.672 y 7.495.088 y la Pat. de EE. UU. N.<sup>o</sup> 5.750.692.

El ARN de un ARNi también se puede modificar para que incluya uno o más ácidos nucleicos bloqueados (LNA, por sus siglas en inglés). Un ácido nucleico bloqueado es un nucleótido que tiene un resto de ribosa modificado en el cual el resto de ribosa comprende un puente adicional que conecta los carbonos 2' y 4'. Esta estructura "bloquea" de forma eficaz la ribosa en la conformación estructural 3'-endo. Se ha demostrado que la adición de ácidos nucleicos bloqueados a los ARNip incrementa la estabilidad del ARNip en suero y reduce los efectos laterales (Elmen, J. *et al.*, (2005) *Nucleic Acids Research* 33(1):439-447; Mook, OR. *et al.*, (2007) *Mol Canc Ther* 6(3):833-843; Grunweller, A. *et al.*, (2003) *Nucleic Acids Research* 31(12):3185-3193).

Las Patentes de EE. UU. representativas que describen la preparación de nucleótidos de ácidos nucleicos bloqueados incluyen, sin carácter limitante, las siguientes: Pat. de EE. UU. N.<sup>os</sup> 6.268.490, 6.670.461, 6.794.499, 6.998.484, 7.053.207, 7.084.125 y 7.399.845.

Las modificaciones potencialmente estabilizantes en los extremos de las moléculas de ARN pueden incluir *N*-(acetilaminocaproil)-4-hidroxiprolinol (Hip-C6-NHAc), *N*-(caproil-4-hidroxiprolinol (Hip-C6), *N*-(acetil-4-hidroxiprolinol (Hip-NHAc), timidin-2'-O-desoxitimidina (éter), *N*-(aminocaproil)-4-hidroxiprolinol (Hip-C6-amino), 2-docosanoiluridin-3'- fosfato, base dT invertida (idT) y otras. La descripción de esta modificación se puede encontrar en la Publicación de PCT N.<sup>o</sup> WO 2011/005861.

**Motivos del ARNi**

Se describe que la secuencia de la hebra sentido se puede representar mediante la fórmula (I):



donde:

5 i y j son cada uno independientemente 0 o 1;

p y q son cada uno independientemente 0-6;

cada  $N_a$  representa independientemente una secuencia oligonucleotídica que comprende 0-25 nucleótidos modificados, comprendiendo cada secuencia al menos dos nucleótidos modificados de forma diferente;

10 cada  $N_b$  representa independientemente una secuencia oligonucleotídica que comprende 0-10 nucleótidos modificados;

cada  $n_p$  y  $n_q$  representa independientemente un nucleótido protuberante;

donde  $N_b$  e Y no tienen la misma modificación; y

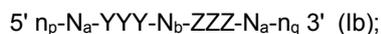
XXX, YYY y ZZZ representan cada uno independientemente un motivo de tres modificaciones idénticas en tres nucleótidos consecutivos. Preferentemente, YYY son todos nucleótidos con la modificación 2'-F.

15 Se describe que  $N_a$  y/o  $N_b$  comprenden modificaciones de patrón alterno.

Se describe que el motivo YYY se encuentra en el sitio de escisión de la hebra sentido o cerca de este. Por ejemplo, cuando el agente de iARN tiene una región dúplex con una longitud de 17-23 nucleótidos, el motivo YYY se puede encontrar en el sitio de escisión o cerca de este (p. ej.: se puede encontrar en las posiciones 6, 7, 8; 7, 8, 9; 8, 9, 10; 9, 10, 11; 10, 11, 12 u 11, 12, 13) de la hebra sentido, empezando a contar a partir del primer nucleótido del extremo 5' u, opcionalmente, empezando a contar en el primer nucleótido apareado dentro de la región dúplex, a partir del extremo 5'.

20

Se describe que i es 1 y j es 0, o i es 0 y j es 1, o tanto i como j son 1. Por consiguiente, la hebra sentido se puede representar mediante las siguientes fórmulas:



25  $5' n_p-N_a-XXX-N_b-YYY-N_a-n_q 3' \quad (Ic);$  o



Cuando la hebra sentido se representa mediante la fórmula (Ib),  $N_b$  representa una secuencia oligonucleotídica que comprende 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 o 0 nucleótidos modificados. Cada  $N_a$  puede representar independientemente una secuencia oligonucleotídica que comprende 2-20, 2-15 o 2-10 nucleótidos modificados.

30 Cuando la hebra sentido se representa como la fórmula (Ic),  $N_b$  representa una secuencia oligonucleotídica que comprende 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 o 0 nucleótidos modificados. Cada  $N_a$  puede representar independientemente una secuencia oligonucleotídica que comprende 2-20, 2-15 o 2-10 nucleótidos modificados.

Cuando la hebra sentido se representa como la fórmula (Id), cada  $N_b$  representa independientemente una secuencia oligonucleotídica que comprende 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 o 0 nucleótidos modificados. Preferentemente,  $N_b$  es 0, 1, 2, 3, 4, 5 o 6. Cada  $N_a$  puede representar independientemente una secuencia oligonucleotídica que comprende 2-20, 2-15 o 2-10 nucleótidos modificados.

35

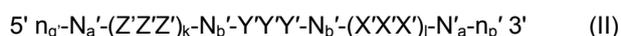
Cada uno de los grupos X, Y y Z puede ser igual o diferente de los demás.

Se describe que i es 0 y j es 0, y la hebra sentido se puede representar mediante la fórmula:



40 Cuando la hebra sentido se representa mediante la fórmula (Ia), cada  $N_a$  puede representar independientemente una secuencia oligonucleotídica que comprende 2-20, 2-15 o 2-10 nucleótidos modificados.

Se describe que la secuencia de la hebra antisentido del ARNi se puede representar mediante la fórmula (II):



donde:

k y l son cada uno independientemente 0 o 1;

p' y q' son cada uno independientemente 0-6;

cada  $N_a'$  representa independientemente una secuencia oligonucleotídica que comprende 0-25 nucleótidos modificados, comprendiendo cada secuencia al menos dos nucleótidos modificados de forma diferente;

- 5 cada  $N_b'$  representa independientemente una secuencia oligonucleotídica que comprende 0-10 nucleótidos modificados;

cada  $n_p'$  y  $n_q'$  representa independientemente un nucleótido protuberante;

donde  $N_b'$  e Y' no tienen la misma modificación;

y

- 10  $X'X'X'$ ,  $Y'Y'Y'$  y  $Z'Z'Z'$  representan cada uno independientemente un motivo de tres modificaciones idénticas en tres nucleótidos consecutivos.

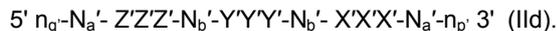
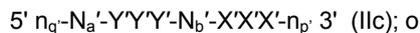
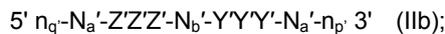
Se describe que  $N_a'$  y/o  $N_b'$  comprenden modificaciones de patrón alterno.

- 15 El motivo  $Y'Y'Y'$  se encuentra en el sitio de escisión de la hebra antisentido o cerca de este. Por ejemplo, cuando el agente de iARN tiene una región dúplex con una longitud de 17-23 nucleótidos, el motivo  $Y'Y'Y'$  se puede encontrar en las posiciones 9, 10, 11; 10, 11, 12; 11, 12, 13; 12, 13, 14 o 13, 14, 15 de la hebra antisentido, empezando a contar a partir del primer nucleótido del extremo 5' u, opcionalmente, empezando a contar en el primer nucleótido apareado dentro de la región dúplex, a partir del extremo 5'. Preferentemente, el motivo  $Y'Y'Y'$  se encuentra en las posiciones 11, 12, 13.

Se describe que el motivo  $Y'Y'Y'$  consiste en que todos los nucleótidos presentan la modificación 2'-OMe.

- 20 Se describe que k es 1 y l es 0, o k es 0 y l es 1, o tanto k como l son 1.

Por consiguiente, la hebra antisentido se puede representar mediante las siguientes fórmulas:

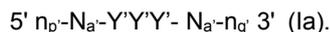


- 25 Cuando la hebra antisentido se representa mediante la fórmula (IIb),  $N_b'$  representa una secuencia oligonucleotídica que comprende 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 o 0 nucleótidos modificados. Cada  $N_a'$  representa independientemente una secuencia oligonucleotídica que comprende 2-20, 2-15 o 2-10 nucleótidos modificados.

- 30 Cuando la hebra antisentido se representa como la fórmula (IIc),  $N_b'$  representa una secuencia oligonucleotídica que comprende 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 o 0 nucleótidos modificados. Cada  $N_a'$  representa independientemente una secuencia oligonucleotídica que comprende 2-20, 2-15 o 2-10 nucleótidos modificados.

Cuando la hebra antisentido se representa como la fórmula (IId), cada  $N_b'$  representa independientemente una secuencia oligonucleotídica que comprende 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 o 0 nucleótidos modificados. Cada  $N_a'$  representa independientemente una secuencia oligonucleotídica que comprende 2-20, 2-15 o 2-10 nucleótidos modificados. Preferentemente,  $N_b$  es 0, 1, 2, 3, 4, 5 o 6.

- 35 Se describe que k es 0 y l es 0, y la hebra antisentido se puede representar mediante la fórmula:



Cuando la hebra antisentido se representa como la fórmula (IIa), cada  $N_a'$  representa independientemente una secuencia oligonucleotídica que comprende 2-20, 2-15 o 2-10 nucleótidos modificados.

Cada uno de los grupos X', Y' y Z' puede ser igual o diferente de los demás.

- 40 Cada nucleótido de la hebra sentido y la hebra antisentido se puede modificar independientemente con LNA, HNA, CeNA, 2'-metoxietilo, 2'-O-metilo, 2'-O-alilo, 2'-C-alilo, 2'-hidroxilo o 2'-fluoro. Por ejemplo, cada nucleótido de la hebra sentido y la hebra antisentido se modifica independientemente con 2'-O-metilo o 2'-fluoro. Cada X, Y, Z, X', Y' y Z', en particular, puede representar una modificación de tipo 2'-O-metilo o una modificación de tipo 2'-fluoro.

- 45 Se describe que la hebra sentido del agente de iARN puede contener un motivo YYY que se encuentre en las posiciones 9, 10 y 11 de la hebra cuando la región dúplex tiene 21 nt, empezando a contar a partir del primer nucleótido del extremo 5' u, opcionalmente, empezando a contar en el primer nucleótido apareado dentro de la

región dúplex, a partir del extremo 5'; e Y representa una modificación de tipo 2'-F. La hebra sentido puede contener adicionalmente un motivo XXX o motivos ZZZ como modificaciones laterales en el extremo opuesto de la región dúplex; y cada motivo XXX y ZZZ representa independientemente una modificación de tipo 2'-OMe o una modificación de tipo 2'-F.

- 5 Se describe que la hebra antisentido puede contener un motivo Y'Y'Y' que se encuentre en las posiciones 11, 12, 13 de la hebra, empezando a contar a partir del primer nucleótido del extremo 5' u, opcionalmente, empezando a contar en el primer nucleótido apareado dentro de la región dúplex, a partir del extremo 5'; e Y' representa una modificación de tipo 2'-O-metilo. La hebra antisentido puede contener adicionalmente un motivo X'X'X' o motivos Z'Z'Z' como modificaciones laterales en el extremo opuesto de la región dúplex; y cada motivo X'X'X' y Z'Z'Z' representa independientemente una modificación de tipo 2'-OMe o una modificación de tipo 2'-F.

La hebra sentido representada mediante cualquiera de las fórmulas anteriores (Ia), (Ib), (Ic) y (Id) forma un dúplex con una hebra antisentido representada mediante cualquiera de las fórmulas (IIa), (IIb), (IIc) y (IId), respectivamente.

- 15 Por consiguiente, los agentes de iARN que se pueden utilizar en los métodos descritos pueden comprender una hebra sentido y una hebra antisentido, teniendo cada hebra 14-30 nucleótidos, donde el dúplex de iARN está representado mediante la fórmula (III):

sentido:  $5' n_p - N_a - (X X X)_i - N_b - Y Y Y - N_b - (Z Z Z)_j - N_a - n_q 3'$

antisentido:  $3' n_p - N_a - (X'X'X')_k - N_b - Y'Y'Y' - N_b - (Z'Z'Z')_l - N_a - n_q 5'$  (III)

donde:

i, j, k, y l son cada uno independientemente 0 o 1;

- 20 p, p', q y q' son cada uno independientemente 0-6;

cada  $N_a$  y  $N_a'$  representa independientemente una secuencia oligonucleotídica que comprende 0-25 nucleótidos modificados, comprendiendo cada secuencia al menos dos nucleótidos modificados de forma diferente;

cada  $N_b$  y  $N_b'$  representa independientemente una secuencia oligonucleotídica que comprende 0-10 nucleótidos modificados;

- 25 donde

cada  $n_p$ ,  $n_p'$ ,  $n_q$  y  $n_q'$ , cada uno de los cuales puede estar presente o no, representa independientemente un nucleótido protuberante; y

XXX, YYY, ZZZ, X'X'X', Y'Y'Y' y Z'Z'Z' representan cada uno independientemente un motivo de tres modificaciones idénticas en tres nucleótidos consecutivos.

- 30 Se describe que i es 0 y j es 0; o i es 1 y j es 0; o i es 0 y j es 1; o tanto i como j son 0; o tanto i como j son 1. Se describe que k es 0 y l es 0; o k es 1 y l es 0; o k es 0 y l es 1; o tanto k como l son 0; o tanto k como l son 1.

Las combinaciones ilustrativas de la hebra sentido y la hebra antisentido para formar un dúplex de iARN incluyen las fórmulas siguientes:

$5' n_p - N_a - Y Y Y - N_a - n_q 3'$

- 35  $3' n_p - N_a - Y'Y'Y' - N_a - n_q 5'$  (IIIa)

$5' n_p - N_a - Y Y Y - N_b - Z Z Z - N_a - n_q 3'$

$3' n_p - N_a - Y'Y'Y' - N_b - Z'Z'Z' - N_a - n_q 5'$  (IIIb)

$5' n_p - N_a - X X X - N_b - Y Y Y - N_a - n_q 3'$

$3' n_p - N_a - X'X'X' - N_b - Y'Y'Y' - N_a - n_q 5'$  (IIIc)

- 40  $5' n_p - N_a - X X X - N_b - Y Y Y - N_b - Z Z Z - N_a - n_q 3'$

$3' n_p - N_a - X'X'X' - N_b - Y'Y'Y' - N_b - Z'Z'Z' - N_a - n_q 5'$  (IIId)

Cuando el agente de iARN se representa mediante la fórmula (IIIa), cada  $N_a$  representa independientemente una secuencia oligonucleotídica que comprende 2-20, 2-15 o 2-10 nucleótidos modificados.

Cuando el agente de iARN se representa mediante la fórmula (IIIb), cada  $N_b$  representa independientemente una secuencia oligonucleotídica que comprende 1-10, 1-7, 1-5 o 1-4 nucleótidos modificados. Cada  $N_a$  representa independientemente una secuencia oligonucleotídica que comprende 2-20, 2-15 o 2-10 nucleótidos modificados.

5 Cuando el agente de iARN se representa como la fórmula (IIIc), cada  $N_b$ ,  $N_b'$  representa independientemente una secuencia oligonucleotídica que comprende 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 o 0 nucleótidos modificados. Cada  $N_a$  representa independientemente una secuencia oligonucleotídica que comprende 2-20, 2-15 o 2-10 nucleótidos modificados.

10 Cuando el agente de iARN se representa como la fórmula (III d), cada  $N_b$ ,  $N_b'$  representa independientemente una secuencia oligonucleotídica que comprende 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 o 0 nucleótidos modificados. Cada  $N_a$ ,  $N_a'$  representa independientemente una secuencia oligonucleotídica que comprende 2-20, 2-15 o 2-10 nucleótidos modificados. Cada uno de los grupos  $N_a$ ,  $N_a'$ ,  $N_b$  y  $N_b'$  comprende independientemente modificaciones de patrón alterno.

Cada uno de los grupos X, Y y Z en las fórmulas (III), (IIIa), (IIIb), (IIIc) y (III d) puede ser igual o diferente de los demás.

15 Cuando el agente de iARN se representa mediante la fórmula (III), (IIIa), (IIIb), (IIIc) y (III d), al menos uno de los nucleótidos Y puede formar un par de bases con uno de los nucleótidos Y'. Como alternativa, al menos dos de los nucleótidos Y forman pares de bases con los nucleótidos Y' correspondientes; o los tres nucleótidos Y forman todos ellos pares de bases con los nucleótidos Y' correspondientes.

20 Cuando el agente de iARN se representa mediante la fórmula (IIIb) o (III d), al menos uno de los nucleótidos Z puede formar un par de bases con uno de los nucleótidos Z'. Como alternativa, al menos dos de los nucleótidos Z forman pares de bases con los nucleótidos Z' correspondientes; o los tres nucleótidos Z forman todos ellos pares de bases con los nucleótidos Z' correspondientes.

25 Cuando el agente de iARN se representa mediante la fórmula (IIIc) o (III d), al menos uno de los nucleótidos X puede formar un par de bases con uno de los nucleótidos X'. Como alternativa, al menos dos de los nucleótidos X forman pares de bases con los nucleótidos X' correspondientes; o los tres nucleótidos X forman todos ellos pares de bases con los nucleótidos X' correspondientes.

Se describe que la modificación en el nucleótido Y es diferente de la modificación en el nucleótido Y', la modificación en el nucleótido Z es diferente de la modificación en el nucleótido Z' y/o la modificación en el nucleótido X es diferente de la modificación en el nucleótido X'.

30 Se describe que cuando el agente de iARN se representa mediante la fórmula (III d), las modificaciones en  $N_a$  son modificaciones de tipo 2'-O-metilo o 2'-fluro. Se describe que cuando el agente de iARN se representa mediante la fórmula (III d), las modificaciones en  $N_a$  son modificaciones de tipo 2'-O-metilo o 2'-fluro,  $n_p' > 0$  y al menos un  $n_p'$  está unido a un nucleótido contiguo mediante una unión de tipo fosforotioato. Se describe que cuando el agente de iARN se representa mediante la fórmula (III d), las modificaciones en  $N_a$  son modificaciones de tipo 2'-O-metilo o 2'-fluro,  $n_p' > 0$  y al menos un  $n_p'$  está unido a un nucleótido contiguo mediante una unión de tipo fosforotioato, y la hebra sentido está conjugada con uno o más derivados de tipo GalNAc unidos mediante un conector ramificado bivalente o trivalente. Se describe que cuando el agente de iARN se representa mediante la fórmula (III d), las modificaciones en  $N_a$  son modificaciones de tipo 2'-O-metilo o 2'-fluro,  $n_p' > 0$  y al menos un  $n_p'$  está unido a un nucleótido contiguo mediante una unión de tipo fosforotioato, la hebra sentido comprende al menos una unión de tipo fosforotioato y la hebra sentido está conjugada con uno o más derivados de tipo GalNAc unidos mediante un conector ramificado bivalente o trivalente.

40

45 Se describe que cuando el agente de iARN se representa mediante la fórmula (IIIa), las modificaciones en  $N_a$  son modificaciones de tipo 2'-O-metilo o 2'-fluro,  $n_p' > 0$  y al menos un  $n_p'$  está unido a un nucleótido contiguo mediante una unión de tipo fosforotioato, la hebra sentido comprende al menos una unión de tipo fosforotioato y la hebra sentido está conjugada con uno o más derivados de tipo GalNAc unidos mediante un conector ramificado bivalente o trivalente.

50 Se describe que el agente de iARN es un multímero que contiene al menos dos dúplex representados mediante la fórmula (III), (IIIa), (IIIb), (IIIc) y (III d), donde los dúplex están conectados mediante un conector. El conector puede ser escindible o no escindible. Opcionalmente, el multímero comprende además un ligando. Cada uno de los dúplex puede tener como diana el mismo gen o dos genes diferentes, o cada uno de los dúplex puede tener como diana el mismo gen en dos sitios diana diferentes.

55 Se describe que el agente de iARN es un multímero que contiene tres, cuatro, cinco, seis o más dúplex representados mediante la fórmula (III), (IIIa), (IIIb), (IIIc) y (III d), donde los dúplex están conectados mediante un conector. El conector puede ser escindible o no escindible. Opcionalmente, el multímero comprende además un ligando. Cada uno de los dúplex puede tener como diana el mismo gen o dos genes diferentes, o cada uno de los dúplex puede tener como diana el mismo gen en dos sitios diana diferentes.

Se describe que dos agentes de iARN representados mediante la fórmula (III), (IIIa), (IIIb), (IIIc) y (IIId) están unidos el uno con el otro en el extremo 5', y uno o ambos extremos 3' están conjugados opcionalmente con un ligando. Cada uno de los agentes puede tener como diana el mismo gen o dos genes diferentes, o cada uno de los agentes puede tener como diana el mismo gen en dos sitios diana diferentes.

## 5 Conjugados de ARNi

Los agentes de ARNi descritos en la presente pueden adoptar la forma de conjugados. El conjugado se puede unir en cualquier posición adecuada de la molécula de ARNi, p. ej., en el extremo 3' o el extremo 5' de la hebra sentido o antisentido. Los conjugados se unen opcionalmente mediante un conector.

Se describe que un agente de ARNi descrito en la presente está unido químicamente a uno o más ligandos, restos o conjugados, los cuales pueden conferir una funcionalidad, p. ej., ejerciendo un efecto sobre (p. ej., potenciando) la actividad, la distribución celular o la captación celular del ARNi. Tales restos incluyen, sin carácter limitante, restos lipídicos tales como un resto de colesterol (Letsinger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, 86: 6553-6556), ácido cólico (Manoharan *et al.*, *Biorg. Med. Chem. Lett.*, 1994, 4:1053-1060), un tioéter, p. ej., beril-S-tritilol (Manoharan *et al.*, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1992, 660:306-309; Manoharan *et al.*, *Biorg. Med. Chem. Lett.*, 1993, 3:2765-2770), un tiocolesterol (Oberhauser *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 1992, 20:533-538), una cadena alifática, p. ej., residuos de dodecandiol o undecilo (Saison-Behmoaras *et al.*, *EMBO J*, 1991, 10:1111-1118; Kabanov *et al.*, *FEBS Lett.*, 1990, 259:327-330; Svinarchuk *et al.*, *Biochimie*, 1993, 75:49-54), un fosfolípido, p. ej., dihexadecil-rac-glicerol o 1,2-di-O-hexadecil-rac-glicero-3-fosfonato de trietilamonio (Manoharan *et al.*, *Tetrahedron Lett.*, 1995, 36:3651-3654; Shea *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 1990, 18:3777-3783), una poliamina o una cadena de polietilenglicol (Manoharan *et al.*, *Nucleosides & Nucleotides*, 1995, 14:969-973) o ácido adamantanacético (Manoharan *et al.*, *Tetrahedron Lett.*, 1995, 36:3651-3654), un resto de palmitilo (Mishra *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta*, 1995, 1264:229-237), o un resto de octadecilamina o hexilaminocarboniloxicolesterol (Crooke *et al.*, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1996, 277:923-937).

Se describe que un ligando altera la distribución, la diana o la vida útil del agente de ARNi en el cual se incorpora. Se describe que un ligando proporciona una afinidad mejorada para una diana seleccionada, p. ej., una molécula, una célula o tipo celular, un compartimento, p. ej., un compartimento celular o de un órgano, un tejido, un órgano o una región del cuerpo en comparación, p. ej., con una especie que carezca del ligando. Los ligandos habituales no formarán parte del apareamiento del dúplex en un ácido nucleico que forme un dúplex.

Los ligandos pueden incluir una sustancia de origen natural tal como una proteína (p. ej., albúmina de suero humano (HSA), una lipoproteína de baja densidad (LDL) o globulina); un carbohidrato (p. ej., un dextrano, pululano, chitina, chitosano, inulina, ciclodextrina o ácido hialurónico) o un lípido. El ligando también puede ser una molécula sintética o recombinante tal como un polímero sintético, p. ej., un ácido poliamínico sintético. Los ejemplos de ácidos poliaminicos incluyen un ácido poliamínico que es una polilisina (PLL), ácido poli-L-aspártico, ácido poli-L-glutámico, copolímero de estireno-anhídrido del ácido maleico, copolímero de poli(L-láctido-co-glicólido), copolímero de éter divinílico-anhídrido maleico, copolímero de N-(2-hidroxipropil)metacrilamida (HMPA), polietilenglicol (PEG), alcohol polivinílico (PVA), poliuretano, ácido poli(2-etilacrílico), polímeros de N-isopropilacrilamida o polifosfazina. Los ejemplos de poliaminas incluyen: polietilenimina, polilisina (PLL), espermina, espermidina, poliamina, pseudopéptido-poliamina, poliamina peptidomimética, poliamina dendrímica, arginina, amidina, protamina, lípido catiónico, porfirina catiónica, sal cuaternaria de una poliamina o un péptido con hélice  $\alpha$ .

Los ligandos también pueden incluir grupos de direccionamiento, p. ej., un agente de direccionamiento hacia una célula o tejido, p. ej., una lectina, glicoproteína, lípido o proteína, p. ej., un anticuerpo, que se une a un tipo celular especificado tal como una célula renal. Un grupo de direccionamiento puede ser una tirotrina, melanotropina, lectina, glicoproteína, proteína A surfactante, carbohidrato de mucina, lactosa multivalente, galactosa multivalente, N-acetilgalactosamina, N-acetilglucosamina, manosa multivalente, fucosa multivalente, poliaminoácidos glicosilados, galactosa multivalente, transferrina, bisfosfonato, poliglutamato, poliaspartato, un lípido, colesterol, un esteroide, ácido biliar, folato, vitamina B12, biotina, o un péptido RGD o un mimético de un péptido RGD.

Se describe que el ligando es un ligando de tipo GalNAc que comprende uno o más derivados de tipo N-acetilgalactosamina (GalNAc). En la sección titulada "Conjugados de carbohidratos" se proporciona una descripción adicional de los ligandos de tipo GalNAc.

Otros ejemplos de ligandos incluyen tintes (p. ej., acridinas), agentes reticulantes (p. ej., psoraleno, mitomicina C), porfirinas (TPPC4, texafirina, Sappfirina), hidrocarburos aromáticos policíclicos (p. ej., fenazina, dihidrofenazina), endonucleasas artificiales (p. ej. EDTA), moléculas lipófilas, p. ej., colesterol, ácido cólico, ácido adamantanacético, ácido 1-pirenobutírico, dihidrotestosterona, 1,3-bis-O(hexadecil)glicerol, un grupo geraniloxihexilo, hexadecilglicerol, borneol, mentol, 1,3-propanodiol, un grupo heptadecilo, ácido palmítico, ácido mirístico, ácido O3-(oleoil)litocólico, ácido O3-(oleoil)colénico, dimetoxitritilo o fenoxazina) y conjugados de péptidos (p. ej., péptidos antenapedia, péptido Tat), agentes alquilantes, fosfato, amino, mercapto, PEG (p. ej., PEG-40K), MPEG, [MPEG]2, poliamino, alquilo, alquilo sustituido, marcadores radiomarcados, enzimas, haptenos (p. ej., biotina), potenciadores del transporte/la absorción (p. ej., aspirina, vitamina E, ácido fólico), ribonucleasas sintéticas (p. ej., imidazol, bisimidazol, histamina, agregados de imidazol, conjugados de acridina-imidazol, complejos de tetraazamacrociclos con Eu3+), dinitrofenilo, HRP o AP.

Los ligandos pueden ser proteínas, p. ej., glicoproteínas, o péptidos, p. ej., macromoléculas con una afinidad específica por un coligando, o anticuerpos, p. ej., un anticuerpo que se une a un tipo celular especificado tal como una célula cancerosa, célula endotelial o célula ósea. Los ligandos también pueden incluir hormonas y receptores de hormonas. También pueden incluir especies no peptídicas tales como lípidos, lectinas, carbohidratos, vitaminas, cofactores, lactosa multivalente, galactosa multivalente, N-acetilgalactosamina, N-acetilglucosamina, manosa multivalente o fucosa multivalente. El ligando puede ser, por ejemplo, un lipopolisacárido, un activador de la cinasa MAP p38 o un activador de NF- $\kappa$ B.

El ligando puede ser una sustancia, p. ej., un fármaco, que puede incrementar la captación del agente de ARNi en la célula, por ejemplo, alterando el citoesqueleto de la célula, p. ej., alterando los microtúbulos, microfilamentos y/o filamentos intermedios de la célula. El fármaco puede ser, por ejemplo, taxon, vincristina, vinblastina, citocalasina, nocodazol, jalpaquinolida, latrunculina A, faloidina, swinholida A, indanocina o mioservina.

Se describe que un ligando unido a un ARNi según se describe en la presente actúa como un modulador farmacocinético (modulador PK, por sus siglas en inglés). Los moduladores PK incluyen lipófilos, ácidos biliares, esteroides, análogos de fosfolípidos, péptidos, agentes de unión a proteínas, PEG, vitaminas, etc. Los moduladores PK ilustrativos incluyen, sin carácter limitante, colesterol, ácidos grasos, ácido cólico, ácido litocólico, dialquiliglicéridos, diacilglicérido, fosfolípidos, esfingolípidos, naproxeno, ibuprofeno, vitamina E, biotina, etc. Existe constancia de que los oligonucleótidos que comprenden una serie de uniones de tipo fosforotioato también se unen a las proteínas del suero, por lo tanto, los oligonucleótidos cortos, p. ej., oligonucleótidos de aproximadamente 5 bases, 10 bases, 15 bases o 20 bases, que comprenden múltiples uniones de tipo fosforotioato en el esqueleto también se pueden utilizar en la presente invención como ligandos (p. ej., como ligandos moduladores PK). Además, los aptámeros que se unen a los componentes del suero (p. ej., proteínas del suero) también son adecuados para ser utilizados como ligandos moduladores PK en las realizaciones descritas en la presente.

Los oligonucleótidos conjugados con ligandos de la invención se pueden sintetizar utilizando un oligonucleótido que contenga una funcionalidad reactiva como sustituyente, tal como la derivada de la unión de una molécula conectora en el oligonucleótido (que se describe más adelante). Este oligonucleótido reactivo se puede hacer reaccionar directamente con ligandos que se pueden adquirir de proveedores comerciales, ligandos que se sintetizan y que contienen un grupo protector cualquiera de entre una gama de grupos protectores, o ligandos que tienen un resto conector unido a ellos.

Los oligonucleótidos utilizados en los conjugados de la presente invención se pueden preparar de forma conveniente y rutinaria mediante la técnica bien establecida de síntesis en fase sólida. Existen varios proveedores que comercializan el equipo para realizar una síntesis de este tipo, los cuales incluyen, por ejemplo, Applied Biosystems (Foster City, Calif.). Adicionalmente o de forma alternativa, se pueden emplear otros medios para este tipo de síntesis conocidos en la técnica. También existe constancia del uso de técnicas similares para preparar otros oligonucleótidos, tales como los fosforotioatos y derivados alquilados.

En los oligonucleótidos conjugados con ligandos y los nucleósidos unidos específicamente a secuencias que contienen moléculas que son ligandos de la presente invención, los oligonucleótidos y oligonucleósidos se pueden acoplar en un sintetizador de ADN adecuado utilizando precursores de nucleótidos o nucleósidos estándar, o precursores de conjugados de nucleótidos o nucleósidos que ya contengan el resto conector, precursores de conjugados de nucleótidos- o nucleósidos-ligando que ya contengan la molécula de ligando, o bloques estructurales que no sean nucleósidos y que contengan el ligando.

Cuando se utilizan precursores de conjugados de nucleótidos que ya contienen un resto conector, normalmente se completa la síntesis de los nucleósidos unidos específicamente a secuencias y a continuación la molécula de ligando se hace reaccionar con el resto conector para formar el oligonucleótido conjugado con el ligando. En algunas realizaciones, los oligonucleótidos o nucleósidos unidos de la presente invención se sintetizan con un sintetizador automatizado utilizando fosforamiditos derivados de conjugados de nucleósido-ligando, además de los fosforamiditos estándar y fosforamiditos no estándar que se pueden adquirir de proveedores comerciales y que se utilizan de forma rutinaria en la síntesis de oligonucleótidos.

#### Conjugados de lípidos

El ligando puede ser un lípido o una molécula basada en un lípido. Este lípido o esta molécula basada en un lípido se puede unir normalmente a una proteína del suero tal como la albúmina de suero humano (HSA). Un ligando de unión a HSA permite distribuir el conjugado en un tejido diana, p. ej., un tejido diana no renal del cuerpo. Por ejemplo, el tejido diana puede ser el hígado, incluidas las células parenquimales del hígado. También se pueden utilizar como ligandos otras moléculas que se pueden unir a HSA. Por ejemplo, se puede utilizar la neproxina o la aspirina. Un lípido o un ligando basado en un lípido puede (a) incrementar la resistencia a la degradación del conjugado, (b) incrementar el direccionamiento o el transporte hacia una célula o membrana celular diana y/o (c) se puede utilizar para ajustar la unión a una proteína del suero, p. ej., HSA.

Un ligando basado en un lípido se puede utilizar para modular, p. ej., controlar (p. ej., inhibir) la unión del conjugado a un tejido diana. Por ejemplo, un lípido o un ligando basado en un lípido que se une a HSA con una unión más

fuerte presentará una menor probabilidad de ser dirigido hacia el riñón y, por consiguiente, presentará una menor probabilidad de ser expulsado del cuerpo. Un ligando basado en un lípido que se una a HSA con una unión menos fuerte se puede utilizar para dirigir el conjugado hacia el riñón.

5 El ligando basado en un lípido puede unirse a HSA. Por ejemplo, el ligando se puede unir a HSA con una afinidad suficiente de manera que la distribución del conjugado en un tejido no renal se vea potenciada. Sin embargo, normalmente la afinidad no es tan fuerte como para que la unión ligando-HSA no se pueda revertir.

El ligando basado en un lípido puede unirse a HSA débilmente o no se une en absoluto, de manera que la distribución del conjugado en el riñón se vea potenciada. También se pueden utilizar otros restos que ejerzan un direccionamiento hacia las células renales, en lugar o además del ligando basado en un lípido.

10 En otro aspecto, el ligando es un resto, p. ej., una vitamina, que es absorbido por una célula diana, p. ej., una célula proliferante. Estos son particularmente útiles para tratar trastornos caracterizados por la proliferación de células no deseadas, p. ej., células cancerosas, p. ej., de tipo maligno o no maligno. Las vitaminas ilustrativas incluyen la vitamina A, E y K. Otras vitaminas ilustrativas incluyen la vitamina B, p. ej., ácido fólico, B12, riboflavina, biotina, piridoxal u otras vitaminas o nutrientes absorbidos por las células cancerosas. También se incluyen HSA y lipoproteínas de baja densidad (LDL).

#### Agentes de permeación celular

20 En otro aspecto, el ligando es un ligando de permeación celular tal como un ligando de permeación celular helicoidal. En una realización, el agente es anfifático. Un agente ilustrativo es un péptido tal como tat o antenopedia. Si el agente es un péptido, este puede ser un péptido modificado, que incluye un peptidomimético, invertómeros, conectores no peptídicos o pseudopeptídicos y el uso de aminoácidos D. El agente helicoidal es normalmente un agente de hélice  $\alpha$  y puede tener una fase lipófila y lipófoba.

25 El ligando puede ser un péptido o peptidomimético. Un peptidomimético (también denominado en la presente como oligopeptidomimético) es una molécula capaz de plegarse en una estructura tridimensional definida similar a la de un péptido natural. La unión de péptidos y peptidomiméticos a agentes de ARNi puede afectar a la distribución farmacocinética del ARNi, por ejemplo, potenciando el reconocimiento y la absorción celular. El resto peptídico o peptidomimético puede tener una longitud de aproximadamente 5-50 aminoácidos, p. ej., una longitud de aproximadamente 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50 aminoácidos.

30 Un péptido o peptidomimético puede ser, por ejemplo, un péptido de permeación celular, un péptido catiónico, un péptido anfifático o un péptido hidrófobo (p. ej., constituido principalmente por Tyr, Trp o Phe). El resto peptídico puede ser un péptido dendrímérico, un péptido de movimiento restringido o un péptido reticulado. En otra alternativa, el resto peptídico puede incluir una secuencia de translocación de membrana hidrófoba (MTS, por sus siglas en inglés). Un péptido que contiene una MTS hidrófoba a modo de ejemplo es RFGF, que tiene la secuencia de aminoácidos AAVALLPAVLLALLAP (SEQ ID NO:3367). Un análogo de RFGF (p. ej., la secuencia de aminoácidos AALLPVLLAAP (SEQ ID NO:3368)) que contenga una MTS hidrófoba también puede ser un resto de

35 direccionamiento. El resto peptídico puede ser un péptido de "suministro", el cual puede transportar moléculas polares grandes, incluidos péptidos, oligonucleótidos y proteínas, a través de las membranas celulares. Por ejemplo, se ha demostrado que la proteína Tat del VIH (GRKKRRQRRRPPQ (SEQ ID NO:3369)) y una proteína de Drosophila Antennapedia (RQIKIWFQNRRMKWKK (SEQ ID NO: 3370)) son capaces de actuar como péptidos de suministro. Un péptido o peptidomimético puede ser codificado por una secuencia aleatoria de ADN, tal como un péptido identificado a partir de una colección de presentación en pagos o una colección combinatoria de una-

40 microesfera-un-compuesto (OBOC, por sus siglas en inglés) (Lam et al., Nature, 354:82-84, 1991). Normalmente, el péptido o peptidomimético unido a un agente de ARNbc mediante una unidad monomérica incorporada es un péptido de direccionamiento hacia una célula tal como el péptido arginina-glicina-ácido aspártico (RGD) o un mimético de RGD. Un resto peptídico puede tener una longitud comprendida entre aproximadamente 5 aminoácidos

45 y aproximadamente 40 aminoácidos. Los restos peptídicos pueden presentar una modificación estructural, por ejemplo, para incrementar la estabilidad o dirigir propiedades conformacionales. Se puede utilizar cualquiera de las modificaciones estructurales que se describen más adelante.

50 Un péptido RGD para su uso en las composiciones y métodos de la invención puede ser lineal o cíclico y puede estar modificado, p. ej., glicosilado o metilado, para facilitar el direccionamiento hacia uno o más tejidos específicos. Los péptidos y peptidomiméticos que contienen RGD pueden incluir aminoácidos D, así como también miméticos de RGD sintéticos. Además de RGD, se pueden utilizar otros restos que tengan como diana el ligando integrina. Los conjugados preferidos de este ligando tienen como diana PECAM-1 o VEGF.

55 Se puede utilizar un resto peptídico RGD para que actúe sobre un tipo celular particular, p. ej., una célula tumoral tal como una célula tumoral endotelial o una célula tumoral de cáncer de mama (Zitzmann et al., Cancer Res., 62:5139-43, 2002). Un péptido RGD puede facilitar el direccionamiento de un agente de ARNbc hacia tumores de varios tejidos diferentes, que incluyen el pulmón, el riñón, el bazo o el hígado (Aoki et al., Cancer Gene Therapy 8:783-787, 2001). Normalmente, el péptido RGD facilitará el direccionamiento de un agente de ARNi hacia el riñón. El péptido RGD puede ser lineal o cíclico y puede estar modificado, p. ej., glicosilado o metilado, para facilitar el

direccionamiento hacia tejidos específicos. Por ejemplo, un péptido RGD glicosilado puede suministrar un agente de ARNi a una célula tumoral que exprese  $\alpha V\beta 3$  (Haubner et al., Jour. Nucl. Med., 42:326-336, 2001).

Un "péptido de permeación celular" es capaz de penetrar en una célula, p. ej., una célula microbiana, tal como una célula bacteriana o fúngica, o una célula de mamífero tal como una célula humana. Un péptido de permeación en células microbianas puede ser, por ejemplo, un péptido lineal de hélice  $\alpha$  (p. ej., LL-37 o Ceropina P1), un péptido que contenga un enlace de tipo disulfuro (p. ej.,  $\alpha$ -defensina,  $\beta$ -defensina o bactenecina) o un péptido que contenga únicamente uno o dos aminoácidos dominantes (p. ej., PR-39 o indolicidina). Un péptido de permeación celular también puede incluir una señal de localización nuclear (NLS, por sus siglas en inglés). Por ejemplo, un péptido de permeación celular puede ser un péptido anfifático bipartito tal como MPG, el cual deriva del dominio del péptido de fusión de gp41 del VIH-1 y NLS del antígeno T grande SV40 (Simeoni et al., Nucl. Acids Res. 31:2717-2724, 2003).

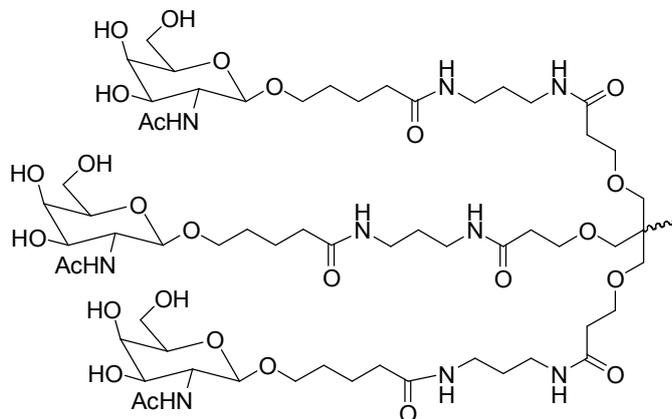
Conjugados de carbohidratos

En relación con las composiciones y los métodos de la invención, un oligonucleótido de tipo ARNi puede comprender además un carbohidrato. Los ARNi conjugados con carbohidratos son convenientes para el suministro *in vivo* de ácidos nucleicos, así como también para composiciones adecuadas para el uso terapéutico *in vivo*, según se describe en la presente. El término "carbohidrato", tal como se utiliza en la presente, se refiere a un compuesto que o bien es un carbohidrato de por sí constituido por una o más unidades de monosacáridos que contienen al menos 6 átomos de carbono (que pueden ser lineales, ramificados o cíclicos) con un átomo de oxígeno, nitrógeno o azufre unido a cada átomo de carbono; o un compuesto que tiene como parte de este un resto de carbohidrato constituido por una o más unidades de monosacáridos, teniendo cada una de ellas al menos seis átomos de carbono (que pueden ser lineales, ramificados o cíclicos), con un átomo de oxígeno, nitrógeno o azufre unido a cada átomo de carbono. Los carbohidratos representativos incluyen los azúcares (mono-, di-, tri- y oligosacáridos que contienen desde aproximadamente 4, 5, 6, 7, 8 o 9 unidades de monosacáridos) y polisacáridos tales como almidones, glicógeno, celulosa y gomas de polisacáridos. Los monosacáridos específicos incluyen azúcares C5 y los azúcares anteriores (p. ej., C5, C6, C7 o C8); los di- y trisacáridos incluyen azúcares que tienen dos o más unidades de monosacáridos (p. ej., C5, C6, C7 o C8).

Se describe que un conjugado de carbohidrato comprende un monosacárido. Se describe que el monosacárido es una N-acetilgalactosamina (GalNAc). Los conjugados de tipo GalNAc se describen, por ejemplo, en la Patente de EE. UU. N.º 8.106.022. Se describe que el conjugado de tipo GalNAc sirve como ligando que dirige el ARNi hacia células particulares. En algunas realizaciones, el conjugado de tipo GalNAc dirige el ARNi hacia células hepáticas, p. ej., actuando como un ligando para el receptor de la asialoglicoproteína de las células hepáticas (p. ej., los hepatocitos).

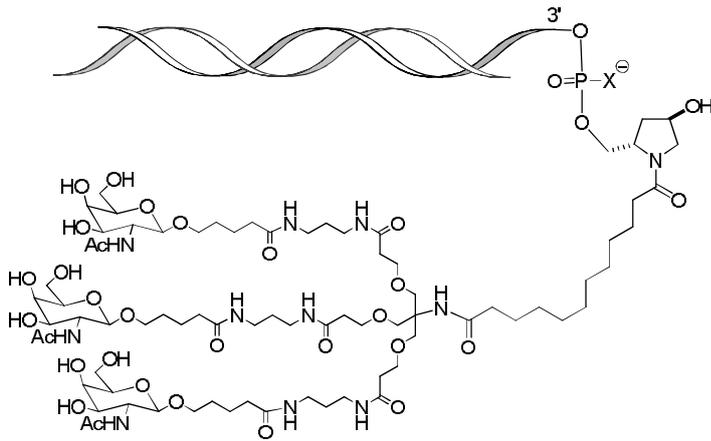
Se describe que el conjugado de carbohidrato comprende uno o más derivados de tipo GalNAc. Los derivados de tipo GalNAc se pueden unir mediante un conector, p. ej., un conector ramificado bivalente o trivalente. Se describe que el conjugado de tipo GalNAc está conjugado con el extremo 3' de la hebra sentido. Se describe que el conjugado de tipo GalNAc está conjugado con el agente de ARNi (p. ej., con el extremo 3' de la hebra sentido) mediante un conector, p. ej., un conector según se describe en la presente.

Se describe que el conjugado de tipo GalNAc es

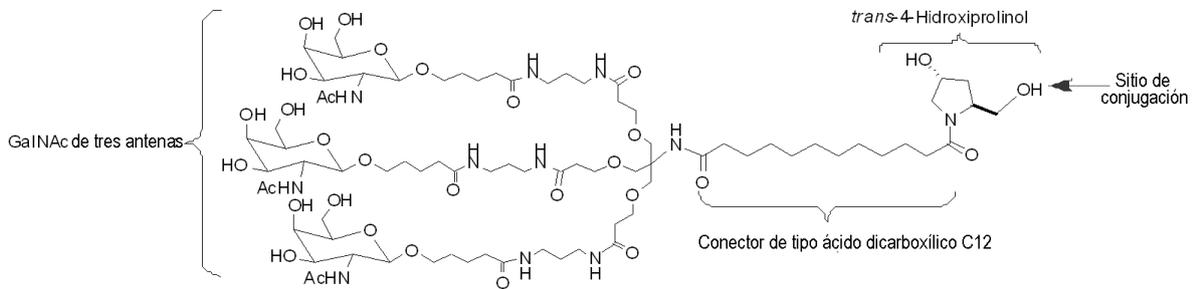


Fórmula II.

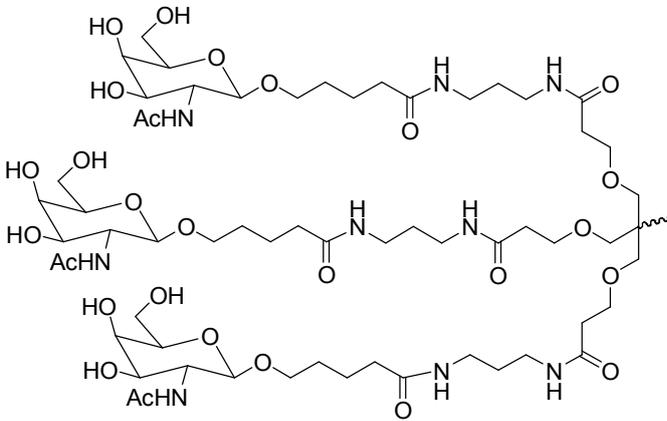
Se describe que el agente de iARN está unido al conjugado de carbohidrato mediante un conector, según se muestra en la siguiente representación esquemática, donde X es O o S



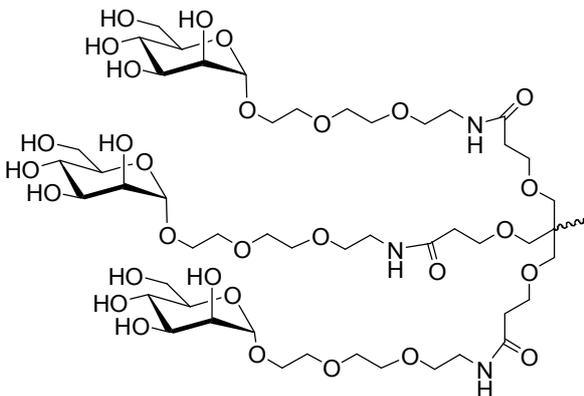
En algunas realizaciones, el agente de iARN se conjuga a L96 según se define en la Tabla 1 y se muestra a continuación



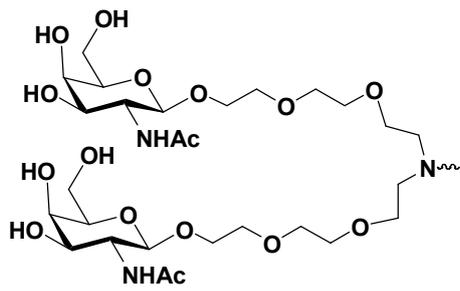
- 5 Un conjugado de carbohidrato para su uso en las composiciones y los métodos se puede seleccionar del grupo constituido por:



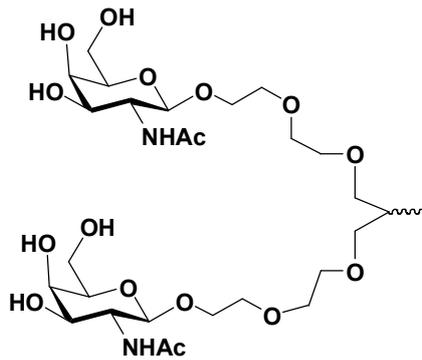
Fórmula II,



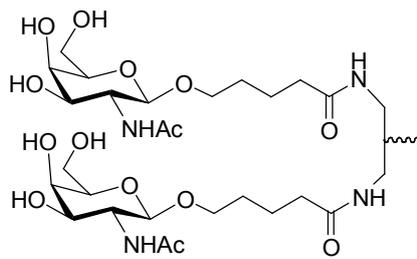
Fórmula III,



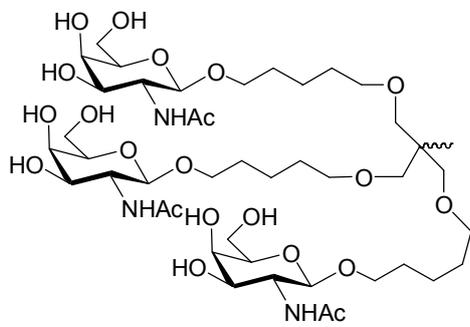
Fórmula IV,



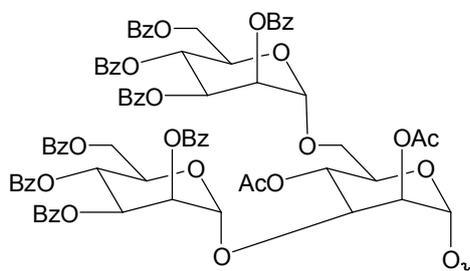
Fórmula V,



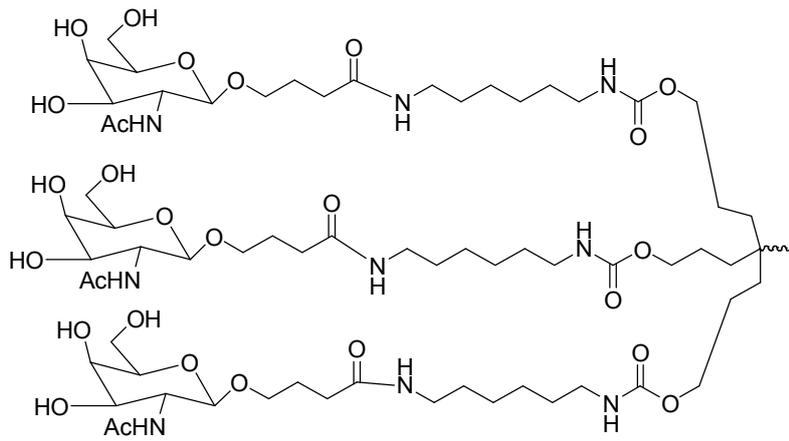
Fórmula VI,



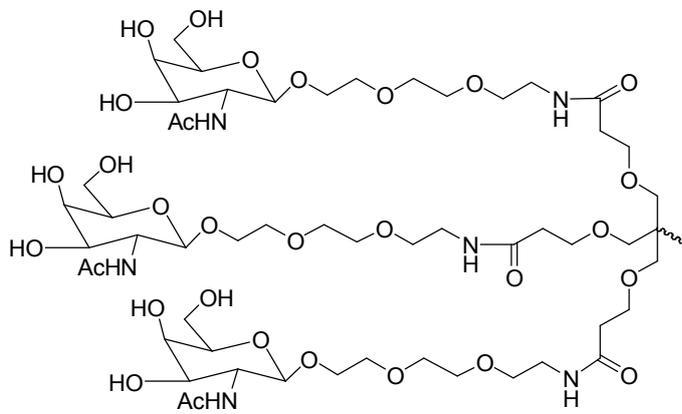
Fórmula VII,



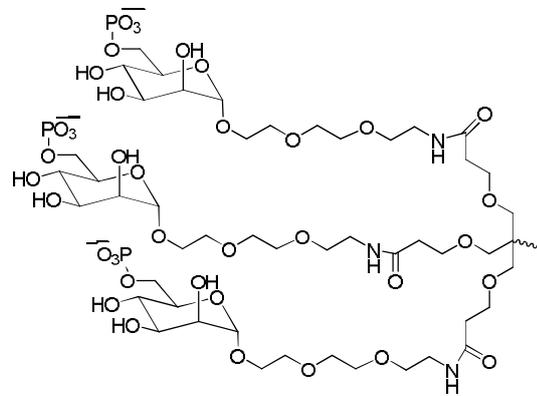
Fórmula VIII,



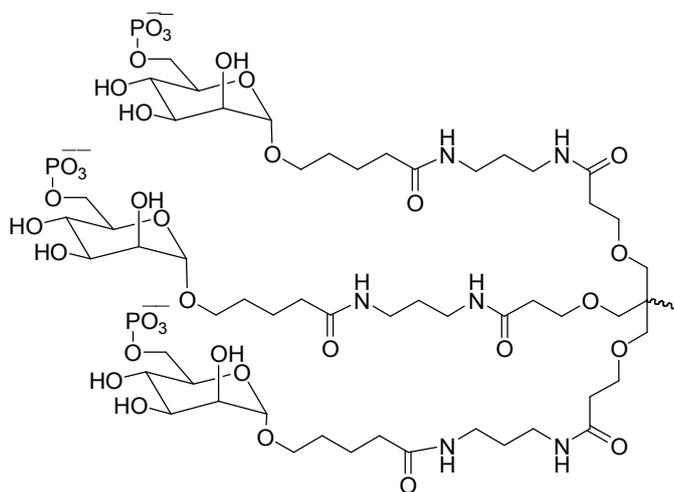
Fórmula IX,



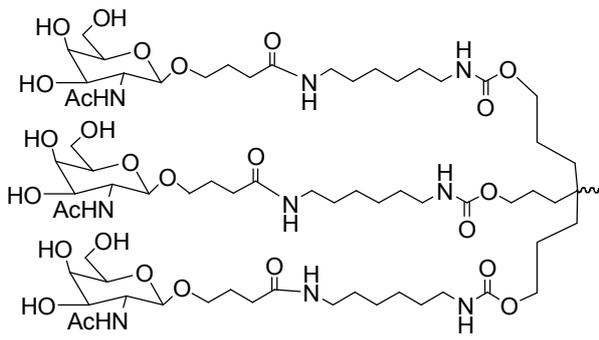
Fórmula X,



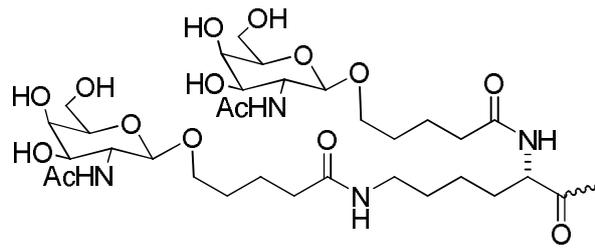
Fórmula XI,



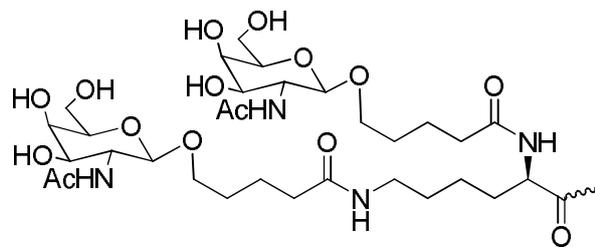
Fórmula XII,



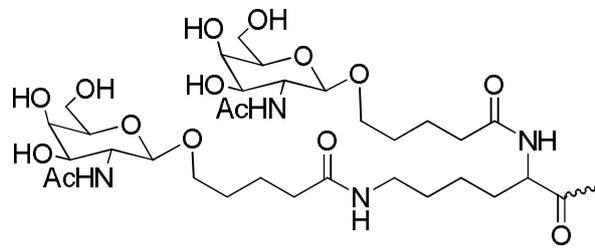
Fórmula XIII,



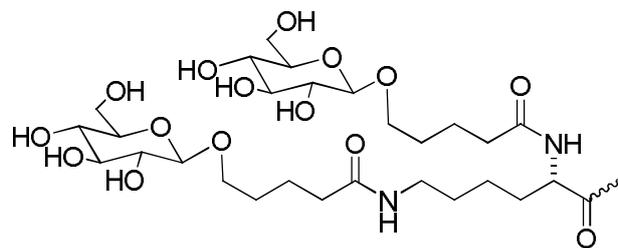
Fórmula XIV,



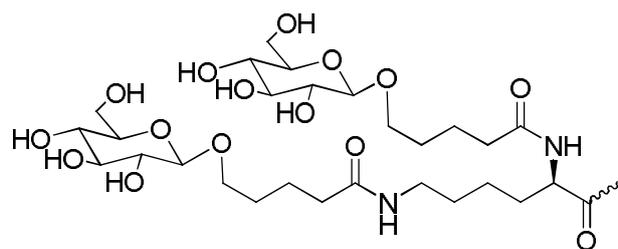
Fórmula XV,



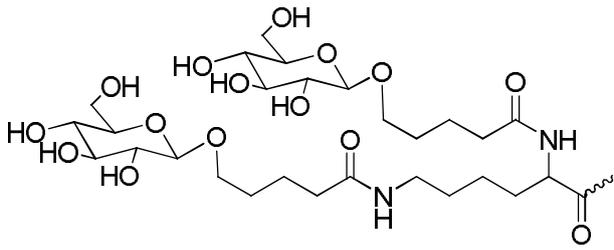
Fórmula XVI,



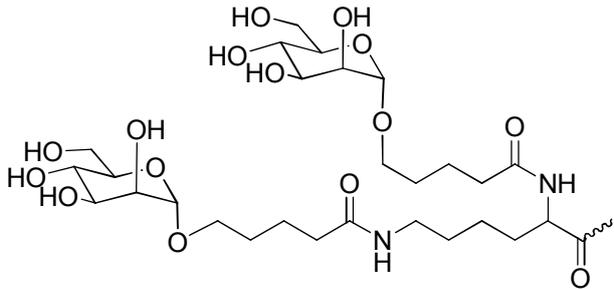
Fórmula XVII,



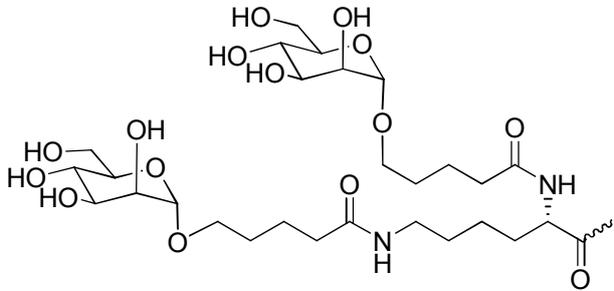
Fórmula XVIII,



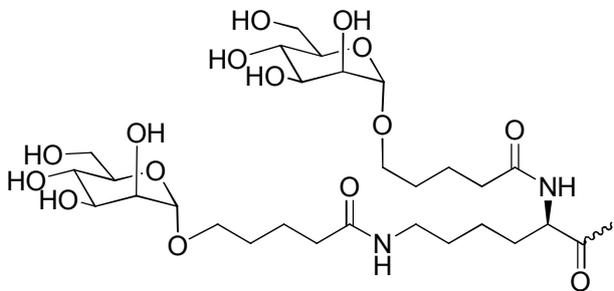
Fórmula XIX,



Fórmula XX,

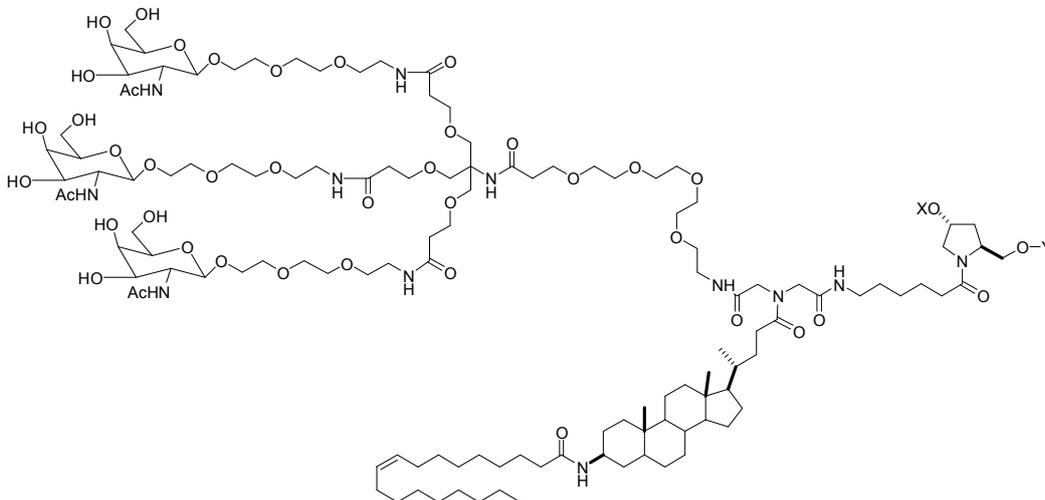


Fórmula XXI,



Fórmula XXII.

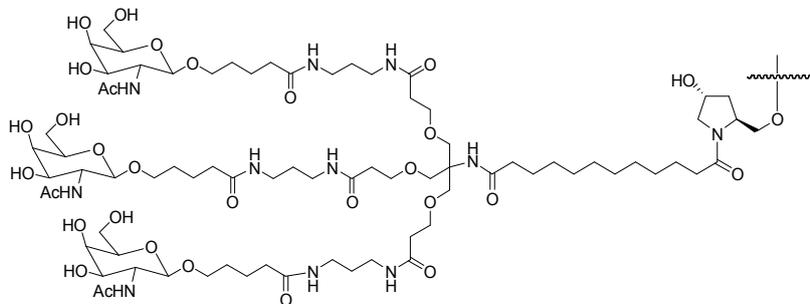
5 Otro conjugado de carbohidrato representativo incluye, sin carácter limitante,



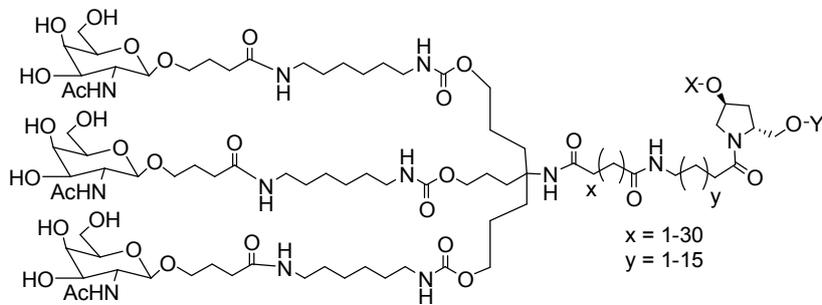
(Fórmula XXIII), donde uno de los grupos X o Y es un oligonucleótido y el otro es un hidrógeno.

Se describe que el conjugado de carbohidrato comprende además uno o más ligandos adicionales como los que se describen en la presente, tales como, sin carácter limitante, un modulador PK y/o un péptido de permeación celular.

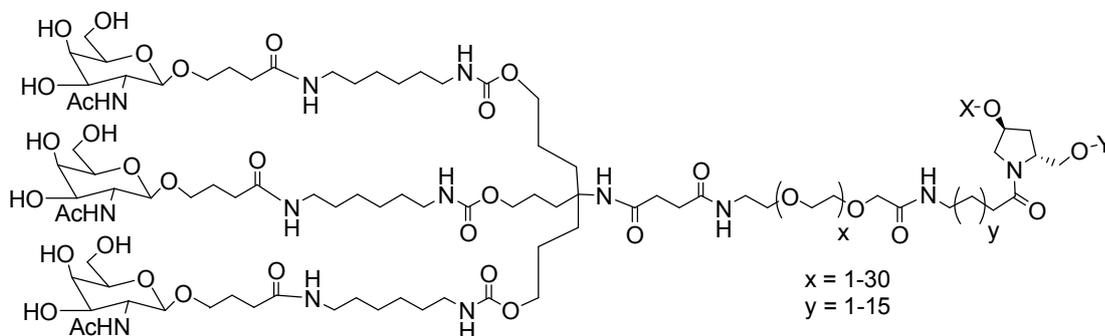
- 5 Se describe que un ARNi de la invención está conjugado con un carbohidrato a través de un conector. Los ejemplos no limitantes de conjugados de carbohidrato y ARNi con conectores de las composiciones y los métodos de la invención incluyen, sin carácter limitante,



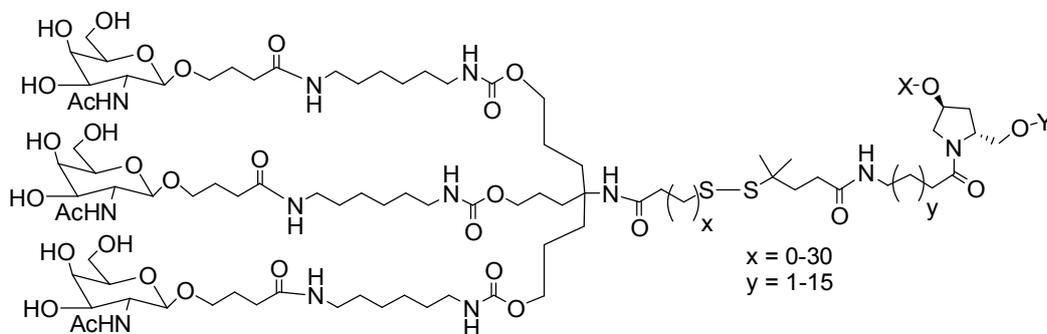
(Fórmula XXIV),



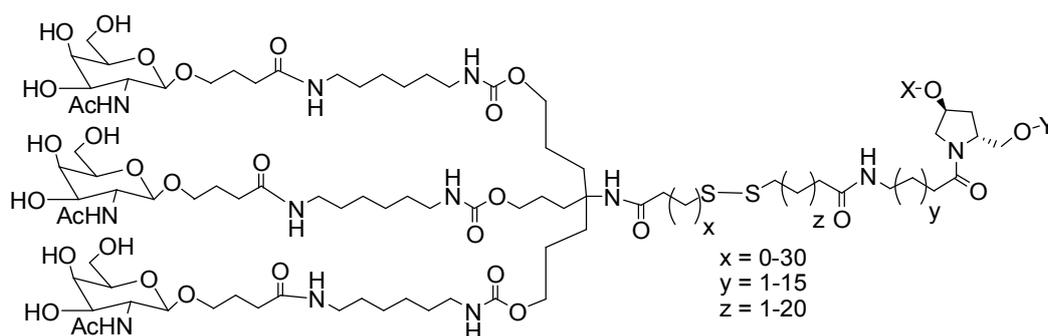
(Fórmula XXV),



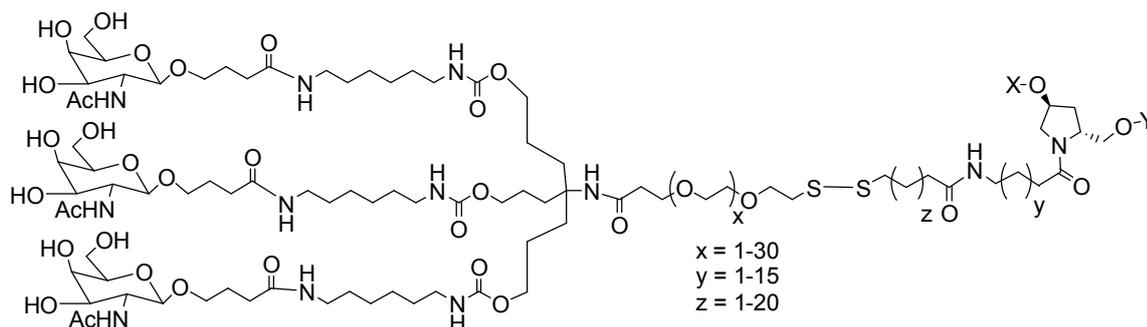
- 10 (Fórmula XXVI),



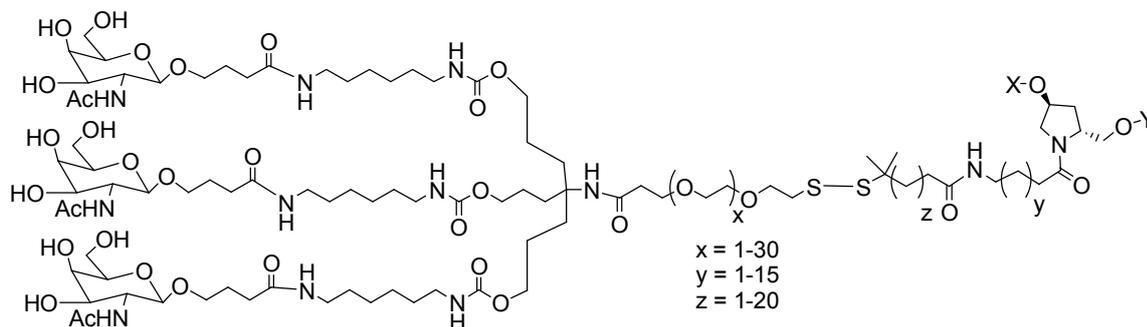
(Fórmula XXVII),



(Fórmula XXVIII),



(Fórmula XXIX) y



5

(Fórmula XXX), donde uno de los grupos X o Y es un oligonucleótido y el otro es un hidrógeno.

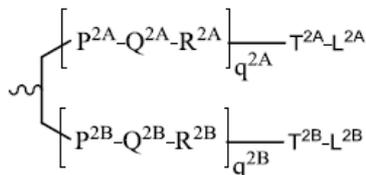
Conectores

Se describe que el conjugado o ligando descrito en la presente se puede unir a un oligonucleótido de tipo ARNi con varios conectores que pueden ser escindibles o no escindibles.

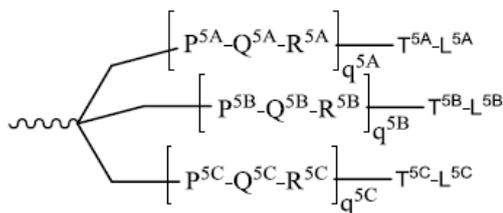
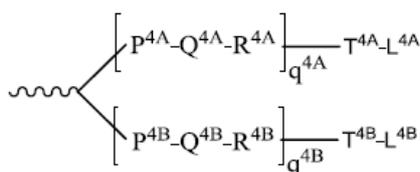
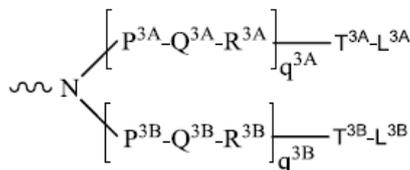
- 10 El término "conector" o "grupo conector" se refiere a un resto orgánico que conecta dos partes de un compuesto, p. ej., une covalentemente dos partes de un compuesto. Los conectores comprenden normalmente un enlace directo o un átomo tal como oxígeno o azufre, una unidad tal como NR<sub>8</sub>, C(O), C(O)NH, SO, SO<sub>2</sub>, SO<sub>2</sub>NH o una cadena de átomos tal como, sin carácter limitante, alquilo sustituido o no sustituido, alquenilo sustituido o no sustituido, alquino sustituido o no sustituido, arilalquilo, arilalquenilo, arilalquino, heteroarilalquilo, heteroarilalquenilo, heteroarilalquino, heterociclilalquilo, heterociclilalquenilo, heterociclilalquino, arilo, heteroarilo, heterociclilo, cicloalquilo, cicloalquenilo, alquilarilalquilo, alquilarilalquenilo, alquilarilalquino, alquinarilalquilo, alquinarilalquenilo, alquinarilalquino, alquilheteroarilalquilo, alquilheteroarilalquenilo, alquilheteroarilalquino, alquinheteroarilalquilo, alquinheteroarilalquenilo, alquinheteroarilalquino, alquinheteroarilalquenilo, alquinheteroarilalquino, alquinheterociclilalquilo, alquinheterociclilalquenilo, alquinheterociclilalquino, alquinheterociclilalquilo, alquinheterociclilalquenilo, alquinheterociclilalquino, alquinheterociclilalquilo, alquinheterociclilalquenilo, alquinarilo, alquinarilo, alquinarilo, alquilheteroarilo, alquinheteroarilo, alquinheteroarilo, donde uno o más metilenos se pueden interrumpir o terminar con O, S, S(O), SO<sub>2</sub>, N(R<sub>8</sub>), C(O), arilo sustituido o no sustituido, heteroarilo sustituido o no sustituido, heterociclilo sustituido o no sustituido; donde R<sub>8</sub> es hidrógeno, acilo, un resto alifático o un resto alifático sustituido. Se describe que el conector tiene aproximadamente 1-24 átomos, 2-24, 3-24, 4-24, 5-24, 6-24, 6-18, 7-18, 8-18 átomos, 7-17, 8-17, 6-16, 7-16 o 8-16 átomos.

Se describe que un ARNbc de la invención está conjugado con un conector ramificado bivalente o trivalente seleccionado a partir del grupo de estructuras que se muestran en cualquiera de las fórmulas (XXXI)-(XXXIV):

Fórmula XXXI



Fórmula XXXII



5 Fórmula XXXI

Fórmula XXXIV

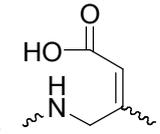
donde:

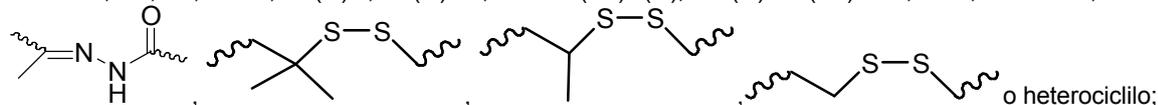
q2A, q2B, q3A, q3B, q4A, q4B, q5A, q5B y q5C representan independientemente en cada caso 0-20 y donde la unidad de repetición puede ser igual o diferente;

10 P2A, P2B, P3A, P3B, P4A, P4B, P5A, P5B, P5C, T2A, T2B, T3A, T3B, T4A, T4B, T4A, T5B, T5C, cada uno independientemente en cada caso, están ausentes o son CO, NH, O, S, OC(O), NHC(O), CH2, CH2NH, CH2O;

Q2A, Q2B, Q3A, Q3B, Q4A, Q4B, Q5A, Q5B, Q5C, cada uno independientemente en cada caso, están ausentes o son alquileo, alquileo sustituido, donde uno o más metilenos pueden estar interrumpidos o terminados con uno o más O, S, S(O), SO2, N(RN), C(R')=C(R''), C≡C o C(O);

R2A, R2B, R3A, R3B, R4A, R4B, R5A, R5B, R5C, cada uno independientemente en cada caso, están ausentes o

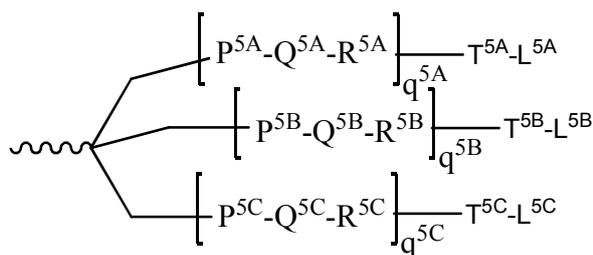
15 son NH, O, S, CH2, C(O)O, C(O)NH, NHCH(Ra)C(O), -C(O)-CH(Ra)-NH-, CO, CH=N-O, ,



o heterociclilo;

20 L2A, L2B, L3A, L3B, L4A, L4B, L5A, L5B y L5C representan el ligando, es decir, cada uno independientemente en cada caso representa un monosacárido (tal como GalNAc), disacárido, trisacárido, tetrasacárido, oligosacárido o polisacárido; y Ra es H o una cadena lateral aminoacídica. Los derivados de tipo GalNAc de conjugación trivalente son particularmente útiles para ser utilizados con los agentes de iARN para inhibir la expresión de un gen diana, tales como los de fórmula (XXXV):

Fórmula XXXV



donde L5A, L5B y L5C representan un monosacárido tal como un derivado de tipo GalNAc.

Los ejemplos de grupos conectores ramificados bivalentes y trivalentes adecuados que se conjugan con derivados de tipo GalNAc incluyen, sin carácter limitante, las estructuras mencionadas anteriormente como fórmulas II, VII, XI, X y XIII.

Un grupo conector escindible es aquel que es suficientemente estable fuera de la célula pero que, al entrar en una célula diana, se escinde para liberar las dos partes que el conector mantenía unidas. En una realización preferida, el grupo conector escindible se escinde al menos aproximadamente 10 veces, 20 veces, 30 veces, 40 veces, 50 veces, 60 veces, 70 veces, 80 veces, 90 veces o más, o al menos aproximadamente 100 veces más rápido en una célula diana o en una primera condición de referencia (la cual se puede seleccionar, p. ej., para que imite o represente las condiciones intracelulares) que en la sangre de un sujeto, o en una segunda condición de referencia (la cual se puede seleccionar, p. ej., para que imite o represente las condiciones que se encuentran en la sangre o el suero).

Los grupos conectores escindibles son sensibles a los agentes de escisión, p. ej., el pH, el potencial rédox o la presencia de moléculas que provocan degradación. En general, los agentes de escisión se encuentran o prevalecen en mayor grado en concentraciones o actividades más elevadas dentro de las células que en suero o sangre. Los ejemplos de tales agentes que provocan degradación incluyen: agentes rédox que se seleccionan para sustratos particulares o que no tienen especificidad por un sustrato, los cuales incluyen, p. ej., enzimas oxidantes o reductoras o agentes reductores tales como los mercaptanos, presentes en las células, que pueden degradar un grupo conector escindible rédox mediante una reducción; esterasas; endosomas o agentes que pueden crear un entorno ácido, p. ej., los que proporcionan un pH de cinco o inferior; enzimas que pueden hidrolizar o degradar un grupo conector escindible con ácido actuando como un ácido general, peptidasas (que pueden ser específicas para un sustrato) y fosfatasas.

Un grupo conector escindible, tal como un enlace de tipo disulfuro, puede ser sensible al pH. El pH del suero humano es de 7.4, mientras que el pH intracelular medio es ligeramente inferior, está comprendido entre aproximadamente 7.1 y 7.3. Los endosomas tienen un pH más ácido, comprendido en el intervalo de 5.5 a 6.0, y los lisosomas tienen un pH todavía más ácido de aproximadamente 5.0. Algunos conectores tendrán un grupo conector escindible que se escinde a un pH preferido, liberando de este modo un lípido catiónico a partir del ligando en el interior de la célula o en el compartimento deseado de la célula.

Un conector puede incluir un grupo conector escindible que pueda ser escindido por una enzima particular. El tipo de grupo conector escindible incorporado en un conector puede depender de la célula que se tenga como diana. Por ejemplo, un ligando que tenga el hígado como diana se puede unir a un lípido catiónico a través de un conector que incluya un grupo éster. Las células hepáticas son ricas en esterasas y, por consiguiente, el conector se escindirá de una forma más eficaz en las células hepáticas que en los tipos celulares que no sean ricos en esterasas. Otros tipos celulares ricos en esterasas incluyen las células del pulmón, la corteza renal y los testículos.

Se pueden utilizar conectores que contengan enlaces peptídicos cuando se tengan como diana tipos celulares ricos en peptidasas tales como las células hepáticas y los sinoviocitos.

En general, la idoneidad de un grupo conector escindible candidato se puede evaluar estudiando la capacidad de un agente (o condición) de degradación para escindir el grupo conector candidato. También será deseable estudiar además el grupo conector escindible candidato con el fin de determinar su capacidad para resistir la escisión en sangre o cuando entre en contacto con otro tejido que no sea la diana. Por lo tanto, se puede determinar la susceptibilidad relativa a la escisión entre una primera y una segunda condición, donde la primera se selecciona para que sea indicativa de la escisión en una célula diana y la segunda se selecciona para que sea indicativa de la escisión en otros tejidos o fluidos biológicos, p. ej., en sangre o suero. Las evaluaciones se pueden llevar a cabo en sistemas exentos de células, en células, en cultivos celulares, en cultivos tisulares o de órganos, o en animales enteros. Puede resultar útil realizar evaluaciones iniciales en condiciones de cultivo o exentas de células y confirmarlas mediante evaluaciones adicionales en animales enteros. En realizaciones preferidas, los compuestos candidatos útiles se escinden al menos aproximadamente 2, 4, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o aproximadamente 100 veces más rápido en la célula (o en condiciones in vitro seleccionadas para imitar las condiciones intracelulares) en comparación con la sangre o el suero (o en condiciones in vitro seleccionadas para imitar las condiciones extracelulares).

Grupos conectores escindibles rédox

Se describe que un grupo conector escindible es un grupo conector escindible rédox que se escinde tras una reducción u oxidación. Un ejemplo de un grupo conector escindible de forma reductiva es un grupo conector de tipo disulfuro (-S-S-). Para determinar si un grupo conector escindible candidato es un "grupo conector escindible de forma reductiva" adecuado o, por ejemplo, es adecuado para su uso con un resto de ARNi particular y un agente de direccionamiento particular, se pueden consultar los métodos descritos en la presente. Por ejemplo, un candidato se puede evaluar mediante la incubación con ditioneitol (DTT) u otro agente reductor utilizando reactivos conocidos en la técnica que imitan la tasa de escisión que se observaría en una célula, p. ej. una célula diana. Los candidatos también se pueden evaluar en unas condiciones que se seleccionan para que imiten las condiciones en sangre o suero. Los compuestos candidatos se pueden escindir como máximo aproximadamente un 10% en sangre. Se describe que los compuestos candidatos útiles se degradan al menos aproximadamente 2, 4, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o aproximadamente 100 veces más rápido en la célula (o en condiciones *in vitro* seleccionadas para imitar las condiciones intracelulares) en comparación con la sangre (o en condiciones *in vitro* seleccionadas para imitar las condiciones extracelulares). La tasa de escisión de los compuestos candidatos se puede determinar utilizando ensayos cinéticos enzimáticos estándar en condiciones seleccionadas para que imiten los medios intracelulares y comparándolos con unas condiciones seleccionadas para imitar los medios extracelulares.

Grupos conectores escindibles basados en fosfatos

Se describe que un conector escindible comprende un grupo conector escindible basado en un fosfato. Un grupo conector escindible basado en un fosfato es escindido por agentes que degradan o hidrolizan el grupo fosfato. Un ejemplo de un agente que escinde grupos fosfato en células son enzimas tales como las fosfatasa en células. Algunos ejemplos de grupos conectores basados en fosfatos son -O-P(O)(ORk)-O-, -O-P(S)(ORk)-O-, -O-P(S)(SRk)-O-, -S-P(O)(ORk)-O-, -O-P(O)(ORk)-S-, -S-P(O)(ORk)-S-, -O-P(S)(ORk)-S-, -S-P(S)(ORk)-O-, -O-P(O)(Rk)-O-, -O-P(S)(Rk)-O-, -S-P(O)(Rk)-O-, -S-P(S)(Rk)-O-, -O-P(S)(Rk)-S-, -S-P(S)(Rk)-S-. Las realizaciones preferidas son -O-P(O)(OH)-O-, -O-P(S)(OH)-O-, -O-P(S)(SH)-O-, -S-P(O)(OH)-O-, -O-P(O)(OH)-S-, -S-P(O)(OH)-S-, -O-P(S)(OH)-S-, -S-P(S)(OH)-O-, -O-P(O)(H)-O-, -O-P(S)(H)-O-, -S-P(O)(H)-O-, -S-P(S)(H)-O-, -S-P(O)(H)-S-, -O-P(S)(H)-S-. Se prefiere -O-P(O)(OH)-O-. Estos candidatos se pueden evaluar utilizando métodos análogos a los descritos anteriormente.

Grupos conectores escindibles con ácido

Se describe que un conector escindible comprende un grupo conector escindible con ácido. Un grupo conector escindible con ácido es un grupo conector que se escinde en condiciones ácidas. Se describe que los grupos conectores escindibles con ácido se escinden en un entorno ácido con un pH de aproximadamente 6.5 o inferior (p. ej., de aproximadamente 6.0, 5.75, 5.5, 5.25, 5.0 o inferior) o con agentes tales como enzimas que pueden actuar como un ácido general. En una célula, los orgánulos de pH bajo específicos, tales como los endosomas y lisosomas, pueden proporcionar un entorno de escisión para los grupos conectores escindibles con ácido. Los ejemplos de grupos conectores escindibles con ácido incluyen, sin carácter limitante, hidrazonas, ésteres, y ésteres de aminoácidos. Los grupos escindibles con ácido presentan la fórmula general -C=NN-, C(O)O o -OC(O). Una realización preferida se produce cuando el carbono unido al oxígeno del éster (el grupo alcoxi) es un grupo arilo, un grupo alquilo sustituido o un grupo alquilo terciario tal como dimetilpentilo o t-butilo. Estos candidatos se pueden evaluar utilizando métodos análogos a los descritos anteriormente.

Grupos conectores escindibles basados en ésteres

Se describe que un conector escindible comprende un grupo conector escindible basado en un éster. Un grupo conector escindible basado en un éster es escindido por enzimas tales como esterases y amidasas en las células. Los ejemplos de grupos conectores escindibles basados en ésteres incluyen, sin carácter limitante, ésteres de grupos alquilenos, alquilenos y alquilenos. Los grupos conectores escindibles basados en ésteres presentan la fórmula general -C(O)O- o -OC(O)-. Estos candidatos se pueden evaluar utilizando métodos análogos a los descritos anteriormente.

Grupos conectores escindibles basados en péptidos

Se describe que un conector escindible comprende un grupo conector escindible basado en péptidos. Un grupo conector escindible basado en péptidos es escindido por enzimas tales como peptidasas y proteasas en las células. Los grupos conectores escindibles basados en péptidos son enlaces peptídicos formados entre aminoácidos para proporcionar oligopéptidos (p. ej., dipéptidos, tripéptidos, etc.) y polipéptidos. Los grupos escindibles basados en péptidos no incluyen el grupo amida (-C(O)NH-). El grupo amida se puede formar entre cualquier alquilenos, alquilenos o alquilenos. Un enlace peptídico es un tipo especial de enlace de tipo amida formado entre aminoácidos para proporcionar péptidos y proteínas. El grupo escindible basado en un péptido se limita en general al enlace peptídico (es decir, el enlace de tipo amida) formado entre aminoácidos para proporcionar péptidos y proteínas y no incluye el grupo funcional amida entero. Los grupos conectores escindibles basados en péptidos presentan la fórmula general -NHCHRAC(O)NHCHRBC(O)- (SEQ ID NO: 13), donde RA y RB son los grupos R de

los dos aminoácidos adyacentes. Estos candidatos se pueden evaluar utilizando métodos análogos a los descritos anteriormente.

5 Las patentes de EE. UU. representativas que describen la preparación de conjugados de ARN incluyen, sin carácter limitante, las Pat. de EE. UU. N.os 4.828.979, 4.948.882, 5.218.105, 5.525.465, 5.541.313, 5.545.730, 5.552.538, 5.578.717, 5.580.731, 5.591.584, 5.109.124, 5.118.802, 5.138.045, 5.414.077, 5.486.603, 5.512.439, 5.578.718, 5.608.046, 4.587.044, 4.605.735, 4.667.025, 4.762.779, 4.789.737, 4.824.941, 4.835.263, 4.876.335, 4.904.582, 4.958.013, 5.082.830, 5.112.963, 5.214.136, 5.082.830, 5.112.963, 5.214.136, 5.245.022, 5.254.469, 5.258.506, 5.262.536, 5.272.250, 5.292.873, 5.317.098, 5.371.241, 5.391.723, 5.416.203, 5.451.463, 5.510.475, 5.512.667, 5.514.785, 5.565.552, 5.567.810, 5.574.142, 5.585.481, 5.587.371, 5.595.726, 5.597.696, 5.599.923, 5.599.928 y 10 5.688.941, 6.294.664, 6.320.017, 6.576.752, 6.783.931, 6.900.297, 7.037.646, 8.106.022.

No es necesario que todas las posiciones de un compuesto determinado se modifiquen de forma uniforme y, de hecho, más de una de las modificaciones mencionadas anteriormente se pueden incorporar en un único compuesto o incluso en un único nucleósido dentro de un ARNi. La presente invención también incluye compuestos de ARNi que son compuestos quiméricos.

15 Los compuestos de ARNi "quiméricos" o "quimeras", en el contexto de la presente invención, son compuestos de ARNi, p. ej., ARNbc, que contienen dos o más regiones químicamente diferentes, cada una de las cuales está constituida por al menos una unidad monomérica, es decir, un nucleótido en el caso de un compuesto de ARNbc. Estos ARNi contienen normalmente al menos una región en la cual el ARN está modificado para conferir al ARNi una mayor resistencia a la degradación por parte de nucleasas, una mayor captación celular y/o una mayor afinidad de 20 unión para el ácido nucleico diana. Una región adicional del ARNi puede servir como sustrato para enzimas capaces de escindir híbridos de ARN:ADN o ARN:ARN. A modo de ejemplo, una RNasa H es una endonucleasa celular que escinde la hebra de ARN de un dúplex de ARN:ADN. Por consiguiente, la activación de una RNasa H provoca la escisión de la diana de ARN y de este modo potencia enormemente la eficacia de la inhibición de la expresión génica por parte del ARNi. Como consecuencia, a menudo se pueden obtener resultados comparables con ARNi 25 más cortos cuando se utilizan ARNbc quiméricos, en comparación con fosforotioato desoxi ARNbc que se hibridan con la misma región diana. La escisión de la diana de ARN se puede detectar de forma rutinaria mediante electroforesis en gel y, cuando proceda, técnicas de hibridación de ácidos nucleicos asociadas conocidas en la técnica.

30 En ciertos casos, el ARN de un ARNi se puede modificar con un grupo que no sea un ligando. Se han conjugado una serie de moléculas que no son ligandos a ARNi con el fin de potenciar la actividad, distribución celular o captación celular del ARNi, y los procedimientos para llevar a cabo tales conjugaciones se pueden consultar en la bibliografía científica. Tales restos que no son ligandos han incluido restos lipídicos, tales como el colesterol (Kubo, T. et al., Biochem. Biophys. Res. Comm., 2007, 365(1):54-61; Letsinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1989, 86:6553), ácido cólico (Manoharan et al., Bioorg. Med. Chem. Lett., 1994, 4:1053), un tioéter, p. ej., hexil-S-tritiltilol 35 (Manoharan et al., Ann. N.Y. Acad. Sci., 1992, 660:306; Manoharan et al., Bioorg. Med. Chem. Lett., 1993, 3:2765), un tiocolésterol (Oberhauser et al., Nucl. Acids Res., 1992, 20:533), una cadena alifática, p. ej., residuos de dodecandiol o undecilo (Saison-Behmoaras et al., EMBO J, 1991, 10:111; Kabanov et al., FEBS Lett., 1990, 259:327; Svinarchuk et al., Biochimie, 1993, 75:49), un fosfolípido, p. ej., dihexadecil-rac-glicerol o 1,2-di-O-hexadecil-rac-glicerol-3H-fosfonato de trietilamonio (Manoharan et al., Tetrahedron Lett., 1995, 36:3651; Shea et al., 40 Nucl. Acids Res., 1990, 18:3777), una poliamina o una cadena de polietilenglicol (Manoharan et al., Nucleosides & Nucleotides, 1995, 14:969) o ácido adamantanacético (Manoharan et al., Tetrahedron Lett., 1995, 36:3651), un resto de palmitilo (Mishra et al., Biochim. Biophys. Acta, 1995, 1264:229), o un resto de octadecilamina o hexilaminocarboniloxicolesterol (Crooke et al., J. Pharmacol. Exp. Ther., 1996, 277:923). Las patentes de Estados Unidos representativas que describen la preparación de tales conjugados de ARN se han enumerado anteriormente. 45 Los protocolos de conjugación habituales implican la síntesis de un ARN que contiene un aminoconector en una o más posiciones de la secuencia. A continuación, el grupo camino se hace reaccionar con la molécula que se ha de conjugar utilizando reactivos activantes o de acoplamiento adecuados. La reacción de conjugación se puede llevar a cabo o bien con el ARN todavía unido al soporte sólido o tras la escisión del ARN, en fase de solución. La purificación del conjugado de ARN mediante HPLC proporciona normalmente el conjugado puro.

#### 50 Suministro de ARNi

El suministro de un ARNi a un sujeto que lo necesite se puede llevar a cabo de diferentes maneras. Se puede llevar a cabo un suministro *in vivo* directamente administrando una composición que comprenda un ARNi, p. ej. un ARNbc, a un sujeto. Como alternativa, el suministro se puede llevar a cabo de forma indirecta administrando uno o más 55 vectores que codifiquen y dirijan la expresión del ARNi. Estas alternativas se exponen con más detalle a continuación.

#### Suministro directo

En general, cualquier método para suministrar una molécula de ácido nucleico se puede adaptar para ser utilizado con un ARNi (remítase, p. ej., a Akhtar S. y Julian RL. (1992) Trends Cell. Biol. 2(5):139-144 y WO94/02595. Sin embargo, existen tres factores importantes que se deben tener en cuenta para suministrar con éxito una molécula de

ARNi *in vivo*: (a) la estabilidad biológica de la molécula suministrada, (2) la prevención de efectos no específicos y (3) la acumulación de la molécula suministrada en el tejido diana. Los efectos no específicos de un ARNi se pueden minimizar mediante una administración local, por ejemplo, mediante una inyección directa o un implante en un tejido (a modo de ejemplo no limitante, un tumor) o administrando el preparado por vía tópica. La administración local a un sitio de tratamiento maximiza la concentración local del agente, limita la exposición del agente a tejidos sistémicos que de otro modo podrían ser dañados por el agente o que podrían degradar el agente, y permite administrar una dosis total más baja de la molécula de ARNi. Varios estudios han mostrado una supresión con éxito de productos génicos cuando se administra un ARNi de forma local. Por ejemplo, se ha demostrado que el suministro intraocular de un ARNbc VEGF mediante una inyección intravítrea en monos cinomólogos (Tolentino, MJ., et al. (2004) *Retina* 24:132-138) e inyecciones subretinales en ratones (Reich, SJ., et al. (2003) *Mol. Vis.* 9:210-216) previenen en ambos casos la neovascularización en un modelo experimental de degeneración macular relacionada con la edad. Además, la inyección intratumoral directa de un ARNbc en ratones reduce el volumen tumoral (Pille, J. et al. (2005) *Mol. Ther.* 11:267-274) y puede prolongar la supervivencia de ratones portadores de tumores (Kim, WJ. et al. (2006) *Mol. Ther.* 14:343-350; Li, S. et al. (2007) *Mol. Ther.* 15:515-523). La interferencia por ARN también ha tenido éxito con el suministro local al SNC mediante inyección directa (Dorn, G. et al. (2004) *Nucleic Acids* 32:e49; Tan, PH., et al. (2005) *Gene Ther.* 12:59-66; Makimura, H. et al. (2002) *BMC Neurosci.* 3:18; Shishkina, GT., et al. (2004) *Neuroscience* 129:521-528; Thakker, ER. et al. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101:17270-17275; Akaneya, Y. et al. (2005) *J. Neurophysiol.* 93:594-602) y a los pulmones mediante una administración intranasal (Howard, KA. et al. (2006) *Mol. Ther.* 14:476-484; Zhang, X. et al. (2004) *J. Biol. Chem.* 279:10677-10684; Bitko, V. et al. (2005) *Nat. Med.* 11:50-55). Con el fin de administrar un ARNi por vía sistémica para el tratamiento de una enfermedad, el ARN se puede modificar o suministrar de forma alternativa utilizando un sistema de suministro farmacológico; ambos métodos actúan para prevenir la degradación rápida del ARNbc por parte de endo- y exonucleasas *in vivo*.

La modificación del ARN o el portador farmacéutico también puede permitir el direccionamiento de la composición de ARNi hacia el tejido diana y evitar efectos laterales no deseados. Las moléculas de ARNi se pueden modificar mediante una conjugación química con otros grupos, p. ej., un grupo que sea un lípido o un carbohidrato según se describe en la presente. Tales conjugados se pueden utilizar para dirigir el ARNi hacia células particulares, p. ej., células hepáticas, p. ej., hepatocitos. Por ejemplo, se pueden utilizar conjugados de tipo GalNAc o formulaciones lipídicas (p. ej., LNP) para dirigir el ARNi hacia células particulares, p. ej., células hepáticas, p. ej., hepatocitos.

Se pueden utilizar grupos lipófilos, tales como el colesterol, para potenciar la captación celular y evitar la degradación. Por ejemplo, se inyectó un ARNi dirigido contra ApoB conjugado con un resto de colesterol lipófilo por vía sistémica en ratones y provocó la supresión del ARNm de apoB tanto en el hígado como en el yeyuno (Soutschek, J. et al. (2004) *Nature* 432:173-178). Se ha demostrado que la conjugación de un ARNi con un aptámero inhibe el crecimiento tumoral y media la regresión tumoral en un modelo de cáncer de próstata en ratón (McNamara, JO. et al. (2006) *Nat. Biotechnol.* 24:1005-1015). En una realización alternativa, el ARNi se puede suministrar utilizando sistemas de suministro farmacológico tales como una nanopartícula, un dendrímero, un polímero, liposomas o un sistema de suministro catiónico. Los sistemas de suministro catiónico de carga positiva facilitan la unión de una molécula de ARNi (cargada negativamente) y también potencian las interacciones en la membrana celular cargada negativamente para permitir una captación eficaz de un ARNi por parte de la célula. Los lípidos catiónicos, dendrímeros o polímeros o bien se pueden unir a un ARNi o pueden ser inducidos para que formen una vesícula o micela (remítase, p. ej., a Kim SH. et al. (2008) *Journal of Controlled Release* 129(2):107-116), la cual encierra un ARNi. La formación de vesículas o micelas previene adicionalmente la degradación del ARNi cuando se administra por vía sistémica. Un experto en la técnica estará familiarizado con los métodos para preparar y administrar complejos de ARNi catiónicos (remítase, p. ej., a Sorensen, DR. et al. (2003) *J. Mol. Biol.* 327:761-766; Verma, UN. et al. (2003) *Clin. Cancer Res.* 9:1291-1300; Arnold, AS et al. (2007) *J. Hypertens.* 25:197-205, los cuales se incorporan a la presente por referencia en su totalidad). Algunos ejemplos no limitantes de sistemas de suministro farmacológico utilizados para el suministro sistémico de ARNi incluyen DOTAP (Sorensen, DR. et al. (2003), mencionado anteriormente; Verma, UN. et al. (2003), mencionado anteriormente), Oligofectamina, "partículas sólidas de ácido nucleico-lípido" (Zimmermann, TS. et al. (2006) *Nature* 441:111-114), cardiopina (Chien, PY. et al. (2005) *Cancer Gene Ther.* 12:321-328; Pal, A. et al. (2005) *Int J. Oncol.* 26:1087-1091), polietilenimina (Bonnet ME. et al. (2008) *Pharm. Res.* 16 de agosto, publicación electrónica previa a la impreza; Aigner, A. (2006) *J. Biomed. Biotechnol.* 71659), péptidos Arg-Gly-Asp (RGD) (Liu, S. (2006) *Mol. Pharm.* 3:472-487) y poliamidoaminas (Tomalia, DA. et al. (2007) *Biochem. Soc. Trans.* 35:61-67; Yoo, H. et al. (1999) *Pharm. Res.* 16:1799-1804). Un ARNi puede formar un complejo con una ciclodextrina para la administración sistémica. Se pueden consultar métodos de administración y composiciones farmacéuticas de ARNi y ciclodextrinas en la Patente de EE. UU. N.o 7. 427.605.

#### ARNi codificados en vectores

En otro aspecto, un ARNi que tiene como diana el gen ALAS1 se puede expresar a partir de unidades de transcripción insertadas en vectores de ADN o ARN (remítase, p. ej., a Couture, A et al., TIG. (1996), 12:5-10; Skillern, A. et al., Publicación de PCT Internacional N.o WO 00/22113, Conrad, Publicación de PCT Internacional N.o WO 00/22114 y Conrad, Pat. de EE. UU. N.o 6.054.299). La expresión puede ser transitoria (del orden de horas a semanas) o sostenida (de semanas a meses o más prolongada), dependiendo del constructo específico utilizado y del tejido o tipo celular diana. Estos transgenes se pueden introducir como un constructo lineal, un plásmido circular

o un vector vírico, el cual puede ser un vector integrador o no integrador. El transgén también se puede construir de modo que se permita que sea heredado como un plásmido extracromosómico (Gassmann et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1995) 92:1292).

5 La hebra individual o las hebras de un ARNi se pueden transcribir a partir de un promotor en un vector de expresión. Cuando se han de expresar dos hebras separadas para generar, por ejemplo, un ARNbc, se pueden introducir conjuntamente dos vectores de expresión separados (p. ej., mediante transfección o infección) en una célula diana. Como alternativa, cada hebra individual de un ARNbc puede ser transcrita por promotores que estén ambos localizados en el mismo plásmido de expresión. Un ARNbc se puede expresar como una repetición invertida unida mediante una secuencia polinucleotídica conectora tal como la de un ARNbc presenta una estructura de tallo y bucle.

10 Un vector de expresión de ARNi es normalmente un plásmido de ADN o un vector vírico. Para producir constructos recombinantes para la expresión de un ARNi según se describe en la presente, se puede utilizar un vector de expresión compatible con células eucariotas, p. ej., con células de vertebrados. Los vectores de expresión para células eucariotas son de uso común en la técnica y se pueden adquirir a partir de una serie de proveedores comerciales. Normalmente, tales vectores contienen sitios de restricción convenientes para la inserción del segmento de ácido nucleico deseado. El suministro de vectores de expresión de ARNi puede ser sistémico, por ejemplo, mediante una administración intravenosa o intramuscular, mediante una administración que tenga como diana células explantadas procedentes del paciente seguida de su reintroducción en el paciente, o mediante cualquier otro medio que permita la introducción en una célula diana deseada.

20 Se puede transfectar un plásmido de expresión de ARNi en una célula diana como un complejo con un portador lipídico catiónico (p. ej., Oligofectamina) o un portador basado en un lípido que no sea catiónico (p. ej., Transit-TKOTM). En la invención también se contemplan múltiples transfecciones de lípidos para supresiones mediadas por ARNi que tienen como diana diferentes regiones de un ARN diana durante un periodo de una semana o más. La introducción con éxito de vectores en células huésped se puede monitorizar utilizando varios métodos conocidos. Por ejemplo, la transfección transitoria se puede señalar con un marcador, tal como un marcador fluorescente, tal como la proteína fluorescente verde (GFP, por sus siglas en inglés). La transfección estable de células ex vivo se puede garantizar utilizando marcadores que proporcionen a la célula infectada resistencia a factores medioambientales específicos (p. ej., antibióticos y fármacos), por ejemplo, resistencia a la higromicina B.

30 Los sistemas de vectores víricos que se pueden utilizar con los métodos y las composiciones que se describen en la presente incluyen, sin carácter limitante (a) vectores de adenovirus; (b) vectores de retrovirus, que incluyen, sin carácter limitante, vectores de lentivirus, virus de la leucemia de murinos de Moloney, etc.; (c) vectores de virus adenoasociados; (d) vectores del virus del herpes simple; (e) vectores de SV40; (f) vectores del virus del poliovirus; (g) vectores del virus del papiloma; (h) vectores de picornavirus; (i) vectores del virus de la varicela tal como un orthopox, p. ej., vectores del virus vaccinia o de la varicela aviar, p. ej., la varicela del canario o la varicela de aves de corral; y (j) un adenovirus "gutless" o dependiente de cooperadores. Los virus de replicación deficiente también pueden ser beneficiosos. Los diferentes vectores se incorporarán o no al genoma de las células. Los constructos pueden incluir secuencias víricas para la transfección, cuando proceda. Como alternativa, el constructo se puede incorporar en vectores capaces de llevar a cabo una replicación episomal, p. ej., vectores EPV y EBV. Los constructos para la expresión recombinante de un ARNi generalmente requerirán elementos reguladores, p. ej., promotores, potenciadores, etc., para garantizar la expresión del ARNi en las células diana. A continuación se describen adicionalmente otros aspectos que se deben considerar para los vectores y los constructos.

Los vectores útiles para el suministro de un ARNi incluirán elementos reguladores (un promotor, potenciador, etc.) suficientes para la expresión del ARNi en la célula o el tejido diana deseado. Los elementos reguladores se pueden seleccionar para que proporcionen una expresión constitutiva o regulada/inducible.

45 La expresión del ARNi se puede regular de forma exacta, por ejemplo, utilizando una secuencia reguladora inducible que sea sensible a ciertos reguladores fisiológicos, p. ej., los niveles de glucosa en circulación u hormonas (Docherty et al., 1994, FASEB J. 8:20-24). Tales sistemas de expresión inducible adecuados para el control de la expresión de ARNbc en células o en mamíferos incluyen, por ejemplo, la regulación por parte de ecdisona, por parte de un estrógeno, progesterona, tetraciclina, inductores químicos de dimerización e isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG). Un experto en la técnica sería capaz de seleccionar la secuencia promotora/reguladora adecuada en función del uso deseado del transgén de ARNi.

55 Se pueden utilizar vectores víricos que contengan secuencias de ácido nucleico que codifiquen un ARNi. Por ejemplo, se puede utilizar un vector retrovírico (remítase a Miller et al., Meth. Enzymol. 217:581-599 (1993)). Estos vectores retrovíricos contienen los componentes necesarios para el empaquetamiento correcto del genoma vírico y su integración en el ADN de la célula huésped. Las secuencias de ácido nucleico que codifican un ARNi se clonan en uno o más vectores, lo cual facilita el suministro del ácido nucleico en un paciente. Se pueden consultar más detalles sobre los vectores retrovíricos, por ejemplo, en Boesen et al., Biotherapy 6:291-302 (1994), que describe el uso de un vector retrovírico para suministrar el gen *mdr1* a células madre hematopoyéticas con el fin de hacer que las células madre sean más resistentes a la quimioterapia. Otras referencias que ilustran el uso de vectores retrovíricos en la terapia génica son: Clowes et al., J. Clin. Invest. 93:644-651 (1994); Kiem et al., Blood 83:1467-

1473 (1994); Salmons y Gunzberg, *Human Gene Therapy* 4:129-141 (1993); y Grossman y Wilson, *Curr. Opin. in Genetics and Devel.* 3:110-114 (1993). Los vectores lentivíricos contemplados para ser utilizados incluyen, por ejemplo, los vectores basados en el VIH que se describen en las Patentes de EE. UU. N.os 6.143.520, 5.665.557 y 5.981.276.

5 También se contemplan los adenovirus para su uso en el suministro de ARNi. Los adenovirus son vehículos especialmente atractivos, p. ej., para suministrar genes a epitelios respiratorios. Los adenovirus infectan de forma natural los epitelios respiratorios, donde provocan una enfermedad leve. Otras dianas para los sistemas de suministro basados en adenovirus son el hígado, el sistema nervioso central, las células endoteliales y los músculos. Los adenovirus presentan la ventaja de que son capaces de infectar células que no se dividen. Kozarsky y Wilson, *Current Opinion in Genetics and Development* 3:499-503 (1993) presentan un artículo de revisión de la terapia génica basada en adenovirus. Bout et al., *Human Gene Therapy* 5:3-10 (1994) demostraron el uso de vectores de adenovirus para transferir genes a los epitelios respiratorios de monos rhesus. Se pueden encontrar otros ejemplos del uso de adenovirus en terapia génica en Rosenfeld et al., *Science* 252:431-434 (1991); Rosenfeld et al., *Cell* 68:143-155 (1992); Mastrangeli et al., *J. Clin. Invest.* 91:225-234 (1993); la Publicación de PCT WO94/12649; y Wang et al., *Gene Therapy* 2:775-783 (1995). En Xia H et al. (2002), *Nat. Biotech.* 20: 1006-1010 se describe un vector de AV adecuado para expresar un ARNi que se expone en la invención, un método para construir el vector de AV recombinante y un método para suministrar el vector en células diana.

También se contempla el uso de virus adenoasociados (AAV) (Walsh et al., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 204:289-300 (1993); Pat. de EE. UU. N.o 5.436.146). En una realización, el ARNi se puede expresar como dos moléculas de ARN bicatenarias complementarias separadas a partir de un vector de AAV recombinante que tenga, por ejemplo, promotores de ARN de H1 o U6, o el promotor de citomegalovirus (CMV). Algunos vectores de AAV adecuados para expresar los ARNbc que se exponen en la invención, métodos para construir el vector de AV recombinante y métodos para suministrar los vectores en las células diana se describen en Samulski R et al. (1987), *J. Virol.* 61: 3096-3101; Fisher K J et al. (1996), *J. Virol.* 70: 520-532; Samulski R et al. (1989), *J. Virol.* 63: 3822-3826; Pat. de EE. UU. N.o 5.252.479; Pat. de EE. UU. N.o 5.139.941; Solicitud de Patente Internacional N.o WO 94/13788; y Solicitud de Patente Internacional N.o WO 93/24641.

Otro vector vírico típico es un virus de la varicela tal como un virus vaccinia, por ejemplo, un virus vaccinia atenuado tal como el virus modificado Ankara (MVA) o NYVAC, un virus de la varicela aviar tal como la varicela de aves de corral o la varicela del canario.

30 El tropismo de los vectores víricos se puede modificar mediante el pseudotipado de vectores con proteínas de la envoltura u otros antígenos de superficie procedentes de otros virus, o mediante la sustitución de diferentes proteínas de la cápside vírica, según sea conveniente. Por ejemplo, los vectores lentivíricos pueden ser pseudotipados con proteínas de superficie procedentes de virus de la estomatitis vesicular (VSV), rabias, Ebola, Mokola y similares. Se pueden preparar vectores de AAV que tengan como diana diferentes células modificando genéticamente los vectores para que expresen diferentes serotipos de proteínas de la cápside; remítase, p. ej., a Rabinowitz J E et al. (2002), *J Virol* 76:791-801.

40 El preparado farmacéutico de un vector puede incluir el vector en un diluyente aceptable o puede incluir una matriz de liberación lenta en la cual se encuentre embebido el vehículo de suministro génico. Como alternativa, cuando el vector de suministro génico completo se pueda producir intacto a partir de células recombinantes, p. ej., vectores retrovíricos, el preparado farmacéutico podrá incluir una o más células que produzcan el sistema de suministro génico.

### III. Composiciones farmacéuticas que contienen ARNi

45 En una realización, la invención proporciona composiciones farmacéuticas que contienen un ARNi, según se describe en la presente, y un portador farmacéuticamente aceptable. La composición farmacéutica que contiene el ARNi es útil para tratar una enfermedad o trastorno relacionado con la expresión o la actividad de un gen ALAS1 (p. ej., un trastorno en el que participe la vía de las porfirinas). Tales composiciones farmacéuticas se formulan en función del modo de suministro. Por ejemplo, las composiciones se pueden formular para una administración sistémica mediante un suministro parenteral, p. ej., mediante un suministro intravenoso (IV). Una composición proporcionada en la presente (p. ej., una formulación LNP) se puede formular para un suministro intravenoso. 50 Una composición proporcionada en la presente (p. ej., una composición que comprende un conjugado de tipo GalNAc) se puede formular para un suministro subcutáneo.

Las composiciones farmacéuticas que se exponen en la presente se administran con una dosis suficiente para inhibir la expresión de un gen ALAS1. En general, una dosis adecuada de ARNi estará comprendida en el intervalo de 0.01 a 200.0 miligramos por kilogramo de peso corporal por día, generalmente en el intervalo de 1 a 50 mg por kilogramo de peso corporal por día. Por ejemplo, se pueden administrar 0.05 mg/kg, 0.5 mg/kg, 1 mg/kg, 1.5 mg/kg, 2 mg/kg, 3 mg/kg, 10 mg/kg, 20 mg/kg, 30 mg/kg, 40 mg/kg o 50 mg/kg del ARNbc en cada dosis. La composición farmacéutica se puede administrar una vez al día o el ARNi se puede administrar como dos, tres o más subdosis en intervalos adecuados a lo largo del día o incluso utilizando una infusión continua o un suministro a través de una formulación de liberación controlada. En este caso, la cantidad de ARNi contenida en cada subdosis

debe ser correspondientemente menor con el fin de obtener la dosis diaria total. La unidad de dosificación también se puede componer para que se suministre durante varios días, p. ej., utilizando una formulación de liberación sostenida convencional que proporcione una liberación sostenida del ARNi durante un periodo de varios días. Las formulaciones de liberación sostenida son de uso común en la técnica y son particularmente útiles para suministrar agentes en un sitio particular, tal como se puede utilizar con los agentes de la presente invención. En esta realización, la unidad de dosificación contiene un múltiple correspondiente de la dosis diaria.

El efecto de una única dosis sobre los niveles de ALAS1 puede tener una duración prolongada, de manera que las dosis posteriores se administran en intervalos de no más de 3, 4 o 5 días, o en intervalos de no más de 1, 2, 3 o 4 semanas.

El experto apreciará que ciertos factores pueden ejercer un efecto sobre la dosis y el tiempo requerido para tratar de forma eficaz a un sujeto, que incluyen, sin carácter limitante, la gravedad de la enfermedad o trastorno, los tratamientos previos, la salud general y/o la edad del sujeto, y otras enfermedades presentes. Además, el tratamiento de un sujeto con una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición puede incluir un tratamiento único o una serie de tratamientos. Las estimaciones de las dosis eficaces y las semividas *in vivo* para los ARNi individuales englobados en la invención se pueden realizar utilizando metodologías convencionales o en función de la evaluación *in vivo* utilizando un modelo animal adecuado, según se describe en otras partes de la presente.

Los avances en la genética del ratón han generado una serie de modelos de ratón para el estudio de varias enfermedades humanas tales como los procesos patológicos relacionados con la expresión de ALAS1 (p. ej., procesos patológicos en los que participan las porfirinas o los defectos en la vía de las porfirinas tales como, por ejemplo, las porfirias). Tales modelos se pueden utilizar para la evaluación *in vivo* del ARNi, así como también para determinar una dosis terapéuticamente eficaz y/o una pauta posológica eficaz.

Un modelo de ratón adecuado es, por ejemplo, un ratón que contenga un transgén que exprese ALAS1 humano. Se pueden utilizar ratones que contienen mutaciones activantes (p. ej., mutaciones que se asocian con porfirias hepáticas agudas en humanos) para determinar la dosis terapéuticamente eficaz y/o la duración de la administración del ARNi de ALAS1. La presente invención también incluye composiciones farmacéuticas y formulaciones que incluyen los compuestos de ARNi que se exponen en la invención. Las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden administrar de varias maneras dependiendo de si se desea un tratamiento local o sistémico y en función del área que se ha de tratar. La administración puede ser tópica (p. ej., mediante un parche transdérmico), pulmonar, p. ej., mediante inhalación o insuflación de polvos o aerosoles, que incluyen un nebulizador; intratraqueal, intranasal, epidérmica y transdérmica, oral o parenteral. La administración parenteral incluye la inyección o infusión intravenosa, intraarterial, subcutánea, intraperitoneal o intramuscular; la administración subdérmica, p. ej., mediante un dispositivo implantado; o intracraneal, p. ej., mediante administración intraparenquimal, intratecal o intraventricular.

El ARNi se puede suministrar de modo que tenga como diana un tejido particular tal como un tejido que produzca eritrocitos. Por ejemplo, el ARNi se puede suministrar a la médula ósea, el hígado (p. ej., los hepatocitos del hígado), los nódulos linfáticos, el bazo, los pulmones (p. ej., la pleura de los pulmones) o la columna vertebral. En una realización, el ARNi se suministra a la médula ósea.

Las composiciones farmacéuticas y las formulaciones para la administración tópica pueden incluir parches transdérmicos, ungüentos, lociones, cremas, geles, gotas, supositorios, aerosoles, líquidos y polvos. Pueden resultar necesarios o deseables portadores farmacéuticos convencionales, bases oleosas, acuosas o en polvo, espesantes y similares. También pueden resultar útiles condones recubiertos, guantes y similares. Las formulaciones tópicas adecuadas incluyen aquellas en las que los ARNi que se exponen en la invención se encuentran en una mezcla con un agente de suministro tópico tal como lípidos, liposomas, ácidos grasos, ésteres de ácidos grasos, esteroides, agentes quelantes y surfactantes. Los lípidos y liposomas adecuados incluyen los que son neutros (p. ej., dioleoilfosfatidiletanolamina DOPE, dimiristoilfosfatidilcolina DMPC, diesteoilfosfatidilcolina) negativos (p. ej., dimiristoilfosfatidilglicerol DMPG) y catiónicos (p. ej., dioleoiltetrametilaminopropilo DOTAP y dioleoilfosfatidiletanolamina DOTMA). Los ARNi que se exponen en la invención se pueden enapsular dentro de liposomas o pueden formar complejos con ellos, en particular con liposomas catiónicos. Como alternativa, los ARNi pueden formar complejos con lípidos, en particular con lípidos catiónicos. Los ácidos grasos y ésteres adecuados incluyen, sin carácter limitante, ácido araquidónico, ácido oleico, ácido eicosanoico, ácido láurico, ácido caprílico, ácido cáprico, ácido mirístico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido linoleico, ácido linolénico, dicaprato, tricaprato, monooleína, dilaurina, 1-monocaprato de glicerilo, 1-dodecilazacicloheptan-2-ona, una acilcarnitina, una acilcolina o un éster de alquilo C1-20 (p. ej., isopropilmiristato IPM), monoglicérido, diglicérido o una sal farmacéuticamente aceptable de estos. Las formulaciones tópicas se describen con detalle en la Patente de EE. UU. N.º 6.747.014.

#### 55 Formulaciones de liposomas

Existen muchas estructuras de surfactantes organizadas, además de las microemulsiones, que han sido estudiadas y utilizadas para la formulación de fármacos. Estas incluyen monocapas, micelas, bicapas y vesículas. Las vesículas, tales como los liposomas, han despertado mucho interés debido a su especificidad y duración de la acción que ofrecen desde el punto de vista del suministro farmacológico. El término "liposoma", tal como se utiliza en

la presente invención, se refiere a una vesícula compuesta por lípidos anfífilos dispuestos en una bicapa o bicapas esféricas.

5 Los liposomas son vesículas unilamelares o multilamelares que contienen una membrana formada de un material lipófilo y un interior acuoso. La porción acuosa contiene la composición que se ha de suministrar. Los liposomas catiónicos poseen la ventaja de que son capaces de fusionarse con la pared celular. Los liposomas no catiónicos, aunque no son capaces de fusionarse tan eficazmente con la pared celular, son captados por los macrófagos *in vivo*.

10 Con el fin de atravesar la piel de los mamíferos y mantenerse intactas, las vesículas lipídicas deben pasar a través de una serie de poros finos, cada uno de ellos con un diámetro inferior a 50 nm, bajo la influencia de un gradiente transdérmico adecuado. Por consiguiente, es deseable utilizar un liposoma que se pueda deformar en gran medida y que sea capaz de pasar a través de estos poros finos.

15 Otras ventajas de los liposomas incluyen: los liposomas obtenidos a partir de fosfolípidos naturales son biocompatibles y biodegradables; los liposomas pueden incorporar una amplia gama de fármacos solubles en agua y lípidos; los liposomas pueden proteger fármacos encapsulados en sus compartimentos internos frente al metabolismo y la degradación (Rosoff, en *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger y Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y., volumen 1, pág. 245). Algunas consideraciones importantes en la preparación de formulaciones de liposomas son la carga superficial del lípido, el tamaño de la vesícula y el volumen acuoso de los liposomas.

20 Los liposomas son útiles para transferir y suministrar principios activos al sitio de acción. Debido a que la membrana de los liposomas es estructuralmente similar a las membranas biológicas, cuando los liposomas se aplican a un tejido, los liposomas se empiezan a fusionar con las membranas celulares y, a medida que la fusión de los liposomas y la célula avanza, los contenidos de los liposomas se vierten en la célula, donde el agente activo puede actuar.

25 Las formulaciones de liposomas han sido el centro de investigaciones exhaustivas como el modo de suministro para muchos fármacos. Cada vez existen más evidencias de que, para la administración tópica, los liposomas presentan varias ventajas en comparación con otras formulaciones. Tales ventajas incluyen una reducción de los efectos laterales relacionados con una absorción sistémica elevada del fármaco administrado, un incremento de la acumulación del fármaco administrado en la diana deseada y la capacidad de administrar una amplia variedad de fármacos, tanto hidrófilos como hidrófobos, en la piel.

30 Varios informes han detallado la capacidad de los liposomas para suministrar agentes, incluido el ADN de peso molecular elevado, en la piel. Se han administrado a la piel compuestos que incluyen analgésicos, anticuerpos, hormonas y ADN de peso molecular elevado. La mayoría de aplicaciones actuaron sobre la epidermis superior.

35 Los liposomas se clasifican en dos grandes clases. Los liposomas catiónicos son liposomas de carga positiva que interactúan con las moléculas de ADN de carga negativa para formar un complejo estable. El complejo de ADN/liposoma de carga positiva se une a la superficie celular de carga negativa y se interioriza en un endosoma. Debido al pH ácido del interior del endosoma, los liposomas se fracturan y liberan sus contenidos en el interior del citoplasma celular (Wang et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1987, 147, 980-985).

40 Los liposomas que son sensibles al pH o de carga negativa, atrapan el ADN en lugar de complejarse con él. Debido a que tanto el ADN como el lípido tienen una carga similar, se produce una repulsión en lugar de la formación de un complejo. A pesar de ello, parte del ADN queda atrapado en el interior acuoso de estos liposomas. Los liposomas sensibles al pH han sido utilizados para suministrar ADN que codifica el gen de la timidina-cinasa a monocapas celulares en cultivo. Se detectó la expresión del gen exógeno en las células diana (Zhou et al., *Journal of Controlled Release*, 1992, 19, 269-274).

45 Un tipo principal de composición de liposomas incluye fosfolípidos distintos de la fosfatidilcolina de origen natural. Las composiciones de liposomas neutros se pueden formar, por ejemplo, a partir de dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC) o dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC). Las composiciones de liposomas aniónicos se forman en general a partir de dimiristoilfosfatidilglicerol, mientras que los liposomas fusogénicos aniónicos se forman principalmente a partir de dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE). Otro tipo de composición de liposomas se forma a partir de fosfatidilcolina (PC) tal como, por ejemplo, PC de soja y PC de huevo. Otro tipo se forma a partir de mezclas de un fosfolípido y/o fosfatidilcolina y/o colesterol.

50 Varios estudios han evaluado el suministro tópico de formulaciones farmacológicas de liposomas en la piel. La aplicación de liposomas que contenían interferón a la piel de conejillos de Indias dio como resultado una reducción de úlceras de herpes en la piel, mientras que el suministro de interferón por otros medios (p. ej., como una solución o como una emulsión) no fue eficaz (Weiner et al., *Journal of Drug Targeting*, 1992, 2, 405-410). Además, un estudio adicional evaluó la eficacia del interferón administrado como parte de una formulación de liposomas en comparación con la administración del interferón utilizando un sistema acuoso, y llegó a la conclusión de que la formulación de liposomas era mejor que la administración acuosa (du Plessis et al., *Antiviral Research*, 1992, 18, 259-265).

También se han examinado sistemas de liposomas no iónicos para determinar su utilidad en el suministro de fármacos a la piel, en particular sistemas que comprenden un surfactante no iónico y colesterol. Se utilizaron formulaciones de liposomas no iónicos que comprendían Novasome™ I (dilaurato de glicerilo/colesterol/éter polioxietileno-10-estearílico) y Novasome™ II (diestearato de glicerilo/colesterol/éter polioxietileno-10-estearílico) para suministrar ciclosporina A en la dermis de piel de ratón. Los resultados indicaron que tales sistemas de liposomas no iónicos eran eficaces a la hora de facilitar la deposición de la ciclosporina A en diferentes capas de la piel (Hu et al. S.T.P.Pharma. Sci., 1994, 4, 6, 466).

Los liposomas también incluyen liposomas "estabilizados estéricamente", un término que, tal como se utiliza en la presente, se refiere a liposomas que comprenden uno o más lípidos especializados que, cuando se incorporan en los liposomas, proporcionan unos tiempos de vida en circulación mejorados en comparación con los liposomas que carecen de tales lípidos especializados. Los ejemplos de liposomas estabilizados estéricamente son aquellos en los que parte de la porción lipídica del liposoma que forma las vesículas (A) comprende uno o más glicolípidos, tales como el monosialogangliósido GM1, o (B) se derivatiza con uno o más polímeros hidrófilos, tales como un resto de polietilenglicol (PEG). Sin pretender vincularse a ninguna teoría particular, se cree en la técnica que, al menos para los liposomas estabilizados estéricamente que contienen gangliósidos, esfingomielina o lípidos derivatizados con PEG, la semivida en circulación mejorada de estos liposomas estabilizados estéricamente procede de una reducción de la captación en células del sistema reticuloendotelial (RES) (Allen et al., FEBS Letters, 1987, 223, 42; Wu et al., Cancer Research, 1993, 53, 3765).

En la técnica se conocen varios liposomas que comprenden uno o más glicolípidos. Papahadjopoulos et al. (Ann. N.Y. Acad. Sci., 1987, 507, 64) han descrito la capacidad del monosialogangliósido GM1, el sulfato de galactocerebrósido y el fosfatidilinositol para mejorar las semividas en sangre de los liposomas. Estos resultados fueron corroborados por Gabizon et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1988, 85, 6949). La Pat. de EE. UU. N.o 4.837.028 y WO 88/04924, ambas de Allen et al., describen liposomas que comprenden (1) esfingomielina y (2) el gangliósido GM1 o un éster de tipo sulfato de un galactocerebrósido. La Pat. de EE. UU. N.o 5.543.152 (Webb et al.) describe liposomas que comprenden esfingomielina. En WO 97/13499 (Lim et al.) se describen liposomas que comprenden 1,2-sn-dimiristoilfosfatidilcolina.

En la técnica se han descrito muchos liposomas que comprenden lípidos derivatizados con uno o más polímeros hidrófilos y métodos para prepararlos. Sunamoto et al. (Bull. Chem. Soc. Jpn., 1980, 53, 2778) han descrito liposomas que comprenden un detergente no iónico, 2C1215G, que contiene un resto de PEG. Illum et al. (FEBS Lett., 1984, 167, 79) descubrieron que un recubrimiento hidrófilo de partículas de poliestireno con glicoles poliméricos proporcionaba unas semividas en sangre significativamente mejoradas. Sears (Pat. de EE. UU. N.os 4.426.330 y 4.534.899) ha descrito fosfolípidos sintéticos modificados mediante la unión de grupos carboxílicos de polialquilenglicoles (p. ej., PEG). Klibanov et al. (FEBS Lett., 1990, 268, 235) han descrito experimentos que demuestran que los liposomas que comprenden fosfatidiletanolamina (PE) derivada con PEG o estearato de PEG presentan incrementos significativos de las semividas en circulación en sangre. Blume et al. (Biochimica et Biophysica Acta, 1990, 1029, 91) extendieron estas observaciones a otros fosfolípidos derivatizados con PEG, p. ej., DSPE-PEG, formados a partir de la combinación de diestearoilfosfatidiletanolamina (DSPE) y PEG. Se han descrito liposomas que tienen restos de PEG unidos covalentemente en su superficie externa en la Patente Europea N.o EP 0 445 131 B1 y en WO 90/04384 de Fisher. Woodle et al. (Pat. de EE. UU. N.os 5.013.556 y 5.356.633) y Martin et al. (Pat. de EE. UU. N.o 5.213.804 y Patente Europea N.o EP 0 496 813 B1) han descrito composiciones de liposomas que contienen un porcentaje molar de 1-20 de PE derivatizado con PEG y métodos para utilizarlas. En WO 91/05545 y la Pat. de EE. UU. N.o 5.225.212 (ambas de Martin et al.) y en WO 94/20073 (Zalipsky et al.) se describen liposomas que comprenden una serie de conjugados de lípido-polímero diferentes. En WO 96/10391 (Choi et al.) se describen liposomas que comprenden lípidos de ceramida modificados con PEG. La Pat. de EE. UU. N.o 5.540.935 (Miyazaki et al.) y la Pat. de EE. UU. N.o 5.556.948 (Tagawa et al.) describen liposomas que contienen PEG y que se pueden derivatizar adicionalmente con restos funcionales en sus superficies.

En la técnica se conocen varios liposomas que comprenden ácidos nucleicos. El documento WO 96/40062 de Thierry et al. describe métodos para encapsular ácidos nucleicos de peso molecular elevado en liposomas. La Pat. de EE. UU. N.o 5.264.221 de Tagawa et al. describe liposomas unidos a proteínas y afirma que los contenidos de tales liposomas pueden incluir un ARNbc. La Pat. de EE. UU. N.o 5.665.710 de Rahman et al. describe ciertos métodos para encapsular oligodesoxinucleótidos en liposomas. El documento WO 97/04787 de Love et al. describe liposomas que comprenden ARNbc que tienen como diana el gen raf.

Los transfersomas son otro tipo más de liposomas y son agregados lipídicos que se pueden deformar en gran medida, los cuales son candidatos atractivos para ser utilizados como vehículos de suministro farmacológico. Los transfersomas se pueden describir como gotículas lipídicas que se pueden deformar tanto que son capaces de penetrar fácilmente a través de poros que sean más pequeños que la gotícula. Los transfersomas se pueden adaptar al entorno en el cual se utilizan, p. ej., se pueden autooptimizar (se pueden adaptar a la forma de los poros en la piel), se pueden autoreparar, frecuentemente llegan a sus dianas sin sufrir fragmentación y a menudo se pueden autocargar. Para preparar transfersomas, es posible añadir activadores de los bordes superficiales, normalmente surfactantes, a la composición de liposomas estándar. Los transfersomas han sido utilizados para

suministrar albúmina de suero a la piel. Se ha demostrado que el suministro mediado por transferrinas de la albúmina de suero es tan eficaz como la inyección subcutánea de una solución que contenga albúmina de suero.

Los surfactantes se aplican de forma generalizada en formulaciones tales como emulsiones (incluidas las microemulsiones) y liposomas. La manera más común de clasificar y puntuar las propiedades de los numerosos tipos diferentes de surfactantes, tanto naturales como sintéticos, es mediante el uso del equilibrio hidrófilo/lipófilo (HLB, por sus siglas en inglés). La naturaleza del grupo hidrófilo (que también se conoce como la "cabeza") proporciona el medio más útil para clasificar los diferentes surfactantes utilizados en las formulaciones (Rieger, en *Pharmaceutical Dosage Forms*, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y., 1988, pág. 285).

Si la molécula de surfactante no está ionizada, se clasifica como un surfactante no iónico. Los surfactantes no iónicos se aplican de forma generalizada en productos cosméticos y farmacéuticos, y se pueden utilizar en un amplio intervalo de valores de pH. En general, sus valores de HLB están comprendidos entre 2 y aproximadamente 18, dependiendo de su estructura. Los surfactantes no iónicos incluyen ésteres no iónicos tales como ésteres de etilenglicol, ésteres de propilenglicol, ésteres de glicerilo, ésteres de poliglicerilo, ésteres de sorbitán, ésteres de sacarosa y ésteres etoxilados. Las alcanolamidas y los éteres no iónicos, tales como los alcoholes grasos etoxilados, alcoholes propoxilados, polímeros en bloque etoxilados/propoxilados, también se incluyen en esta clase. Los surfactantes de polioxietileno son los miembros más populares de la clase de surfactantes no iónicos.

Si la molécula de surfactante tiene una carga negativa cuando se disuelve o dispersa en agua, el surfactante se clasifica como aniónico. Los surfactantes aniónicos incluyen carboxilatos tales como jabones, acilacetatos, amidas acílicas de aminoácidos, ésteres del ácido sulfúrico tales como alquilsulfatos y alquilsulfatos etoxilados, sulfonatos tales como alquilbencenosulfonatos, acilisotionatos, acilauratos y sulfosuccinatos, y fosfatos. Los miembros más importantes de la clase de surfactantes aniónicos son los alquilsulfatos y los jabones.

Si la molécula de surfactante tiene una carga positiva cuando se disuelve o dispersa en agua, el surfactante se clasifica como catiónico. Los surfactantes catiónicos incluyen sales de amonio cuaternario y aminas etoxiladas. Las sales de amonio cuaternario son los miembros más utilizados de esta clase.

Si la molécula de surfactante tiene la capacidad de tener tanto una carga positiva como negativa, el surfactante se clasifica como anfótero. Los surfactantes anfóteros incluyen derivados del ácido acrílico, alquilamidas sustituidas, N-alquilbetaínas y fosfátidos.

El uso de surfactantes en productos farmacológicos, formulaciones y en emulsiones ha sido objeto de artículos de revisión (Rieger, en *Pharmaceutical Dosage Forms*, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y., 1988, pág. 285).

### Partículas de ácido nucleico-lípido

Un ARNbc de ALAS1 puede estar totalmente encapsulado en la formulación lipídica, p. ej., para formar una partícula de SPLP, pSPLP, SNALP u otra partícula de ácido nucleico-lípido. El término "SNALP", tal como se utiliza en la presente, se refiere a una partícula de ácido nucleico-lípido estable, incluida una SPLP. El término "SPLP", tal como se utiliza en la presente, se refiere a una partícula de ácido nucleico-lípido que comprende ADN plasmídico encapsulado dentro de una vesícula lipídica. Las SNALP y SPLP contienen normalmente un lípido catiónico, un lípido no catiónico y un lípido que evita la agregación de la partícula (p. ej., un conjugado de PEG- lípido). Las SNALP y SPLP son extremadamente útiles para las aplicaciones sistémicas, ya que exhiben unos tiempos de vida en circulación extendidos tras su inyección intravenosa (i.v.) y se acumulan en sitios alejados (p. ej., sitios separados físicamente del sitio de administración). Las SPLP incluyen "pSPLP", las cuales incluyen un complejo de ácido nucleico-agente de condensación encapsulado, según se expone en la Publicación de PCT N.º WO 00/03683. Las partículas de la presente invención tienen normalmente un diámetro medio comprendido entre aproximadamente 50 nm y aproximadamente 150 nm, más habitualmente entre aproximadamente 60 nm y aproximadamente 130 nm, más habitualmente entre aproximadamente 70 nm y aproximadamente 110 nm, de la forma más habitual entre aproximadamente 70 nm y aproximadamente 90 nm y son sustancialmente atóxicas. Además, los ácidos nucleicos, cuando están presentes en las partículas de ácido nucleico-lípido de la presente invención, son resistentes en solución acuosa a la degradación por parte de una nucleasa. Las partículas de ácido nucleico-lípido y su método de preparación se describen, p. ej., en las Patentes de EE. UU. N.ºs 5.976.567, 5.981.501, 6.534.484, 6.586.410, 6.815.432 y la Publicación de PCT N.º WO 96/40964.

La proporción de lípido frente a fármaco (proporción de masa/masa) (p. ej., proporción de lípido frente a ARNbc) puede estar comprendida en el intervalo de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 50:1, de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 25:1, de aproximadamente 3:1 a aproximadamente 15:1, de aproximadamente 4:1 a aproximadamente 10:1, de aproximadamente 5:1 a aproximadamente 9:1 o de aproximadamente 6:1 a aproximadamente 9:1.

El lípido catiónico puede ser, por ejemplo, cloruro de N,N-dioleil-N,N-dimetilamonio (DODAC), bromuro de N,N-diestearil-N,N-dimetilamonio (DDAB), cloruro de N-(1-(2,3-dioleiloil)propil)-N,N,N-trimetilamonio (DOTAP), cloruro de N-(1-(2,3-dioleiloil)propil)-N,N,N-trimetilamonio (DOTMA), N,N-dimetil-2,3-dioleiloilpropilamina (DODMA), 1,2-dilinoiloxi-N,N-dimetilaminopropano (DLinDMA), 1,2-dilinoiloxi-N,N-dimetilaminopropano (DLenDMA), 1,2-

dilinoleilcarbamoiloxi-3-dimetilaminopropano (DLin-C-DAP), 1,2-dilinoleioxi-3-(dimetilamino)acetoxipropano (DLin-DAC), 1,2-dilinoleioxi-3-morfolinopropano (DLin-MA), 1,2-dilinoleoil-3-dimetilaminopropano (DLinDAP), 1,2-dilinoleiltio-3-dimetilaminopropano (DLin-S-DMA), 1-linoleoil-2-linoleiloxi-3-dimetilaminopropano (DLin-2-DMAP), sal de tipo cloruro de 1,2-dilinoleiloxi-3-trimetilaminopropano (DLin-TMA.Cl), sal de tipo cloruro de 1,2-dilinoleoil-3-trimetilaminopropano (DLin-TAP.Cl), 1,2-dilinoleiloxi-3-(N-metilpiperazino)propano (DLin-MPZ) o 3-(N,N-dilinoleilamino)-1,2-propanodiol (DLinAP), 3-(N,N-dioleilamino)-1,2-propanodiol (DOAP), 1,2-dilinoleiloxo-3-(2-N,N-dimetilamino)etoxipropano (DLin-EG-DMA), 1,2-dilineniloxi-N,N-dimetilaminopropano (DLinDMA), 2,2-dilinoleil-4-dimetilaminometil-[1,3]-dioxolano (DLin-K-DMA) o análogos de este, (3aR,5S,6aS)-N,N-dimetil-2,2-di((9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienil)tetrahidro-3aH-ciclopenta[d][1,3]dioxol-5-amina (ALN100), 4-(dimetilamino)butanoato de (6Z,9Z,28Z,31Z)-heptatriaconta-6,9,28,31-tetraen-19-ilo (MC3), 1,1'-(2-(4-(2-((2-(bis(2-hidroxidodecil)amino)etil)(2-hidroxidodecil)amino)etil)piperazin-1-il)etilazanodil)didodecan-2-ol (Tech G1) o una mezcla de estos. El lípido catiónico puede comprender de aproximadamente un 20% mol a aproximadamente un 50% mol o aproximadamente un 40% mol del lípido total presente en la partícula.

Se puede utilizar el compuesto 2,2-dilinoleil-4-dimetilaminoetil-[1,3]-dioxolano para preparar nanopartículas de lípido-ARNip. La síntesis de 2,2-dilinoleil-4-dimetilaminoetil-[1,3]-dioxolano se describe en la solicitud de patente provisional de los Estados Unidos número 61/107.998, presentada el 23 de octubre de 2008.

La partícula de lípido-ARNip puede incluir un 40% de 2,2-dilinoleil-4-dimetilaminoetil-[1,3]-dioxolano: 10% de DSPC: 40% de colesterol: 10% de PEG-C-DOMG (porcentaje molar) con un tamaño de partícula de  $63.0 \pm 20$  nm y una proporción de ARNip/lípido de 0.027.

El lípido no catiónico puede ser un lípido aniónico o un lípido neutro, que incluye, sin carácter limitante, diestearoilfosfatidilcolina (DSPC), dioleoilfosfatidilcolina (DOPC), dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), dioleoilfosfatidilglicerol (DOPG), dipalmitoilfosfatidilglicerol (DPPG), dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE), palmitoiloleoilfosfatidilcolina (POPC), palmitoiloleoilfosfatidiletanolamina (POPE), 4-(N-maleimidometil)ciclohexan-il-carboxilato de dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE-mal), dipalmitoilfosfatidiletanolamina (DPPE), dimiristoilfosfoetanolamina (DMPE), diestearoilfosfatidiletanolamina (DSPE), 16-O-monometil-PE, 16-O-dimetil-PE, 18-1-trans-PE, 1-estearoil-2-oleoilfosfatidiletanolamina (SOPE), colesterol o una mezcla de estos. El lípido no catiónico puede constituir de aproximadamente un 5% mol a aproximadamente un 90% mol, aproximadamente un 10% mol o aproximadamente un 58% mol si se incluye colesterol, del lípido total presente en la partícula.

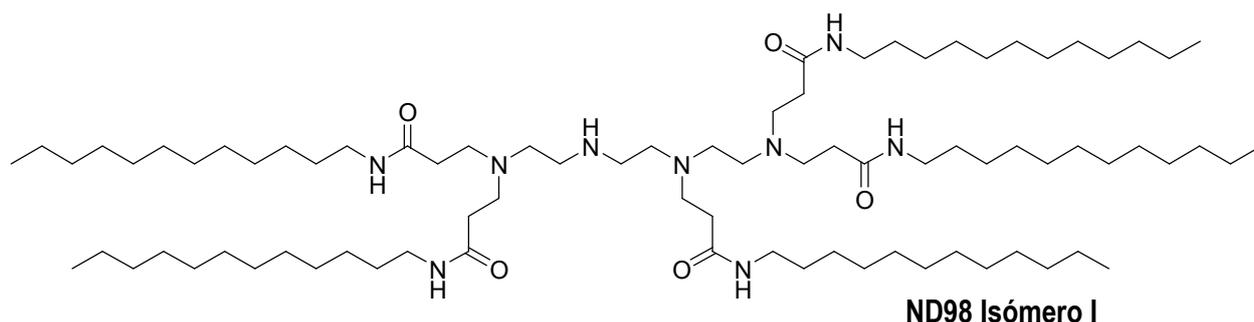
El conjugado de lípido que inhibe la agregación de partículas puede ser, por ejemplo, un polietilenglicol (PEG)-lípido, que incluye, sin carácter limitante, un PEG-diacilglicerol (DAG), un PEG-dialquiloilpropilo (DAA), un PEG-fosfolípido, un PEG-ceramida (Cer) o una mezcla de estos. El conjugado de PEG-DAA puede ser, por ejemplo, un PEG-dilauriloilpropilo (Ci2), un PEG-dimiristiloilpropilo (Ci4), un PEG-dipalmitiloilpropilo (Ci6) o un PEG-diesteariloilpropilo (Cj8). El lípido conjugado que evita la agregación de partículas puede constituir desde un 0% mol hasta aproximadamente un 20% mol o aproximadamente un 2% mol del lípido total presente en la partícula.

La partícula de ácido nucleico-lípido puede incluir además colesterol con una concentración comprendida, p. ej., entre aproximadamente un 10% mol y aproximadamente un 60% mol o de aproximadamente un 48% mol del lípido total presente en la partícula.

El ARNi se puede formular en una nanopartícula lipídica (LNP).

LNP01

En una realización, se pueden utilizar el lipidoide ND98-4HCl (PM 1487) (remítase a la Solicitud de Patente de EE. UU. N.o 12/056.230, presentada el 26/3/2008), colesterol (Sigma-Aldrich) y PEG-ceramida C16 (Avanti Polar Lipids) para preparar nanopartículas de lípido-ARNbc (p. ej., partículas LNP01). Se pueden preparar soluciones patrón de cada uno de ellos en etanol como se indica a continuación: ND98, 133 mg/mL; colesterol, 25 mg/mL, PEG-ceramida C16, 100 mg/mL. A continuación, las soluciones patrón de ND98, colesterol y PEG-ceramida C16 se pueden combinar en una relación molar de, p. ej., 42:48:10. La solución lipídica combinada se puede mezclar con ARNbc acuoso (p. ej., en acetato de sodio de pH 5) de manera que la concentración final de etanol sea de aproximadamente un 35-45% y la concentración final de acetato de sodio sea de aproximadamente 100-300 mM. Normalmente, las nanopartículas de lípido-ARNbc se forman espontáneamente cuando se produce la mezcla. Dependiendo de la distribución de tamaños de partícula deseada, la mezcla de nanopartículas resultante se puede extraer a través de una membrana de policarbonato (p. ej., con un punto de corte de 100 nm) utilizando, por ejemplo, una extrusora de tambor térmico tal como la extrusora Lipex (Northern Lipids, Inc). En algunos casos, se puede omitir el paso de extrusión. Se puede conseguir eliminar el etanol e intercambiar el tampón de forma simultánea mediante, por ejemplo, diálisis o filtración de flujo tangencial. El tampón se puede intercambiar, por ejemplo, con una solución salina tamponada con fosfato (PBS) a un pH de aproximadamente 7, p. ej., un pH de aproximadamente 6.9, un pH de aproximadamente 7.0, un pH de aproximadamente 7.1, un pH de aproximadamente 7.2, un pH de aproximadamente 7.3 o un pH de aproximadamente 7.4.



Fórmula 1

Las formulaciones de LNP01 se describen, p. ej., en la Publicación de Solicitud Internacional N.o WO 2008/042973.

En la tabla a continuación se proporcionan formulaciones de lípido-ARNbc ilustrativas adicionales.

5 Tabla 10: formulaciones lipídicas ilustrativas

	<b>Lípido catiónico</b>	<b>Conjugado de lípido catiónico/lípido no catiónico/colesterol/PEG-lípido</b> <b>Proporción de lípido:ARNip</b>
SNAL P	1,2-Dilinoilenoil- <i>N,N</i> -dimetilaminopropano (DLinDMA)	DLinDMA/DPPC/Colesterol/PEG-cDMA (57.1/7.1/34.4/1.4) lípido:ARNip ~ 7:1
S-XTC	2,2-Dilinoil-4-dimetilaminoetil-[1,3]-dioxolano (XTC)	XTC/DPPC/Colesterol/PEG-cDMA 57.1/7.1/34.4/1.4 lípido:ARNip ~ 7:1
LNP0 5	2,2-Dilinoil-4-dimetilaminoetil-[1,3]-dioxolano (XTC)	XTC/DSPC/Colesterol/PEG-DMG 57.5/7.5/31.5/3.5 lípido:ARNip ~ 6:1
LNP0 6	2,2-Dilinoil-4-dimetilaminoetil-[1,3]-dioxolano (XTC)	XTC/DSPC/Colesterol/PEG-DMG 57.5/7.5/31.5/3.5 lípido:ARNip ~ 11:1
LNP0 7	2,2-Dilinoil-4-dimetilaminoetil-[1,3]-dioxolano (XTC)	XTC/DSPC/Colesterol/PEG-DMG 60/7.5/31/1.5 lípido:ARNip ~ 6:1
LNP0 8	2,2-Dilinoil-4-dimetilaminoetil-[1,3]-dioxolano (XTC)	XTC/DSPC/Colesterol/PEG-DMG 60/7.5/31/1.5 lípido:ARNip ~ 11:1
LNP0 9	2,2-Dilinoil-4-dimetilaminoetil-[1,3]-dioxolano (XTC)	XTC/DSPC/Colesterol/PEG-DMG 50/10/38.5/1.5 lípido:ARNip 10:1
LNP1 0	(3 <i>aR</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>aS</i> )- <i>N,N</i> -dimetil-2,2-di((9 <i>Z</i> ,12 <i>Z</i> )-octadeca-9,12-dienil)tetrahidro-3 <i>aH</i> -ciclopenta[ <i>d</i> ][1,3]dioxol-5-amina (ALN100)	ALN100/DSPC/Colesterol/PEG-DMG 50/10/38.5/1.5 lípido:ARNip 10:1
LNP1 1	4-(Dimetilamino)butanoato de (6 <i>Z</i> ,9 <i>Z</i> ,28 <i>Z</i> ,31 <i>Z</i> )-heptatriaconta-6,9,28,31-tetraen-19-ilo (MC3)	MC-3/DSPC/Colesterol/PEG-DMG 50/10/38.5/1.5 lípido:ARNip 10:1
LNP1 2	1,1'-(2-(4-(2-((2-(bis(2-hidroxidodecil)amino)etil)(2-hidroxidodecil)amino)etil)piperazin-1-il)etilazanodil)didodecan-2-ol (C12-200)	C12-200/DSPC/Colesterol/PEG-DMG 50/10/38.5/1.5 lípido:ARNip 10:1

LNP1 3	XTC	XTC/DSPC/Col/PEG-DMG 50/10/38.5/1.5 lípidos:ARNip 33:1
LNP1 4	MC3	MC3/DSPC/Col/PEG-DMG 40/15/40/5 lípidos:ARNip 11:1
LNP1 5	MC3	MC3/DSPC/Col/PEG-DSG/GalNAc- PEG-DSG 50/10/35/4.5/0.5 lípidos:ARNip 11:1
LNP1 6	MC3	MC3/DSPC/Col/PEG-DMG 50/10/38.5/1.5 lípidos:ARNip 7:1
LNP1 7	MC3	MC3/DSPC/Col/PEG-DSG 50/10/38.5/1.5 lípidos:ARNip 10:1
LNP1 8	MC3	MC3/DSPC/Col/PEG-DMG 50/10/38.5/1.5 lípidos:ARNip 12:1
LNP1 9	MC3	MC3/DSPC/Col/PEG-DMG 50/10/35/5 lípidos:ARNip 8:1
LNP2 0	MC3	MC3/DSPC/Col/PEG-DPG 50/10/38.5/1.5 lípidos:ARNip 10:1
LNP2 1	C12-200	C12-200/DSPC/Col/PEG-DSG 50/10/38.5/1.5 lípidos:ARNip 7:1
LNP2 2	XTC	XTC/DSPC/Col/PEG-DSG 50/10/38.5/1.5 lípidos:ARNip 10:1

DSPC: diesteoilfosfatidilcolina

DPPC: dipalmitoilfosfatidilcolina

PEG-DMG: PEG-didimistioilglicerol (C14-PEG o PEG-C14) (PEG con un peso molecular medio de 2000)

PEG-DSG: PEG-diestirilglicerol (C18-PEG o PEG-C18) (PEG con un peso molecular medio de 2000)

5 PEG-cDMA: PEG-carbamoil-1,2-dimistiloxipropilamina (PEG con un peso molecular medio de 2000)

Se describen formulaciones que comprenden SNALP (1,2-dilinoileniloxi-N,N-dimetilaminopropano (DLinDMA)) en la Publicación Internacional N.o WO2009/127060, presentada el 15 de abril de 2009.

10 Se describen formulaciones que comprenden XTC, p. ej., en el N.o de serie Provisional de EE. UU. 61/148.366, presentado el 29 de enero de 2009; el N.o de serie Provisional de EE. UU. 61/156.851, presentado el 2 de marzo de 2009; el N.o de serie Provisional de EE. UU. presentado el 10 de junio de 2009; el N.o de serie Provisional de EE. UU. 61/228.373, presentado el 24 de julio de 2009; el N.o de serie Provisional de EE. UU. 61/239.686, presentado el 3 de septiembre de 2009, y la Solicitud Internacional N.o PCT/US2010/022614, presentada el 29 de enero de 2010.

15 Se describen formulaciones que comprenden MC3, p. ej., en el N.o de serie Provisional de EE. UU. 61/244.834, presentado el 22 de septiembre de 2009, el N.o de serie Provisional de EE. UU. 61/185.800, presentado el 10 de junio de 2009, y la Solicitud Internacional N.o PCT/US10/28224, presentada el 10 de junio de 2010.

Se describen formulaciones que comprenden ALNY-100, p. ej., en la Solicitud de Patente Internacional número PCT/US09/63933, presentada el 10 de noviembre de 2009.

Se describen formulaciones que comprenden C12-200, p. ej., en el N.o de serie Provisional de EE. UU. 61/175.770, presentado el 5 de mayo de 2009, y la Solicitud Internacional N.o PCT/US10/33777, presentada el 5 de mayo de 2010.

### **Síntesis de lípidos catiónicos**

5 Cualquiera de los compuestos, p. ej., lípidos catiónicos y similares, utilizados en las partículas de ácido nucleico-lípido que se exponen en la invención se pueden preparar mediante técnicas conocidas de síntesis orgánica, que incluyen los métodos que se describen con más detalle en los Ejemplos. Todos los sustituyentes son como se definen a continuación, a menos que se indique de otro modo.

10 El término "alquilo" se refiere a un hidrocarburo alifático saturado, cíclico o no cíclico, de cadena lineal o ramificada, que contiene de 1 a 24 átomos de carbono. Los alquilos saturados de cadena lineal representativos incluyen metilo, etilo, n-propilo, n-butilo, n-pentilo, n-hexilo y similares; mientras que los alquilos saturados ramificados incluyen isopropilo, sec-butilo, isobutilo, tert-butilo, isopentilo y similares. Los alquilos cíclicos saturados representativos incluyen ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo y similares; mientras que los alquilos cíclicos no saturados incluyen ciclopentenilo y ciclohexenilo, y similares.

15 El término "alqueno" se refiere a un alquilo, como se ha definido anteriormente, que contiene al menos un doble enlace entre átomos de carbono adyacentes. Los alquenos incluyen los isómeros tanto cis como trans. Los alquenos de cadena lineal y ramificada representativos incluyen etilenilo, propilenilo, 1-butenilo, 2-butenilo, isobutilenilo, 1-pentenilo, 2-pentenilo, 3-metil-1-butenilo, 2-metil-2-butenilo, 2,3-dimetil-2-butenilo y similares.

20 El término "alquino" se refiere a cualquier alquilo o alqueno, como se han definido anteriormente, que contiene adicionalmente al menos un triple enlace entre átomos de carbono adyacentes. Los alquinos de cadena lineal y ramificada representativos incluyen acetilenilo, propinilo, 1-butinilo, 2-butinilo, 1-pentinilo, 2-pentinilo, 3-metil-1 butinilo y similares.

25 El término "acilo" se refiere a cualquier alquilo, alqueno o alquino donde el átomo de carbono en el punto de unión se ha sustituido con un grupo oxo, según se define más adelante. Por ejemplo,  $-C(=O)$ alquilo,  $-C(=O)$ alqueno y  $-C(=O)$ alquino son grupos acilo.

30 El término "heterociclo" se refiere a un anillo heterocíclico monocíclico de 5 a 7 miembros o bicíclico de 7 a 10 miembros, el cual está saturado, no saturado o es aromático, y el cual contiene 1 o 2 heteroátomos seleccionados independientemente entre nitrógeno, oxígeno y azufre, y donde los heteroátomos de nitrógeno y azufre pueden estar opcionalmente oxidados y el heteroátomo de nitrógeno puede estar opcionalmente cuaternizado, incluidos los anillos bicíclicos en los cuales cualquiera de los heterociclos anteriores está fusionado con un anillo de benceno. El heterociclo puede estar unido mediante cualquier heteroátomo o átomo de carbono. Los heterociclos incluyen los heteroarilos, según se definen más adelante. Los heterociclos incluyen morfolinilo, pirrolidinilo, piperidinilo, piperizinilo, hidantoinilo, valerolactamilo, oxiranilo, oxetanilo, tetrahidrofuranilo, tetrahidropiranilo, tetrahidropiridinilo, tetrahidropirimidinilo, tetrahidrotiofenilo, tetrahidrotiopiranilo, tetrahidropirimidinilo, tetrahidrotiofenilo, tetrahidrotiopiranilo y similares.

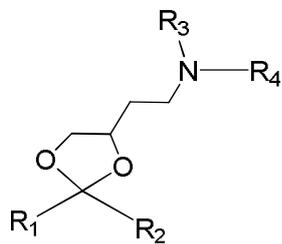
35 Las expresiones "alquilo opcionalmente sustituido", "alqueno opcionalmente sustituido", "alquino opcionalmente sustituido", "acilo opcionalmente sustituido" y "heterociclo opcionalmente sustituido" se refieren a que, cuando están sustituidos, al menos un átomo de hidrógeno se ha reemplazado por un sustituyente. En el caso de un sustituyente oxo ( $=O$ ), se han reemplazado dos átomos de hidrógeno. En este sentido, los sustituyentes incluyen oxo, halógeno, heterociclo,  $-CN$ ,  $-ORx$ ,  $-NRxRy$ ,  $-NRxC(=O)Ry$ ,  $-NRxSO2Ry$ ,  $-C(=O)Rx$ ,  $-C(=O)ORx$ ,  $-C(=O)NRxRy$ ,  $-SONRx$  y  $-SONNRxRy$ , donde n es 0, 1 o 2, Rx y Ry son iguales o diferentes y son independientemente hidrógeno, alquilo o heterociclo, y cada uno de dichos sustituyentes alquilo y heterociclo puede estar sustituido adicionalmente con uno o más de los siguientes: oxo, halógeno,  $-OH$ ,  $-CN$ , alquilo,  $-ORx$ , heterociclo,  $-NRxRy$ ,  $-NRxC(=O)Ry$ ,  $-NRxSO2Ry$ ,  $-C(=O)Rx$ ,  $-C(=O)ORx$ ,  $-C(=O)NRxRy$ ,  $-SONRx$  y  $-SONNRxRy$ .

45 El término "halógeno" se refiere a fluoro, cloro, bromo y yodo.

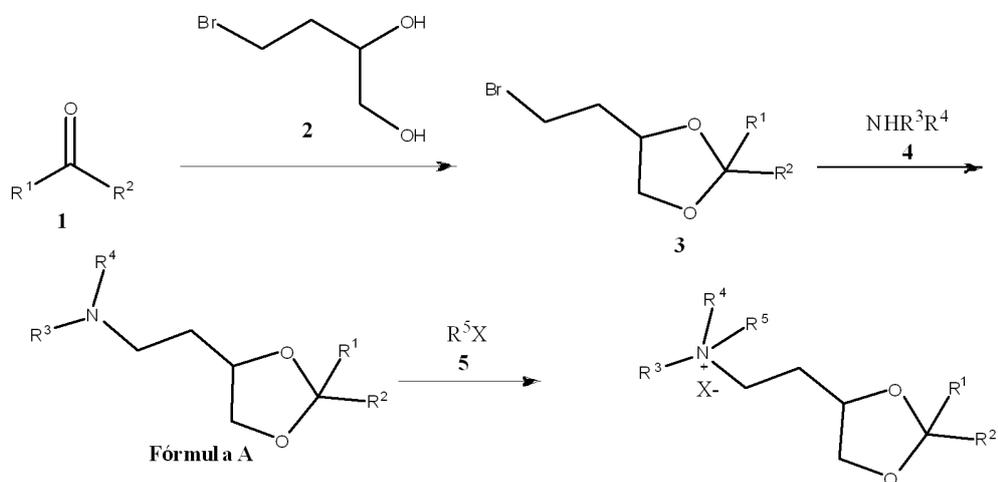
50 En algunas realizaciones, los métodos que se exponen en la invención pueden requerir el uso de grupos protectores. Los expertos en la técnica estarán familiarizados con la metodología de grupos protectores (remítase, por ejemplo, a Protective Groups in Organic Synthesis, Green, T.W. et al., Wiley-Interscience, Ciudad de Nueva York, 1999). Resumiendo, los grupos protectores, en el contexto de esta invención, son cualquier grupo que reduzca o elimine la reactividad no deseada de un grupo funcional. Se puede añadir un grupo protector a un grupo funcional para enmascarar su reactividad durante ciertas reacciones y a continuación se elimina para revelar el grupo funcional original. En algunas realizaciones, se utiliza un "grupo protector de alcoholes". Un "grupo protector de alcoholes" es cualquier grupo que reduzca o elimine la reactividad no deseada de un grupo funcional de tipo alcohol. Los grupos protectores se pueden añadir y eliminar utilizando técnicas de uso común en la materia.

55 Síntesis de la Fórmula A

En una realización, las partículas de ácido nucleico-lípido que se exponen en la invención se formulan utilizando un líquido catiónico de fórmula A:



5 donde R1 y R2 son independientemente alquilo, alquenoilo o alquinilo, pudiendo estar cada uno de ellos opcionalmente sustituido, y R3 y R4 son independientemente alquilo inferior o R3 y R4 se pueden considerar conjuntamente para formar un anillo heterocíclico opcionalmente sustituido. En algunas realizaciones, el lípido catiónico es XTC (2,2-dilinoleil-4-dimetilaminoetil-[1,3]-dioxolano). En general, el lípido de fórmula A anterior se puede preparar mediante los siguientes Esquemas de reacción 1 o 2, donde todos los sustituyentes son como se han definido anteriormente, a menos que se indique de otro modo.



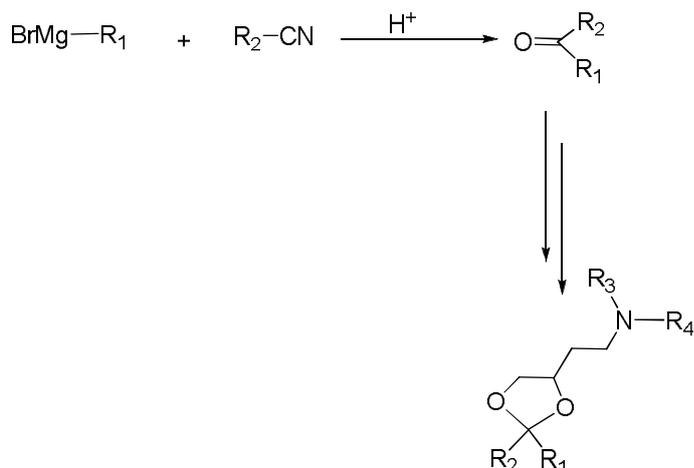
10

Esquema 1

El lípido A, donde R1 y R2 son independientemente alquilo, alquenoilo o alquinilo, pudiendo estar cada uno de ellos opcionalmente sustituido, y R3 y R4 son independientemente alquilo inferior o R3 y R4 se pueden considerar conjuntamente para formar un anillo heterocíclico opcionalmente sustituido, se puede preparar de acuerdo con el Esquema 1. La cetona 1 y el bromuro 2 se pueden adquirir o preparar de acuerdo con métodos conocidos por los expertos en la técnica. La reacción de 1 y 2 proporciona el acetal 3. El tratamiento del acetal 3 con la amina 4 proporciona los lípidos de fórmula A. Los lípidos de fórmula A se pueden convertir en la correspondiente sal de amonio con una sal orgánica de fórmula 5, donde X es un contraión seleccionado entre halógeno, hidróxido, fosfato, sulfato o similares.

15

Esquema 2



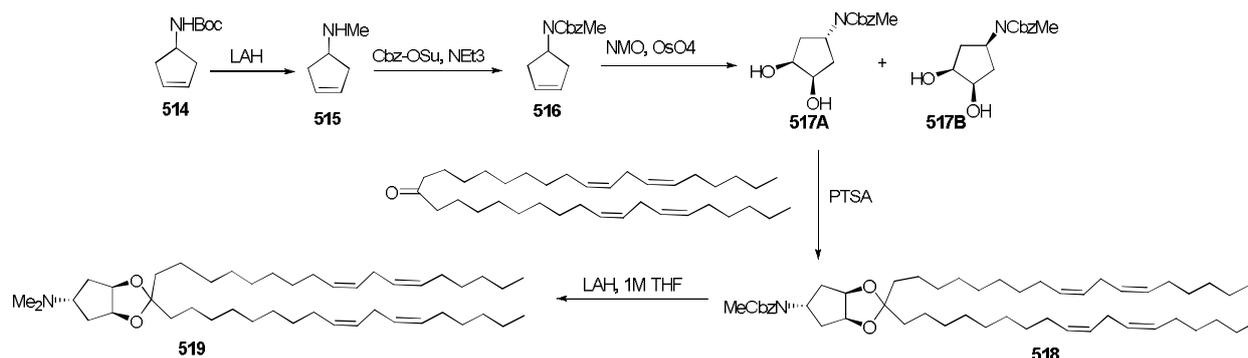
5 Como alternativa, la cetona 1 que actúa como material de partida se puede preparar de acuerdo con el Esquema 2. El reactivo de Grignard 6 y el cianuro 7 se pueden adquirir o preparar de acuerdo con métodos conocidos por los expertos en la técnica. La reacción de 6 y 7 proporciona la cetona 1. La conversión de la cetona 1 en los lípidos correspondientes de fórmula A se lleva a cabo como se ha descrito en el Esquema 1.

#### Síntesis de MC3

10 La preparación de DLin-M-C3-DMA (es decir, 4-(dimetilamino)butanoato de (6Z,9Z,28Z,31Z)-heptatriaconta-6,9,28,31-tetraen-19-ilo) se llevó a cabo como se indica a continuación. Una solución de (6Z,9Z,28Z,31Z)-heptatriaconta-6,9,28,31-tetraen-19-ol (0.53 g), clorhidrato del ácido 4-N,N-dimetilaminobutírico (0.51 g), 4-N,N-dimetilaminopiridina (0.61 g) y clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (0.53 g) en diclorometano (5 mL) se agitó a temperatura ambiente durante toda la noche. La solución se lavó con ácido clorhídrico diluido y a continuación con bicarbonato de sodio acuoso diluido. Las fracciones orgánicas se secaron con sulfato de magnesio anhidro, se filtraron y se eliminó el disolvente en un rotavapor. El residuo se hizo pasar a través de una columna de gel de sílice (20 g) utilizando un gradiente de elución de un 1-5% de metanol/diclorometano. Las fracciones que  
15 contenían el producto purificado se combinaron y se eliminó el disolvente, para proporcionar un aceite incoloro (0.54 g).

#### Síntesis de ALNY-100

La síntesis del cetil 519 [ALNY-100] se llevó a cabo utilizando el siguiente esquema 3:



#### 20 Síntesis de 515:

25 A una suspensión agitada de LiAlH<sub>4</sub> (3.74 g, 0.09852 mol) en 200 mL de THF anhidro en un matraz de fondo redondo de dos bocas (1 L), se añadió una solución de 514 (10 g, 0.04926 mol) en 70 mL de THF lentamente a 0 °C en atmósfera de nitrógeno. Tras completar la adición, la mezcla de reacción se calentó hasta temperatura ambiente y a continuación se calentó a reflujo durante 4 h. La evolución de la reacción se monitorizó mediante TLC. Después de que se completara la reacción (mediante TLC), la mezcla se enfrió hasta 0 °C y se desactivó añadiendo cuidadosamente una solución saturada de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. La mezcla de reacción se agitó durante 4 h a temperatura ambiente y se separó por filtración. El residuo se lavó bien con THF. El filtrado y los lavados se mezclaron, se diluyeron con 400 mL de dioxano y 26 mL de HCl conc. y se agitaron durante 20 minutos a temperatura ambiente. Los componentes volátiles se eliminaron al vacío para proporcionar la sal clorhídrica de 515 como un sólido blanco.

## ES 2 640 260 T3

Rendimiento: 7.12 g. 1H-RMN (DMSO, 400MHz):  $\delta$  = 9.34 (ancho, 2H), 5.68 (s, 2H), 3.74 (m, 1H), 2.66-2.60 (m, 2H), 2.50-2.45 (m, 5H).

Síntesis de 516:

5 A una solución agitada del compuesto 515 en 100 mL de DCM anhidro en un matraz de fondo redondo de dos bocas de 250 mL, se añadió  $\text{NEt}_3$  (37.2 mL, 0.2669 mol) y se enfrió hasta 0 °C en atmósfera de nitrógeno. Después de una adición lenta de N-(benciloxicarbonilo)succinimida (20 g, 0.08007 mol) en 50 mL de DCM anhidro, se permitió que la mezcla de reacción se calentara hasta temperatura ambiente. Después de que se completara la reacción (2-3 h mediante TLC), la mezcla se lavó sucesivamente con una solución de HCl 1 N (1 x 100 mL) y una solución saturada de  $\text{NaHCO}_3$  (1 x 50 mL). A continuación, la fase orgánica se secó con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro y se evaporó el disolvente para obtener un material crudo, el cual se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice para obtener 516 como una masa pegajosa. Rendimiento: 11 g (89%). 1H-RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  = 7.36-7.27 (m, 5H), 5.69 (s, 2H), 5.12 (s, 2H), 4.96 (a, 1H), 2.74 (s, 3H), 2.60 (m, 2H), 2.30-2.25 (m, 2H). LC-MS  $[\text{M}+\text{H}]^-$  -232.3 (96.94%).

Síntesis de 517A y 517B:

15 El ciclopenteno 516 (5 g, 0.02164 mol) se disolvió en una solución de 220 mL de acetona y agua (10:1) en un matraz de fondo redondo de 500 mL de una boca y a esto se le añadió N-óxido de N-metilmorfolina (7.6 g, 0.06492 mol) y a continuación 4.2 mL de una solución al 7.6% de  $\text{OsO}_4$  (0.275 g, 0.00108 mol) en tert-butanol a temperatura ambiente. Después de que se completara la reacción (~ 3 h), la mezcla se desactivó con la adición de  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  sólido y la mezcla resultante se agitó durante 1.5 h a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se diluyó con DCM (300 mL) y se lavó con agua (2 x 100 mL), a continuación con una solución saturada de  $\text{NaHCO}_3$  (1 x 50 mL), agua (1 x 30 mL) y finalmente con salmuera (1x 50 mL). La fase orgánica se secó con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro y se eliminó el disolvente al vacío. La purificación del material crudo mediante cromatografía en columna de gel de sílice proporcionó una mezcla de diastereómeros, los cuales se separaron mediante HPLC prep. Rendimiento: - 6 g de crudo

25 517A - Pico 1 (sólido blanco), 5.13 g (96%). 1H-RMN (DMSO, 400 MHz):  $\delta$  = 7.39-7.31 (m, 5H), 5.04 (s, 2H), 4.78-4.73 (m, 1H), 4.48-4.47 (d, 2H), 3.94-3.93 (m, 2H), 2.71 (s, 3H), 1.72- 1.67 (m, 4H). LC-MS -  $[\text{M}+\text{H}]^-$ -266.3,  $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ -283.5 presente, HPLC-97.86%. Estereoquímica confirmada mediante rayos X.

Síntesis de 518:

30 Utilizando un procedimiento análogo al descrito para la síntesis del compuesto 505, se obtuvo el compuesto 518 (1.2 g, 41%) como un aceite incoloro. 1H-RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  = 7.35-7.33 (m, 4H), 7.30-7.27 (m, 1H), 5.37-5.27 (m, 8H), 5.12 (s, 2H), 4.75 (m, 1H), 4.58-4.57 (m, 2H), 2.78-2.74 (m, 7H), 2.06-2.00 (m, 8H), 1.96-1.91 (m, 2H), 1.62 (m, 4H), 1.48 (m, 2H), 1.37-1.25 (m a, 36 H), 0.87 (m, 6H). HPLC-98.65%.

Procedimiento general para la síntesis del compuesto 519:

35 Una solución del compuesto 518 (1 eq) en hexano (15 mL) se añadió gota a gota a una solución enfriada con hielo de LAH en THF (1 M, 2 eq). Tras completar la adición, la mezcla se calentó a 40 °C durante 0.5 h y a continuación se enfrió de nuevo en un baño de hielo. La mezcla se hidrolizó cuidadosamente con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  acuoso saturado, a continuación se filtró a través de celite y se redujo hasta obtener un aceite. La cromatografía en columna proporcionó 519 puro (1.3 g, 68%), que se obtuvo como un aceite incoloro.  $^{13}\text{C}$  RMN = 130.2, 130.1 (x2), 127.9 (x3), 112.3, 79.3, 64.4, 44.7, 38.3, 35.4, 31.5, 29.9 (x2), 29.7, 29.6 (x2), 29.5 (x3), 29.3 (x2), 27.2 (x3), 25.6, 24.5, 23.3, 22.6, 14.1; MS por electronebulización (modo positivo): Peso molecular para  $\text{C}_{44}\text{H}_{80}\text{NO}_2$  (M + H)<sup>+</sup> Calc. 654.6, Experimental 654.6.

45 Las formulaciones preparadas mediante el método estándar o un método exento de extrusión se pueden caracterizar de maneras similares. Por ejemplo, las formulaciones se caracterizan normalmente mediante una inspección visual. Deberían ser soluciones translúcidas blanquecinas exentas de agregados o sedimento. El tamaño de partícula y la distribución de tamaños de partícula de las nanopartículas lipídicas se pueden medir mediante dispersión de la luz utilizando, por ejemplo, un instrumento Malvern Zetasizer Nano ZS (Malvern, EE. UU.). Las partículas deberían de tener un tamaño de aproximadamente 20-300 nm, tal como de 40-100 nm. La distribución de tamaños de partícula debería ser unimodal. La concentración total de ARNbc en la formulación, así como también la fracción atrapada, se estima utilizando un ensayo de exclusión de tinte. Una muestra del ARNbc formulado se puede incubar con un tinte de unión a ARN, tal como Ribogreen (Molecular Probes), en presencia o ausencia de un surfactante que altere la formulación, p. ej., Triton-X100 al 0.5%. El ARNbc total de la formulación se puede determinar mediante la señal procedente de la muestra que contiene el surfactante, en relación con una curva patrón. La fracción atrapada se determina restando el contenido de ARNbc "libre" (que se mide mediante la señal en ausencia de surfactante) del contenido de ARNbc total. El porcentaje de ARNbc atrapado es normalmente > 85%.

55 Para una formulación SNALP, el tamaño de partícula es de al menos 30 nm, al menos 40 nm, al menos 50 nm, al menos 60 nm, al menos 70 nm, al menos 80 nm, al menos 90 nm, al menos 100 nm, al menos 110 nm y al menos 120 nm. En el intervalo adecuado es normalmente de aproximadamente al menos 50 nm a aproximadamente al

menos 110 nm, de aproximadamente al menos 60 nm a aproximadamente al menos 100 nm o de aproximadamente al menos 80 nm a aproximadamente al menos 90 nm.

Las composiciones y formulaciones para administración oral incluyen polvos o gránulos, micropartículas, nanopartículas, suspensiones o soluciones en agua o medios no acuosos, cápsulas, cápsulas de gel, sobres, comprimidos o minicompriados. Puede ser deseable utilizar espesantes, agentes saborizantes, diluyentes, emulsionantes, adyuvantes dispersantes o aglutinantes. En algunas realizaciones, las formulaciones orales son aquellas en las que los ARNbc que se exponen en la invención se administran conjuntamente con uno o más agentes quelantes y surfactantes potenciadores de la penetración. Los surfactantes adecuados incluyen ácidos grasos y/o ésteres o sales de estos, ácidos biliares y/o sales de estos. Los ácidos/sales biliares adecuados incluyen ácido quenodesoxicólico (CDCA) y ácido ursodesoxiquenodesoxicólico (UDCA), ácido cólico, ácido deshídrocólico, ácido desoxicólico, ácido glucólico, ácido glicólico, ácido glicodesoxicólico, ácido taurocólico, ácido taurodesoxicólico, tauro-24,25-dihidrofusidato de sodio y glicodihidrofusidato de sodio. Los ácidos grasos adecuados incluyen ácido araquidónico, ácido undecanoico, ácido oleico, ácido láurico, ácido caprílico, ácido cáprico, ácido mirístico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido linoleico, ácido linolénico, dicaprato, tricaprato, monooleína, dilaurina, 1-monocaprato de glicerilo, 1-dodecilazacicloheptan-2-ona, una acilcarnitina, una acilcolina o un monoglicérido, un diglicérido o una sal farmacéuticamente aceptable de estos (p. ej., de sodio). En algunas realizaciones, se utilizan combinaciones de potenciadores de la penetración, por ejemplo, sales/ácidos grasos combinados con sales/ácidos biliares. Una combinación ilustrativa es la sal sódica de ácido láurico, ácido cáprico y UDCA. Otros potenciadores de la penetración incluyen el éter polioxietilén-9-laurílico y el éter polioxietilén-20-cetílico. Los ARNbc que se exponen en la invención se pueden suministrar por vía oral, en forma granular, que incluye partículas secas pulverizadas, o complejo para formar micro- o nanopartículas. Los agentes complejantes de ARNbc incluyen poliaminoácidos; poliiiminas; poliácridatos; polialquilacrilatos, polioxetanos, polialquilocianoacrilatos; gelatinas cationizadas, albúminas, almidones, acrilatos, polietilenglicoles (PEG) y almidones; polialquilocianoacrilatos; poliiiminas derivatizadas con DEAE, polulanos, celulosas y almidones. Los agentes complejantes adecuados incluyen quitosano, N-trimetilquitosano, poli-L-lisina, polihistidina, poliornitina, poliesperminas, protamina, polivinilpiridina, politiidietilaminometileno P(TDAE), poliaminoestireno (p. ej., p-amino), poli(metilcianoacrilato), poli(etilcianoacrilato), poli(butilcianoacrilato), poli(isobutilcianoacrilato), poli(isohexilcianoacrilato), DEAE-metacrilato, DEAE-hexilacrilato, DEAE-acrilamida, DEAE-alúmina y DEAE-dextrano, polimetilacrilato, polihexilacrilato, poli(ácido D,L-láctico), poli(ácido DL-láctico-co-glicólico (PLGA), alginato y polietilenglicol (PEG). Se describen detalladamente formulaciones orales para ARNbc y su preparación en la Patente de EE. UU. 6.887.906, la Publicación de EE. UU. N.o 20030027780 y la Patente de EE. UU. N.o 6.747.014.

Las composiciones y formulaciones para administración parenteral, intraparenquimal (en el cerebro), intratecal, intraventricular o intrahepática pueden incluir soluciones acuosas estériles, las cuales también pueden contener tampones, diluyentes y otros aditivos adecuados tales como, sin carácter limitante, potenciadores de la penetración, compuestos portadores y otros excipientes o portadores farmacéuticamente aceptables.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención incluyen, sin carácter limitante, soluciones, emulsiones y formulaciones que contienen liposomas. Estas composiciones se pueden generar a partir de varios componentes que incluyen, sin carácter limitante, líquidos preformados, sólidos autoemulsionantes y semisólidos autoemulsionantes.

Las formulaciones farmacéuticas que se exponen en la presente invención, las cuales se pueden presentar convenientemente en una forma farmacéutica unitaria, se pueden preparar de acuerdo con técnicas convencionales muy conocidas en la industria farmacéutica. Tales técnicas incluyen el paso de asociar los principios activos con el o los portadores o el o los excipientes farmacéuticos. En general, las formulaciones se preparan asociando de forma uniforme e íntima los principios activos con portadores líquidos o portadores sólidos finamente divididos o ambos y a continuación, cuando proceda, dando forma al producto.

Las composiciones que se exponen en la presente invención se pueden formular en cualquiera de las muchas formas farmacéuticas posibles tales como, sin carácter limitante, comprimidos, cápsulas, cápsulas de gel, jarabes líquidos, geles blandos, supositorios y enemas. Las composiciones también se pueden formular como suspensiones en medios acuosos, no acuosos o mixtos. Las suspensiones acuosas pueden contener además sustancias que incrementen la viscosidad de la suspensión, que incluyen, por ejemplo, carboximetilcelulosa de sodio, sorbitol y/o dextrano. La suspensión también puede contener estabilizantes.

## **Formulaciones adicionales**

### Emulsiones

Las composiciones de la presente invención se pueden preparar y formular como emulsiones. Las emulsiones son normalmente sistemas heterogéneos de un líquido dispersado en otro en forma de gotículas con un diámetro normalmente superior a 0.1µm (remítase, p. ej., a Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG. y Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8.a ed.), Nueva York, NY; Idson, en Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger y Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y., volumen 1, pág. 199; Rosoff, en Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger y Banker (Eds.), 1988, Marcel

- Dekker, Inc., Nueva York, N.Y., Volumen 1, pág. 245; Block en *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger y Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y., volumen 2, pág. 335; Higuchi et al., en *Remington's Pharmaceutical Sciences*, Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1985, pág. 301). Las emulsiones suelen ser sistemas bifásicos que comprenden dos fases líquidas inmiscibles mezcladas de forma íntima y dispersadas una en la otra.
- 5 En general, las emulsiones pueden ser de la variedad agua en aceite (a/ac) o aceite en agua (ac/a). Cuando una fase acuosa se divide finalmente y se dispersa en forma de gotículas minúsculas en una masa de fase oleosa, la composición resultante se denomina emulsión de agua en aceite (a/ac). Como alternativa, cuando una fase oleosa se divide finalmente y se dispersa en forma de gotículas minúsculas en una masa de fase acuosa, la composición resultante se denomina emulsión de aceite en agua (ac/a). Las emulsiones pueden contener componentes
- 10 adicionales además de las fases dispersadas y del fármaco activo, el cual puede estar presente como una solución tanto en la fase acuosa, la fase oleosa o por sí mismo como una fase separada. Cuando proceda, en las emulsiones también puede haber excipientes farmacéuticos presentes tales como emulsionantes, estabilizantes, tintes y antioxidantes. Las emulsiones farmacéuticas también pueden ser emulsiones múltiples que comprendan más de dos fases tales como, por ejemplo, en el caso de emulsiones de aceite en agua en aceite (ac/a/ac) y de agua en aceite
- 15 en agua (a/ac/a). Tales formulaciones complejas suelen proporcionar ciertas ventajas que las emulsiones binarias simples no proporcionan. Las emulsiones múltiples en las cuales gotículas de aceite individuales de una emulsión de ac/a encierran pequeñas gotículas de agua constituyen una emulsión de a/ac/a. De modo similar, un sistema de gotículas de aceite encerradas en glóbulos de agua estabilizados en una fase continua oleosa proporcionan una emulsión de ac/a/ac.
- 20 Las emulsiones se caracterizan por tener una estabilidad dinámica escasa o nula. A menudo, la fase dispersada o discontinua de la emulsión está bien dispersada en la fase externa o continua y se mantiene en esta forma a través de los medios de emulsionantes o la viscosidad de la formulación. Cualquiera de las fases de la emulsión puede ser un semisólido o un sólido, como es el caso de las cremas y bases de ungüentos de tipo emulsión. Otros medios para estabilizar emulsiones implican el uso de emulsionantes que se pueden incorporar en cualquier fase de la emulsión.
- 25 Los emulsionantes se pueden clasificar a grandes rasgos en cuatro categorías: surfactantes sintéticos, emulsionantes de origen natural, bases de absorción y sólidos finamente dispersados (remítase, p. ej., a *Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems*, Allen, LV., Popovich NG. y Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8.a ed.), Nueva York, NY; Idson, en *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger y Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y., volumen 1, pág. 199).
- 30 Los surfactantes sintéticos, también conocidos como agentes tensioactivos, se aplican de forma generalizada en la formulación de emulsiones y han sido objeto de artículos de revisión en la bibliografía (remítase, p. ej., a *Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems*, Allen, LV., Popovich NG. y Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8.a ed.), Nueva York, NY; Rieger, en *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger y Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y., volumen 1, pág. 285; Idson, en *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger y Banker (Eds.), Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y., 1988, volumen 1, pág. 199). Los surfactantes son normalmente anfífilos y comprenden una porción hidrófila y una hidrófoba. La proporción de la naturaleza hidrófila frente a la hidrófoba del surfactante se ha denominado equilibrio hidrófilo/lipófilo (HLB) y es una herramienta valiosa para clasificar y seleccionar surfactantes en la preparación de formulaciones. Los surfactantes se pueden clasificar en diferentes clases en función de la naturaleza del grupo hidrófilo: no iónicos, aniónicos,
- 35 catiónicos y anfóteros (remítase, p. ej., a *Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems*, Allen, LV., Popovich NG. y Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8.a ed.), Nueva York, NY; Rieger, en *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger y Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y., volumen 1, pág. 285).
- 40 Los emulsionantes de origen natural utilizados en las formulaciones de emulsiones incluyen lanolina, cera de abejas, fosfátidos, lecitina y acacia. Las bases de absorción poseen propiedades hidrófilas, por ejemplo, pueden empaparse de agua para formar emulsiones de a/ac a la vez que conservan sus consistencias semisólidas, por ejemplo, lanolina anhidra y vaselina hidrófila. También se han utilizado sólidos finamente divididos como emulsionantes satisfactorios, especialmente combinados con surfactantes y en preparados viscosos. Estos incluyen sólidos inorgánicos polares, tales como hidróxidos de metales pesados, arcillas que no se expanden tales como bentonita, atapulgita, hectorita,
- 45 caolín, montmorillonita, silicato de aluminio coloidal y silicato de aluminio y magnesio coloidal, pigmentos y sólidos no polares tales como carbón o triestearato de glicerilo.
- 50 En las formulaciones de emulsiones también se incluye una gran variedad de materiales no emulsionantes, los cuales contribuyen a definir las propiedades de las emulsiones. Estos incluyen grasas, aceites, ceras, ácidos grasos, alcoholes grasos, ésteres grasos, humectantes, coloides hidrófilos, conservantes y antioxidantes (Block, en *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger y Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y., volumen 1, pág. 335; Idson, en *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger y Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y., volumen 1, pág. 199).
- 55 Los coloides o hidrocoloides hidrófilos incluyen gomas de origen natural y polímeros sintéticos tales como polisacáridos (por ejemplo, acacia, agar, ácido alginico, carragenano, goma guar, goma karaya y tragacanto), derivados de la celulosa (por ejemplo, carboximetilcelulosa y carboxipropilcelulosa) y polímeros sintéticos (por ejemplo, carbómeros, éteres de celulosa y polímeros de carboxivinilo). Estos se dispersan o expanden en agua para
- 60

formar soluciones coloidales que estabilizan las emulsiones formando películas interfaciales resistentes alrededor de las gotículas de la fase dispersadas e incrementando la viscosidad de la fase externa.

Debido a que las emulsiones suelen contener una serie de ingredientes, tales como carbohidratos, proteínas, esteroides y fosfátidos, que pueden propiciar fácilmente el crecimiento de microbios, estas formulaciones suelen incorporar conservantes. Los conservantes utilizados habitualmente que se incluyen en las formulaciones de emulsiones incluyen parabeno metílico, parabeno propílico, sales de amonio cuaternario, cloruro de benzalconio, ésteres del ácido p-hidroxibenzoico y ácido bórico. Habitualmente también se añaden antioxidantes a las formulaciones de emulsiones para evitar el deterioro de la formulación. Los antioxidantes utilizados pueden ser atrapadores de radicales libres tales como tocoferoles, galatos de alquilo, hidroxianisol butilado, hidroxitolueno butilado o agentes reductores tales como ácido ascórbico y metabisulfito de sodio, y singergistas antioxidantes tales como ácido cítrico, ácido tartárico y lecitina.

La aplicación de las formulaciones de emulsiones por vía dermatológica, oral y parenteral y los métodos para su elaboración han sido objeto de artículos de revisión en la bibliografía (remítase, p. ej., a Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG. y Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8.a ed.), Nueva York, NY; Idson, en Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger y Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y., volumen 1, pág. 199). Las formulaciones de emulsiones para un suministro oral han sido utilizadas de forma generalizada debido a que su formulación resulta sencilla, así como también debido a su eficacia desde el punto de vista de la absorción y biodisponibilidad (remítase, p. ej., a Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG. y Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8.a ed.), Nueva York, NY; Rosoff, en Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger y Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y., volumen 1, pág. 245; Idson, en Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger y Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y., volumen 1, pág. 199). Los laxantes con una base de aceite mineral, las vitaminas solubles en aceites y los preparados nutritivos ricos en grasas se encuentran entre los materiales que se han administrado habitualmente por vía oral como emulsiones de ac/a.

En una realización de la presente invención, las composiciones de ARNi y los ácidos nucleicos se formulan como microemulsiones. Una microemulsión se puede definir como un sistema de agua, aceite y un material anfífilo que es una solución líquida termodinámicamente estable y ópticamente isotrópica estable (remítase, p. ej., a Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG. y Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8.a ed.), Nueva York, NY; Rosoff, en Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger y Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y., volumen 1, pág. 245). Normalmente, las microemulsiones son sistemas que se preparan dispersando en primer lugar un aceite en una solución acuosa de surfactante y a continuación añadiendo una cantidad suficiente de un cuarto componente, generalmente un alcohol con una longitud de cadena intermedia para formar un sistema transparente. Por consiguiente, las microemulsiones también se han descrito como dispersiones termodinámicamente estables e isotrópicamente transparentes de dos líquidos inmiscibles que se estabilizan mediante películas interfaciales de moléculas tensioactivas (Leung y Shah, en: Controlled Release of Drugs: Polymers and Aggregate Systems, Rosoff, M., Ed., 1989, VCH Publishers, Nueva York, páginas 185-215). Las microemulsiones se preparan normalmente mediante una combinación de tres a cinco componentes que incluyen aceite, agua, surfactante, cosurfactante y electrolito. El hecho de que la microemulsión sea del tipo agua en aceite (a/ac) o aceite en agua (ac/a) depende de las propiedades del aceite y el surfactante utilizados y de la estructura y la geometría del empaquetamiento de las cabezas polares y las colas hidrocarbonadas de las moléculas de surfactante (Schott, en Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1985, pág. 271).

La estrategia fenomenológica que utiliza diagramas de fase se ha estudiado exhaustivamente y ha proporcionado un conocimiento comprensivo, para el experto en la técnica, sobre cómo formular las microemulsiones (remítase, p. ej., a Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG. y Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8.a ed.), Nueva York, NY; Rosoff, en Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger y Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y., volumen 1, pág. 245; Block, en Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger y Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y., volumen 1, pág. 335). En comparación con las emulsiones convencionales, las microemulsiones ofrecen la ventaja de que solubilizan fármacos insolubles en agua en una formulación de partículas termodinámicamente estables que se forman espontáneamente.

Los surfactantes utilizados en la preparación de microemulsiones incluyen, sin carácter limitante, surfactantes iónicos, surfactantes no iónicos, Brij 96, éteres oleílicos de polioxietileno, ésteres de poliglicerol y ácidos grasos, monolaurato de tetraglicerol (ML310), monooleato de tetraglicerol (MO310), monooleato de hexaglicerol (PO310), pentaoleato de hexaglicerol (PO500), monocaprato de decaglicerol (MCA750), monooleato de decaglicerol (MO750), sequioleato de decaglicerol (SO750), decaoleato de decaglicerol (DAO750), solos o combinados con cosurfactantes. El cosurfactante, normalmente un alcohol de cadena corta tal como etanol, 1-propanol y 1-butanol, sirve para incrementar la fluidez interfacial penetrando en la película surfactante y consecuentemente creando una película desordenada debido al espacio hueco generado entre las moléculas de surfactante. A pesar de ello, las microemulsiones se pueden preparar sin el uso de cosurfactantes y en la técnica se conocen sistemas de microemulsiones autoemulsionantes exentos de alcoholes. Normalmente, la fase acuosa es, sin carácter limitante,

agua, una solución acuosa del fármaco, glicerol, PEG300, PEG400, poligliceroles, propilenglicoles y derivados del etilenglicol. La fase oleosa puede incluir, sin carácter limitante, materiales tales como Captex 300, Captex 355, Capmul MCM, ésteres de ácidos grasos, mono-, di- y triglicéridos de cadena media (C8-C12), ésteres de ácidos grasos glicéricos polioxietilados, alcoholes grasos, glicéridos poliglicolizados, glicéridos C8-C10 poliglicolizados saturados, aceites vegetales y aceite de silicona.

Las microemulsiones tienen un interés particular desde el punto de vista de la solubilización de fármacos y la absorción mejorada de fármacos. Se ha postulado que las microemulsiones basadas en lípidos (tanto de ac/a como de a/ac) potencian la biodisponibilidad oral de los fármacos, incluidos los péptidos (remítase, p. ej., a las Patentes de EE. UU. N.os 6.191.105, 7.063.860, 7.070.802, 7.157.099; Constantinides et al., *Pharmaceutical Research*, 1994, 11, 1385-1390; Ritschel, *Meth. Find. Exp. Clin. Pharmacol.*, 1993, 13, 205). Las microemulsiones ofrecen las ventajas de una solubilización mejorada del fármaco, una protección del fármaco frente a la hidrólisis enzimática, una posible mejora de la absorción del fármaco debido a alteraciones inducidas por el surfactante en la fluidez y permeabilidad de la membrana, la sencillez de su preparación, la sencillez de su administración oral en comparación con las formas farmacéuticas sólidas, una potencia clínica mejorada y una menor toxicidad (remítase, p. ej., a las Patentes de EE. UU. N.os 6.191.105, 7.063.860, 7.070.802, 7.157.099, Constantinides et al., *Pharmaceutical Research*, 1994, 11, 1385; Ho et al., *J. Pharm. Sci.*, 1996, 85, 138-143). A menudo las microemulsiones se pueden formar espontáneamente cuando se combinan sus componentes a temperatura ambiente. Esto puede resultar particularmente conveniente cuando se formulan fármacos, péptidos o ARNi termolábiles. Las microemulsiones también han resultado ser eficaces en el suministro transdérmico de componentes activos en aplicaciones tanto cosméticas como farmacéuticas. Cabe esperar que las formulaciones y composiciones de microemulsiones de la presente invención propicien un incremento de la absorción sistémica de los ARNi y los ácidos nucleicos a partir del aparato gastrointestinal, así como también que mejoren la captación celular local de los ARNi y los ácidos nucleicos.

Las microemulsiones de la presente invención también pueden contener componentes y aditivos adicionales tales como monoestearato de sorbitán (malla 3), labrasol y potenciadores de la penetración para mejorar las propiedades de la formulación y para mejorar la absorción de los ARNi y los ácidos nucleicos de la presente invención. Los potenciadores de la penetración utilizados en las microemulsiones de la presente invención se pueden clasificar como pertenecientes a una de las cinco categorías generales siguientes: surfactantes, ácidos grasos, sales biliares, agentes quelantes y agentes no surfactantes ni quelantes (Lee et al., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, pág. 92). Cada una de estas clases ha sido expuesta anteriormente.

### Potenciadores de la penetración

Se pueden emplear varios potenciadores de la penetración para ejercer un suministro eficaz de los ácidos nucleicos, particularmente los ARNi, en la piel de animales. La mayoría de los fármacos están presentes en solución tanto en forma ionizada como no ionizada. Sin embargo, normalmente solo los fármacos lipófilos o solubles en lípidos atraviesan fácilmente las membranas celulares. Se ha descubierto que incluso los fármacos no lipófilos pueden atravesar las membranas celulares si la membrana que se ha de atravesar se trata con un potenciador de la penetración. Además de propiciar la difusión de los fármacos no lipófilos a través de las membranas celulares, los potenciadores de la penetración también potencian la permeabilidad de los fármacos lipófilos.

Los potenciadores de la penetración se pueden clasificar como pertenecientes a una de entre cinco categorías generales, es decir, surfactantes, ácidos grasos, sales biliares, agentes quelantes y agentes no surfactantes ni quelantes (remítase, p. ej., a Malmsten, M. *Surfactants and polymers in drug delivery*, Informa Health Care, Nueva York, NY, 2002; Lee et al., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, pág. 92). Cada una de las clases mencionadas anteriormente de potenciadores de la penetración se describen a continuación con más detalle.

Surfactantes: En relación con la presente invención, los surfactantes (o "agentes tensioactivos") son entidades químicas que, cuando se disuelven en una solución acuosa, reducen la tensión superficial de la solución o la tensión interfacial entre la solución acuosa y otro líquido, con el resultado de que se potencia la absorción de los ARNi a través de la mucosa. Además de las sales biliares y los ácidos grasos, estos potenciadores de la penetración incluyen, por ejemplo, laurilsulfato de sodio, éter polioxietileno-9-laurílico y éter polioxietileno-20-cetílico (remítase, p. ej., a Malmsten, M. *Surfactants and polymers in drug delivery*, Informa Health Care, Nueva York, NY, 2002; Lee et al., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, pág. 92) y emulsiones perfluoroquímicas tales como FC-43. Takahashi et al., *J. Pharm. Pharmacol.*, 1988, 40, 252).

Ácidos grasos: Los diferentes ácidos grasos y sus derivados que actúan como potenciadores de la penetración incluyen, por ejemplo, ácido oleico, ácido láurico, ácido cáprico (ácido n-decanoico), ácido mirístico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido linoleico, ácido linolénico, dicaprato, tricaprato, monooleína (1-monooleoil-rac-glicerol), dilaurina, ácido caprílico, ácido araquidónico, 1-monocaprato de glicerol, 1-dodecilazacicloheptan-2-ona, acilcarnitinas, acilcolinas, sus ésteres de alquilo C1-20 (p. ej., metilo, isopropilo y t-butilo), y mono- y diglicéridos de estos (es decir, oleato, laurato, caprato, miristato, palmitato, estearato, linoleato, etc.) (remítase, p. ej., a Tuitou, E. et al. *Enhancement in Drug Delivery*, CRC Press, Danvers, MA, 2006; Lee et al., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, pág. 92; Muranishi, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1990, 7, 1-33; El Hariri et al., *J. Pharm. Pharmacol.*, 1992, 44, 651-654).

5 Sales biliares: La función fisiológica de la bilis incluye facilitar la dispersión y la absorción de lípidos y de vitaminas solubles en grasas (remítase, p. ej., a Malmsten, M. *Surfactants and polymers in drug delivery*, Informa Health Care, Nueva York, NY, 2002; Brunton, Capítulo 38 en: *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 9.a Ed., Hardman et al. Eds., McGraw-Hill, Nueva York, 1996, págs. 934-935). Varias sales biliares naturales, y sus  
 10 derivados sintéticos, actúan como potenciadores de la penetración. Por lo tanto, la expresión "sales biliares" incluye cualquiera de los componentes de origen natural de la bilis, así como también cualquiera de sus derivados sintéticos. Las sales biliares adecuadas incluyen, por ejemplo, ácido cólico (o su sal sódica farmacéuticamente aceptable, el colato de sodio), ácido deshidrocólico (deshidrocólato de sodio), ácido desoxicólico (desoxicólato de sodio), ácido glucólico (glucólato de sodio), ácido glicólico (glicólato de sodio), ácido glicodesoxicólico (glicodesoxicólato de sodio), ácido taurocólico (taurocólato de sodio), ácido taurodesoxicólico (taurodesoxicólato de sodio), ácido quenodesoxicólico (quenodesoxicólato de sodio), ácido ursodesoxicólico (UDCA), tauro-24,25-dihidrofusidato de sodio (STDHF), glicodihidrofusidato de sodio y éter polioxiétilen-9-laurílico (POE) (remítase, p. ej., a Malmsten, M. *Surfactants and polymers in drug delivery*, Informa Health Care, Nueva York, NY, 2002; Lee et al., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, página 92; Swinyard, Capítulo 39 en: *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18.a Ed., Gennaro, ed., Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1990, páginas 782-783; Muranishi, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1990, 7, 1-33; Yamamoto et al., *J. Pharm. Exp. Ther.*, 1992, 263, 25; Yamashita et al., *J. Pharm. Sci.*, 1990, 79, 579-583).

20 Agentes quelantes: Los agentes quelantes, cuando se utilizan en relación con la presente invención, se pueden definir como compuestos que eliminan iones metálicos de la solución mediante la formación de complejos con ellos, con el resultado de que se potencia la absorción de los ARNi a través de la mucosa. En lo que respecta a su uso como potenciadores de la penetración en la presente invención, los agentes quelantes presentan la ventaja añadida de que también sirven como inhibidores de la DNasa, ya que la mayoría de ADN-nucleasas caracterizadas requieren un ion metálico bivalente para la catálisis y, por lo tanto, son inhibidas por los agentes quelantes (Jarrett, *J. Chromatogr.*, 1993, 618, 315-339). Los agentes quelantes adecuados incluyen, sin carácter limitante,  
 25 etilendiamintetraacetato de sodio (EDTA), ácido cítrico, salicilatos (p. ej., salicilato de sodio, 5-metoxisalicilato y homovanilato), derivados N-acílicos del colágeno, derivados de tipo lauret-9 y N-aminoácido de  $\beta$ -dicetonas (enaminas)(remítase, p. ej., a Katdare, A. et al., *Excipient development for pharmaceutical, biotechnology, and drug delivery*, CRC Press, Danvers, MA, 2006; Lee et al., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, página 92; Muranishi, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1990, 7, 1-33; Buur et al., *J. Control Rel.*, 1990, 14, 43-51).

30 Agentes no surfactantes ni quelantes: Los compuestos potenciadores de la penetración no surfactantes ni quelantes, tal como se utilizan en la presente, se pueden definir como compuestos que presentan una actividad insignificante como agentes quelantes o como surfactantes pero que, a pesar de ello, potencian la absorción de los ARNi a través de la mucosa alimentaria (remítase, p. ej., a Muranishi, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1990, 7, 1-33). Esta clase de potenciadores de la penetración incluyen, por ejemplo, ureas cíclicas insaturadas, derivados de tipo 1-alkil- y 1-alkenilazaciloalcanona (Lee et al., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, page 92) y agentes antiinflamatorios no esteroideos tales como diclofenac sódico, indometacina y fenilbutazona (Yamashita et al., *J. Pharm. Pharmacol.*, 1987, 39, 621-626).

40 También se pueden añadir agentes que potencian la captación de ARNi a nivel celular a las composiciones farmacéuticas u otras composiciones de la invención. Por ejemplo, también existe constancia de que lípidos catiónicos, tales como la lipofectina (Junichi et al, Pat. de EE. UU. N.o 5.705.188), derivados catiónicos del glicerol y moléculas policationicas tales como la polilisina (Lollo et al., Solicitud de PCT WO 97/30731) potencian la captación celular de ARNbc. Los ejemplos de reactivos de transfección que se pueden adquirir de proveedores comerciales incluyen, por ejemplo, Lipofectamine™ (Invitrogen; Carlsbad, CA), Lipofectamine 2000™ (Invitrogen; Carlsbad, CA), 293fectin™ (Invitrogen; Carlsbad, CA), Cellfectin™ (Invitrogen; Carlsbad, CA), DMRIE-C™ (Invitrogen; Carlsbad, CA), FreeStyle™ MAX (Invitrogen; Carlsbad, CA), Lipofectamine™ 2000 CD (Invitrogen; Carlsbad, CA), Lipofectamine™ (Invitrogen; Carlsbad, CA), RNAiMAX (Invitrogen; Carlsbad, CA), Oligofectamine™ (Invitrogen; Carlsbad, CA), Optifect™ (Invitrogen; Carlsbad, CA), el reactivo de transfección X-tremeGENE Q2 (Roche; Grenzacherstrasse, Suiza), el reactivo de transfección liposomal DOTAP (Grenzacherstrasse, Suiza), el reactivo de transfección liposomal DOSPER (Grenzacherstrasse, Suiza) o Fugene (Grenzacherstrasse, Suiza), el reactivo Transfectam® (Promega; Madison, WI), el reactivo de transfección TransFast™ (Promega; Madison, WI), el reactivo Tfx™-20 (Promega; Madison, WI), el reactivo Tfx™-50 (Promega; Madison, WI), DreamFect™ (OZ Biosciences; Marsella, Francia), EcoTransfect (OZ Biosciences; Marsella, Francia), el reactivo de transfección TransPass<sup>a</sup> D1 (New England Biolabs; Ipswich, MA, EE. UU.), LyoVec™/LipoGen™ (Invitrogen; San Diego, CA, EE. UU.), el reactivo de transfección PerFectin (Genlantis; San Diego, CA, EE. UU.), el reactivo de transfección NeuroPORTER (Genlantis; San Diego, CA, EE. UU.), el reactivo de transfección GenePORTER (Genlantis; San Diego, CA, EE. UU.), el reactivo de transfección GenePORTER 2 (Genlantis; San Diego, CA, EE. UU.), el reactivo de transfección Cytofectin (Genlantis; San Diego, CA, EE. UU.), el reactivo de transfección BaculoPORTER (Genlantis; San Diego, CA, EE. UU.), el reactivo de transfección TroganPORTER™ (Genlantis; San Diego, CA, EE. UU.), RiboFect (Bioline; Taunton, MA, EE. UU.), PlasFect (Bioline; Taunton, MA, EE. UU.), UniFECTOR (B-Bridge International; Mountain View, CA, EE. UU.), SureFECTOR (B-Bridge International; Mountain View, CA, EE. UU.) o HiFect™ (B-Bridge International, Mountain View, CA, EE. UU.), entre otros.

Se pueden utilizar otros reactivos para potenciar la penetración de los ácidos nucleicos administrados, que incluyen glicoles tales como etilenglicol y propilenglicol, pirroles tales como 2-pirrol, azonas y terpenos tales como limoneno y mentona.

#### Portadores

- 5 Ciertas composiciones de la presente invención también incorporan compuestos portadores en la formulación. La expresión "compuesto portador" o "portador", tal como se utiliza en la presente, se puede referir a un ácido nucleico o un análogo de este, que es inerte (es decir, no posee actividad biológica de por sí) pero que es reconocido como un ácido nucleico por procesos *in vivo* que reducen la biodisponibilidad de un ácido nucleico con actividad biológica, por ejemplo, degradando el ácido nucleico biológicamente activo o propiciando su eliminación de la circulación. La administración conjunta de un ácido nucleico y un compuesto portador, normalmente con un exceso de la última sustancia, puede dar como resultado una reducción sustancial de la cantidad de ácido nucleico que se recupera en el hígado, el riñón u otros depósitos extracirculatorios, probablemente debido a la competición entre el compuesto portador y el ácido nucleico por un receptor común. Por ejemplo, la recuperación de un ARNbc de tipo parcialmente fosforotioato en tejido hepático se puede reducir cuando se administra conjuntamente con ácido poliinosínico, sulfato de dextrano, ácido policitídico o ácido 4-acetamido-4'isotiocianoestilben-2,2'-disulfónico (Miyao et al., *DsRNA Res. Dev.*, 1995, 5, 115-121; Takakura et al., *DsRNA & Nucl. Acid Drug Dev.*, 1996, 6, 177-183).

#### Excipientes

- 20 A diferencia de un compuesto portador, un "excipiente" o "portador farmacéutico" es un agente de suspensión o un disolvente farmacéuticamente aceptable o cualquier otro vehículo farmacológicamente inerte para suministrar uno o más ácidos nucleicos a un animal. El excipiente puede ser líquido o sólido y se selecciona, teniendo en cuenta la vía de administración planeada, de modo que proporcione la masa, consistencia, etc. deseadas, cuando se combina con un ácido nucleico y los demás componentes de una composición farmacéutica determinada. Los portadores farmacéuticos habituales incluyen, sin carácter limitante, agentes aglutinantes (p. ej., almidón de maíz pregelatinizado, polivinilpirrolidona o hidroxipropilmetilcelulosa, etc.); rellenos (p. ej., lactosa u otros azúcares, celulosa microcristalina, pectina, gelatina, sulfato de calcio, etilcelulosa, poliácridatos o hidrogenofosfato de calcio, etc.); lubricantes (p. ej., estearato de magnesio, talco, sílice, dióxido de sílice coloidal, ácido esteárico, estearatos metálicos, aceites vegetales hidrogenados, almidón de maíz, polietilenglicoles, benzoato de sodio, acetato de sodio, etc.); desintegrantes (p. ej., almidón, glicolato de almidón sódico, etc.) y agentes humectantes (p. ej., laurilsulfato de sodio, etc.).
- 30 Para formular las composiciones de la presente invención, también se pueden utilizar excipientes orgánicos o inorgánicos farmacéuticamente aceptables adecuados para la administración no parenteral que no reaccionen de forma perjudicial con los ácidos nucleicos. Los portadores farmacéuticamente aceptables adecuados incluyen, sin carácter limitante, agua, soluciones salinas, alcoholes, polietilenglicoles, gelatina, lactosa, amilosa, estearato de magnesio, talco, ácido silícico, parafina viscosa, hidroximetilcelulosa, polivinilpirrolidona y similares.
- 35 Las formulaciones para la administración tópica de los ácidos nucleicos pueden incluir soluciones acuosas estériles y no estériles, soluciones no acuosas en disolventes habituales tales como alcoholes, o soluciones de los ácidos nucleicos en bases oleosas sólidas o líquidas. Las soluciones también pueden contener tampones, diluyentes u otros aditivos adecuados. Se pueden utilizar excipientes orgánicos o inorgánicos farmacéuticamente aceptables adecuados para la administración no parenteral que no reaccionen de forma perjudicial con los ácidos nucleicos.
- 40 Los excipientes farmacéuticamente aceptables adecuados incluyen, sin carácter limitante, agua, soluciones salinas, alcohol, polietilenglicoles, gelatina, lactosa, amilosa, estearato de magnesio, talco, ácido silícico, parafina viscosa, hidroximetilcelulosa, polivinilpirrolidona y similares.

#### Otros componentes

- 45 Las composiciones pueden contener adicionalmente otros componentes adjuntos que se encuentran convencionalmente en las composiciones farmacéuticas, con sus niveles de uso establecidos en la técnica. De este modo, las composiciones pueden contener, por ejemplo, materiales farmacéuticamente activos compatibles adicionales tales como, por ejemplo, agentes antipruríticos, astringentes, anestésicos locales o antiinflamatorios, o pueden contener materiales adicionales útiles a la hora de formular físicamente varias formas farmacéuticas de las composiciones de la presente invención, tales como tintes, agentes saborizantes, conservantes, antioxidantes, opacificantes, agentes espesantes y estabilizantes. Sin embargo, tales materiales, cuando se añaden, no deberían de interferir indebidamente con las actividades biológicas de los componentes de las composiciones de la presente invención. Las formulaciones se pueden esterilizar y, cuando proceda, mezclar con agentes auxiliares, p. ej., lubricantes, conservantes, estabilizantes, agentes humectantes, emulsionantes, sales para ejercer un efecto sobre la presión osmótica, tampones, colorantes, saborizantes y/o sustancias aromáticas y similares, los cuales no interactúan de forma perjudicial con el o los ácidos nucleicos de la formulación.

Las suspensiones acuosas pueden contener sustancias que incrementen la viscosidad de la suspensión, que incluyen, por ejemplo, carboximetilcelulosa de sodio, sorbitol y/o dextrano. La suspensión también puede contener estabilizantes.

5 En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas que se exponen en la invención incluyen (a) uno o más compuestos de ARNi y (b) uno o más agentes biológicos que actúan mediante un mecanismo que no es de iARN. Los ejemplos de tales agentes biológicos incluyen agentes que interfieren con una interacción de ALAS1 y al menos una pareja de unión a ALAS1.

10 La toxicidad y la eficacia terapéutica de tales compuestos se pueden determinar mediante procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos celulares o animales de experimentación, p. ej., para determinar la DL50 (la dosis letal para un 50% de la población) y la DE50 (la dosis terapéuticamente eficaz en un 50% de la población). La proporción de dosis entre los efectos tóxico y terapéutico es el índice terapéutico y se puede expresar como la proporción de DL50/DE50. Es habitual encontrar compuestos que exhiben índices terapéuticos elevados.

15 Los datos obtenidos a partir de ensayos de cultivos celulares y estudios con animales se pueden utilizar para formular una serie de dosis para uso en humanos. La dosis de las composiciones que se exponen en la invención se encuentra generalmente dentro de un intervalo de concentraciones en circulación que incluye la DE50 con una toxicidad baja o nula. La dosis puede variar dentro de este intervalo dependiendo de la forma farmacéutica empleada y la vía de administración utilizada. Para cualquier compuesto utilizado en los métodos que se exponen en la invención, la dosis terapéuticamente eficaz se puede estimar inicialmente a partir de ensayos de cultivo celular. Se puede formular una dosis en modelos con animales para conseguir un intervalo de concentraciones en circulación en plasma del compuesto o, cuando proceda, del producto polipeptídico de una secuencia diana (p. ej., para conseguir una reducción de la concentración del polipéptido) que incluya la CI50 (es decir, la concentración del compuesto de prueba que proporciona una inhibición de los síntomas que es la mitad de la máxima) según se determina en un cultivo celular. Tal información se puede utilizar para determinar con más exactitud las dosis útiles en seres humanos. Los niveles en plasma se pueden medir, por ejemplo, mediante cromatografía líquida de alta resolución.

20

25

Además de su administración, según se ha discutido anteriormente, los ARNi que se exponen en la invención se pueden administrar combinados con otros agentes conocidos eficaces en el tratamiento de enfermedades o trastornos relacionados con la expresión de ALAS1. En cualquier caso, el médico que lo administre puede ajustar la cantidad y los intervalos de tiempo para la administración del ARNi en función de los resultados observados utilizando medidas estándar de la eficacia que se conocen en la técnica o se describen en la presente.

30

### **Métodos para tratar enfermedades relacionadas con la expresión de un gen ALAS1**

La divulgación se refiere en particular al uso de un ARNi que tiene ALAS1 como diana para inhibir la expresión de ALAS1 y/o tratar una enfermedad, trastorno o proceso patológico que se relacione con la expresión de ALAS1.

35 La expresión "un trastorno relacionado con la expresión de ALAS1", un "trastorno relacionado con la expresión de ALAS1", un "proceso patológico relacionado con la expresión de ALAS1" o similares, tal como se utilizan en la presente, incluyen cualquier afección, trastorno o enfermedad en la cual se altera (p. ej., se incrementa) la expresión de ALAS1, se altera (p. ej., se incrementa) el nivel de una o más porfirinas, se altera el nivel o la actividad de una o más enzimas de la vía biosintética del grupo hemo (vía de las porfirinas) u otros mecanismos que produzcan cambios patológicos en la vía biosintética del grupo hemo. Por ejemplo, un ARNi que tenga un gen ALAS1 como diana, o una combinación de estos, se puede utilizar para el tratamiento de afecciones en las cuales los niveles de una porfirina o un precursor de una porfirina (p. ej., ALA o PBG) sean elevados (p. ej. ciertas porfirias) o afecciones en las que existan defectos en las enzimas de la vía biosintética del grupo hemo (p. ej., ciertas porfirias). Los trastornos relacionados con la expresión de ALAS1 incluyen, por ejemplo, anemia sideroblástica relacionada con X (XLSA), porfiria debida a la deficiencia de ALA-deshidratasa (porfiria de Doss), porfiria intermitente aguda (AIP), porfiria eritropoyética congénita, porfiria cutánea tardía, coproporfiria hereditaria (coproporfiria), porfiria variegata, protoporfiria eritropoyética (EPP) y eritroporfiria transitoria de la infancia.

40

45

Un "sujeto", tal como se utiliza en la presente, que se ha de tratar de acuerdo con los métodos descritos en la presente incluye un ser humano o un animal no humano, p. ej., un mamífero. El mamífero puede ser, por ejemplo, un roedor (p. ej., una rata o un ratón) o un primate (p. ej., un mono). En algunas realizaciones, el sujeto es un ser humano.

50

El sujeto puede padecer un trastorno relacionado con la expresión de ALAS1 (p. ej., se le ha diagnosticado una porfiria o ha sufrido uno o más síntomas de porfiria y es portador de una mutación asociada con la porfiria) o corre el riesgo de desarrollar un trastorno relacionado con la expresión de ALAS1 (p. ej., un sujeto con un historial familiar de porfiria o un sujeto que es portador de una mutación genética asociada con la porfiria).

55 Las clasificaciones de las porfirias, incluidas las porfirias hepáticas agudas, se describen, p. ej., en Balwani, M. y Desnick, R.J., Blood, 120(23), publicado en línea como un artículo de la primera edición de Blood, 12 de julio, 102; DOI 10.1182/blood-2012-05-423186. Según describen Balwain y Desnick, la porfiria intermitente aguda, (AIP) la

5 coproporfiria hereditaria (HCP) y la porfiria variegata (VP) son porfirias dominantes autosómicas y la porfiria debida a la deficiencia de ALA- deshidratasa (ADP) es recesiva autosómica. En raras ocasiones, AIP, HCP y VP aparecen como formas dominantes homocigóticas. Además, existe una forma recesiva homocigótica rara de la porfiria cutánea tardía (PCT), que es la única porfiria cutánea hepática, y también se conoce como porfiria hepatoeritropoyética. Las características clínicas y de laboratorio de estas porfirias se describen en la Tabla 11 a continuación.

Tabla 11: Porfirias hepáticas humanas: características clínicas y de laboratorio

Porfiria	Enzima deficiente	Herencia	Síntomas principales, NV o CP	Actividad enzimática, % de la normal	Porfirinas y/o precursores de porfirinas cuyo nivel se ha incrementado*		
					Eritrocitos	Orina	Heces
<b>Porfirias hepáticas agudas</b>							
ADP	ALA-deshidratasa	AR	NV	~5	Zn-protoporfirina	ALA, coproporfirina III	-
AIP	HMB-sintasa	AD	NV	~50	-	ALA, PBG, uroporfirina	-
HCP	COPRO-oxidasa	AD	NV y CP	~50	-	ALA, PBG, coproporfirina III	coproporfirina III
VP	PROTO-oxidasa	AD	NV y CP	~50	-	ALA, PBG, coproporfirina III	coproporfirina III, protoporfirina
<b>Porfirias cutáneas hepáticas</b>							
PCT	URO-descarboxilasa	Esporádica o AD	CP	<20	-	uroporfirina, 7-carboxilato porfirina	uroporfirina, 7-carboxilato porfirina

AR se refiere a autosómica recesiva; AD, autosómica dominante; NV, neurovisceral; CP (por sus siglas en inglés), fotosensibilidad cutánea; y -, no procede.

\*Incrementos que pueden ser importantes para el diagnóstico.

10 Se describe que el sujeto padece o corre el riesgo de desarrollar una porfiria, p. ej., una porfiria hepática, p. ej., AIP, HCP, VP, ADP o una porfiria hepatoeritropoyética.

Se describe que la porfiria es una porfiria hepática aguda, p. ej., una porfiria hepática aguda seleccionada entre porfiria intermitente aguda (AIP), coproporfiria hereditaria (HCP), porfiria variegata (VP) y porfiria debida a la deficiencia de ALA-deshidratasa (ADP).

15 Se describe que la porfiria es una porfiria dual, p. ej., al menos dos porfirias. En algunas realizaciones, la porfiria dual comprende dos o más porfirias seleccionadas entre una porfiria intermitente aguda (AIP), coproporfiria hereditaria (HCP), porfiria variegata (VP) y porfiria debida a la deficiencia de ALA-deshidratasa (ADP).

20 Se describe que la porfiria es una porfiria hepática dominante homocigótica (p. ej., AIP, HCP o VP dominante homocigótica) o una porfiria hepatoeritropoyética. Se describe que la porfiria es AIP, HCP, VP o una porfiria hepatoeritropoyética, o una combinación de estas (p. ej., una porfiria dual). Se describe que la AIP, HCP o VP es o bien dominante heterocigótica o dominante homocigótica.

Se describe que el sujeto padece o corre el riesgo de desarrollar una porfiria, p. ej., ADP y presenta un nivel elevado (p. ej., un nivel elevado en orina) de ALA y/o coproporfirina III. Se describe que el sujeto padece o corre el riesgo de desarrollar una porfiria, p. ej., ADP y presenta un nivel elevado del eritrocito Zn-protoporfirina.

25 Se describe que el sujeto padece o corre el riesgo de desarrollar una porfiria, p. ej., AIP y presenta un nivel elevado (p. ej., un nivel elevado en orina) de ALA, PBG y/o uroporfirina.

30 Se describe que el sujeto padece o corre el riesgo de desarrollar una porfiria, p. ej., HCP y presenta un nivel elevado (p. ej., un nivel elevado en orina) de ALA, PBG, y/o coproporfirina III. Se describe que el sujeto padece o corre el riesgo de desarrollar una porfiria, p. ej., HCP y presenta un nivel elevado (p. ej., un nivel elevado en las heces) de coproporfirina III.

Se describe que el sujeto padece o corre el riesgo de desarrollar una porfiria, p. ej., VP y presenta un nivel elevado (p. ej., un nivel elevado en orina) de ALA, PBG, y/o coproporfirina III.

Se describe que el sujeto padece o corre el riesgo de desarrollar una porfiria, p. ej., HCP y presenta un nivel elevado (p. ej., un nivel elevado en las heces) de coproporfirina III y/o protoporfirina.

35 Se describe que el sujeto padece o corre el riesgo de desarrollar una porfiria, p. ej., PCT (p. ej., porfiria hepatoeritropoyética) y presenta un nivel elevado (p. ej., un nivel elevado en orina) de uroporfirina y/o 7-

carboxilatoporfirina. Se describe que el sujeto padece o corre el riesgo de desarrollar una porfiria, p. ej., PCT (p. ej., porfiria hepatoeritropoyética) y presenta un nivel elevado (p. ej., un nivel elevado en las heces) de uroporfirina y/o 7-carboxilatoporfirina.

5 Una mutación asociada con la porfiria incluye cualquier mutación en un gen que codifique una enzima de la vía biosintética del grupo hemo (vía de las porfirinas) o un gen que altere la expresión de un gen de la vía biosintética del grupo hemo. Se describe que el sujeto es portador de una o más mutaciones en una enzima de la vía de las porfirinas (p. ej., una mutación en ALA-deshidratasa o PBG-desaminasa). Se describe que el sujeto padece una porfiria aguda (p. ej., AIP, porfiria debida a la deficiencia de ALA-deshidratasa).

10 En algunos casos, los pacientes con una porfiria hepática aguda (p. ej., AIP) o pacientes que son portadores de mutaciones asociadas con una porfiria hepática aguda (p. ej., AIP) pero los cuales no presentan síntomas, tienen unos niveles elevados de ALA y/o PBG en comparación con individuos sanos. Remítase, p. ej., a Floderus, Y. et al., *Clinical Chemistry*, 52(4): 701-707, 2006; Sardh et al., *Clinical Pharmacokinetics*, 46(4): 335-349, 2007. En tales casos, el nivel de ALA y/o PBG se puede incrementar incluso cuando el paciente no padece o nunca ha padecido un ataque. En algunos casos de este tipo, el paciente es por lo demás completamente asintomático. En algunos casos de este tipo, el paciente sufre dolor, p. ej., dolor neuropático, el cual puede ser un dolor crónico (p. ej., dolor neuropático crónico). En algunos casos, el paciente padece una neuropatía. En algunos casos, el paciente padece una neuropatía progresiva.

20 Se describe que el sujeto que se ha de tratar de acuerdo con los métodos descritos en la presente tiene un nivel elevado de una porfirina o un precursor de una porfirina, p. ej., ALA y/o PBG. Los niveles de una porfirina o un precursor de una porfirina se pueden evaluar utilizando métodos conocidos en la técnica o métodos que se describen en la presente. Por ejemplo, los métodos para evaluar los niveles de ALA y PBG en orina y en plasma, así como también los niveles de porfirinas en orina y en plasma, se describen en Floderus, Y. et al., *Clinical Chemistry*, 52(4): 701-707, 2006; y Sardh et al., *Clinical Pharmacokinetics*, 46(4): 335-349, 2007, los contenidos completos de los cuales se incorporan a la presente en su totalidad.

25 Se describe que el sujeto es un modelo animal de una porfiria, p. ej., un modelo de ratón de una porfiria (p. ej., un ratón mutado según se describe en Lindberg et al. *Nature Genetics*, 12: 195-199, 1996). Se describe que el sujeto es un ser humano, p. ej., un ser humano que padece o corre el riesgo de desarrollar una porfiria, según se describe en la presente. Se describe que el sujeto no está sufriendo un ataque agudo de porfiria. Se describe que el sujeto nunca ha sufrido un ataque. Se describe que el paciente sufre dolor crónico. Se describe que el paciente presenta daños nerviosos. Se describe que el sujeto presenta cambios en el EMG y/o cambios en la velocidad de conducción nerviosa. En algunas realizaciones, el sujeto no presenta síntomas. Se describe que el sujeto corre el riesgo de desarrollar una porfiria (p. ej., es portador de una mutación génica asociada con una porfiria) y no presenta síntomas. Se describe que el sujeto ha sufrido previamente un ataque agudo pero no presenta síntomas en el momento del tratamiento.

35 Se describe que el sujeto corre el riesgo de desarrollar una porfiria y se trata profilácticamente para prevenir el desarrollo de la porfiria. Se describe que el sujeto presenta un nivel elevado de una porfirina o un precursor de una porfirina, p. ej., ALA y/o PBG. En algunas realizaciones, el tratamiento profiláctico empieza en la pubertad. Se describe que el tratamiento reduce el nivel (p. ej., el nivel en plasma o el nivel en orina) de una porfirina o un precursor de una porfirina, p. ej., ALA y/o PBG. Se describe que el tratamiento previene el desarrollo de un nivel elevado de una porfirina o un precursor de una porfirina, p. ej., ALA y/o PBG. Se describe que el tratamiento previene el desarrollo, o reduce la frecuencia o la gravedad, de un síntoma asociado con una porfiria, p. ej., dolor o daños nerviosos.

45 Se describe que el nivel de una porfirina o un precursor de una porfirina, p. ej., ALA o PBG, es elevado, p. ej., en una muestra de plasma u orina del sujeto. Se describe que el nivel de una porfirina o un precursor de una porfirina, p. ej., ALA o PBG, en el sujeto se evalúa en función del nivel absoluto de la porfirina o el precursor de la porfirina, p. ej., ALA o PBG en una muestra del sujeto. Se describe que el nivel de una porfirina o un precursor de una porfirina, p. ej., ALA o PBG, en el sujeto se evalúa en función del nivel relativo de la porfirina o el precursor de la porfirina, p. ej., ALA o PBG, en una muestra del sujeto. Se describe que el nivel relativo es relativo respecto al nivel de otra proteína o compuesto, p. ej., el nivel de creatinina, en una muestra del sujeto. Se describe que la muestra es una muestra de orina. Se describe que la muestra es una muestra de plasma. Se describe que la muestra es una muestra de las heces.

55 Un nivel elevado de una porfirina o un precursor de una porfirina, p. ej., ALA y/o PBG, se puede establecer, p. ej., mostrando que el sujeto presenta un nivel de una porfirina o un precursor de una porfirina, p. ej., ALA y/o PBG (p. ej., un nivel en plasma u orina de ALA y/o PBG) que sea superior, o superior o igual, a un valor de referencia. Un médico con experiencia en el tratamiento de porfirias sería capaz de determinar si el nivel de una porfirina o un precursor de una porfirina (p. ej., ALA y/o PBG) es elevado, p. ej., con el fin de diagnosticar una porfiria o para determinar si un sujeto corre el riesgo de desarrollar una porfiria, p. ej., un sujeto puede estar predispuesto a sufrir un ataque agudo o una patología asociada con una porfiria tal como, p. ej., dolor crónico (p. ej., dolor neuropático) y una neuropatía (p. ej., una neuropatía progresiva).

- 5 La expresión "valor de referencia", tal como se utiliza en la presente, se refiere a un valor del sujeto cuando el sujeto no padece un estado patológico, o un valor de un sujeto normal o sano, o un valor de una muestra o población de referencia, p. ej., un grupo de sujetos normales o sanos (p. ej., un grupo de sujetos que no son portadores de ninguna mutación asociada con una porfiria y/o un grupo de sujetos que no padecen los síntomas asociados con una porfiria).
- 10 Se describe que el valor de referencia es un nivel previo a la enfermedad en el mismo individuo. En algunas realizaciones, el valor de referencia es un nivel en una muestra o población de referencia. Se describe que el valor de referencia es el valor medio o mediano en una muestra o población de referencia. Se describe que el valor de referencia es el valor que corresponde a dos desviaciones estándar por encima de la media en una muestra o población de referencia. Se describe que el valor de referencia es el valor que corresponde a 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5 o 5 desviaciones estándar por encima de la media en una muestra o población de referencia.
- 15 Se describe que donde el sujeto presenta un nivel elevado de una porfirina o un precursor de una porfirina, p. ej., ALA y/o PBG, el sujeto presenta un nivel de ALA y/o PBG que es al menos un 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% o 90% superior respecto a un valor de referencia. Se describe que el sujeto presenta un nivel de una porfirina o un precursor de una porfirina, p. ej., ALA y/o PBG, que es al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 veces superior respecto a un valor de referencia.
- 20 Se describe que el valor de referencia es un límite de referencia superior. La expresión "límite de referencia superior", tal como se utiliza en la presente, se refiere a un nivel que representa el límite superior del intervalo de confianza del 95% para una muestra o población de referencia, p. ej., un grupo de individuos sanos o normales (p. ej., de origen natural), p. ej., individuos que no son portadores de ninguna mutación genética asociada con una porfiria y/o individuos que no padecen ninguna porfiria. Por consiguiente, un límite de referencia inferior se refiere a un nivel que representa el límite inferior del mismo intervalo de confianza del 95%.
- 25 Cuando el sujeto presenta un nivel elevado, p. ej., un nivel en plasma o un nivel en orina, de una porfirina o un precursor de una porfirina, p. ej., ALA o PBG, el nivel puede ser superior o igual a 2 veces, 3 veces, 4 veces o 5 veces el de un valor de referencia, p. ej., un valor de referencia superior. Se describe que el sujeto presenta un nivel en orina de una porfirina o un precursor de una porfirina, p. ej., ALA o PBG que es superior a 4 veces el de un límite de referencia superior.
- 30 Se describe que el valor de referencia es un valor proporcionado en Floderus, Y. et al., *Clinical Chemistry*, 52(4): 701-707, 2006 o Sardh et al., *Clinical Pharmacokinetics*, 46(4): 335-349, 2007. Se describe que el valor de referencia es un valor proporcionado en la Tabla 1 de Sardh et al.
- 35 Se describe que el sujeto es un ser humano y presenta un nivel de PBG en orina superior o igual a 4.8 mmol/mol de creatinina. Se describe que el sujeto es un ser humano y presenta un nivel de PBG en orina superior a, o superior o igual a, aproximadamente 3, 4, 5, 6, 7 u 8 mmol/mol de creatinina.
- Se describe que el valor de referencia para PBG en plasma es de 0.12  $\mu\text{mol/L}$ . Se describe que el sujeto es un ser humano y presenta un nivel de PBG en plasma superior a, o superior o igual a, 0.10  $\mu\text{mol/L}$ , 0.12  $\mu\text{mol/L}$ , 0.24  $\mu\text{mol/L}$ , 0.36  $\mu\text{mol/L}$ , 0.48  $\mu\text{mol/L}$  o 0.60  $\mu\text{mol/L}$ . Se describe que el sujeto es un ser humano y presenta un nivel de PBG en plasma superior a, o superior o igual a, 0.48  $\mu\text{mol/L}$ .
- 40 Se describe que el valor de referencia para PBG en orina es de 1.2 mmol/mol de creatinina. Se describe que el sujeto es un ser humano y presenta un nivel de PBG en orina superior a, o superior o igual a, 1.0 mmol/mol de creatinina, 1.2 mmol/mol de creatinina, 2.4 mmol/mol de creatinina, 3.6 mmol/mol de creatinina, 4.8 mmol/mol de creatinina o 6.0 mmol/mol de creatinina. Se describe que el sujeto es un ser humano y presenta un nivel de PBG en orina superior a, o superior o igual a, 4.8 mmol/mol de creatinina.
- 45 Se describe que el valor de referencia para ALA en plasma es de 0.12  $\mu\text{mol/L}$ . Se describe que el sujeto es un ser humano y presenta un nivel de ALA en plasma superior a, o superior o igual a, 0.10  $\mu\text{mol/L}$ , 0.12  $\mu\text{mol/L}$ , 0.24  $\mu\text{mol/L}$ , 0.36  $\mu\text{mol/L}$ , 0.48  $\mu\text{mol/L}$  o 0.60  $\mu\text{mol/L}$ . Se describe que el sujeto es un ser humano y presenta un nivel de ALA en plasma superior a, o superior o igual a, 0.48  $\mu\text{mol/L}$ .
- 50 Se describe que el valor de referencia para ALA en orina es de 3.1 mmol/mol de creatinina. Se describe que el sujeto es un ser humano y presenta un nivel de ALA en orina superior a, o superior o igual a, 2.5 mmol/mol de creatinina, 3.1 mmol/mol de creatinina, 6.2 mmol/mol de creatinina, 9.3 mmol/mol de creatinina, 12.4 mmol/mol de creatinina o 15.5 mmol/mol de creatinina.
- 55 Se describe que el valor de referencia para la porfirina en plasma es de 10 nmol/L. Se describe que el sujeto es un ser humano y presenta un nivel de porfirina en plasma superior a, o superior o igual a, 10 nmol/L. Se describe que el sujeto es un ser humano y presenta un nivel de porfirina en plasma superior a, o superior o igual a 8, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50 nmol/L. El sujeto es un ser humano y presenta un nivel de porfirina en plasma superior a, o superior o igual a, 40 nmol/L. Se describe que el valor de referencia para la porfirina en orina es de 25  $\mu\text{mol/mol}$  de creatinina. Se describe que el sujeto es un ser humano y presenta un nivel de porfirina en orina superior a, o

- superior o igual a, 25  $\mu\text{mol/mol}$  de creatinina. Se describe que el sujeto es un ser humano y presenta un nivel de porfirina en orina superior a, o superior o igual a, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75 u 80  $\mu\text{mol/mol}$  de creatinina.
- 5 Se describe que el sujeto presenta un nivel, p. ej., un nivel en plasma o un nivel en orina, de una porfirina o un precursor de una porfirina, p. ej., ALA o PBG, que es superior al de un 99% de los individuos en una muestra de individuos sanos.
- Se describe que el sujeto presenta un nivel, p. ej., un nivel en plasma o un nivel en orina, de ALA o PBG que es superior a dos desviaciones estándar por encima del nivel medio en una muestra de individuos sanos.
- 10 Se describe que el sujeto presenta un nivel de ALA en orina que es 1.6 o más veces el nivel medio en un sujeto normal (p. ej., un sujeto que no es portador de ninguna mutación asociada con una porfiria). Se describe que el sujeto presenta un nivel de ALA en plasma que es 2 o 3 veces el nivel medio en un sujeto normal. Se describe que el sujeto presenta un nivel de PBG en orina que es cuatro o más veces el nivel medio en un sujeto normal. Se describe que el sujeto presenta un nivel de PBG en plasma que es cuatro o más veces el nivel medio en un sujeto normal.
- 15 Se describe que el método es eficaz para reducir el nivel de una porfirina o un precursor de una porfirina, p. ej., ALA y/o PBG. Se describe que el método es eficaz para producir una reducción predeterminada en el nivel elevado de la porfirina o el precursor de la porfirina, p. ej., ALA o PBG. Se describe que la reducción predeterminada es una reducción de al menos un 10%, 20%, 30%, 40% o 50%. Se describe que la reducción predeterminada es una reducción que es eficaz para prevenir o mejorar los síntomas, p. ej., el dolor o ataques recurrentes.
- 20 Se describe que la reducción predeterminada es una reducción que corresponde a 1, 2, 3 o más desviaciones estándar, donde la desviación estándar se determina en función de los valores de una muestra de referencia, p. ej., una muestra de referencia según se describe en la presente.
- Se describe que la reducción predeterminada es una reducción que modifica el nivel de la porfirina o el precursor de la porfirina hasta un nivel que es inferior a, o hasta un nivel que es inferior o igual a, un valor de referencia (p. ej., un valor de referencia según se describe en la presente).
- 25 Se describe que el sujeto que se ha de tratar de acuerdo con los métodos descritos sufre dolor, p. ej., dolor crónico. Se describe que el sujeto padece o corre el riesgo de desarrollar una porfiria, p. ej., una porfiria hepática aguda, p. ej., AIP. Se describe que el método es eficaz para tratar el dolor, p. ej., mediante la reducción de la intensidad del dolor o curando el dolor. Se describe que el método es eficaz para reducir o prevenir daños nerviosos.
- 30 Se describe que el sujeto que se ha de tratar de acuerdo con los métodos descritos en la presente
- (a) presenta un nivel elevado de ALA y/o PBG y (b) sufre dolor, p. ej., dolor crónico. En algunas realizaciones, el método es eficaz para reducir un nivel elevado de ALA y/o PBG y/o para tratar el dolor, p. ej., mediante la reducción de la intensidad del dolor o curando el dolor.
- 35 Se describe que el sujeto es un mamífero que sirve como modelo para un trastorno relacionado con la expresión de ALAS1.
- Se describe que el sujeto es un animal que sirve como modelo para una porfiria (p. ej., un animal modificado genéticamente con una o más mutaciones). Se describe que la porfiria es AIP y el sujeto es un modelo animal de AIP. Se describe que el sujeto es un ratón modificado genéticamente que es deficiente en porfobilinógeno-desaminasa tal como, por ejemplo, el ratón descrito en Lindberg *et al.*, *Nature Genetics*, 12:195-199, 1996, o el ratón R167Q homocigótico descrito en Yasuda, M., Yu, C. Zhang, J., Clavero, S., Edelmann, W., Gan, L., Phillips, J.D. y Desnick, R.J. *Acute intermittent porphyria: A severely affected knock-in mouse that mimics the human homozygous dominant phenotype* (resumen de la presentación del 14 de octubre de 2011 en el Congreso *American Society of Human Genetics*; Programa N.º 1308F; al cual se accedió en línea el 4 de abril de 2012 en [ichg2011.org/cgi-bin/showdetail.pl?absno=21167](http://ichg2011.org/cgi-bin/showdetail.pl?absno=21167)); estas dos referencias se incorporan a la presente en su totalidad. Se han generado
- 40 varios modelos de activación para mutaciones que provocan AIP dominante homocigótica en seres humanos. Las mutaciones empleadas incluyen, p. ej., R167Q, R173Q y R173W en la PBG-desaminasa. Los casos homocigóticos viables incluyeron R167Q/R176Q y R167Q/R173Q, los cuales presentan niveles de ALA y PBG constitutivamente elevados análogos a los del genotipo en AIP dominante homocigótica en seres humanos; un modelo de ratón de AIP homocigótica variable de este tipo puede ser el sujeto.
- 45 Se describe que un sujeto que se ha de tratar de acuerdo con los métodos descritos en la presente (p. ej., un paciente o sujeto humano) corre el riesgo de desarrollar, o se le ha diagnosticado, un trastorno relacionado con la expresión de ALAS1, p. ej., una porfiria. Se describe que el sujeto es un sujeto que ha padecido uno o más ataques agudos de uno o más síntomas porfíricos. Se describe que el sujeto es un sujeto que ha padecido crónicamente uno o más síntomas de porfiria (p. ej., dolor, p. ej., dolor neuropático y/o una neuropatía, p. ej., una neuropatía
- 50 progresiva). Se describe que el sujeto es portador de una alteración genética (p. ej., una mutación) según se
- 55

describe en la presente, pero por lo demás no presenta síntomas. Se describe que el sujeto ha sido tratado previamente con un producto de tipo hemo (p. ej., hemina, arginato de hemo o albúmina que contiene hemo), según se describe en la presente.

5 Se describe que un sujeto (p. ej., un sujeto con una porfiria tal como, p. ej., AIP) que se ha de tratar de acuerdo con los métodos descritos en la presente ha experimentado recientemente o está experimentando actualmente un pródromo. Se describe que se administra al sujeto un tratamiento combinado, p. ej., un ARNi según se describe en la presente y uno o más tratamientos adicionales que se sabe que son eficaces contra la porfiria (p. ej., glucosa y/o un producto de tipo hemo tal como la hemina, según se describe en la presente) o sus síntomas asociados.

10 Se describe que un ARNi según se describe en la presente se administra combinado con glucosa o dextrosa. Por ejemplo, se puede proporcionar dextrosa al 10-20% en solución salina normal por vía intravenosa. Normalmente, cuando se administra glucosa, se administran al menos 300 g de glucosa al 10% por vía intravenosa diariamente. El ARNi (p. ej., un ARNi en una formulación LNP) también se puede administrar por vía intravenosa como parte de la misma infusión que se utiliza para administrar la glucosa o dextrosa, o como una infusión separada que se administra antes, después o de forma simultánea a la administración de la glucosa o dextrosa. Se describe que el  
15 ARNi se administra mediante una vía de administración diferente (p. ej., subcutáneamente). Se describe que el ARNi se administra combinado con nutrición parenteral total. El ARNi se puede administrar antes, después o de forma simultánea con la administración de nutrición parenteral total.

20 Se describe que el ARNi se administra combinado con un producto de tipo hemo (p. ej., hemina, arginato de hemo o albúmina que contiene hemo). Se describe que el ARNi se administra combinado con un producto de tipo hemo y glucosa, un producto de tipo hemo y dextrosa o un producto de tipo hemo y nutrición parenteral total.

Un "pródromo", tal como se utiliza en la presente, incluye cualquier síntoma que el sujeto individual haya experimentado previamente justo antes de desarrollar un ataque agudo. Los síntomas típicos de un pródromo incluyen, p. ej., dolor abdominal, náusea, cefaleas, síntomas psicológicos (p. ej., ansiedad), inquietud y/o insomnio. Se describe que el sujeto experimenta dolor (p. ej., dolor abdominal y/o una cefalea) durante el pródromo. Se describe que el sujeto experimenta náusea durante el pródromo. Se describe que el sujeto experimenta síntomas psicológicos (p. ej., ansiedad) durante el pródromo. Se describe que el sujeto se vuelve inquieto y/o padece insomnio durante el pródromo.

30 Un "ataque" agudo de porfiria implica el inicio de uno o más síntomas de porfiria, normalmente en un paciente que es portador de una mutación asociada con la porfiria (p. ej., una mutación en un gen que codifica una enzima de la vía de las porfirinas).

Se describe que la administración de un ARNi de ALAS1 provoca una reducción del nivel de una o más porfirinas o precursores de porfirinas, según se describe en la presente (p. ej., ALA y/o PBG). La reducción se puede medir con relación a cualquier valor de referencia o control adecuado. Por ejemplo, la reducción del nivel de una o más porfirinas o precursores de porfirinas se puede establecer en un sujeto individual, p. ej., como una reducción de al  
35 menos un 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50% o más en comparación con el nivel previo al tratamiento (p. ej., inmediatamente antes del tratamiento). La reducción del nivel de un precursor de una porfirina, una porfirina o un metabolito de una porfirina se puede medir utilizando cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, el nivel de PBG y/o ALA en orina o plasma se puede evaluar utilizando la prueba de Watson-Schwartz, cromatografía de intercambio iónico o cromatografía líquida de alta resolución-espectrometría de masas. Remítase,  
40 p. ej., a Thunell (1993).

Se describe que la administración de un ARNi de ALAS1 es eficaz para reducir el nivel de ALA y/o PBG en el sujeto. El nivel de ALA o PBG en el sujeto se puede evaluar, p. ej., basándose en el nivel absoluto de ALA o PBG, o basándose en el nivel relativo de ALA o PBG (p. ej., relativo respecto al nivel de otra proteína o compuesto, p. ej., el nivel de creatinina) en una muestra del sujeto. En algunas realizaciones, la muestra es una muestra de orina. En  
45 algunas realizaciones, la muestra es una muestra de plasma.

Se describe que un ARNi que tiene ALAS1 como diana se administra combinado con uno o más tratamientos adicionales, p. ej., otro tratamiento que se sabe que es eficaz para tratar la porfiria o síntomas de la porfirina. Por ejemplo, el otro tratamiento puede ser glucosa (p. ej., glucosa IV) o un producto de tipo hemo (p. ej., hemina, arginato de hemo o albúmina que contiene hemo). El o los tratamientos adicionales se pueden administrar antes,  
50 después o de forma simultánea con la administración del ARNi.

El ARNi y un agente terapéutico adicional se pueden administrar combinados en la misma composición, p. ej., por vía intravenosa, o el agente terapéutico adicional se puede administrar como parte de una composición separada o mediante otro método descrito en la presente.

55 Se describe que la administración de ARNi o la administración de ARNi combinado con uno o más tratamientos adicionales (p. ej., glucosa, dextrosa o similares) reduce la frecuencia de ataques agudos (p. ej., mediante la prevención de los ataques agudos de modo que ya no se produzcan, o mediante la reducción del número de ataques que se producen en un cierto periodo de tiempo, p. ej., se producen menos ataques por año). En algunas

realizaciones, el ARNi se administra de acuerdo con una pauta posológica regular, p. ej., diariamente, semanalmente, cada dos semanas o mensualmente.

5 Se describe que el ARNi se administra después de un ataque agudo de porfiria. En algunas realizaciones de este tipo, el ARNi se encuentra en una composición, p. ej., una composición que comprende una formulación lipídica, p. ej., una formulación LNP.

Se describe que el ARNi se administra durante un ataque agudo de porfiria. En algunas realizaciones de este tipo, el ARNi se encuentra en una composición, p. ej., una composición que comprende una formulación lipídica (p. ej., una formulación LNP) o una composición que comprende un conjugado de tipo GalNAc.

10 Se describe que la administración de un ARNip de ALAS1 es eficaz para reducir la gravedad del ataque (p. ej., mejora uno o más signos o síntomas asociados con el ataque). Se describe que la administración de un ARNip de ALAS1 es eficaz para reducir la duración de un ataque. Se describe que la administración de un ARNip de ALAS1 es eficaz para detener un ataque. Se describe que el ARNi se administra profilácticamente para prevenir un ataque agudo de porfiria. Se describe que el ARNi se encuentra en la forma de un conjugado de tipo GalNAc, p. ej., en una composición que comprende un conjugado de tipo GalNAc. Se describe que la administración profiláctica se lleva a cabo antes, durante o después de la exposición a un factor precipitante o la aparición de este. Se describe que el sujeto corre el riesgo de desarrollar una porfiria.

Se describe que el ARNip se administra durante un pródromo. Se describe que el pródromo se caracteriza por dolor (p. ej., cefalea y/o dolor abdominal), náusea, síntomas psicológicos (p. ej., ansiedad), inquietud y/o insomnio.

20 Se describe que el ARNi se administra durante una fase particular del ciclo menstrual, p. ej., durante la fase luteínica.

25 Se describe que la administración de un ARNip de ALAS1 es eficaz para prevenir ataques (p. ej., ataques recurrentes que se asocian con un pródromo y/o con un factor precipitante, p. ej., con una fase particular del ciclo menstrual, p. ej., la fase luteínica). Se describe que la administración de un ARNip de ALAS1 es eficaz para reducir la frecuencia de los ataques. En algunas realizaciones, la administración de un ARNip de ALAS1 es eficaz para reducir la gravedad del ataque (p. ej., mejora uno o más signos o síntomas asociados con el ataque). Se describe que la administración de un ARNip de ALAS1 es eficaz para reducir la duración de un ataque. Se describe que la administración de un ARNip de ALAS1 es eficaz para detener un ataque.

Se describe que la administración de un ARNip de ALAS1 es eficaz para prevenir o reducir la frecuencia o la intensidad del dolor, p. ej., el dolor neuropático.

30 Se describe que la administración de un ARNip de ALAS1 es eficaz para prevenir o reducir la frecuencia o la intensidad de una neuropatía.

35 Los efectos de la administración de un ARNip de ALAS1 se pueden establecer, por ejemplo, por comparación con un control adecuado. Por ejemplo, se puede establecer una reducción de la frecuencia de los ataques agudos, así como también una reducción del nivel de una o más porfirinas o precursores de porfirinas, por ejemplo, en un grupo de pacientes con AIP, como una reducción de la frecuencia en comparación con un grupo de control adecuado. Un grupo de control (p. ej., un grupo de individuos similares o el mismo grupo de individuos en un diseño cruzado) puede incluir, por ejemplo, una población no tratada, una población que ha sido tratada con un tratamiento convencional para la porfiria (p. ej., un tratamiento convencional para AIP puede incluir glucosa, hemina o ambas); una población que ha sido tratada con placebo o un ARNi sin diana, opcionalmente combinado con uno o más tratamientos convencionales para la porfiria (p. ej., glucosa, p. ej., glucosa IV) y similares.

40 Un sujeto "que corre el riesgo" de desarrollar una porfiria, tal como se utiliza en la presente, incluye un sujeto con un historial familiar de porfiria y/o un historial de uno o más síntomas porfíricos recurrentes o crónicos, y/o un sujeto que es portador de una alteración genética (p. ej., una mutación) en un gen que codifica una enzima de la vía biosintética del grupo hemo, y un sujeto que es portador de una alteración genética, p. ej., una mutación que se sabe que está asociada con la porfiria.

45 Se describe que la alteración, p. ej., la mutación hace que el individuo sea susceptible de padecer un ataque agudo (p. ej., tras la exposición a un factor precipitante, p. ej., un fármaco, el seguimiento de un régimen u otro factor precipitante, p. ej., un factor precipitante como los que se describen en la presente). Se describe que la alteración, p. ej., la mutación, se asocia con unos niveles elevados de una porfirina o un precursor de una porfirina (p. ej., ALA y/o PBG). Se describe que la alteración, p. ej., la mutación, se asocia con dolor crónico (p. ej., dolor neuropático crónico) y/o una neuropatía (p. ej., una neuropatía progresiva). Se describe que la alteración, p. ej., la mutación, se asocia con cambios en el EMG y/o en las velocidades de conducción nerviosa.

Se describe que la alteración es una mutación en el gen ALAS1. Se describe que la alteración es una mutación en el promotor del gen ALAS1 o en regiones en dirección 5' o dirección 3' del gen ALAS1. Se describe que la alteración es

una mutación en factores de transcripción u otros genes que interaccionan con ALAS1. Se describe que la alteración es una alteración, p. ej., una mutación, en un gen que codifica una enzima en la vía biosintética del grupo hemo.

5 Se describe que el sujeto tiene una alteración genética según se describe en la presente (p. ej., una mutación genética que se sabe que está asociada con una porfiria). Se describe que el sujeto presenta un nivel elevado (p. ej., nivel en orina o plasma) de ALA y/o PBG. Se describe que el sujeto no presenta un nivel elevado de ALA y/o PBG. Se describe que el sujeto tiene una alteración genética según se describe en la presente y presenta otros síntomas, p. ej., dolor crónico, cambios en el EMG, cambios en la velocidad de conducción nerviosa y/u otros síntomas asociados con una porfiria. Se describe que el sujeto tiene una alteración genética pero no padece ataques agudos.

Se describe que el sujeto tiene una mutación asociada con AIP, HCP, VP o ADP.

10 Se describe que la porfiria es AIP. Se describe que el sujeto tiene una alteración, p. ej., al menos una mutación, en el gen de la PBG-desaminasa. En la técnica se conocen muchas mutaciones de la PBG-desaminasa, por ejemplo, según se describe en Hrdinka, M. et al. *Physiological Research*, 55 (Supl. 2):S119-136 (2006). Se describe que el sujeto es heterocigótico respecto a una mutación de la PBG-desaminasa. Se describe que el sujeto es homocigótico respecto a una mutación de la PBG-desaminasa. Un sujeto homocigótico puede ser portador de dos mutaciones idénticas o dos mutaciones diferentes en el gen de la PBG-desaminasa.

15 Se describe que la porfiria es HCP. Se describe que el sujeto tiene una alteración, p. ej., al menos una mutación, en el gen que codifica la enzima coproporfirinógeno III-oxidasa.

Se describe que la porfiria es VP. Se describe que el sujeto tiene una alteración, p. ej., al menos una mutación, en el gen que codifica la protoporfirinógeno-oxidasa.

20 Se describe que la porfiria es ADP, p. ej., ADP recesiva autosómica. Se describe que el sujeto tiene una alteración, p. ej., al menos una mutación, en el gen que codifica la ALA-deshidratasa.

25 Los métodos de tratamiento que se proporcionan en la presente pueden servir para mejorar uno o más síntomas asociados con una porfiria, para reducir la frecuencia de los ataques asociados con la porfiria, para reducir la probabilidad de que se produzca un ataque de uno o más síntomas asociados con la porfiria tras la exposición a un factor precipitante o para reducir el riesgo de desarrollar afecciones asociadas con la porfiria (p. ej., una neuropatía (p. ej., una neuropatía progresiva), un cáncer hepatocelular). Además, los métodos que se proporcionan en la presente pueden servir para reducir el nivel de uno o más precursores de porfirinas, porfirinas y/o productos o metabolitos relacionados con las porfirinas. El nivel de una porfirina o un precursor de una porfirina se puede medir en cualquier muestra biológica tal como, p. ej., orina, sangre, heces, fluido cerebroespinal o una muestra tisular. La muestra puede estar presente dentro de un sujeto o se puede obtener o extraer a partir del sujeto. Se describe que la porfiria es AIP y se reduce el nivel de PBG y/o ALA. Se describe que el producto o metabolito de la porfirina es porfobilina, porfobilinógeno o uroporfirina. La reducción del nivel de un producto o metabolito de una porfirina se puede medir utilizando cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, el nivel de PBG y/o ALA en orina o plasma se puede evaluar utilizando la prueba de Watson-Schwartz, cromatografía de intercambio iónico o cromatografía líquida de alta resolución-espectrometría de masas. Remítase, p. ej., a Thunell (1993).

35 Los métodos descritos en la presente también pueden servir para reducir niveles crónicamente elevados de precursores de porfirinas (p. ej. ALA y/o PBG) en sujetos que padecen una porfiria (p. ej., una porfiria hepática aguda, p. ej., AIP) o que corren el riesgo de desarrollar una porfiria. Los métodos para evaluar los niveles en plasma y orina (p. ej., niveles crónicamente elevados) de precursores de porfirinas incluyen, p. ej., HPLC-espectrometría de masas y cromatografía de intercambio iónico. Los niveles de precursores de porfirinas se pueden expresar como el nivel relativo respecto a otra proteína o compuesto, p. ej., la creatinina. Remítase, p. ej., a Floderus, Y. et al., *Clinical Chemistry*, 52(4): 701-707, 2006; Sardh et al., *Clinical Pharmacokinetics*, 46(4): 335-349, 2007.

45 Un "factor precipitante", tal como se utiliza en la presente, se refiere a un factor endógeno o exógeno que puede inducir un ataque agudo de uno o más síntomas asociados con una porfiria. Los factores precipitantes incluyen ayuno (u otras formas de ingesta calórica reducida o inadecuada, debido a dietas extremas, atletismo de fondo, etc.), estrés metabólico (p. ej., infecciones, cirugía, viajes aéreos internacionales y estrés psicológico), hormonas endógenas (p. ej., progesterona), fumar cigarrillos, agentes químicos exógenos liposolubles (que incluyen, p. ej., agentes químicos presentes en el humo del tabaco, ciertos fármacos recetados, disolventes orgánicos, biocidas, componentes de bebidas alcohólicas), factores endocrinos (p. ej., hormonas reproductivas (las mujeres pueden experimentar exacerbaciones durante el periodo premenstrual), estrógenos sintéticos, progesteronas, estimulantes de la ovulación y terapia de reemplazo hormonal). Remítase, por ejemplo, a Thunell (1993). Los factores precipitantes comunes incluyen fármacos que inducen el citocromo P450 y fenobarbital.

55 Los síntomas asociados con una porfiria pueden incluir dolor o calambres abdominales, cefaleas, efectos provocados por anomalías del sistema nervioso y sensibilidad a la luz, que provoca sarpullidos, ampollas y aparición de cicatrices en la piel (fotodermatitis). Se describe que la porfiria es AIP. Los síntomas de la AIP incluyen síntomas gastrointestinales (p. ej., dolor abdominal intenso y poco localizado, náusea/vómitos, estreñimiento, diarrea, íleo), síntomas urinarios (disuria, retención/incontinencia urinaria u orina oscura), síntomas neurológicos (p. ej., neuropatía

5 sensorial, neuropatía motriz (p. ej., que afecta a los nervios craneales y/o que provoca debilidad en los brazos o las piernas), convulsiones, dolor neuropático, neuropatía progresiva, cefaleas, síntomas neuropsiquiátricos (p. ej., confusión mental, ansiedad, agitación, alucinación, histeria, delirio, apatía, depresión, fobias, psicosis, insomnio, somnolencia, coma), participación del sistema nervioso autónomo (que provoca, p. ej., síntomas cardiovasculares tales como taquicardia, hipertensión y/o arritmias, así como también otros síntomas tales como, p. ej., un incremento de los niveles de catecolamina en circulación, sudoración, inquietud y/o temblores), deshidratación y anomalías electrolíticas.

10 Se describe que se administra un ARNi que tiene ALAS1 como diana junto con (p. ej., antes, después o de forma simultánea) otro tratamiento que pueda servir para aliviar uno o más de los síntomas anteriores. Por ejemplo, el dolor abdominal se puede tratar, p. ej., con analgésicos narcóticos, las convulsiones se pueden tratar, p. ej., con medicamentos contra las convulsiones, las náuseas/vómitos se pueden tratar, p. ej., con fenotiazinas y la taquicardia/hipertensión se puede tratar, p. ej., con bloqueadores beta.

15 Se pretende que el término "reducir" (o "incrementar") se refiera a un cambio medible, p. ej., un cambio estadísticamente significativo. El cambio puede ser, por ejemplo, un cambio de al menos un 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50% o más (p. ej., reducción (o incremento) respecto a un valor de referencia, p. ej., una referencia en la que no se proporcione ARNi).

20 La divulgación se refiere además al uso de un ARNi o una composición farmacéutica de este, p. ej., para tratar un trastorno relacionado con la expresión de ALAS1, combinado con otros agentes farmacéuticos y/u otros métodos terapéuticos, p. ej., con agentes terapéuticos conocidos y/o métodos terapéuticos conocidos tales como, por ejemplo, los que se emplean actualmente para tratar el trastorno. Se describe que el ARNi o la composición farmacéutica de este se puede administrar junto con un producto de tipo hemo (p. ej., hemina, arginato de hemo o albúmina que contiene hemo, según se describe en la presente) y/o junto con infusiones intravenosas de glucosa. En algunas realizaciones, el ARNi o la composición farmacéutica de este se utiliza profilácticamente, p. ej., para prevenir o mejorar los síntomas de un ataque anticipado de porfiria aguda. El uso profiláctico se puede hacer coincidir con la exposición o exposición anticipada del sujeto a un factor precipitante. Un factor precipitante, según se describe en la presente, puede ser cualquier factor endógeno o exógeno que se sepa que precipita un ataque agudo. Por ejemplo, la fase premenstrual es un factor precipitante endógeno y un fármaco que induce el citocromo P450 es un factor precipitante exógeno.

30 La cantidad eficaz para el tratamiento del trastorno relacionado con la expresión de ALAS1 (p. ej., una porfiria tal como AIP) depende del tipo de trastorno que se ha de tratar, la gravedad de los síntomas, el sujeto que se esté tratando, el sexo, la edad, el estado de salud general del sujeto, la vía de administración, etc. Para cualquier caso dado, un experto en la técnica podrá determinar la "cantidad eficaz" adecuada utilizando experimentación rutinaria. La monitorización de la eficacia del tratamiento o la prevención se encuentra dentro de las competencias de un experto en la técnica y se lleva a cabo midiendo cualquiera de tales parámetros o cualquier combinación de parámetros. En relación con la administración de un ARNi que tiene ALAS1 como diana o una composición farmacéutica de este, la expresión "eficaz contra" un trastorno relacionado con la expresión de ALAS1 indica que la administración de un modo clínicamente adecuado provoca un efecto beneficioso, p. ej., para un paciente individual o para al menos una fracción de los pacientes, p. ej., una fracción estadísticamente significativa de los pacientes. Los efectos beneficiosos incluyen, p. ej., la prevención o la reducción de los síntomas u otros efectos. Por ejemplo, los efectos beneficiosos incluyen, p. ej., una mejora (p. ej., reducción de la gravedad o la frecuencia) de los síntomas, una reducción de la gravedad o la frecuencia de los ataques, un menor riesgo de desarrollar una enfermedad asociada (p. ej., una neuropatía (p. ej., una neuropatía progresiva), cáncer hepatocelular), una capacidad mejorada para tolerar un factor precipitante, una mejora en la calidad de vida, una reducción de la expresión de ALAS1, una reducción del nivel (p. ej., el nivel en plasma u orina) de una porfirina o un precursor de una porfirina (p. ej., ALA y/o PBG) u otro efecto que sea reconocido en general como positivo por los doctores médicos familiares con el tratamiento del tipo particular de trastorno.

50 Un efecto del tratamiento o la prevención se pone de manifiesto cuando se produce una mejora, p. ej., una mejora estadísticamente significativa en uno o más parámetros del estado patológico, o porque no empeoran o no se desarrollan síntomas que de otro modo cabría anticipar. A modo de ejemplo, un cambio favorable de al menos un 10% en un parámetro medible de la enfermedad, p. ej., de al menos un 20%, 30%, 40%, 50% o más, puede ser indicativo de un tratamiento eficaz. La eficacia de un fármaco de ARNi determinado o una formulación de este fármaco también se puede juzgar utilizando un modelo animal experimental para la enfermedad determinada según se conoce en la técnica. Cuando se utiliza un modelo animal experimental, la eficacia del tratamiento se pone de manifiesto cuando se observa una reducción estadísticamente significativa de un marcador (p. ej., ALA o PBG en plasma u orina) o síntoma.

55 Se puede administrar una cantidad terapéutica de ARNi a los pacientes. La cantidad terapéutica puede ser, p. ej., de 0.05-50 mg/kg. Por ejemplo, la cantidad terapéutica puede ser de 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0, 1.5, 2.0 o 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50 mg/kg de ARNbc.

60 Se describe que el ARNi se formula como una formulación lipídica, p. ej., una formulación LNP según se describe en la presente. Se describe que la cantidad terapéutica es de 0.05-5 mg/kg, p. ej., de 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6,

0.7, 0.8, 0.9, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5 o 5.0 mg/kg de ARNbc. Se describe que la formulación lipídica, p. ej., una formulación LNP, se administra por vía intravenosa.

Se describe que el ARNi se administra mediante una infusión intravenosa durante un periodo de tiempo tal como durante un periodo de 5 minutos, 10 minutos, 15 minutos, 20 minutos o 25 minutos.

5 Se describe que el ARNi se encuentra en forma de un conjugado de tipo GalNAc según se describe en la presente. Se describe que la cantidad terapéutica es de 0.5-50 mg, p. ej., de 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50 mg/kg de ARNbc. Se describe que el conjugado de tipo GalNAc se administra por vía subcutánea.

10 Se describe que la administración se repite, por ejemplo, de forma regular, tal como diariamente, cada dos semanas durante un mes, dos meses, tres meses, cuatro meses o más. Después de un régimen de tratamiento inicial, los tratamientos se pueden administrar con menos frecuencia. Por ejemplo, después de la administración cada dos semanas durante tres meses, la administración se puede repetir una vez al mes durante seis meses o un año o más.

15 Se describe que el agente de ARNi se administra en dos o más dosis. Se describe que el número o la cantidad de dosis posteriores depende de la obtención del efecto deseado, p. ej., la supresión de un gen ALAS, la reducción del nivel de una porfirina o un precursor de una porfirina (p. ej., ALA y/o PBG), o la obtención de un efecto terapéutico o profiláctico, p. ej., la reducción o la prevención de uno o más síntomas asociados con una porfiria (p. ej., dolor, p. ej., dolor neuropático) y/o la prevención de ataques o la reducción de la frecuencia y/o la gravedad de los ataques asociados con una porfiria.

20 Se describe que el agente de ARNi se administra siguiendo un programa. Por ejemplo, el agente de ARNi se puede administrar una vez por semana, dos veces por semana, tres veces por semana, cuatro veces por semana o cinco veces por semana. Se describe que el programa implica administraciones espaciadas de forma regular, p. ej., cada hora, cada cuatro horas, cada seis horas, cada ocho horas, cada doce horas, diariamente, cada 2 días, cada 3 días, cada 4 días, cada 5 días, semanalmente, una vez cada dos semanas o mensualmente. Se describe que el agente de ARNi se administra semanalmente o cada dos semanas para conseguir un efecto deseado, p. ej., para reducir el nivel de ALA y/o PBG, para reducir el dolor y/o para prevenir ataques agudos.

30 Se describe que el programa implica administraciones poco espaciadas seguidas por un periodo de tiempo más prolongado durante el cual no se administra el agente. Por ejemplo, el programa puede implicar un conjunto inicial de dosis que se administran en un periodo de tiempo relativamente corto (p. ej., aproximadamente cada 6 horas, aproximadamente cada 12 horas, aproximadamente cada 24 horas, aproximadamente cada 48 horas o aproximadamente cada 72 horas) seguido de un periodo de tiempo más prolongado (p. ej., aproximadamente 1 semana, aproximadamente 2 semanas, aproximadamente 3 semanas, aproximadamente 4 semanas, aproximadamente 5 semanas, aproximadamente 6 semanas, aproximadamente 7 semanas o aproximadamente 8 semanas) durante el cual no se administra el agente de ARNi. Se describe que el agente de ARNi se administra inicialmente cada hora y posteriormente se administra en un intervalo más prolongado (p. ej., diariamente, semanalmente, cada dos semanas o mensualmente). Se describe que el agente de ARNi se administra inicialmente de forma diaria y posteriormente se administra en un intervalo más prolongado (p. ej., semanalmente, cada dos semanas o mensualmente). Se describe que el intervalo más prolongado aumenta con el tiempo o se determina en función de la obtención del efecto deseado. Se describe que el agente de ARNi se administra una vez al día durante un ataque agudo y a continuación se administran dosis semanalmente empezando en el octavo día de administración. Se describe que el agente de ARNi se administra una vez cada dos días durante una primera semana y a continuación se administran dosis semanalmente empezando en el octavo día de administración.

45 Se describe que el agente de ARNi se administra para prevenir o reducir la gravedad o la frecuencia de ataques recurrentes, p. ej., ataques cíclicos asociados con un factor precipitante. En algunas realizaciones, el factor precipitante es el ciclo menstrual. Se describe que el ARNi se administra de forma repetida, p. ej., en intervalos regulares para prevenir o reducir la gravedad o la frecuencia de ataques recurrentes, p. ej., ataques cíclicos asociados con un factor precipitante, p. ej., el ciclo menstrual, p. ej., una fase particular del ciclo menstrual, p. ej., la fase luteínica. En algunas realizaciones, el ARNi se administra durante una fase particular del ciclo menstrual o en función de los niveles hormonales del paciente que se esté tratando (p. ej., en función de los niveles hormonales que se asocian con una fase particular del ciclo menstrual). Se describe que el ARNi se administra en uno o más días particulares del ciclo menstrual, p. ej., en el día 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 o en el día 28 (o en un día posterior para sujetos que tienen un ciclo menstrual más prolongado). Se describe que el ARNi se administra durante la fase luteínica, p. ej., en uno o más días entre los días 14-28 del ciclo menstrual (o posteriormente en sujetos que tienen un ciclo menstrual de más de 28 días). Se describe que se evalúa la ovulación del sujeto (p. ej., utilizando una prueba en sangre u orina que detecta una hormona asociada con la ovulación, p. ej., LH) y el ARNi se administra en un intervalo predeterminado después de la ovulación. Se describe que el ARNi se administra inmediatamente después de la ovulación. En algunas realizaciones, el ARNi se administra 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 o 18 días después de la ovulación. Cualquiera de estos programas se puede repetir opcionalmente durante una o más iteraciones. El número de iteraciones puede depender de la obtención del efecto deseado, p. ej., la supresión de un gen ALAS1 y/o la

obtención de un efecto terapéutico o profiláctico, p. ej., reducir o prevenir uno o más síntomas asociados con una porfiria, para reducir la frecuencia de los ataques asociados con una porfiria.

5 Se describe que se administra una dosis inicial del agente de ARNi y se evalúa el nivel de ALA o PBG, p. ej., 1-48 horas, p. ej., 2, 4, 8, 12 o 24 horas después de la administración de la dosis inicial. Se describe que si el nivel de ALA y/o PBG se ha reducido (p. ej. hasta conseguir una reducción predeterminada, p. ej., una normalización) y/o si los síntomas asociados con una porfiria (p. ej., dolor) han mejorado (p. ej., de manera que el paciente no presente síntomas), no se administra ninguna dosis adicional, mientras que si el nivel de ALA y/o PBG no se ha reducido (p. ej., no ha alcanzado una reducción predeterminada, p. ej., no se ha normalizado), se administra una dosis adicional de ALA o PBG. Se describe que la dosis adicional se administra 12, 24, 36, 48, 60 o 72 horas después de la dosis inicial. Se describe que si la dosis inicial no es eficaz para reducir el nivel de ALA y/o PBG, la dosis adicional se modifica, p. ej., se incrementa para alcanzar una reducción deseada (p. ej., una reducción predeterminada, p. ej., una normalización) de los niveles de ALA o PBG.

10 Se describe que la reducción predeterminada es una reducción de al menos un 10%, 20%, 30%, 40% o 50%. Se describe que la reducción predeterminada es una reducción que es eficaz para prevenir o mejorar los síntomas, p. ej., el dolor, síntomas prodrómicos o ataques recurrentes.

15 Se describe que la reducción predeterminada es una reducción que corresponde a al menos 1, 2, 3 o más desviaciones estándar, donde la desviación estándar se determina en función de los valores de una muestra de referencia, p. ej., una muestra de referencia según se describe en la presente.

20 Se describe que la reducción predeterminada es una reducción que modifica el nivel de la porfirina o el precursor de la porfirina hasta un nivel que es inferior a, o hasta un nivel que es inferior o igual a, un valor de referencia (p. ej., un valor de referencia según se describe en la presente).

25 Una "normalización" de los niveles de ALA o PBG (o un nivel "normal" o "normalizado"), tal como se utiliza en la presente, se refiere a un nivel (p. ej., un nivel en orina y/o plasma) de ALA o PBG, o de ambos, que se encuentra dentro del intervalo esperado para un individuo sano, un individuo que no presenta síntomas (p. ej., un individuo que no experimenta dolor y/o no sufre ninguna neuropatía) o un individuo que no es portador de ninguna mutación asociada con una porfiria. Por ejemplo, se describe que un nivel normalizado se encuentra dentro de dos desviaciones estándar de la media normal. Se describe que un nivel normalizado se encuentra dentro de los límites de referencia normales, p. ej., dentro del intervalo de confianza del 95% para una muestra de control adecuada, p. ej., una muestra de individuos sanos o individuos que no son portadores de ninguna mutación génica asociada con una porfiria. Se describe que el nivel de ALA y/o PBG del sujeto (p. ej., el nivel de ALA y/o PBG en orina y/o plasma) se monitoriza por intervalos y se administra una dosis adicional del agente de ARNi cuando el nivel aumenta por encima del valor de referencia.

30 La administración del ARNi puede reducir los niveles proteicos o de ARNm de ALAS1, p. ej., en una célula, tejido, sangre, orina u otro compartimento del paciente al menos un 10%, al menos un 15%, al menos un 20%, al menos un 25%, al menos un 30%, al menos un 40%, al menos un 50%, al menos un 60%, al menos un 70%, al menos un 80 % o al menos un 90% o más. La administración del ARNi puede reducir los niveles de productos asociados con la expresión del gen ALAS1, p. ej., los niveles de una o más porfirinas o precursores de porfirinas (p. ej., el nivel de ALA y/o PBG). La administración del agente de ARNi también puede inhibir o prevenir el aumento de los niveles proteicos o de ARNm de ALAS1 durante un ataque agudo de AIP.

35 Antes de la administración de una dosis completa del ARNi, se puede administrar a los pacientes una dosis más pequeña, tal como una dosis de infusión de un 5%, y monitorizar a los pacientes en busca de efectos adversos, tales como una reacción alérgica, o de una presión sanguínea o niveles lipídicos elevados. En otro ejemplo, se puede monitorizar al paciente en busca de efectos no deseados.

#### **Métodos para modular la expresión de un gen ALAS1**

45 En otro aspecto más, la divulgación proporciona un método para modular (p. ej., inhibir o activar) la expresión de un gen ALAS1, p. ej., en una célula o en un sujeto. Se describe que la célula se encuentra *ex vivo*, *in vitro* o *in vivo*. Se describe que la célula es una célula eritroide o un hepatocito. Se describe que la célula se encuentra en un sujeto (p. ej., un mamífero tal como, por ejemplo, un ser humano). Se describe que el sujeto (p. ej., el ser humano) corre el riesgo de padecer o ha sido diagnosticado con una enfermedad relacionada con la expresión de ALAS1, según se describe en la presente.

50 Se describe que el método incluye poner en contacto la célula con un ARNi según se describe en la presente, en una cantidad eficaz para reducir la expresión de un gen ALAS1 en la célula. La expresión "poner en contacto", tal como se utiliza en la presente, incluye poner en contacto directamente una célula, así como también poner en contacto indirectamente una célula. Por ejemplo, una célula de un sujeto (p. ej., una célula eritroide o una célula hepática tal como un hepatocito) se puede poner en contacto cuando se administra una composición que comprende un ARNi (p. ej., por vía intravenosa o por vía subcutánea) al sujeto.

La expresión de un gen ALAS1 se puede evaluar en función del nivel de expresión de un ARNm de ALAS1, una proteína de ALAS1 o el nivel de un parámetro relacionado funcionalmente con el nivel de expresión de un gen ALAS1 (p. ej., el nivel de una porfirina o la incidencia o gravedad de un síntoma relacionado con una porfiria). Se describe que la expresión de ALAS1 se mide al menos un 5%, al menos un 10%, al menos un 15%, al menos un 20%, al menos un 25%, al menos un 30%, al menos un 35%, al menos un 40%, al menos un 45%, al menos un 50%, al menos un 55%, al menos un 60%, al menos un 65%, al menos un 70%, al menos un 75%, al menos un 80%, al menos un 85%, al menos un 90% o al menos un 95%. Se describe que el ARNi presenta una CI50 comprendida en el intervalo de 0.001-0.01 nM, 0.001-0.10 nM, 0.001-1.0 nM, 0.001-10 nM, 0.01-0.05 nM, 0.01-0.50 nM, 0.02-0.60 nM, 0.01-1.0 nM, 0.01-1.5 nM, 0.01-10 nM. El valor de CI50 se puede normalizar respecto a un valor de control adecuado, p. ej., la CI50 de un ARNi que no tenga diana.

Se describe que el método incluye introducir en la célula un ARNi según se describe en la presente y mantener la célula durante un tiempo suficiente para obtener la degradación del transcrito de ARNm de un gen ALAS1, de este modo se inhibe la expresión del gen ALAS1 en la célula.

Se describe que el método incluye administrar una composición descrita en la presente, p. ej., una composición que comprende un ARNi que tiene ALAS1 como diana, al mamífero de modo que la expresión del gen ALAS1 diana se reduzca, por ejemplo, durante un periodo prolongado, p. ej., al menos dos, tres, cuatro días o más, p. ej., una semana, dos semanas, tres semanas o cuatro semanas o más. En algunas realizaciones, la reducción de la expresión de ALAS1 se detecta en un periodo de 1 hora, 2 horas, 4 horas, 8 horas, 12 horas o 24 horas desde la primera administración.

Se describe que el método incluye administrar una composición según se describe en la presente a un mamífero de modo que la expresión del gen ALAS1 se incremente, p. ej., al menos un 10% en comparación con un animal no tratado. Se describe que la activación de ALAS1 tiene lugar durante un periodo prolongado, p. ej., una semana, dos semanas, tres semanas, cuatro semanas o más. Sin pretender vincularse a ninguna teoría, un ARNi puede activar la expresión de ALAS1 estabilizando el transcrito de ARNm de ALAS1, interaccionando con un promotor en el genoma y/o inhibiendo un inhibidor de la expresión de ALAS1.

Los ARNi útiles para los métodos y las composiciones que se exponen en la divulgación tienen específicamente como diana ARN (primarios o procesados) de un gen ALAS1. Las composiciones y los métodos para inhibir la expresión de un gen ALAS1 utilizando ARNi se pueden preparar y aplicar según se describe en otras partes de la presente.

Se describe que el método incluye administrar una composición que contiene un ARNi, donde el ARNi incluye una secuencia de nucleótidos que es complementaria respecto a al menos una parte de un transcrito de ARN del gen ALAS1 del mamífero que se ha de tratar. Cuando el organismo que se ha de tratar es un mamífero tal como un ser humano, la composición se puede administrar mediante cualquier medio conocido en la técnica, que incluye, sin carácter limitante, la vía oral, intraperitoneal o parenteral, incluida la administración intracraneal (p. ej., intraventricular, intraparenquimal e intratecal), intravenosa, intramuscular, subcutánea, transdérmica, a través de las vías respiratorias (aerosol), nasal, rectal y tópica (incluida la bucal y sublingual).

Se describe que las composiciones se administran mediante una infusión o inyección intravenosa. En algunas realizaciones de este tipo, las composiciones comprenden un ARNi formulado en un líquido (p. ej., una formulación LNP tal como una formulación LNP11) para una infusión intravenosa. En realizaciones particulares, tales composiciones se pueden utilizar para tratar ataques agudos de porfiria y/o para la profilaxis (p. ej., para reducir la gravedad o la frecuencia de los ataques).

Se describe que las composiciones se administran por vía subcutánea. En algunas realizaciones de este tipo, las composiciones comprenden un ARNi conjugado con un ligando de tipo GalNAC. Se describe que tales composiciones se pueden utilizar para tratar ataques agudos de porfiria o para la profilaxis (p. ej., para reducir la gravedad o la frecuencia de los ataques).

#### **Métodos para reducir el nivel de una porfirina o un precursor de una porfirina**

En otro aspecto, la divulgación proporciona un método para reducir el nivel de una porfirina o un precursor de una porfirina, p. ej., en una célula o en un sujeto.

Se describe que la célula se encuentra ex vivo, in vitro o *in vivo*. Se describe que la célula es una célula eritroide o un hepatocito. Se describe que la célula es un hepatocito. En algunas realizaciones, la célula se encuentra en un sujeto (p. ej., un mamífero tal como, por ejemplo, un ser humano).

Se describe que el sujeto (p. ej., el ser humano) corre el riesgo de padecer o ha sido diagnosticado con una porfiria, según se describe en la presente. Se describe que el método es eficaz para tratar una porfiria según se describe en la presente (p. ej., mejorando uno o más síntomas asociados con una porfiria, reduciendo la frecuencia de los ataques asociados con una porfiria, reduciendo la probabilidad de que se produzca un ataque de uno o más síntomas asociados con una porfiria tras la exposición a un factor precipitante o reduciendo el riesgo de desarrollar

afecciones asociadas con una porfiria (p. ej., una neuropatía (p. ej., una neuropatía progresiva), un cáncer hepatocelular). Se describe que el método incluye poner en contacto la célula con un ARNi, según se describe en la presente, en una cantidad suficiente para reducir el nivel de la porfirina o del precursor de la porfirina (p. ej., ALA o PBG) en la célula, o en otra célula o grupo de células relacionadas, o en el sujeto. La expresión "poner en contacto", tal como se utiliza en la presente, incluye poner en contacto directamente una célula, así como también poner en contacto indirectamente una célula. Por ejemplo, una célula de un sujeto (p. ej., una célula eritroide o una célula hepática tal como un hepatocito) se puede poner en contacto cuando se administra una composición que comprende un ARNi (p. ej., por vía intravenosa o por vía subcutánea) al sujeto. La expresión "otra célula o grupo de células relacionadas", tal como se utiliza en la presente, incluye cualquier célula o grupo de células en las que el nivel de la porfirina o el precursor de la porfirina se reduce como resultado de la puesta en contacto. Por ejemplo, la célula puede formar parte de un tejido presente en un sujeto (p. ej., una célula hepática presente en un sujeto) y el hecho de poner en contacto la célula del sujeto (p. ej., poner en contacto una o más células hepáticas presentes en un sujeto) con el ARNi puede provocar una reducción del nivel de la porfirina o del precursor de la porfirina en otra célula o grupo de células relacionadas (p. ej., células nerviosas del sujeto) o en un tejido o fluido del sujeto (p. ej., en la orina, sangre, plasma o fluido cerebroespinal del sujeto).

Se describe que la porfirina o el precursor de porfirina se selecciona del grupo constituido por ácido δ-aminolevulínico (ALA), porfopilinógeno (PBG), hidroximetilbilano (HMB), uroporfirinógeno III, coproporfirinógeno III, protoporfirinógeno IX y protoporfirina IX. En algunas realizaciones, el precursor de porfirina es ALA. Se describe que el precursor de porfirina es PBG. En algunas realizaciones, el método reduce el nivel de ALA y PBG. El nivel de una porfirina o un precursor de una porfirina se puede medir según se describe en la presente y se conoce en la técnica.

A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente tienen el mismo significado que interpreta habitualmente un experto en la técnica a la cual pertenece esta invención.

## **EJEMPLOS**

### **Ejemplo 1. Síntesis de ARNi**

#### **Origen de los reactivos**

Cuando en la presente no se proporcione específicamente el origen de un reactivo, tal reactivo se podrá obtener a partir de cualquier proveedor de reactivos para biología molecular con una calidad/pureza estándar para su aplicación en biología molecular.

#### **Síntesis de oligonucleótidos**

Todos los oligonucleótidos se sintetizan en un sintetizador AKTAoligopilot. Para la síntesis de los oligonucleótidos, se utilizaron soportes sólidos de vidrio con poros controlados que se pueden adquirir de proveedores comerciales (dT-CPG, 500 Å, Prime Synthesis) y fosforamiditos de ARN con grupos protectores estándar, 5'-O-dimetoxitritil-N6-benzoil-2'-t-butildimetilsililadenosin-3'-O-N,N'-diisopropil-2-cianoetilfosforamidito, 5'-O-dimetoxitritil-N4-acetil-2'-t-butildimetilsililitidina-3'-O-N,N'-diisopropil-2-cianoetilfosforamidito, 5'-O-dimetoxitritil-N2-isobutil-2'-t-butildimetilsililguanosa-3'-O-N,N'-diisopropil-2-cianoetilfosforamidito y 5'-O-dimetoxitritil-2'-t-butildimetilsililuridin-3'-O-N,N'-diisopropil-2-cianoetilfosforamidito (Pierce Nucleic Acids Technologies). Los fosforamiditos con la sustitución 2'-F, 5'-O-dimetoxitritil-N4-acetil-2'-flurocitidin-3'-O-N,N'-diisopropil-2-cianoetilfosforamidito y 5'-O-dimetoxitritil-2'-flurouridin-3'-O-N,N'-diisopropil-2-cianoetilfosforamidito, se adquieren de Promega. Todos los fosforamiditos se utilizan con una concentración de 0.2 M en acetonitrilo (CH<sub>3</sub>CN) excepto para la guanosina, que se utiliza con una concentración de 0.2 M en THF al 10%/ACN (v/v). Se utiliza un tiempo de acoplamiento/reciclaje de 16 minutos. El activador es 5-etiltiotetrazol (0.75 M, American International Chemicals); para la oxidación de PO se utiliza yodo/agua/piridina y para la oxidación de PS se utiliza PADS (2%) en 2,6-lutidina/ACN (1:1 v/v).

Las hebras conjugadas con el ligando 3' se sintetizan utilizando un soporte sólido que contiene el ligando correspondiente. Por ejemplo, la introducción de una unidad de colesterol en la secuencia se lleva a cabo partiendo de un fosforamidito de hidroxiprolinol-colesterol. El colesterol se une a trans-4-hidroxiprolinol mediante un conector de tipo 6-aminohexanoato para obtener un resto de hidroxiprolinol-colesterol. Los ARNi marcados con Cy-3 y Cy-5.5 (fluoróforo) en el extremo 5' se sintetizan a partir del fosforamidito Quasar-570 (Cy-3) correspondiente, que se adquiere de Biosearch Technologies. La conjugación de los ligandos en el extremo 5' y/o en una posición interna se consigue utilizando bloques estructurales de fosforamidito-ligando protegidos adecuadamente. Un acoplamiento prolongado de 15 min de una solución de fosforamidito 0.1 M en CH<sub>3</sub>CN anhidro en presencia del activador 5-(etil-tio)-1H-tetrazol a un oligonucleótido unido a un soporte sólido. La oxidación del fosfito entre nucleótidos para obtener el fosfato se lleva a cabo utilizando yodo-agua estándar según se ha descrito (1) o mediante el tratamiento con hidropéroxido de tert-butilo/acetronitrilo/agua (10: 87: 3) con un tiempo de espera para la oxidación de 10 min para el oligonucleótido conjugado. El fosforotioato se introduce mediante la oxidación del fosfito para obtener el fosforotioato utilizando un reactivo de transferencia de azufre tal como DDTT (se adquiere de AM Chemicals), PADS y/o el reactivo de Beaucage. El fosforamidito de colesterol se sintetiza dentro de la empresa y se utiliza con una concentración de 0.1 M en diclorometano. El tiempo de acoplamiento para el fosforamidito de colesterol es de 16 minutos.

**Desprotección I (desprotección de bases nucleotídicas)**

Tras completar la síntesis, el soporte se transfiere a una botella de vidrio de 100 mL (VWR). El oligonucleótido se escinde del soporte con la desprotección simultánea de la base y los grupos fosfato utilizando 80 mL de una mezcla de amoníaco en etanol [amoníaco: etanol (3:1)] durante 6.5 h a 55 oC. La botella se enfría brevemente en hielo y a continuación la mezcla de amoníaco en etanol se filtra en una nueva botella de 250 mL. El CPG se lava con 2 x 40 mL porciones de etanol/agua (1:1 v/v). A continuación, el volumen de la mezcla se reduce hasta ~ 30 mL en un rotavapor. A continuación, la mezcla se congela en nieve carbónica y se seca al vacío en un aparato SpeedVac.

**Desprotección II (eliminación del grupo 2'-TBDMS)**

El residuo seco se vuelve a suspender en 26 mL de trietilamina, trihidrofluoruro de trietilamina (TEA•3HF) o piridina-HF y DMSO (3:4:6) y se calienta a 60 oC durante 90 minutos para eliminar los grupos tert-butildimetilsililo (TBDMS) de la posición 2'. A continuación, la reacción se desactiva con 50 mL de acetato de sodio 20 mM y el pH se ajusta hasta 6.5. El oligonucleótido se conserva en un congelador hasta su purificación.

**Análisis**

Los oligonucleótidos se analizan mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) antes de su purificación y la selección del tampón y la columna depende de la naturaleza de la secuencia y/o del ligando conjugado.

**Purificación por HPLC**

Los oligonucleótidos conjugados con ligandos se purifican mediante HPLC preparativa de fase inversa. Los oligonucleótidos no conjugados se purifican mediante HPLC de intercambio aniónico o en una columna de gel TSK empacitada dentro de la empresa. Los tampones son fosfato de sodio 20 mM (pH 8.5) en CH<sub>3</sub>CN al 10% (tampón A) y fosfato de sodio 20 mM (pH 8.5) en CH<sub>3</sub>CN al 10%, NaBr 1 M (tampón B). Las fracciones que contienen los oligonucleótidos de longitud completa se agrupan, se eliminan las sales y se liofilizan. Aproximadamente 0.15 DO de los oligonucleótidos, una vez que se han eliminado las sales, se diluyen en agua hasta obtener 150 µL y a continuación se pipetea en viales especiales para el análisis de CGE y LC/MS. A continuación, los compuestos se analizan mediante LC-ESMS y CGE.

**Preparación de los ARNip**

Para la preparación general de los ARNip, se calientan cantidades equimolares de la hebra sentido y antisentido en 1xPBS a 95 °C durante 5 min y se enfrían lentamente hasta temperatura ambiente. La integridad del dúplex se confirma mediante análisis de HPLC.

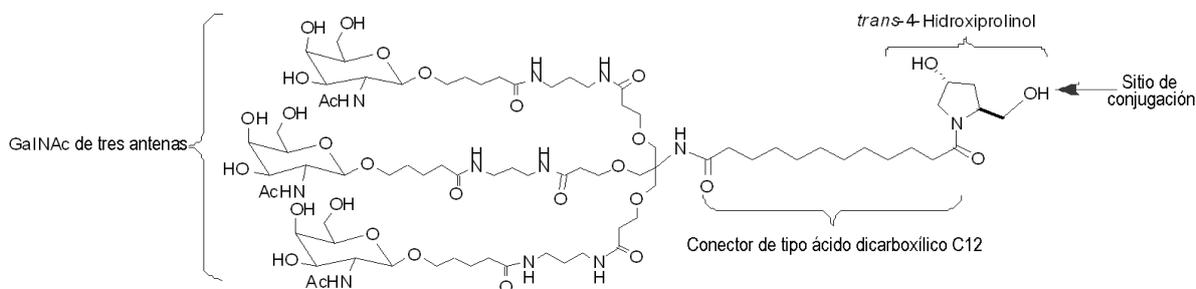
Más adelante se representan las secuencias de los ácidos nucleicos utilizando la nomenclatura estándar y, específicamente, las abreviaciones de la Tabla 1.

**Tabla 1: Abreviaciones de los monómeros nucleotídicos que se utilizan en la representación de las secuencias de los ácidos nucleicos.** Se sobreentenderá que estos monómeros, cuando estén presentes en un oligonucleótido, estarán unidos mutuamente mediante enlaces 5'-3'-fosfodiéster.

Abreviación	Nucleótido(s)
A	Adenosin-3'-fosfato
Ab	beta-L-adenosin-3'-fosfato
Abs	beta-L-adenosin-3'-fosforotioato
Af	2'-fluoroadenosin-3'-fosfato
Afs	2'-fluoroadenosin-3'-fosforotioato
As	adenosin-3'-fosforotioato
C	citidin-3'-fosfato
Cb	beta-L-citidin-3'-fosfato
Cbs	beta-L-citidin-3'-fosforotioato
Cf	2'-fluorocitidin-3'-fosfato
Cfs	2'-fluorocitidin-3'-fosforotioato
(Chd)	2'-O-hexadecilcitidin-3'-fosfato
(Chds)	2'-O-hexadecilcitidin-3'-fosforotioato
Cs	citidin-3'-fosforotioato
G	guanosin-3'-fosfato
Gb	beta-L-guanosin-3'-fosfato
Gbs	beta-L-guanosin-3'-fosforotioato
Gf	2'-fluoroguanosin-3'-fosfato
Gfs	2'-fluoroguanosin-3'-fosforotioato
Gs	guanosin-3'-fosforotioato

T	5'-metiluridin-3'-fosfato
Tb	beta-L-timidin-3'-fosfato
Tbs	beta-L-timidin-3'-fosforotioato
Tf	2'-fluoro-5-metiluridin-3'-fosfato
Tfs	2'-fluoro-5-metiluridin-3'-fosforotioato
Ts	5-metiluridin-3'-fosforotioato
U	uridin-3'-fosfato
Ub	beta-L-uridin-3'-fosfato
Ubs	beta-L-uridin-3'-fosforotioato
Uf	2'-fluorouridin-3'-fosfato
Ufs	2'-fluorouridin-3'-fosforotioato
(Uhd)	2'-O-hexadeciluridin-3'-fosfato
(Uhds)	2'-O-hexadeciluridin-3'-fosforotioato
Us	uridin-3'-fosforotioato
N	cualquier nucleótido (G, A, C, T o U)
a	2'-O-metiladenosin-3'-fosfato
as	2'-O-metiladenosin-3'-fosforotioato
c	2'-O-metilcitidin-3'-fosfato
cs	2'-O-metilcitidin-3'-fosforotioato
g	2'-O-metilguanosin-3'-fosfato
gs	2'-O-metilguanosin-3'-fosforotioato
t	2'-O-metil-5-metiluridin-3'-fosfato
ts	2'-O-metil-5-metiluridin-3'-fosforotioato
u	2'-O-metiluridin-3'-fosfato
us	2'-O-metiluridin-3'-fosforotioato
dA	2'-desoxiadenosin-3'-fosfato
dAs	2'-desoxiadenosin-3'-fosforotioato
dC	2'-desoxicitidin-3'-fosfato
dCs	2'-desoxicitidin-3'-fosforotioato
dG	2'-desoxiguanosin-3'-fosfato
dGs	2'-desoxiguanosin-3'-fosforotioato
dT	2'-desoxitimidina
dTs	2'-desoxitimidin-3'-fosforotioato
dU	2'-desoxiuridina
s	conector de tipo fosforotioato
L96 <sup>1</sup>	<i>N</i> -[tris(GalNAc-alkil)amidodecanoil]-4-hidroxirolinol Hyp(GalNAc-quilo) <sub>3</sub>
(Aeo)	2'-O-metoxietiladenosin-3'-fosfato
(Aeos)	2'-O-metoxietiladenosin-3'-fosforotioato
(Geo)	2'-O-metoxietilguanosin-3'-fosfato
(Geos)	2'-O-metoxietilguanosin-3'-fosforotioato
(Teo)	2'-O-metoxietil-5-metiluridin-3'-fosfato
(Teos)	2'-O-metoxietil-5-metiluridin-3'-fosforotioato
(m5Ceo)	2'-O-metoxietil-5-metilcitidin-3'-fosfato
(m5Ceos)	2'-O-metoxietil-5-metilcitidin-3'-fosforotioato

<sup>1</sup>La estructura química de L96 es la siguiente:



## Ejemplo 2. Diseño y síntesis de ARNip de ALAS1

### Métodos experimentales

**Bioinformática**Transcritos

Se llevó a cabo un diseño de ARNip para identificar ARNip que tuvieran como diana transcritos de ALAS1 humanos, de rhesus (*Macaca mulatta*), ratón y rata registrados en la base de datos de genes del NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/). El diseño utilizó los siguientes transcritos de la colección de RefSeq del NCBI: Humano - NM\_000688.4 (remítase a la FIG.3), NM\_199166.1; de rhesus - XM\_001090440.2, XM\_001090675.2; de ratón - NM\_020559.2; de rata - NM\_024484.2. Debido a la elevada divergencia de las secuencias de primate/roedor, los dúplex de ARNip se diseñaron en varios lotes separados, que incluyeron, sin carácter limitante, lotes que contenían dúplex que coincidían con transcritos humanos y de rhesus únicamente; transcritos humanos, de rhesus, ratón y rata únicamente; y transcritos de ratón y rata únicamente. La mayoría de los dúplex de ARNip se diseñaron de modo que compartieran una identidad del 100% con el transcrito humano enumerado y los transcritos de otras especies considerados en cada lote de diseño (anterior). En algunos casos (remítase a la Tabla 8), se permitieron apareamientos erróneos entre el dúplex y la diana de ARNm en la primera posición antisentido (la última posición sentido) cuando el par de bases complementario de la hebra antisentido:ARNm diana era un par GC o CG. En estos casos, los dúplex se designaron con pares UA o AU en el primer par antisentido:último par sentido. De este modo, los dúplex conservaron la complementariedad pero tenían apareamientos erróneos respecto a la diana (U:C, U:G, A:C o A:G). Dieciocho de estos dúplex de "intercambio de UA" fueron designados como parte del conjunto humano/rhesus/ratón/rata (remítase a los dúplex en la Tabla 8 con las marcas "C19U", "G19U", "C19A" o "G19A" en la columna de la Posición).

Diseño, especificidad y predicción de la eficacia de los ARNip

Se pronosticó la especificidad prevista para todos los nonadecámeros posibles a partir de cada secuencia. A continuación, se seleccionaron los nonadecámeros candidatos que carecían de repeticiones de más de 7 nucleótidos. Estos 1510 ARNip candidatos humanos/de rhesus, 114 humanos/de rhesus/ratón/rata, y 717 de ratón/rata se utilizaron en búsquedas exhaustivas frente a transcriptomas adecuados (definidos como el conjunto de registros NM\_ y XM\_ dentro de los conjuntos de Refseq del NCBI para humanos, rhesus, perros, ratones o ratas) utilizando un algoritmo exhaustivo de "fuerza bruta" implementado en el script Python 'BruteForce.py'. A continuación, el script analizó las alineaciones de transcrito-oligo para generar una puntuación basada en la posición y el número de apareamientos erróneos entre el ARNip y cualquier transcrito "alejado de la diana" potencial. La puntuación alejada de la diana se pondera para enfatizar las diferencias en la región "semilla" de los ARNip, en las posiciones 2-9 partiendo del extremo 5' de la molécula. A cada par de oligo-transcrito de la búsqueda de fuerza bruta se le otorgó una puntuación de apareamientos erróneos sumando las puntuaciones de apareamientos erróneos individuales; los apareamientos erróneos en las posiciones 2-9 se contaron como 2.8, los apareamientos erróneos en las posiciones de los sitios de escisión 10-11 se contaron como 1.2 y los apareamientos erróneos en la región 12-19 se contaron como 1.0. Se realizó una predicción alejada de la diana adicional comparando la frecuencia de los heptámeros y octómeros derivados de 3 hexámeros diferentes derivados de la región semilla de cada oligo. Los hexámeros de las posiciones 2-7 con relación al inicio 5' se utilizan para crear 2 heptámeros y un octómero. Hemos creado el "heptámero 1" añadiendo una A 3' al hexámero; hemos creado el heptámero 2 añadiendo una A 5' al hexámero; hemos creado el octómero añadiendo una A a ambos extremos 5' y 3' del hexámero. Se precalculó la frecuencia de los octómeros y heptámeros en 3'UTRome humana, de rhesus, ratón o rata (que se define como la subsecuencia del transcriptoma de la base de datos de Refseq del NCBI en la que el extremo de la región codificante, la "CDS", está claramente definido). La frecuencia de los octómeros se normalizó respecto a la frecuencia de los heptámeros utilizando el valor mediano de la gama de frecuencias de los octómeros. A continuación, se calculó una puntuación "mirSeedScore" calculando la suma de ((3 X recuento de octómeros normalizado) + (2 X recuento del heptámero 2) + (1 X recuento del heptámero 1)).

Ambas hebras de ARNip fueron asignadas a una categoría de especificidad de acuerdo con las puntuaciones calculadas: una puntuación por encima de 3 se califica como altamente específica, igual a 3 como específica y entre 2.2 y 2.8 como moderadamente específica. Realizamos la clasificación según la especificidad de la hebra antisentido. A continuación, seleccionamos dúplex cuyos oligos antisentido carecían de GC en la primera posición, carecían de G en las posiciones 13 y 14 y tenían 3 o más Us o As en la región semilla (características de dúplex con una eficacia prevista elevada).

Se diseñaron dúplex conjugados con GalNAc candidatos, con una longitud de 21 y 23 nucleótidos para las hebras sentido y antisentido, respectivamente, extendiendo nonadecámeros antisentido 4 nucleótidos adicionales en la dirección 3' (conservando una complementariedad perfecta con el transcrito diana). Se especificó la hebra sentido como el complemento inverso de los primeros 21 nucleótidos del tricosámero antisentido. Se seleccionaron los dúplex que conservaron apareamientos perfectos para todos los transcritos de las especies seleccionadas en los 23 nucleótidos.

Selección de las secuencias de ARNip

Se sintetizaron oligos nonadecámicos de ARNip humanos/de rhesus derivados de un total de 90 hebras sentido y 90 hebras antisentido, humanos/de rhesus/ratón/ratón/rata derivados de 40 hebras sentido y 40 hebras antisentido, y

de ratón/rata derivados de 40 hebras sentido y 40 hebras antisentido y se utilizaron para formar los dúplex. Se sintetizaron oligos henicosaméricos/tricosaméricos humanos/de rhesus derivados de un total de 45 hebras sentido y 45 hebras antisentido para proporcionar 45 dúplex conjugados con GalNAc.

5 Las secuencias de las hebras sentido y antisentido de los dúplex modificados se muestran en la Tabla 2 y las secuencias de las hebras sentido y antisentido de los dúplex no modificados se muestran en la Tabla 3.

### **Síntesis de secuencias de ALAS1**

10 Se sintetizaron secuencias de ALAS1 en un sintetizador MerMade 192 a escala de 1 o 0.2  $\mu$ mol. Se prepararon hebras individuales con modificaciones de tipo 2'-O-metilo para realizar un cribado in vitro utilizando reactivos de transfección. Se prepararon conjugados 3' GalNAc con secuencias que contenían modificaciones de tipo 2'F y 2'-O-metilo en la hebra sentido en los diseños henicosaméricos/tricosaméricos para la captación libre en células. Para todas las secuencias henicosaméricas de la lista, se aplicó una química "endolight" según se detalla a continuación.

- Todas las pirimidinas (citosina y uridina) de la hebra sentido contenían bases con modificaciones de tipo 2'-O-metilo (C con modificación 2'-O-metilo y U con modificación 2'-O).
- En la hebra antisentido, las pirimidinas adyacentes (hacia la posición 5') a un ribonucleósido A se reemplazaron por sus correspondientes nucleósidos con modificaciones 2-O-metilo.
- Se introdujo una extensión de dos bases dTsdT en el extremo 3' de ambas secuencias sentido y antisentido.
- El archivo de las secuencias se convirtió en un archivo de texto con el fin de que fuera compatible para cargarlo en el programa informático de síntesis MerMade 192.

20 Para las hebras sentido conjugadas con GalNAc y las secuencias antisentido complementarias, se introdujeron nucleósidos con modificaciones 2'F y con otras modificaciones combinados con ribo con nucleósidos de modificaciones 2'O-metilo. La síntesis se llevó a cabo en un soporte CPG modificado con GalNAc para la hebra sentido y CPG modificado con un soporte universal para la secuencia antisentido.

### **Síntesis, escisión y desprotección:**

25 La síntesis de las secuencias de ALAS1 fue una síntesis de oligonucleótidos en soporte sólido basada en la química de los fosoramiditos. Para las secuencias "endolight" henicosaméricas, se utilizó desoxitimidina-CPG como soporte sólido, mientras que para los conjugados de GalNAc, se utilizó un soporte sólido de GalNAc para la hebra sentido y CPG universal para la hebra antisentido.

30 La síntesis de las secuencias anteriores se llevó a cabo a escala de 1 o 0.2  $\mu$ m en placas de 96 pocillos. Las soluciones de los amiditos se prepararon con una concentración de 0.1 M y se utilizó etiltiotetrazol (0.6 M en acetonitrilo) como activador.

35 Las secuencias sintetizadas se escindieron y desprotegieron en placas de 96 pocillos, utilizando metilamina en el primer paso y un reactivo de fluoruro en el segundo paso. Para las secuencias que contenían GalNAc y nucleósidos con modificaciones 2'F, se modificaron las condiciones de desprotección. Después de la escisión y desprotección de las secuencias, se provocó su precipitación utilizando una mezcla de acetona:etanol (80:20) y el pellet se suspendió de nuevo en un tampón de acetato de sodio 0.2 M. Las muestras de cada secuencia se analizaron mediante LC-MS para confirmar su identidad y mediante UV para cuantificarlas, y un conjunto de muestras seleccionadas se analizó mediante cromatografía de intercambio iónico para determinar su pureza.

### **Purificación y eliminación de las sales:**

40 Se provocó la precipitación de las secuencias de ALAS1 y estas se purificaron en un sistema purificador AKTA utilizando una columna Sephadex. El ALAS1ess se llevó a cabo a temperatura ambiente. La inyección y la recolección de las muestras se llevaron a cabo en placas de 96 pocillos (pocillos con una profundidad de 1.8 mL). En el eluyente se recolectó un único pico correspondiente a la secuencia de longitud completa. Las secuencias de ALAS1, una vez eliminadas las sales, se analizaron para determinar su concentración (mediante una medición de UV a A260) y pureza (mediante HPLC de intercambio iónico). A continuación, las hebras individuales complementarias se combinaron con una relación estequiométrica 1:1 para formar los dúplex de ARNip.

**Tabla 2: Secuencias de los dúplex y de las hebras individuales modificadas de ALAS1 humano**

SEQ ID NO: (sentido)	SEQ ID NO: (anti-sentido)	Posición en el transcrito NM_000688.4	Nombre del dúplex	Secuencia sentido (5'-3')	Secuencia antisentido (5'-3')
2	3	522-540	AD-55078.2	cuccGGccAGuGAGAAAGAdTsdT	UCUUUCUcACUGGCCGGAGdTsdT
4	5	669-687	AD-55084.2	uGGcAGcAcAGAuGAAucAdTsdT	UGAUUcAUCUGUGCUGCcAdTsdT
6	7	790-808	AD-55090.2	cAGuGuGGuuAGuGuGAAAdTsdT	UUUcAcACuAACcAcACUGdTsdT
8	9	853-871	AD-55096.2	cAucAuGcAAAAGcAAAGAdTsdT	UCUUUGCUUUUGcAUGAUGdTsdT
10	11	876-894	AD-55102.2	AAAGAGuGucucAucuucudTsdT	AGAAGAUGAGAcACUCUUUdTsdT
12	13	877-895	AD-55106.2	AAGAGuGucucAucuucudTsdT	AAGAAGAUGAGAcACUCUUdTsdT
14	15	914-932	AD-55111.2	ucuGuuuccAcuuuucAGudTsdT	ACUGAAAAGUGGAAAcAGAdTsdT
16	17	923-941	AD-55073.2	AcuuuuuAGuAuGAucGuudTsdT	AACGAUcAuACUGAAAAGUdTsdT
18	19	926-944	AD-55079.2	uuucAGuAuGAucGuuucudTsdT	AGAAACGAUcAuACUGAAAdTsdT
20	21	927-945	AD-55085.2	uucAGuAuGAucGuuucudTsdT	AAGAAACGAUcAuACUGAAAdTsdT
22	23	928-946	AD-55091.2	ucAGuAuGAucGuuucudTsdT	AAAGAAACGAUcAuACUGAdTsdT
24	25	932-950	AD-55097.2	uAuGAucGuuucuuGAGAdTsdT	UCUcAAAGAAACGAUcAuAdTsdT
26	27	973-991	AD-55103.2	uGAccAcAccuAucGAGuudTsdT	AACUCGAuAGGUGUGGUcAdTsdT
28	29	975-993	AD-55107.2	AccAcAccuAucGAGuuudTsdT	AAAACUCGAuAGGUGUGGUdTsdT
30	31	1029-1047	AD-55112.2	uGGcAGAuGAcuAuucAGAdTsdT	UCUGAAuAGUcAUCUGCcAdTsdT
32	33	1077-1095	AD-55074.2	ucuGGuGcAGuAAuGAcuAdTsdT	uAGUcAUuACUGcAcAGAdTsdT
34	35	1124-1142	AD-55080.2	uGuGGGGcAGuuAuGGAcAdTsdT	UGUCcAuAACUGCCcAcAdTsdT
36	37	1137-1155	AD-55086.2	uGGAcAcuuuGAAAcAAcAdTsdT	UGUUGUUUcAAAGUGUCcAdTsdT
38	39	1182-1200	AD-55098.2	AuAuuucuGGAACuAGuAAdTsdT	UuACuAGUUCcAGAAuAUdTsdT
40	41	1184-1202	AD-55104.2	AuuucuGGAACuAGuAAAdTsdT	AUUuACuAGUUCcAGAAUdTsdT
42	43	1185-1203	AD-55108.2	uuucuGGAACuAGuAAAdTsdT	AAUUuACuAGUUCcAGAAAdTsdT
44	45	1188-1206	AD-55113.2	cuGGAACuAGuAAuuccAdTsdT	UGGAAUUuACuAGUUCcAGdTsdT
46	47	1325-1343	AD-55075.2	uGuGAGAuuuAcucuGAuudTsdT	AAUcAGAGuAAAUCUcAcAdTsdT
48	49	1364-1382	AD-55081.2	AuccAAGGGAuucGAAAcAdTsdT	UGUUUCGAAUCCCUUGGAUdTsdT
50	51	1382-1400	AD-55087.2	AGccGAGuGccAAAGuAcAdTsdT	UGuACUUUGGcACUCGGCUdTsdT
52	53	1478-1496	AD-55093.2	uuuGAAAcuGuccAuucAAAdTsdT	UUGAAUGGAcAGUUUcAAAdTsdT
54	55	1531-1549	AD-55099.2	uGAuGuGGcccAuGAGuudTsdT	AAACUcAUGGGCCcAcAUcAdTsdT
56	57	1631-1649	AD-53573.3	GucAuGccAAAAuGGAcAdTsdT	UGUCcAUUUUUGGcAUGACdTsdT
58	59	1637-1655	AD-55109.2	ccAAAAuGGAcAucAuuudTsdT	AAAUGAUGUCcAUUUUUGGdTsdT
60	61	1706-1724	AD-55114.2	AcGAGuucucuGAuGAcAdTsdT	UGUcAAUcAGAGAACUCGUdTsdT
62	63	1962-1980	AD-55076.2	AAGucuGuGAuGAAcAAAdTsdT	AUuAGUUCuAcAcAGACUUdTsdT
64	65	1967-1985	AD-55082.2	uGuGAuGAAcAAuGAGcAdTsdT	UGCUCuAUuAGUUCuAcAcAdTsdT
66	67	1977-1995	AD-55088.2	uAAuGAGcAGAcAuAAcAdTsdT	AUGUuAUGUCUGCUcAUuAdTsdT
68	69	2189-2207	AD-55094.2	uuuGAAGuGAuGAGuGAAAdTsdT	UUUcACUcAUcACUUcAAAdTsdT
70	71	2227-2245	AD-55100.2	AGGcuuGAGcAAGuuGGuAdTsdT	uACcAACUUGCUcAAGCCUdTsdT
72	73	2313-2331	AD-55105.2	ucuuAGAGuuGucuuuAdTsdT	AuAAAGAcAACUCUGAAGAdTsdT
74	75	2317-2335	AD-55110.2	cAGAGuuGucuuuAuAuGudTsdT	AcAuAuAAAGAcAACUCUGdTsdT
76	77	2319-2337	AD-55115.2	GAGuuGucuuuAuAuGuGAdTsdT	UcAcAuAuAAAGAcAACUCdTsdT
78	79	2320-2338	AD-55077.2	AGuuGucuuuAuAuGuGAAdTsdT	UUcAcAuAuAAAGAcAACUdTsdT

ES 2 640 260 T3

80	81	2344-2362	AD-55083.2	uuAuAuuAAAuuuuAAucudTsdT	AGAUuAAAAUuAAuAuAAdTsdT
82	83	2352-2370	AD-55089.2	AAuuuuAAucuAuAGuAAAdTsdT	UUuACuAuAGAUuAAAAUdTsdT
84	85	2353-2371	AD-55095.2	AuuuuAAucuAuAGuAAAdTsdT	UUUuACuAuAGAUuAAAAUdTsdT
86	87	2376-2394	AD-55101.2	AGuccuGGAAuAAAuucudTsdT	AGAAUuAUUUCcAGGACUdTsdT
88	89	358-376	AD-53511.1	cuGcccAuucuuAucccGAdTsdT	UCGGGAuAAGAAUGGGcAGdTsdT
90	91	789-807	AD-53512.1	ccAGuGuGGuuAGuGuGAAdTsdT	UUcAcACuAACcAcACUGGdTsdT
92	93	1076-1094	AD-53513.1	GucuGGuGcAGuAAuGAcudTsdT	AGUcAUuACUGcACcAGACdTsdT
94	95	1253-1271	AD-53514.1	GcAcucuuGuuuuccucGudTsdT	ACGAGGAAAACAGAGUGCdTsdT
96	97	1544-1562	AD-53515.1	GAGuuuGGAGcAAucAccudTsdT	AGGUGAUUGCUCcAAACUCdTsdT
98	99	2228-2246	AD-53516.1	GGcuuGAGcAAGuuGGuAudTsdT	AuACcAACUUGCUCcAAGCCdTsdT
100	101	404-422	AD-53517.1	GGcAAAucucuGuuGuucudTsdT	AGAAcAAcAGAGAUUUGCCdTsdT
102	103	404-422	AD-53517.1	GGcAAAucucuGuuGuucudTsdT	AGAAcAAcAGAGAUUUGCCdTsdT
104	105	866-884	AD-53518.1	cAAAGAccAGAAAGAGuGudTsdT	AcACUCUUUCUGGUCUUUGdTsdT
106	107	1080-1098	AD-53519.1	GGuGcAGuAAuGAcuAccudTsdT	AGGuAGUcAUuACUGcACCdTsdT
108	109	1258-1276	AD-53520.1	cuuGuuuuccucGuGcuudTsdT	AAAGcACGAGGAAAACAGdTsdT
110	111	1616-1634	AD-53521.1	GGGGAuGcGGAGuGAGucAdTsdT	UGACUCcAUCCCGAUCCCCdTsdT
112	113	2230-2248	AD-53522.1	cuuGAGcAAGuuGGuAucudTsdT	AGAUcAcAACUUGCUCcAAGdTsdT
114	115	436-454	AD-53523.1	ccccAAGAuGAuGGAAGuudTsdT	AACUUCcAUcAUCUUGGGdTsdT
116	117	436-454	AD-53523.1	ccccAAGAuGAuGGAAGuudTsdT	AACUUCcAUcAUCUUGGGdTsdT
118	119	885-903	AD-53524.1	cucAucuucucAAGAuAAdTsdT	UuAUCUUGAAGAAGUAGdTsdT
120	121	1127-1145	AD-53525.1	GGGGcAGuuAuGGAcAcuudTsdT	AAGUGUCcAuAACUGCCCCdTsdT
122	123	1315-1333	AD-53526.1	GAuGccAGGcuGuGAGAuudTsdT	AAUCUcAcAGCCUGGcAUCdTsdT
124	125	1870-1888	AD-53527.1	GAGAcAGAuGcuAAuGGAudTsdT	AUCcAUuAGcAUCUGUCUCdTsdT
126	127	2286-2304	AD-53528.1	ccccAGGccAuuAucAuAudTsdT	AuAUGAuAAUGGCCUGGGdTsdT
128	129	489-507	AD-53529.1	cAGcAGuAcAcuAccAAcAdTsdT	UGUUGGuAGUGuACUGCUGdTsdT
130	131	489-507	AD-53529.1	cAGcAGuAcAcuAccAAcAdTsdT	UGUUGGuAGUGuACUGCUGdTsdT
132	133	915-933	AD-53530.1	cuGuuuuccAcuuucAGuAdTsdT	uACUGAAAAGUGGAAAACgAdTsdT
134	135	1138-1156	AD-53531.1	GGAcAcuuuGAAAcAAcAudTsdT	AUGUUGUUUcAAAGUGUCCdTsdT
136	137	1324-1342	AD-53532.1	cuGuGAGAuuuAcucuGAudTsdT	AUcAGAGuAAAUCUcAcAGdTsdT
138	139	1927-1945	AD-53533.1	cccuGuGcGGGuuGcAGAudTsdT	AUCUGcAACCCGcAcAGGGdTsdT
140	141	2312-2330	AD-53534.1	GucuucAGAGuuGucuuuAdTsdT	uAAAGAcAACUCUGAAGACdTsdT
142	143	646-664	AD-53535.1	cAcuGcAAGcAAAuGccudTsdT	AGGGcAUUUGCUUGcAGUGdTsdT
144	145	922-940	AD-53536.1	cAcuuuucAGuAuGAucGudTsdT	ACGAUcAuACUGAAAAGUGdTsdT
146	147	1163-1181	AD-53537.1	GGGGcAGGuGGuAcuAGAAAdTsdT	UUCuAGuACcACCUGCCCCdTsdT
148	149	1347-1365	AD-53538.1	GGAAccAuGccuccAuGAudTsdT	AUcAUGGAGGcAUGGUUCCdTsdT
150	151	1964-1982	AD-53539.1	GucuGuGAuGAAcuAAuGAdTsdT	UcAUuAGUUCcAUcAcAGACdTsdT
152	153	2321-2339	AD-53540.1	GuuGucuuuAuAuGuGAudTsdT	AUUcAcAuAuAAAGAcACdTsdT
154	155	671-689	AD-53541.1	GcAGcAcAGAuGAAucAGAdTsdT	UCUGAUUcAUCUGUGCUGCdTsdT
156	157	924-942	AD-53542.1	cuuuucAGuAuGAucGuudTsdT	AAACGAUcAuACUGAAAAGdTsdT
158	159	1164-1182	AD-53543.1	GGGcAGGuGGuAcuAGAAAdTsdT	UUUCuAGuACcACCUGCCCCdTsdT
160	161	1460-1478	AD-53544.1	GuccccAAGAuGuGGcAudTsdT	AUGCcAcAAUCUUGGGGACdTsdT
162	163	1976-1994	AD-53545.1	cuAAuGAGcAGAcAuAAcAdTsdT	UGUuAUGUCUGUCcAUuAGdTsdT
164	165	786-804	AD-53546.1	GccccAGuGuGGuuAGuGudTsdT	AcACuAACcAcACUGGGGcCdTsdT

166	167	935-953	AD-53547.1	GAucGuuuuuuuGAGAAAAdTsdT	UUUUCUcAAAGAAACGAUCdTsdT
168	169	1165-1183	AD-53548.1	GGcAGGuGGuAcuAGAAAudTsdT	AUUUCuAGuACcACCUGCCdTsdT
170	171	1530-1548	AD-53549.1	GuGAuGuGGcccAuGAGuudTsdT	AACUcAUGGGCCcAcAUcACdTsdT
172	173	2003-2021	AD-53550.1	cAAGcAAucAAuuAcccuAdTsdT	uAGGGuAAUUGAUUGCUUGdTsdT
174	175	788-806	AD-53551.1	cccAGuGuGGuuAGuGuGAdTsdT	UcAcACuAACcAcACUGGGdTsdT
176	177	974-992	AD-53552.1	GAccAcAccuAucGAGuuudTsdT	AAACUCGAuAGGUGUGGUCdTsdT
178	179	1191-1209	AD-53553.1	GAAcuAGuAAuuuccAuGudTsdT	AcAUGGAAUuACuAGUUCdTsdT
180	181	1541-1559	AD-53554.1	cAuGAGuuuGGAGcAAucAdTsdT	UGAUUGCUCcAAACUcAUGdTsdT
182	183	2075-2093	AD-53555.1	ccccAGAuGAuGAAcuAcudTsdT	AGuAGUUCuAUCUCUGGGdTsdT
184	185	360-378	AD-53561.1	GcccAuuccuuAucccGAGudTsdT	ACUCGGGAuAAGAAUGGGCdTsdT
186	187	1356-1374	AD-53567.1	ccuccAuGAuccAAGGGAudTsdT	AUCCCUUGGAUcAUGGAGdTsdT
188	189	1631-1649	AD-53573.1	GucAuGccAAAAAuGGAcAdTsdT	UGUCcAUUUUUGGcAUGACdTsdT
190	191	1634-1652	AD-53579.1	AuGccAAAAAuGGAcAucAdTsdT	UGAUGUCcAUUUUUGGcAucAdTsdT

**Tabla 3: Secuencias de los dúplex y de las hebras individuales no modificadas de ALAS1 humano**

SEQ ID NO: (sentido)	SEQ ID NO: (anti-sentido)	Posición en el transcrito NM_000688.4	Nombre del dúplex	Secuencia sentido (5'-3')	Secuencia antisentido (5'-3')
192	193	522-540	AD-55078.2	CUCCGGCCAGUGAGAAAGA	UCUUUCUCACUGGCCGGAG
194	195	669-687	AD-55084.2	UGGCAGCACAGAUGAAUCA	UGAUUCAUCUGUGCUGCCA
196	197	790-808	AD-55090.2	CAGUGUGGUUAGUGUGAAA	UUUCACACUAACCACACUG
198	199	853-871	AD-55096.2	CAUCAUGCAAAGCAAAGA	UCUUUGCUUUUGCAUGAUG
200	201	876-894	AD-55102.2	AAAGAGUGUCUCAUCUUCU	AGAAGAUGAGACACUCUUU
202	203	877-895	AD-55106.2	AAGAGUGUCUCAUCUUCU	AAGAAGAUGAGACACUCU
204	205	914-932	AD-55111.2	UCUGUUUCCACUUUCAGU	ACUGAAAAGUGGAAACAGA
206	207	923-941	AD-55073.2	ACUUUUCAGUAUGAUCGUU	AACGAUCAUACUGAAAAGU
208	209	926-944	AD-55079.2	UUUCAGUAUGAUCGUUUCU	AGAAACGAUCAUACUGAAA
210	211	927-945	AD-55085.2	UUCAGUAUGAUCGUUUCU	AAGAAACGAUCAUACUGAA
212	213	928-946	AD-55091.2	UCAGUAUGAUCGUUUCUUU	AAAGAAACGAUCAUACUGA
214	215	932-950	AD-55097.2	UAUGAUCGUUUCUUUGAGA	UCUCAAAGAAACGAUCAUA
216	217	973-991	AD-55103.2	UGACCACACCUAUCGAGUU	AACUCGAUAGGUGUGGUCA
218	219	975-993	AD-55107.2	ACCACACCUAUCGAGUUUU	AAAACUCGAUAGGUGUGGU
220	221	1029-1047	AD-55112.2	UGGCAGAUGACUAUUCAGA	UCUGAAUAGUCAUCUGCCA
222	223	1077-1095	AD-55074.2	UCUGGUGCAGUAAUGACUA	UAGUCAUUACUGCACCAGA
224	225	1124-1142	AD-55080.2	UGUGGGGCAGUUAUGGACA	UGUCCAUAACUGCCCCACA
226	227	1137-1155	AD-55086.2	UGGACACUUUGAAACAACA	UGUUUUUCAAAGUGUCCA
228	229	1182-1200	AD-55098.2	AUAUUUCUGGAACUAGUAA	UUACUAGUUCAGAAAUAU
230	231	1184-1202	AD-55104.2	AUUUCUGGAACUAGUAAA	AUUUACUAGUUCAGAAA
232	233	1185-1203	AD-55108.2	UUUCUGGAACUAGUAAA	AAUUUACUAGUUCAGAAA
234	235	1188-1206	AD-55113.2	CUGGAACUAGUAAA	UGGAAUUUACUAGUUCAG
236	237	1325-1343	AD-55075.2	UGUGAGAUUUACUCUGAUU	AAUCAGAGUAAAUCUCACA
238	239	1364-1382	AD-55081.2	AUCCAAGGGAUUCGAAACA	UGUUUCGAAUCCCUUGGAU
240	241	1382-1400	AD-55087.2	AGCCGAGUGCCAAAGUACA	UGUACUUUGGCACUCGGCU
242	243	1478-1496	AD-55093.2	UUUGAAACUGUCCAUAUCA	UUGAAUGGACAGUUUCAAA

ES 2 640 260 T3

244	245	1531-1549	AD-55099.2	UGAUGUGGCCCAUGAGUUU	AAACUCAUGGGCCACAUCA
246	247	1631-1649	AD-53573.3	GUCAUGCCAAAAUGGACA	UGUCCAUUUUUGGCAUGAC
248	249	1637-1655	AD-55109.2	CCAAAAUGGACAUCAUUU	AAAUGAUGUCCAUUUUUGG
250	251	1706-1724	AD-55114.2	ACGAGUUCUCUGAUUGACA	UGUCAUUCAGAGAACUCGU
252	253	1962-1980	AD-55076.2	AAGUCUGUGAUGAACUAAU	AUUAGUUCAUCACAGACUU
254	255	1967-1985	AD-55082.2	UGUGAUGAACUAAUGAGCA	UGCUCAUUAGUUCAUCACA
256	257	1977-1995	AD-55088.2	UAAUGAGCAGACAUAAU	AUGUUUUGUCUGUCUUAUA
258	259	2189-2207	AD-55094.2	UUUGAAGUGAUGAGUGAAA	UUUCACUCAUCACUUCAAA
260	261	2227-2245	AD-55100.2	AGGCUUGAGCAAGUUGGUA	UACCAACUUGUCUCAAGCCU
262	263	2313-2331	AD-55105.2	UCUUCAGAGUUGUCUUUUAU	AUAAAAGACAACUCUGAAGA
264	265	2317-2335	AD-55110.2	CAGAGUUGUCUUUAUUAUGU	ACAUUAAAAGACAACUCUG
266	267	2319-2337	AD-55115.2	GAGUUGUCUUUAUUAUGUGA	UCACAUUAAAAGACAACUC
268	269	2320-2338	AD-55077.2	AGUUGUCUUUAUUAUGUGAA	UUCACAUUAAAAGACAACU
270	271	2344-2362	AD-55083.2	UUUAUUAAAUUUAUUCU	AGAUUAAAUUUAUUAUA
272	273	2352-2370	AD-55089.2	AAUUUUAAUCUUAUAGUAAA	UUUACUUAUAGAUUAAAAU
274	275	2353-2371	AD-55095.2	AUUUUAAUCUUAUAGUAAAA	UUUUACUUAUAGAUUAAAAU
276	277	2376-2394	AD-55101.2	AGUCCUGGAAAUAUUUCU	AGAAUUUAUUUCCAGGACU
278	279	358-376	AD-53511.1	CUGCCAUUCUUAUCCCGA	UCGGGAUAAGAAUGGGCAG
280	281	789-807	AD-53512.1	CCAGUGUGGUUAGUGUGAA	UUCACACUAACCACACUGG
282	283	1076-1094	AD-53513.1	GUCUGGUGCAGUAAUGACU	AGUCAUUACUGCACCAGAC
284	285	1253-1271	AD-53514.1	GCACUCUUGUUUCCUCGU	ACGAGGAAAACAAGAGUGC
286	287	1544-1562	AD-53515.1	GAGUUUGGAGCAAUCACCU	AGGUGAUUGCUCCAAACUC
288	289	2228-2246	AD-53516.1	GGCUUGAGCAAGUUGGUU	AUACCAACUUGCUCAAGCC
290	291	404-422	AD-53517.1	GGCAAUCUCUGUUGUUCU	AGAACAACAGAGAUUUGCC
292	293	404-422	AD-53517.1	GGCAAUCUCUGUUGUUCU	AGAACAACAGAGAUUUGCC
294	295	866-884	AD-53518.1	CAAAGACCAGAAAGAGUGU	ACACUCUUUCUGGUCUUUG
296	297	1080-1098	AD-53519.1	GGUGCAGUAAUGACUACCU	AGGUAGUCAUUACUGCACC
298	299	1258-1276	AD-53520.1	CUUGUUUUCUCUGUCUUU	AAAGCACGAGGAAAACAAG
300	301	1616-1634	AD-53521.1	GGGAUCGGGAUGGAGUCA	UGACUCCAUCCCGAUCCCC
302	303	2230-2248	AD-53522.1	CUUGAGCAAGUUGGUUUCU	AGAUACCAACUUGCUCAAG
304	305	436-454	AD-53523.1	CCCCAAGAUGAUGGAAGUU	AACUCCAUCUUCUUGGGG
306	307	436-454	AD-53523.1	CCCCAAGAUGAUGGAAGUU	AACUCCAUCUUCUUGGGG
308	309	885-903	AD-53524.1	CUCAUCUUCUUAAGAUAA	UUUUCUUGAAGAAGAUGAG
310	311	1127-1145	AD-53525.1	GGGCAGUUAUGGACACUU	AAGUGUCCAUAACUGCCCC
312	313	1315-1333	AD-53526.1	GAUGCCAGGCUGUGAGAUU	AAUCUCACAGCCUGGCAUC
314	315	1870-1888	AD-53527.1	GAGACAGAUGC UAAUGGAU	AUCCA UUGCAUCUGUCUC
316	317	2286-2304	AD-53528.1	CCCCAGGCCAUUAUCAUUA	AUAUGAUAAUGGCCUGGGG
318	319	489-507	AD-53529.1	CAGCAGUACACUACCAACA	UGUUGGUAGUGUACUGCUG
320	321	489-507	AD-53529.1	CAGCAGUACACUACCAACA	UGUUGGUAGUGUACUGCUG
322	323	915-933	AD-53530.1	CUGUUUCCACUUUUCAGUA	UACUGAAAAGUGGAAACAG
324	325	1138-1156	AD-53531.1	GGACACUUUGAAACAACAU	AUGUUGUUUCAAGUGUCC
326	327	1324-1342	AD-53532.1	CUGUGAGAUUUACUCUGAU	AUCAGAGUAAAUCUCACAG
328	329	1927-1945	AD-53533.1	CCUGUGCGGGUUGCAGAU	AUCUGCAACCCGCACAGGG

330	331	2312-2330	AD-53534.1	GUCUUCAGAGUUGUCUUUA	UAAAGACAACUCUGAAGAC
332	333	646-664	AD-53535.1	CACUGCAAGCAAUGCCCU	AGGGCAUUUUGCUUGCAGUG
334	335	922-940	AD-53536.1	CACUUUUCAGUAUGAUCGU	ACGAUCAUACUGAAAAGUG
336	337	1163-1181	AD-53537.1	GGGGCAGGUGGUACUAGAA	UUCUAGUACCACCUGCCCC
338	339	1347-1365	AD-53538.1	GGAACCAUGCCUCCAUGAU	AUCAUGGAGGCAUGGUUCC
340	341	1964-1982	AD-53539.1	GUCUGUGAUGAACUAAUGA	UCAUUAGUUCAUCACAGAC
342	343	2321-2339	AD-53540.1	GUUGUCUUUAUUGUGAAU	AUUCACAUUAAAAGACAAC
344	345	671-689	AD-53541.1	GCAGCACAGAUGAAUCAGA	UCUGAUUCAUCUGUGCUGC
346	347	924-942	AD-53542.1	CUUUUCAGUAUGAUCGUUU	AAACGAUCAUACUGAAAAG
348	349	1164-1182	AD-53543.1	GGGCAGGUGGUACUAGAAA	UUUCUAGUACCACCUGCCCC
350	351	1460-1478	AD-53544.1	GUCCCAAGAUUGUGGCAU	AUGCCACAAUCUUGGGGAC
352	353	1976-1994	AD-53545.1	CUAAUGAGCAGACAUAACA	UGUUUUGUCUGCUCAUUAG
354	355	786-804	AD-53546.1	GCCCCAGUGUGGUUAGUGU	ACACUAACCACACUGGGGC
356	357	935-953	AD-53547.1	GAUCGUUUCUUUGAGAAAA	UUUUCUCAAGAAACGAUC
358	359	1165-1183	AD-53548.1	GGCAGGUGGUACUAGAAAU	AUUUCUAGUACCACCUGCC
360	361	1530-1548	AD-53549.1	GUGAUGUGGCCCAUGAGUU	AACUCAUGGGCCACAUCAC
362	363	2003-2021	AD-53550.1	CAAGCAAUCAUUACCCUA	UAGGGUAAUUGAUUGCUUG
364	365	788-806	AD-53551.1	CCCAGUGUGGUUAGUGUGA	UCACACUAACCACACUGGG
366	367	974-992	AD-53552.1	GACCACACCUAUCGAGUUU	AAACUCGAUAGGUGUGGUC
368	369	1191-1209	AD-53553.1	GAACUAGUAAAUUCCAUGU	ACAUGGAAUUUACUAGUUC
370	371	1541-1559	AD-53554.1	CAUGAGUUUGGAGCAAUCA	UGAUUGCUCCAAACUCAUG
372	373	2075-2093	AD-53555.1	CCCCAGAUGAUGAACUACU	AGUAGUUCAUCAUCUGGGG
374	375	360-378	AD-53561.1	GCCCAUUCUUAUCCCGAGU	ACUCGGGAUAAGAAUGGGC
376	377	1356-1374	AD-53567.1	CCUCCAUGAUCCAAGGGAU	AUCCCUUGGAUCAUGGAGG
378	379	1631-1649	AD-53573.1	GUCAUGCCAAAAAUGGACA	UGUCCAUUUUUGGCAUGAC
380	381	1634-1652	AD-53579.1	AUGCCAAAAAUGGACAUCA	UGAUGUCCAUUUUUGGCAU

### **Ejemplo 3. Cribado *in vitro* de los dúplex de ARNip de ALAS1 para determinar la actividad de desactivación de ALAS1**

Los dúplex de ARNip de ALAS1 se cribaron con el fin de determinar su capacidad para desactivar la expresión de ALAS1 *in vitro*.

#### **5 Cribado *in vitro***

##### Cultivos celulares y transfecciones

Se cultivaron células Hep3B (ATCC, Manassas, VA) hasta casi llegar a la confluencia a 37 °C en una atmósfera de un 5% de CO<sub>2</sub> en MEM (ATCC) suplementada con un 10% de FBS, antes de liberarlas de la placa mediante tripsinización. La transfección se llevó a cabo añadiendo 14.8 µl de Opti-MEM más 0.2 µl de Lipofectamine RNAiMax por pocillo (Invitrogen, Carlsbad CA, n.º de catálogo 13778-150) a 5 µl de los dúplex de ARNip por pocillo en una placa de 96 pocillos y se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos. A continuación, se añadieron 80 µl de medio de cultivo completo que contenían ~2 x 10<sup>4</sup> células Hep3B a la mezcla de ARNip. Las células se incubaron durante 24 o 120 horas antes de la purificación del ARN. Se llevaron a cabo experimentos de dosis individuales para una concentración final del dúplex de 10 nM y 0.1n M y se llevaron a cabo experimentos de dosis-respuesta para una concentración final del dúplex de 10, 1.67, 0.27, 0.046, 0.0077, 0.0013, 0.00021 y 0.00004 nM.

Aislamiento de ARN total utilizando el kit de aislamiento de ARNm DYNABEADS (Invitrogen, componente n.º: 610-12)

Las células se recolectaron y lisaron en 150 µl de tampón de lisis/unión, a continuación se mezclaron durante 5 minutos a 850 rpm utilizando un instrumento Eppendorf Thermomixer (la velocidad de mezclado fue la misma a lo largo de todo el proceso). Se añadieron diez microlitros de microesferas magnéticas y 80 µl de mezcla de tampón de

5 lisis/unión a una placa de fondo redondo y se mezclaron durante 1 minuto. Las microesferas magnéticas se capturaron utilizando un soporte magnético y se retiró el sobrenadante sin que se alteraran las microesferas. Después de retirar el sobrenadante, las células lisadas se añadieron a las microesferas remanentes y se mezclaron durante 5 minutos. Después de retirar el sobrenadante, las microesferas magnéticas se lavaron 2 veces con 150 µl de tampón de lavado A y se mezclaron durante 1 minuto. Las microesferas se capturaron nuevamente y se retiró el sobrenadante. A continuación, las microesferas se lavaron con 150 µl de tampón de lavado B, se capturaron y se retiró el sobrenadante. A continuación, las microesferas se lavaron con 150 µl de tampón de elución, se capturaron y se retiró el sobrenadante. Se permitió que las microesferas se secaran durante 2 minutos. Después del secado, se añadieron 50 µl de tampón de elución y se mezclaron durante 5 minutos a 70 °C. Las microesferas se capturaron con un imán durante 5 minutos. Se retiraron 40 µl de sobrenadante y se añadieron a otra placa de 96 pocillos.

Síntesis de ADNc utilizando el kit de transcripción inversa de ADNc de alta capacidad de ABI (Applied Biosystems, Foster City, CA, n.º de catálogo 4368813)

15 Una mezcla patrón de 2 µl de 10X tampón, 0.8 µl de 25X dNTPs, 2 µl de cebadores aleatorios, 1 µl de transcriptasa inversa, 1 µl de inhibidor de RNasa y 3.2 µl de H<sub>2</sub>O por reacción se añadió a 10 µl de ARN total. Se generó ADNc utilizando un ciclador térmico Bio-Rad C-1000 o S-1000 (Hercules, CA) mediante los pasos siguientes: 25 °C 10 min, 37 °C 120 min, 85 °C 5 s y se mantiene a 4 °C.

PCR a tiempo real

20 Se añadieron 2 µl de ADNc a una mezcla patrón que contenía 0.5 µl de una sonda TaqMan de GAPDH (Applied Biosystems, n.º de catálogo 4326317E), 0.5 µl de una sonda TaqMan de ALAS1 (Applied Biosystems, n.º de catálogo Hs00167441\_m1) y 5 µl de una mezcla patrón para una sonda Lightcycler 480 (Roche, n.º de catálogo 04887301001) por pocillo en una placa de 384 pocillos (Roche, n.º de catálogo 04887301001). Se llevó a cabo una PCR a tiempo real en un sistema de PCR a tiempo real Roche LC480 (Roche) utilizando el ensayo de  $\Delta\Delta Ct$ (RQ). Cada dúplex se evaluó en dos transfecciones independientes con dos réplicas biológicas para cada uno de ellos, y cada transfección se evaluó por duplicado, a menos que se indique de otro modo en las tablas de resumen.

25 Para calcular el factor de cambio relativo, los datos a tiempo real se analizaron utilizando el método de  $\Delta\Delta Ct$  y se normalizaron respecto a los ensayos realizados con células transfectadas con AD-1955 10 nM o células transfectadas con vector vacío. Los valores de  $CI_{50}$  se calcularon utilizando un modelo de ajuste de 4 parámetros empleando XLFit y se normalizaron respecto a células transfectadas con AD-1955 o células vírgenes para el mismo intervalo de dosis, o respecto a su propia dosis más baja.

30 Desactivación *in vitro* de la expresión de ALAS1 endógeno mediante los dúplex de ARNip de ALAS1

35 La Tabla 4 ilustra la desactivación de ALAS1 en células Hep3B mediante los dúplex de ARNip modificados para ALAS1 (remítase a la Tabla 2). El silenciamiento se expresa como la fracción de mensaje de ARN remanente respecto al ARNip AD-1955 que actúa como control negativo (luciferasa). Los datos se generaron según se ha descrito anteriormente tras la transfección de una concentración 10 nM o 0.1 nM de cada ARNip. La qPCR se llevó a cabo utilizando la sonda TaqMan de ALAS1 Hs00167441\_m1.

**Tabla 4: Expresión de ALAS1 en células Hep3B tras la transfección con ARNip de ALAS1**

ID del dúplex	10 nM, media	0.1 nM, media	10 nM, desv. est.	0.1 nM, desv. est.
AD-55078.2	0.7	0.87	0.001	0.089
AD-55084.2	0.08	0.3	0	0.04
AD-55090.2	0.06	0.08	0.002	0.003
AD-55096.2	0.61	0.92	0.171	0.34
AD-55102.2	0.63	0.62	0.005	0.069
AD-55106.2	0.07	0.08	0.004	0.027
AD-55111.2	0.06	0.23	0.013	0.062
AD-55073.2	0.21	0.4	0.018	0.061
AD-55079.2	0.17	0.43	0.033	0.089
AD-55085.2	0.13	0.21	0.011	0.019
AD-55091.2	0.27	0.55	0.033	0.009
AD-55097.2	0.31	0.38	0.051	0.059
AD-55103.2	0.05	0.11	0.017	0.006

ES 2 640 260 T3

AD-55107.2	0.12	0.24	0.007	0.008
AD-55112.2	0.15	0.2	0.036	0.025
AD-55074.2	0.16	0.45	0.008	0.002
AD-55080.2	0.79	0.99	0.095	0.304
AD-55086.2	0.09	0.22	0.005	0.035
AD-55098.2	0.25	0.51	0.03	0.07
AD-55104.2	0.06	0.1	0.017	0.001
AD-55108.2	0.47	0.65	0.03	0.015
AD-55113.2	0.38	0.62	0.068	0.039
AD-55075.2	0.12	0.28	0.007	0.051
AD-55081.2	0.21	0.51	0.036	0.066
AD-55087.2	0.1	0.19	0.017	0.02
AD-55093.2	0.24	0.56	0.029	0.053
AD-55099.2	0.05	0.18	0.001	0.038
AD-53573.3	0.67	1.07	0.16	0.153
AD-55109.2	0.07	0.23	0.006	0.052
AD-55114.2	0.08	0.16	0.004	0.017
AD-55076.2	0.05	0.14	0.007	0.035
AD-55082.2	0.08	0.3	0.019	0.016
AD-55088.2	0.06	0.12	0.008	0.02
AD-55094.2	0.06	0.18	0.005	0.023
AD-55100.2	0.45	0.83	0.02	0.05
AD-55105.2	0.02	0.05	0.005	0.004
AD-55110.2	0.15	0.19	0.031	0.016
AD-55115.2	0.35	0.58	0.045	0.052
AD-55077.2	0.14	0.14	0.006	0.019
AD-55083.2	0.56	0.98	0.24	0.188
AD-55089.2	0.62	0.79	0.036	0.094
AD-55095.2	0.59	0.92	0.12	0.079
AD-55101.2	0.71	0.97	0.074	0.097
AD-1955	1.00	1.01	0.03	0.04
AD-53511.1	0.84	1.08	0.028	0.0515
AD-53512.1	0.15	0.65	0.062	0.023
AD-53513.1	0.34	0.86	0.055	0.011
AD-53514.1	0.12	0.61	0.003	0.008
AD-53515.1	0.25	0.66	0.005	0.004
AD-53516.1	1.05	1.02	0.032	0.011
AD-53517.1	0.145	0.725	0.025	0.0155
AD-53518.1	0.72	0.85	0.045	0.028
AD-53519.1	0.18	0.66	0.061	0.004
AD-53520.1	0.18	0.9	0.041	0.001

ES 2 640 260 T3

AD-53521.1	0.97	1.07	0.01	0.003
AD-53522.1	0.87	1.1	0.065	0.112
AD-53523.1	0.48	0.96	0.0305	0.0255
AD-53524.1	0.11	0.66	0.02	0.006
AD-53525.1	0.71	1.03	0.016	0.01
AD-53526.1	0.23	0.85	0.075	0.01
AD-53527.1	0.25	0.83	0.015	0.017
AD-53528.1	0.44	0.93	0.037	0.006
AD-53529.1	0.185	0.73	0.015	0.014
AD-53530.1	0.1	0.62	0.02	0.003
AD-53531.1	0.48	0.93	0.019	0.045
AD-53532.1	0.06	0.17	0	0.003
AD-53533.1	0.36	0.93	0.025	0.034
AD-53534.1	0.1	0.36	0.014	0.012
AD-53535.1	0.58	1.05	0.036	0.071
AD-53536.1	0.12	0.45	0.009	0.026
AD-53537.1	0.73	0.96	0.101	0.015
AD-53538.1	0.74	1.07	0	0.046
AD-53539.1	0.52	0.97	0.057	0.032
AD-53540.1	0.1	0.47	0.017	0.012
AD-53541.1	0.11	0.29	0.026	0.015
AD-53542.1	0.08	0.23	0.008	0.006
AD-53543.1	0.62	1.01	0.027	0.014
AD-53544.1	0.8	1.04	0.002	0.001
AD-53545.1	0.17	0.73	0.007	0.007
AD-53546.1	0.27	0.93	0.058	0.019
AD-53547.1	0.12	0.28	0.008	0.01
AD-53548.1	0.1	0.34	0.022	0.002
AD-53549.1	0.8	1.04	0.011	0.026
AD-53550.1	0.05	0.54	0.02	0.003
AD-53551.1	0.96	1.16	0.029	0.044
AD-53552.1	0.13	0.5	0.002	0.009
AD-53553.1	0.92	1.1	0.027	0.02
AD-53554.1	0.76	0.67	0.005	0.004
AD-53555.1	0.11	0.53	0.009	0.007
AD-53561.1	0.72	0.94	0.014	0.001
AD-53567.1	0.16	0.66	0.019	0.003
AD-53573.1	1.06	1.10	0.019	0.037
AD-53579.1	0.19	0.76	0.036	0.019

**Valores de  $CI_{50}$  de los dúplex de ARNip de ALAS1 seleccionados en un cribado *in vitro***

La Tabla 5 ilustra los valores de  $CI_{50}$  de los dúplex de ARNip de ALAS1 seleccionados determinados a partir de la desactivación de ALAS1 expresado de forma endógena en la línea celular Hep3B, mediante dúplex de ARNip modificados para ALAS1 (remítase a la Tabla 2). Los datos se generaron como se ha descrito anteriormente, 24 o 120 horas después de la transfección de cada dúplex de ARNip. El silenciamiento de ALAS1 se expresa como la fracción de mensaje de ARNm remanente respecto al ARNip AD-1955, un ARNip que no actúa sobre la diana y que se utiliza como control negativo. Los datos de experimentos de transfección replicados se utilizaron para ajustar una única línea con el fin de determinar la  $CI_{50}$ . Varios dúplex (p. ej., AD-53541.1, AD-53542.1 y AD-53547.1) presentaron una  $CI_{50}$  de tan solo aproximadamente 0.03 nM a las 24 horas. Numerosos dúplex presentaron una  $CI_{50}$  inferior a 0.1 nM (p. ej., AD-53534.1, AD-53536.1, AD-53540.1, AD-53541.1, AD-53542.1, AD-53547.1, AD-53548.1, AD-53550.1, AD-53552.1) a las 24 horas y algunos de estos también presentaron una  $CI_{50}$  inferior a 0.1 nM (p. ej., AD-53534.1, AD-53540.1, AD-53541.1, AD-53542.1, AD-53547.1, AD-53552.1) a las 120 horas.

**Tabla 5: Valores de  $CI_{50}$  de los dúplex de ARNip de ALAS1 normalizados respecto a AD-1955**

ID DEL DÚPLEX	$CI_{50}$ (nM)	
	24 h	120 h
AD-53534.1	0.045	0.076
AD-53536.1	0.049	0.105
AD-53540.1	0.054	0.077
AD-53541.1	0.032	0.062
AD-53542.1	0.028	0.093
AD-53547.1	0.03	0.062
AD-53548.1	0.044	0.101
AD-53550.1	0.085	0.152
AD-53552.1	0.077	0.063
AD-53567.1	0.219	0.357
AD-53579.1	0.217	0.566

**Ejemplo 4. Silenciamiento *in vivo* utilizando un ARNip de ALAS1 de ratón/rata formulado como un LNP**

En la Tabla 6 a continuación se muestran las secuencias del dúplex modificado AD-53558.

**Tabla 6: Secuencias del dúplex de ARNip de ALAS1 AD-53558.4**

SEQ ID NO: (sentido)	SEQ ID NO: (anti-sentido)	Posición de inicio en el transcrito de NM_020559.2	Nombre del dúplex	Secuencia sentido (5'-3')	Secuencia antisentido (5'-3')
383	384	1184	AD-53558	cuGuGAAUuuAcucuGAudTsdT	AUcAGAGuAAAUUUcAcAGdTsdT

Este dúplex se formuló como una formulación LNP11 (remítase a la Tabla 10 mostrada anteriormente). El ARNip AD-53558 formulado en LNP se evaluó *in vivo* en ratones (N = 25 animales; 5 animales por grupo) y ratas (N = 20 animales; 4 animales por grupo) y se confirmó que silenciaba el ARNm de ALAS1 *in vivo*. Los resultados se muestran en la FIG. 5 y la FIG. 6.

La FIG. 5 muestra que el ARNip presentó un efecto de dosis-respuesta en ratones. La expresión de ARNm de ALAS1 de ratón (ALAS1r) se redujo aproximadamente un 78% cuando el ARNip se administró con una dosis de 1 mg/kg; el ARNm de ALAS1 de ratón se redujo aproximadamente un 60% cuando el ARNip se administró con una dosis de 0.3 mg/kg; y el ARNm de ALAS1 de ratón se redujo aproximadamente un 49% cuando el ARNip se administró con una dosis de 0.1 mg/kg. Estas reducciones se expresan respecto a un control de PBS. También se empleó un control de LUC AD-1955, según se muestra en la FIG. 5.

De modo similar, la FIG. 6 muestra que el ARNip presentó un efecto de dosis-respuesta en ratas. La expresión de ARN de ALAS1 se redujo aproximadamente un 70% cuando el ARNip se administró con una dosis de 1 mg/kg; el ARNm de ALAS1 se redujo aproximadamente un 62% cuando el ARNip se administró con una dosis de 0.3 mg/kg; y el ARNm de ALAS1 se redujo aproximadamente un 34% cuando el ARNip se administró con una dosis de 0.1 mg/kg.

También se evaluó la durabilidad del silenciamiento en ratones (N = 15; 3 animales por punto de evaluación). Los resultados se muestran en la FIG. 7, la cual muestra que AD-53558 suprimió el ARNm de ALAS1r aproximadamente un 80% durante al menos 9 días. Una supresión de al menos aproximadamente un 50% perduró durante al menos 14 días.

5 **Ejemplo 5. Eficacia del ARNip de ALAS1 en un modelo animal de AIP**

Se investigaron los efectos de la formulación LNP11 de AD-53558 (un ARNip de ALAS1 de ratón/rata descrito en el ejemplo previo) en un modelo de ratón de AIP. La desactivación de PBGD no es viable (-/-, 0% de actividad). Existen ratones heterocigóticos con desactivación de PBGD (+/-, ~50% de actividad), pero no se dispone de su fenotipo bioquímico completo y, por lo tanto, no reproducen el fenotipo humano de la enfermedad. Por lo tanto, se ha desarrollado un modelo de ratón de AIP que es un caso heterocigótico compuesto con alelos T1/T2, que incluye la disrupción del promotor de T1 (+/-) y la alteración del sitio de corte y empalme de T2 (-/-). Se ha observado que estos ratones presentan una actividad de PBGD residual hepática que es aproximadamente un 30% del nivel de origen natural o presentan niveles de ALA y PBG en plasma de referencia ligeramente elevados o normales. Se ha observado que los ratones parecen normales en estadios iniciales de su vida y se vuelven ligeramente más lentos y atáxicos con la edad. Se ha descrito que, cuando los ratones tienen una edad de seis meses, desarrollan una coordinación motriz y un rendimiento muscular deteriorados, así como también una degeneración axonal cuando se someten a un examen patológico. La investigación de la patología del modelo de ratón ha mostrado degeneración axonal, así como coordinación motriz y rendimiento muscular deteriorados en ratones de edad más avanzada. Se ha observado que ALA y PBG en plasma y orina aumentan notablemente con la administración i.p. en serie de fenobarbital (remítase a Lindberg et al., (1996), Nature Genetics, 12:195-219 y Lindberg et al., (1999), Journal of Clinical Investigation, 103:1127-34). Los ratones se rescataron mediante la expresión mediada por AAV de PBGD en el hígado (Yasuda et al. (2010), Molecular Medicine, 1:17-22 y Unzu et al. (2011), Molecular Medicine, 2:243-50).

El día 1, se administró a los ratones 1 mg/kg de ARNip de ALAS1 (n = 5) o el control AD-1955 de LUC (n = 3) mediante inyección i.v. Se suministraron tres inyecciones de fenobarbital (1 inyección por día en los días 2, 3 y 4) para inducir ALAS1 hepático y los precursores de porfirinas, ALA y PBG. Se tomaron muestras de orina durante la noche y de plasma en el día 5 y se midieron los niveles de metabolitos mediante LC-MS. Los niveles de metabolitos se midieron en plasma mediante LC-MS y también se midieron en la orina. Se midieron los niveles de referencia de los metabolitos antes del primer tratamiento el día 1. Los resultados se muestran en las FIG. 8-12 y en las Tablas 12 y 13.

La FIG. 8 y la FIG. 9 muestran los niveles de ALA en plasma en µM. Los niveles de ALA de referencia fueron bajos (n = 4) y el tratamiento con fenobarbital indujo incrementos significativos en los niveles de ALA en plasma en los animales tratados con ARNip de LUC como control (n = 3). El tratamiento con ARNip de ALAS1 inhibió la inducción de ALA en plasma (n = 5), según se muestra en la FIG. 8. El ARNip de ALAS1 fue uniformemente eficaz a la hora de bloquear la inducción de ALA en plasma en cada uno de los animales individuales estudiados (remítase a la FIG. 9). Estos resultados indican que el tratamiento con ARNip de ALAS1 fue eficaz a la hora de prevenir los incrementos de ALA en plasma asociados con los ataques agudos inducidos por fenobarbital en este modelo animal de AIP.

La FIG. 10 y la FIG. 11 muestran los niveles de PBG en plasma en µM. Los niveles de PBG de referencia fueron bajos (n = 4) y el tratamiento con fenobarbital indujo incrementos significativos en los niveles de PBG en plasma en los animales tratados con ARNip de LUC como control (n = 3). El tratamiento con ARNip de ALAS1 inhibió la inducción de PBG en plasma (n = 5), según se muestra en la FIG. 10. El ARNip de ALAS1 fue uniformemente eficaz a la hora de bloquear la inducción de PBG en plasma en cada uno de los animales individuales estudiados (remítase a la FIG. 11). Estos resultados indican que el tratamiento con ARNip de ALAS1 fue eficaz a la hora de prevenir los incrementos de PBG en plasma asociados con los ataques agudos inducidos por fenobarbital en este modelo animal de AIP.

Las Tablas 12 y 13 muestran los niveles de ALA y PBG en orina en el punto de referencia y después del tratamiento con fenobarbital en animales tratados con ARNip de LUC (n = 2), control (CTR, que se refiere a un animal tratado con tampón de PBS, n = 1) y ARNip de ALAS1 (n = 5).

Tabla 12: Datos en orina de animales individuales que muestran la prevención de un ataque agudo inducido

ID del ratón	ALA (microM /L)	PBG (microM /L)	Creatinina (mg/dL)	ALA (micro M/mg de creatinina)	PBG (micro M/mg de creatinina)	ARNip	PB
Ha-17-4-6				29.7	7.9	Referencia	-
Ha-19-5-4/2				15.7	5.1	Referencia	-
Ha-20-39-4/3				28.6	6.7	Referencia	-
Ha-20-38-4				21.4	4.7	Referencia	-
Ha-21-33-4	934.92	483.71	0.4205	222.33	115.03	Luc	+
Ha-21-36-9	944.08	563.53	0.5055	186.76	111.48	Luc	+
Ha-21-18-8	32.88	8.69	0.133	24.72	6.53	ALAS1;	+

						1 mg/kg	
Ha-21-33-7	83.07	23.28	0.426	19.50	5.46	ALAS1; 1 mg/kg	+
Ha-21-34-5	59.15	18.41	0.263	22.49	7.00	ALAS1; 1 mg/kg	+

PB se refiere a fenobarbital. Un signo “+” indica que se administró fenobarbital.

Tabla 13: Datos medios en orina

ALA medio (microM/mg de creatinina)	PBG medio (microM/mg de creatinina)
23.8	6.1, referencia de AIP
204.55	113.26, ARNip de Luc
22.24	6.33, ARNip de ALAS1

- 5 El tratamiento con fenobarbital indujo incrementos marcados (incrementos de ~25-30 veces) de ALA en orina (~9 veces por encima de los niveles de referencia) y PBG en orina (~19 veces por encima de los niveles de referencia) en los ratones tratados con ARNip de LUC, el control, mientras que tales incrementos no se observaron en los animales tratados con ARNip de ALAS1. Por lo tanto, el ARNip de ALAS1 bloqueó los incrementos inducidos por fenobarbital de ALA y PBG en orina. Estos resultados son coherentes con las medidas en plasma y muestran que el tratamiento con ARNip de ALAS1 fue eficaz a la hora de prevenir los incrementos de metabolitos en orina (ALA y PBG) asociados con los ataques agudos inducidos por fenobarbital en este modelo animal de AIP.
- 10 En otros experimentos (FIG. 12), se observó que el tratamiento con fenobarbital indujo grandes incrementos (~25 veces) en la expresión de ARNm de ALAS1 en el hígado del modelo de ratón. La administración de ARNip de ALAS1 bloqueó completamente esta inducción de ARNm de ALAS1. Estos resultados proporcionan más pruebas de que el ARNip de ALAS1 es eficaz en un modelo animal de AIP.
- 15 En conjunto, los resultados proporcionados en este Ejemplo muestran que el ARNip de ALAS1 fue eficaz a la hora de tratar ataques agudos en un modelo animal de la porfiria hepática aguda AIP. Las medidas de múltiples parámetros respaldan esta conclusión, incluidos los niveles de ALA en plasma, los niveles de PBG en plasma, los niveles de ALA en orina, los niveles de PBG en orina y los niveles de expresión de ARNm de ALAS1 en el hígado.

**Ejemplo 6. Silenciamiento *in vivo* utilizando ARNip de ALAS1 de ratón conjugado con GalNAC**

- 20 Los experimentos descritos en este ejemplo investigaron la eficacia *in vivo* de tres ARNip conjugados con GalNAC (remítase a la Tabla 7). Estos ARNip se diseñaron y produjeron con métodos tales como los descritos en el Ejemplo 2.

**Tabla 7: Secuencias de AD-57929**

SEQ ID NO: (sentido)	SEQ ID NO: (anti-sentido)	Posición de la sec. sentido en el transcrito NM_020559.2	Nombre del dúplex	Secuencia sentido (5'-3')	Secuencia antisentido (5'-3')	Posición de la sec. antisentido en el transcrito NM_020559.2
385	386	775-795	AD-56211	AfaGfuCfuGfuUfUfCfcAfcUfuUfuCfaAfl96	uUfgAfaAfaGfuGfgaaAfcAfgAfcUfusUfsg	773-795
387	388	2168-2188	AD-56173	AfcAfuAfgUfaGfCfCfaGfaAfuUfgUfcUfl96	aGfaCfaAfuUfcUfggcUfaCfuAfuGfusGfsg	2166-2188
389	390	775-795	AD-57929	AfsasGfuCfuGfuUfUfCfcAfcUfuUfuCfaAfl96	usUfsgAfaAfaGfuGfgaaAfcAfgAfcUfusug	773-795

- 25 Los ratones (n = 40; n = 4 por cada condición experimental) se dividieron en grupos que recibieron PBS o dosis de 3 mg/kg, 10 mg/kg o 30 mg/kg de ARNip administradas por vía subcutánea. Se determinó el nivel de ARNm de ALAS1r/GAPDHr, respecto al control de PBS, en células hepáticas 72 horas después de la administración. Los resultados se muestran en la FIG. 13. No se observó un efecto de dosis-respuesta claro para los ARNip AD-56211 y AD-56173. Por el contrario, el ARNip de ALAS1 AD-57929 presentó un efecto de dosis-respuesta para la inhibición de la expresión de ALAS1r. Estos resultados demuestran que un conjugado de GalNAC de ALAS1 fue eficaz a la hora de inhibir la expresión de ARNm de ALAS1 *in vivo* y presentó un efecto de dosis-respuesta.

30 **Ejemplo 7. ARNip humanos**

Se diseñaron y se produjeron ARNip humanos adicionales según se ha descrito en el Ejemplo 2. Se seleccionaron los 45 ARNip mejores en función de su eficacia prevista. En la Tabla 8 se proporcionan las secuencias de estos 45 ARNip.

**Tabla 8: Secuencias sentido y antisentido de ARNip de ALAS1 humano**

SEQ NO: (sentido)	ID SEQ NO: (anti-sentido)	Posición en el transcrito NM_000688.4	Secuencia sentido (5'-3')	Secuencia antisentido (5'-3')
391	392	1635-1657	CAUGCCAAAAUUGGACAUCAU	AUGAUGUCCAUUUUUJGGCAUGAC
393	394	2352-2374	UAAUUUUUAAUCUAUAGUAAA	UUUACUAUAGAUUAAAAUUUAAU
395	396	1324-1346	GGCUGUGAGAUUUACUCUGAU	AUCAGAGUAAAUCUCACAGCCUG
397	398	1637-1659	UGCCAAAAUUGGACAUCAUUU	AAAUUGAUGUCCAUUUUUJGGCAUG
399	400	1363-1385	AUGAUCCAAGGGAUUCGAAAC	GUUUCGAAUCCCUUGGAUCAUGG
401	402	925-947	ACUUUUCAGUAUGAUCGUUUC	GAAACGAUCAUACUGAAAAGUGG
403	404	790-812	CCCAGUGUGGUUAGUGUGAAA	UUUCACACUAACCACACUGGGGC
405	406	1531-1553	UGUGAUGUGGCCCAUGAGUUU	AAACUCAUGGGCCACAUCACACA
407	408	2189-2211	AUUUUGAAGUGAUGAGUGAAA	UUUCACUCAUCACUUCAAAAUGC
409	410	929-951	UUCAGUAUGAUCGUUUCUUUG	CAAAGAAACGAUCAUACUGAAAA
411	412	872-894	GACCAGAAAGAGUGUCUCAUC	GAUGAGACACUCUUUCUGGUCUU
413	414	706-728	UUCUGCAAAGCCAGUCUUGAG	CUCAAGACUGGCUUUGCAGAAGA
415	416	1362-1384	CAUGAUCCAAGGGAUUCGAAA	UUUCGAAUCCCUUGGAUCAUGGA
417	418	1634-1656	UCAUGCCAAAAUUGGACAUCA	UGAUGUCCAUUUUJGGCAUGACU
419	420	1325-1347	GCUGUGAGAUUUACUCUGAUU	AAUCAGAGUAAAUCUCACAGCCU
421	422	2208-2230	AAGAGAGAAGUCCUAAUUUCUC	GAGAAUAGGACUUCUCUCUUUC
423	424	2344-2366	AGUUUAUUAAAUUUUAUCU	AGAUUAAAAUUAAUUAACUUA
425	426	924-946	CACUUUUCAGUAUGAUCGUUU	AAACGAUCAUACUGAAAAGUGGA
427	428	873-895	ACCAGAAAGAGUGUCUCAUCU	AGAUGAGACACUCUUUCUGGUCU
429	430	759-781	GAGGAAAGAGGUUGCUGAAAC	GUUUCAGCAACCUCUUUCCUCAC
431	432	871-893	AGACCAGAAAGAGUGUCUCAU	AUGAGACACUCUUUCUGGUCUUU
433	434	1183-1205	AAUUUUUCUGGAACUAGUAAA	UUUACUAGUCCAGAAAUAUUUC
435	436	2229-2251	AGGCUUGAGCAAGUUGGUAUC	GAUACCAACUUGCUCUAGCCUGA
437	438	671-693	UGGCAGCACAGAUGAAUCAGA	UCUGAUUCAUCUGUGCUGCCAGG
439	440	2187-2209	GCAUUUUGAAGUGAUGAGUGA	UCACUCAUCACUUCAAAAUGCAG
441	442	913-935	AAUCUGUUUCCACUUUUCAG	CUGAAAAGUGGAAACAGAUUUUG
443	444	1977-1999	ACUAAUGAGCAGACUAACAUCU	AUGUUUUGUCUGUCUUAUAGUUC
445	446	1174-1196	GGUACUAGAAAUUUUUCUGGA	UCCAGAAAUUUUCUAGUACCAC
447	448	1810-1832	AUCCUGAAGAGCGCUGAGGGA	UCCUCAGCGCUCUUCAGGAUCC
449	450	892-914	CUUCUUAAGAUAAACUUGCCA	UGGCAAGUUUUCUUGAAGAAGAU
451	452	877-899	GAAAGAGUGUCUCAUCUUCUU	AAGAAGAUAGACACUCUUUCUG
453	454	935-957	AUGAUCGUUUCUUUGAGAAAA	UUUUCUCAAAAGAAACGAUCAUAC
455	456	1975-1997	GAACUAAUGAGCAGACUAAC	GUUAUGUCUGUCUUAUAGUUAU
457	458	1478-1500	CAUUUGAAACUGUCCAUCUCAA	UUGAAUGGACAGUUUCAAUGCC
459	460	2366-2388	UAGUAAAAACAUAGUCCUGGA	UCCAGGACUAUGUUUUUACUUAU
461	462	853-875	GACAUCAUGCAAAGCAAAGA	UCUUUGCUUUUGCAUGAUGUCCU
463	464	1966-1988	GUCUGUGAUGAACUAAUGAGC	GCUCAUUAGUUAUCACAGACUU

ES 2 640 260 T3

465	466	928-950	UUUCAGUAUGAUCGUUUCUUU	AAAGAAACGAUCAUACUGAAAAG
467	468	1186-1208	AUUUCUGGAACUAGUAAAUUC	GAAUUUACUAGUUCAGAAAUAU
469	470	1189-1211	UCUGGAACUAGUAAAUCCAU	AUGGAAUUUACUAGUUCAGAAA
471	472	973-995	AAUGACCACACCUAUCGAGUU	AACUCGAUAGGUGUGGUCAUUCU
473	474	983-1005	CCUAUCGAGUUUUUAAAACUG	CAGUUUUAAAACUCGAUAGGUG
475	476	1185-1207	JAUUUCUGGAACUAGUAAAUU	AAUUUACUAGUUCAGAAAUAUU
477	478	2353-2375	AAAUUUUAAUCUAUAGUAAAA	UUUUACUAUAGAUUAAAUAUUAA
479	480	875-897	CAGAAAGAGUGUCUCAUCUUC	GAAGAUGAGACACUCUUCUGGU
481	482	360-378	GCCCAUUCUUAUCCCGAGU	ACUCGGGAUAAGAAUGGGC
483	484	428-446	CAAAACUGCCCAAGAUGA	UCAUCUUGGGGCAGUUUUG
485	486	873-891	CAGAAAGAGUGUCUCAUCU	AGAUGAGACACUCUUCUG
487	488	874-892	AGAAAGAGUGUCUCAUCUU	AAGAUGAGACACUCUUUCU
489	490	877-895	AAGAGUGUCUCAUCUUCUU	AAGAAGAUGAGACACUCUU
491	492	1295-1313	CUCUUCACCCUGGCUAAGA	UCUUAGCCAGGGUGAAGAG
493	494	1296-1314	UCUUCACCCUGGCUAAGAU	AUCUUAGCCAGGGUGAAGA
495	496	1299-1317	UCACCCUGGCUAAGAUGAU	AUCAUCUUAGCCAGGGUGA
497	498	1347-1365	GGAACCAUGCCUCCAUGAU	AUCAUGGAGGCAUGGUUCC
499	500	1355-1373	GCCUCCAUGAUCCAAGGGA	UCCCUUGGAUCAUGGAGGC
501	502	1356-1374	CCUCCAUGAUCCAAGGGAU	AUCCCUUGGAUCAUGGAGG
503	504	1357-1375	CUCCAUGAUCCAAGGGAUU	AAUCCCUUGGAUCAUGGAG
505	506	1631-1649	GUCAUGCCAAAAUUGGACA	UGUCCAUUUUUUGGCAUGAC
507	508	1634-1652	AUGCCAAAAUUGGACAUCA	UGAUGUCCAUUUUUGGCAU
509	510	1635-1653	UGCCAAAAUUGGACAUCAU	AUGAUGUCCAUUUUUGGCA
511	512	1791-1809	CCCUGGAGUCUGUGCGGAU	AUCCGCACAGACUCCAGGG
513	514	1794-1812	UGGAGUCUGUGCGGAUCCU	AGGAUCCGCACAGACUCCA
515	516	1921-1939	CAUCAUCCUGUGCGGGUU	AACCCGCACAGGGAUGAUG
517	518	359-377	UGCCCAUUCUUAUCCCGAA	UUCGGGAUAAGAAUGGGCA
519	520	362-380	CCAUUCUUAUCCCGAGUCA	UGACUCGGGAUAAGAAUGG
521	522	363-381	CAUUCUUAUCCCGAGUCCA	UGGACUCGGGAUAAGAAUG
523	524	434-452	UGCCCAAGAUGAUGGAAU	AUCCAUCAUCUUGGGGCA
525	526	872-890	CCAGAAAGAGUGUCUCAUA	UAUGAGACACUCUUCUGG
527	528	875-893	GAAAGAGUGUCUCAUCUUA	UAAGAUGAGACACUCUUUC
529	530	1112-1130	CACCCACGGGUGUGUGGGA	UCCACACACCCGUGGGUG
531	532	1113-1131	ACCCACGGGUGUGUGGGGA	UCCACACACCCGUGGGU
533	534	1297-1315	CUUCACCCUGGCUAAGAU	UAUCUUAGCCAGGGUGAAG
535	536	1300-1318	CACCCUGGCUAAGAUGAU	UAUCAUCUUAGCCAGGGUG
537	538	1301-1319	ACCCUGGCUAAGAUGAUGA	UCAUCAUCUUAGCCAGGGU
539	540	1348-1366	GAACCAUGCCUCCAUGAU	UAUCAUGGAGGCAUGGUUC
541	542	1481-1499	GAAACUGUCCAUCUUAUGA	UCAUUGAAUGGACAGUUUC
543	544	1786-1804	UGGAGCCCUGGAGUCUGUA	UACAGACUCCAGGGCUCCA
545	546	1795-1813	GGAGUCUGUGCGGAUCCUA	UAGGAUCCGCACAGACUCC
547	548	1919-1937	CACAUCAUCCUGUGCGGA	UCCGCACAGGGAUGAUGUG
549	550	1922-1940	AUCAUCCUGUGCGGGUUA	UAACCCGCACAGGGAUGAU

551	552	1923-1941	UCAUCCUGUGCGGGUUGA	UCAACCCGCACAGGGAUGA
-----	-----	-----------	--------------------	---------------------

**Ejemplo 8. ARNip humanos**

Se generaron ARNip humanos nonadecaméricos adicionales. En la Tabla 9 se proporcionan las secuencias de estos ARNip. Estos ARNip se pueden evaluar para determinar su eficacia utilizando métodos descritos en la presente y/o métodos conocidos en la técnica.

5 **Tabla 9: Secuencias sentido y antisentido de ARNip de ALAS1 humano**

SEQ ID NO: (sentido)	SEQ ID NO: (anti-sentido)	Posición en el transcrito NM_000688.4	Secuencia sentido (5'-3')	Secuencia antisentido (5'-3')
553	554	4-22	UAUAUUAAGGCGCCGCGCA	UCGCCGGCGCCUUAUAUA
555	556	5-23	AUAUUAAGGCGCCGCGGAU	AUCGCCGGCGCCUUAUAUA
557	558	6-24	UAUUAAGGCGCCGCGGAUC	GAUCGCCGGCGCCUUAUAUA
559	560	7-25	AUUAAGGCGCCGCGGAUCG	CGAUCGCCGGCGCCUUAUA
561	562	8-26	UUAAGGCGCCGCGGAUCGC	GCGAUCGCCGGCGCCUUAUA
563	564	9-27	UAAGGCGCCGCGGAUCGCG	CGCGAUCGCCGGCGCCUUA
565	566	10-28	AAGGCGCCGCGGAUCGCGG	CCGCGAUCGCCGGCGCCUUA
567	568	11-29	AGGCGCCGCGGAUCGCGGC	GCCGCGAUCGCCGGCGCCU
569	570	12-30	GGCGCCGCGGAUCGCGGCC	GGCCGCGAUCGCCGGCGCC
571	572	13-31	GCGCCGCGGAUCGCGGCCU	AGGCCGCGAUCGCCGGCGC
573	574	14-32	CGCCGCGGAUCGCGGCCUG	CAGGCCGCGAUCGCCGGCG
575	576	81-99	CUUGAGUGCCCGCCUCCUU	AAGGAGGCGGGCACUCAAG
577	578	82-100	UUGAGUGCCCGCCUCCUUC	GAAGGAGGCGGGCACUCA
579	580	83-101	UGAGUGCCCGCCUCCUUCG	CGAAGGAGGCGGGCACUCA
581	582	84-102	GAGUGCCCGCCUCCUUCGC	GCGAAGGAGGCGGGCACUC
583	584	85-103	AGUGCCCGCCUCCUUCGCC	GGCGAAGGAGGCGGGCACU
585	586	86-104	GUGCCCGCCUCCUUCGCCG	CGGCGAAGGAGGCGGGCAC
587	588	87-105	UGCCCGCCUCCUUCGCCGC	GCGGCGAAGGAGGCGGGCA
589	590	88-106	GCCCGCCUCCUUCGCCGCC	GGCGGCGAAGGAGGCGGGC
591	592	89-107	CCCGCCUCCUUCGCCGCCG	CGGCGGCGAAGGAGGCGGG
593	594	90-108	CCGCCUCCUUCGCCGCCGC	GCGGCGGCGAAGGAGGCGG
595	596	91-109	CGCCUCCUUCGCCGCCGCC	GGCGGCGGCGAAGGAGGCG
597	598	92-110	GCCUCCUUCGCCGCCGCCU	AGGCGGCGGCGAAGGAGGC
599	600	93-111	CCUCCUUCGCCGCCGCCUC	GAGGCGGCGGCGAAGGAGG
601	602	356-374	CGCUGCCCAUUCUUAUCCC	GGGAUAAGAAUGGGCAGCG
603	604	357-375	GCUGCCCAUUCUUAUCCCG	CGGGAUAAGAAUGGGCAGC
605	606	359-377	UGCCCAUUCUUAUCCCGAG	CUCGGGAUAAGAAUGGGCA
607	608	361-379	CCCAUUCUUAUCCCGAGUC	GACUCGGGAUAAGAAUGGG
609	610	362-380	CCAUUCUUAUCCCGAGUCC	GGACUCGGGAUAAGAAUGG
611	612	363-381	CAUUCUUAUCCCGAGUCCC	GGGACUCGGGAUAAGAAUG
613	614	364-382	AUUCUUAUCCCGAGUCCCC	GGGGACUCGGGAUAAGAAU
615	616	365-383	UUCUUAUCCCGAGUCCCCC	GGGGGACUCGGGAUAAGAA
617	618	366-384	UCUUAUCCCGAGUCCCCCA	UGGGGGACUCGGGAUAAGA
619	620	367-385	CUUAUCCCGAGUCCCCCAG	CUGGGGGACUCGGGAUAAG
621	622	368-386	UUAUCCCGAGUCCCCCAGG	CCUGGGGGACUCGGGAUAA
623	624	369-387	UAUCCCGAGUCCCCCAGGC	GCCUGGGGGACUCGGGAUA
625	626	370-388	AUCCCGAGUCCCCCAGGCC	GGCCUGGGGGACUCGGGAU
627	628	371-389	UCCCGAGUCCCCCAGGCCU	AGGCCUGGGGGACUCGGGA
629	630	372-390	CCCGAGUCCCCCAGGCCUU	AAGGCCUGGGGGACUCGGG
631	632	373-391	CCGAGUCCCCCAGGCCUUU	AAAGGCCUGGGGGACUCGG
633	634	374-392	CGAGUCCCCCAGGCCUUUC	GAAAGGCCUGGGGGACUCG
635	636	375-393	GAGUCCCCCAGGCCUUUCU	AGAAAGGCCUGGGGGACUC
637	638	376-394	AGUCCCCCAGGCCUUUCUG	CAGAAAGGCCUGGGGGACU
639	640	377-395	GUCCCCCAGGCCUUUCUGC	GCAGAAAGGCCUGGGGGAC
641	642	378-396	UCCCCCAGGCCUUUCUGCA	UGCAGAAAGGCCUGGGGGGA
643	644	379-397	CCCCCAGGCCUUUCUGCAG	CUGCAGAAAGGCCUGGGGG
645	646	380-398	CCCCAGGCCUUUCUGCAGA	UCUGCAGAAAGGCCUGGGG
647	648	381-399	CCCAGGCCUUUCUGCAGAA	UUCUGCAGAAAGGCCUGGG

ES 2 640 260 T3

649	650	382-400	CCAGGCCUUUCUGCAGAAA	UUUCUGCAGAAAGGCCUGG
651	652	383-401	CAGGCCUUUCUGCAGAAAG	CUUUCUGCAGAAAGGCCUG
653	654	384-402	AGGCCUUUCUGCAGAAAGC	GCUUUCUGCAGAAAGGCCU
655	656	385-403	GGCCUUUCUGCAGAAAGCA	UGCUUUCUGCAGAAAGGCC
657	658	386-404	GCCUUUCUGCAGAAAGCAG	CUGCUUUCUGCAGAAAGGC
659	660	387-405	CCUUUCUGCAGAAAGCAGG	CCUGCUUUCUGCAGAAAGG
661	662	388-406	CUUUCUGCAGAAAGCAGGC	GCCUGCUUUCUGCAGAAAG
663	664	389-407	UUUCUGCAGAAAGCAGGCA	UGCCUGCUUUCUGCAGAAA
665	666	390-408	UUCUGCAGAAAGCAGGCAA	UUGCCUGCUUUCUGCAGAA
667	668	391-409	UCUGCAGAAAGCAGGCAAA	UUUGCCUGCUUUCUGCAGA
669	670	392-410	CUGCAGAAAGCAGGCAAAU	AUUUGCCUGCUUUCUGCAG
671	672	393-411	UGCAGAAAGCAGGCAAAUC	GAUUUGCCUGCUUUCUGC
673	674	394-412	GCAGAAAGCAGGCAAAUCU	AGAUUUGCCUGCUUUCUGC
675	676	395-413	CAGAAAGCAGGCAAAUCUC	GAGAUUUGCCUGCUUUCUG
677	678	396-414	AGAAAGCAGGCAAAUCUCU	AGAGAUUUGCCUGCUUUCU
679	680	397-415	GAAAGCAGGCAAAUCUCUG	CAGAGAUUUGCCUGCUUUC
681	682	398-416	AAAGCAGGCAAAUCUCUGU	ACAGAGAUUUGCCUGCUUU
683	684	399-417	AAGCAGGCAAAUCUCUGUU	AACAGAGAUUUGCCUGCUU
685	686	400-418	AGCAGGCAAAUCUCUGUUG	CAACAGAGAUUUGCCUGCU
687	688	401-419	GCAGGCAAAUCUCUGUUGU	ACAACAGAGAUUUGCCUGC
689	690	402-420	CAGGCAAAUCUCUGUUGUU	AACAACAGAGAUUUGCCUG
691	692	403-421	AGGCAAAUCUCUGUUGUUC	GAACAACAGAGAUUUGCCU
693	694	405-423	GCAAAUCUCUGUUGUUCUA	UAGAACAACAGAGAUUUGC
695	696	406-424	CAAAUCUCUGUUGUUCUAU	AUAGAACAACAGAGAUUUG
697	698	407-425	AAAUCUCUGUUGUUCUAUG	CAUAGAACAACAGAGAUUU
699	700	408-426	AAUCUCUGUUGUUCUAUGC	GCAUAGAACAACAGAGAUU
701	702	409-427	AUCUCUGUUGUUCUAUGCC	GGCAUAGAACAACAGAGAU
703	704	410-428	UCUCUGUUGUUCUAUGCCC	GGGCAUAGAACAACAGAGA
705	706	411-429	CUCUGUUGUUCUAUGCCCA	UGGGCAUAGAACAACAGAG
707	708	412-430	UCUGUUGUUCUAUGCCCAA	UUGGGCAUAGAACAACAG
709	710	413-431	CUGUUGUUCUAUGCCCAAA	UUUGGGCAUAGAACAACAG
711	712	414-432	UGUUGUUCUAUGCCCAAAA	UUUUGGGCAUAGAACAACA
713	714	415-433	GUUGUUCUAUGCCCAAAAC	GUUUUGGGCAUAGAACAAC
715	716	416-434	UUGUUCUAUGCCCAAAACU	AGUUUUGGGCAUAGAACA
717	718	417-435	UGUUCUAUGCCCAAAACUG	CAGUUUUGGGCAUAGAACA
719	720	418-436	GUUCUAUGCCCAAAACUGC	GCAGUUUUGGGCAUAGAAC
721	722	419-437	UUCUAUGCCCAAAACUGCC	GGCAGUUUUGGGCAUAGAA
723	724	420-438	UCUAUGCCCAAAACUGCCC	GGGCAGUUUUGGGCAUAGA
725	726	421-439	CUAUGCCCAAAACUGCCCC	GGGGCAGUUUUGGGCAUAG
727	728	422-440	UAUGCCCAAAACUGCCCCA	UGGGGCAGUUUUGGGCAUA
729	730	423-441	AUGCCCAAAACUGCCCCAA	UUGGGGCAGUUUUGGGCAU
731	732	424-442	UGCCCAAAACUGCCCCAAG	CUUGGGGCAGUUUUGGGCA
733	734	425-443	GCCCAAAACUGCCCCAAGA	UCUUGGGGCAGUUUUGGGC
735	736	426-444	CCCAAAACUGCCCCAAGAU	AUCUUGGGGCAGUUUUGGG
737	738	427-445	CCAAAACUGCCCCAAGAUG	CAUCUUGGGGCAGUUUUGG
739	740	429-447	AAAACUGCCCCAAGAUGAU	AUCAUCUUGGGGCAGUUUU
741	742	430-448	AAACUGCCCCAAGAUGAUG	CAUCAUCUUGGGGCAGUUU
743	744	431-449	AACUGCCCCAAGAUGAUGG	CCAUCAUCUUGGGGCAGUU
745	746	432-450	ACUGCCCCAAGAUGAUGGA	UCCAUCUUCUUGGGGCAGU
747	748	433-451	CUGCCCCAAGAUGAUGGAA	UUCCAUCUUCUUGGGGCAG
749	750	434-452	UGCCCCAAGAUGAUGGAAG	CUUCCAUCUUCUUGGGGCA
751	752	435-453	GCCCCAAGAUGAUGGAAGU	ACUUCCAUCUUCUUGGGGC
753	754	437-455	CCCAAGAUGAUGGAAGUUG	CAACUCCAUCUUCUUGGG
755	756	438-456	CCAAGAUGAUGGAAGUUGG	CCAACUCCAUCUUCUUGG
757	758	439-457	CAAGAUGAUGGAAGUUGGG	CCCAACUCCAUCUUCUUG
759	760	440-458	AAGAUGAUGGAAGUUGGGG	CCCCAACUCCAUCUUCUU
761	762	441-459	AGAUGAUGGAAGUUGGGGC	GCCCCAACUCCAUCUUCU
763	764	442-460	GAUGAUGGAAGUUGGGGCC	GGCCCCAACUCCAUCUUC
765	766	443-461	AUGAUGGAAGUUGGGGCCA	UGGCCCAACUCCAUCUUC
767	768	444-462	UGAUGGAAGUUGGGGCCAA	UUGGCCCAACUCCAUCUUC
769	770	445-463	GAUGGAAGUUGGGGCCAAG	CUUGGCCCAACUCCAUCUUC
771	772	446-464	AUGGAAGUUGGGGCCAAGC	GCUUGGCCCAACUCCAUCU

ES 2 640 260 T3

773	774	447-465	UGGAAGUUGGGGCCAAGCC	GGCUUGGCCCCAACUCCA
775	776	448-466	GGAAGUUGGGGCCAAGCCA	UGGCUUGGCCCCAACUCC
777	778	449-467	GAAGUUGGGGCCAAGCCAG	CUGGCUUGGCCCCAACUUC
779	780	450-468	AAGUUGGGGCCAAGCCAGC	GCUGGCUUGGCCCCAACUU
781	782	451-469	AGUUGGGGCCAAGCCAGCC	GGCUUGGCUUGGCCCCAACU
783	784	452-470	GUUGGGGCCAAGCCAGCCC	GGGCUUGGCUUGGCCCCAAC
785	786	453-471	UUGGGGCCAAGCCAGCCCC	GGGGCUUGGCUUGGCCCCAAC
787	788	454-472	UGGGGCCAAGCCAGCCCCU	AGGGGCUUGGCUUGGCCCCA
789	790	455-473	GGGGCCAAGCCAGCCCCU	GAGGGGCUUGGCUUGGCCCCA
791	792	456-474	GGGCAAGCCAGCCCCUCG	CGAGGGGCUUGGCUUGGCC
793	794	457-475	GGCCAAGCCAGCCCCUCGG	CCGAGGGGCUUGGCUUGGCC
795	796	458-476	GCCAAGCCAGCCCCUCGGG	CCCGAGGGGCUUGGCUUGGC
797	798	459-477	CCAAGCCAGCCCCUCGGGC	GCCCGAGGGGCUUGGCUUGG
799	800	460-478	CAAGCCAGCCCCUCGGGCA	UGCCCAGGGGCUUGGCUUG
801	802	461-479	AAGCCAGCCCCUCGGGCAU	AUGCCCAGGGGCUUGGCUU
803	804	462-480	AGCCAGCCCCUCGGGCAUU	AAUGCCCAGGGGCUUGGCU
805	806	463-481	GCCAGCCCCUCGGGCAUUG	CAAUGCCCAGGGGCUUGGC
807	808	464-482	CCAGCCCCUCGGGCAUUGU	ACAAUGCCCAGGGGCUUGG
809	810	465-483	CAGCCCCUCGGGCAUUGUC	GACAAUGCCCAGGGGCUUG
811	812	466-484	AGCCCCUCGGGCAUUGUCC	GGACAAUGCCCAGGGGCUU
813	814	467-485	GCCCCUCGGGCAUUGUCCA	UGGACAAUGCCCAGGGGGC
815	816	468-486	CCCCUCGGGCAUUGUCCAC	GUGGACAAUGCCCAGGGGG
817	818	469-487	CCCUCGGGCAUUGUCCACU	AGUGGACAAUGCCCAGGGG
819	820	470-488	CCUCGGGCAUUGUCCACUG	CAGUGGACAAUGCCCAGGG
821	822	471-489	CUCGGGCAUUGUCCACUGC	GCAGUGGACAAUGCCCAGG
823	824	472-490	UCGGGCAUUGUCCACUGCA	UGCAGUGGACAAUGCCCAG
825	826	473-491	CGGGCAUUGUCCACUGCAG	CUGCAGUGGACAAUGCCCAG
827	828	474-492	GGGCAUUGUCCACUGCAGC	GCUGCAGUGGACAAUGCCC
829	830	475-493	GGCAUUGUCCACUGCAGCA	UGCUGCAGUGGACAAUGCCC
831	832	476-494	GCAUUGUCCACUGCAGCAG	CUGCUGCAGUGGACAAUGCC
833	834	477-495	CAUUGUCCACUGCAGCAGU	ACUGCUGCAGUGGACAAUG
835	836	478-496	AUUGUCCACUGCAGCAGUA	UACUGCUGCAGUGGACAAU
837	838	479-497	UUGUCCACUGCAGCAGUAC	GUACUGCUGCAGUGGACAA
839	840	480-498	UGUCCACUGCAGCAGUACA	UGUACUGCUGCAGUGGACA
841	842	481-499	GUCCACUGCAGCAGUACAC	GUGUACUGCUGCAGUGGAC
843	844	482-500	UCCACUGCAGCAGUACACU	AGUGUACUGCUGCAGUGGA
845	846	483-501	CCACUGCAGCAGUACACUA	UAGUGUACUGCUGCAGUGG
847	848	484-502	CACUGCAGCAGUACACUAC	GUAGUGUACUGCUGCAGUG
849	850	485-503	ACUGCAGCAGUACACUACC	GGUAGUGUACUGCUGCAGU
851	852	486-504	CUGCAGCAGUACACUACCA	UGGUAGUGUACUGCUGCAG
853	854	487-505	UGCAGCAGUACACUACCAA	UUGGUAGUGUACUGCUGCA
855	856	488-506	GCAGCAGUACACUACCAAC	GUUGGUAGUGUACUGCUGC
857	858	490-508	AGCAGUACACUACCAACAG	CUGUUGGUAGUGUACUGCU
859	860	491-509	GCAGUACACUACCAACAGA	UCUGUUGGUAGUGUACUGC
861	862	492-510	CAGUACACUACCAACAGAU	AUCUGUUGGUAGUGUACUG
863	864	493-511	AGUACACUACCAACAGAU	GAUCUGUUGGUAGUGUACU
865	866	494-512	GUACACUACCAACAGAUCA	UGAUCUGUUGGUAGUGUAC
867	868	495-513	UACACUACCAACAGAUCAA	UUGAUCUGUUGGUAGUGUA
869	870	496-514	ACACUACCAACAGAUCAAA	UUUGAUCUGUUGGUAGUGU
871	872	497-515	CACUACCAACAGAUCAAAG	CUUUGAUCUGUUGGUAGUG
873	874	498-516	ACUACCAACAGAUCAAAGA	UCUUUGAUCUGUUGGUAGU
875	876	499-517	CUACCAACAGAUCAAAGAA	UUCUUUGAUCUGUUGGUAG
877	878	500-518	UACCAACAGAUCAAAGAAA	UUUCUUUGAUCUGUUGGUA
879	880	501-519	ACCAACAGAUCAAAGAAAC	GUUUCUUUGAUCUGUUGGU
881	882	502-520	CCAACAGAUCAAAGAAACC	GGUUUCUUUGAUCUGUUGG
883	884	523-541	UCCGCCAGUGAGAAAGAC	GUCUUUCUCACUGGCCGGA
885	886	524-542	CCGGCCAGUGAGAAAGACA	UGUCUUUCUCACUGGCCGG
887	888	525-543	CGGCCAGUGAGAAAGACAA	UUGUCUUUCUCACUGGCCG
889	890	526-544	GGCCAGUGAGAAAGACAAA	UUUGUCUUUCUCACUGGCC
891	892	527-545	GCCAGUGAGAAAGACAAA	UUUUGUCUUUCUCACUGGC
893	894	528-546	CCAGUGAGAAAGACAAAAC	GUUUUGUCUUUCUCACUGG
895	896	529-547	CAGUGAGAAAGACAAAACU	AGUUUUGUCUUUCUCACUG

ES 2 640 260 T3

897	898	530-548	AGUGAGAAAGACAAAACUG	CAGUUUUUGUCUUUCUCACU
899	900	531-549	GUGAGAAAGACAAAACUGC	GCAGUUUUUGUCUUUCUCAC
901	902	570-588	CUCCUGAUGGAUCCAGCA	UGCUGGGAUCCAUCAGGAG
903	904	571-589	UCCUGAUGGAUCCAGCAG	CUCUGGGAUCCAUCAGGA
905	906	572-590	CCUGAUGGAUCCAGCAGA	UCUGCUGGGAUCCAUCAGG
907	908	573-591	CUGAUGGAUCCAGCAGAG	CUCUGCUGGGAUCCAUCAG
909	910	574-592	UGAUGGAUCCAGCAGAGU	ACUCUGCUGGGAUCCAUCA
911	912	575-593	GAUGGAUCCAGCAGAGUC	GACUCUGCUGGGAUCCAUC
913	914	576-594	AUGGAUCCAGCAGAGUCC	GGACUCUGCUGGGAUCCAUC
915	916	577-595	UGGAUCCAGCAGAGUCCA	UGGACUCUGCUGGGAUCCA
917	918	578-596	GGAUCCAGCAGAGUCCAG	CUGGACUCUGCUGGGAUCC
919	920	579-597	GAUCCAGCAGAGUCCAGA	UCUGGACUCUGCUGGGAUC
921	922	580-598	AUCCAGCAGAGUCCAGAU	AUCUGGACUCUGCUGGGAU
923	924	581-599	UCCAGCAGAGUCCAGAU	CAUCUGGACUCUGCUGGGA
925	926	582-600	CCCAGCAGAGUCCAGAU	CCAUCUGGACUCUGCUGGG
927	928	583-601	CCAGCAGAGUCCAGAU	GCCAUCUGGACUCUGCUGG
929	930	584-602	CAGCAGAGUCCAGAU	UGCCAUCUGGACUCUGCUG
931	932	585-603	AGCAGAGUCCAGAU	GUGCCAUCUGGACUCUGCU
933	934	586-604	GCAGAGUCCAGAU	UGUGCCAUCUGGACUCUGC
935	936	587-605	CAGAGUCCAGAU	GUGUGCCAUCUGGACUCUG
937	938	588-606	AGAGUCCAGAU	UGUGUGCCAUCUGGACUCU
939	940	589-607	GAGUCCAGAU	CUGUGUGCCAUCUGGACUC
941	942	590-608	AGUCCAGAU	GCUGUGUGCCAUCUGGACU
943	944	591-609	GUCCAGAU	AGCUGUGUGCCAUCUGGAC
945	946	592-610	UCCAGAU	AAGCUGUGUGCCAUCUGGA
947	948	593-611	CCAGAU	GAAGCUGUGUGCCAUCUGG
949	950	594-612	CAGAU	GGAAGCUGUGUGCCAUCUG
951	952	595-613	AGAUGGCACACAGCU	CGGAAGCUGUGUGCCAUCU
953	954	596-614	GAUGGCACACAGCU	ACGGAAGCUGUGUGCCAUC
955	956	597-615	AUGGCACACAGCU	GACGGAAGCUGUGUGCCAUC
957	958	598-616	UGGCACACAGCU	AGACGGAAGCUGUGUGCCA
959	960	599-617	GGCACACAGCU	CAGACGGAAGCUGUGUGCC
961	962	600-618	GCACACAGCU	CCAGACGGAAGCUGUGUGC
963	964	601-619	CACACAGCU	UCCAGACGGAAGCUGUGUG
965	966	602-620	ACACAGCU	GUCCAGACGGAAGCUGUGU
967	968	603-621	CACAGCU	UGUCCAGACGGAAGCUGUG
969	970	604-622	ACAGCU	GUGUCCAGACGGAAGCUGU
971	972	605-623	CAGCU	GGUGUCCAGACGGAAGCUG
973	974	606-624	AGCU	GGUGUCCAGACGGAAGCU
975	976	607-625	GCU	GGGUGUCCAGACGGAAGC
977	978	608-626	CU	AGGGGUGUCCAGACGGAAG
979	980	609-627	U	AAGGGGUGUCCAGACGGA
981	982	610-628	U	CAAGGGGUGUCCAGACGGA
983	984	611-629	C	GCAAGGGGUGUCCAGACGG
985	986	612-630	CG	GGCAAGGGGUGUCCAGACG
987	988	613-631	GUC	AGGCAAGGGGUGUCCAGAC
989	990	614-632	UCUG	CAGGCAAGGGGUGUCCAGA
991	992	615-633	CUGG	GCAGGCAAGGGGUGUCCAG
993	994	616-634	UGG	GGCAGGCAAGGGGUGUCCA
995	996	617-635	GGAC	UGGCAGGCAAGGGGUGUCC
997	998	618-636	GAC	GUGGCAGGCAAGGGGUGUC
999	1000	619-637	AC	UGUGGCAGGCAAGGGGUGU
1001	1002	620-638	C	UUGUGGCAGGCAAGGGGUG
1003	1004	621-639	AC	CUUGUGGCAGGCAAGGGGU
1005	1006	622-640	CC	GCUUGUGGCAGGCAAGGGG
1007	1008	623-641	CCU	GGCUUGUGGCAGGCAAGGG
1009	1010	624-642	CCU	UGGCUUGUGGCAGGCAAGG
1011	1012	625-643	CU	CUGGCUUGUGGCAGGCAAG
1013	1014	626-644	UUG	CCUGGCUUGUGGCAGGCAA
1015	1016	627-645	UG	CCUUGGCUUGUGGCAGGCA
1017	1018	628-646	GCC	GCCUUGGCUUGUGGCAGGC
1019	1020	629-647	CCU	UGCCUUGGCUUGUGGCAGG

ES 2 640 260 T3

1021	1022	630-648	CUGCCACAAGCCAGGGCAC	GUGCCCUUGGCUUGUGGCAG
1023	1024	631-649	UGCCACAAGCCAGGGCACU	AGUGCCCUGGCUUGUGGCA
1025	1026	632-650	GCCACAAGCCAGGGCACUG	CAGUGCCCUGGCUUGUGGC
1027	1028	633-651	CCACAAGCCAGGGCACUGC	GCAGUGCCCUGGCUUGUGG
1029	1030	634-652	CACAAGCCAGGGCACUGCA	UGCAGUGCCCUGGCUUGUG
1031	1032	635-653	ACAAGCCAGGGCACUGCAA	UUGCAGUGCCCUGGCUUGU
1033	1034	636-654	CAAGCCAGGGCACUGCAAG	CUUGCAGUGCCCUGGCUUG
1035	1036	637-655	AAGCCAGGGCACUGCAAGC	GCUUGCAGUGCCCUGGCUU
1037	1038	638-656	AGCCAGGGCACUGCAAGCA	UGCUGCAGUGCCCUGGCUU
1039	1040	639-657	GCCAGGGCACUGCAAGCAA	UUGCUGCAGUGCCCUGGCG
1041	1042	640-658	CCAGGGCACUGCAAGCAAA	UUUGCUGCAGUGCCCUGG
1043	1044	641-659	CAGGGCACUGCAAGCAAAU	AUUUGCUGCAGUGCCCUG
1045	1046	642-660	AGGGCACUGCAAGCAAAUG	CAUUUGCUGCAGUGCCCU
1047	1048	643-661	GGGCACUGCAAGCAAAUGC	GCAUUUGCUGCAGUGCCC
1049	1050	644-662	GGCACUGCAAGCAAAUGCC	GGCAUUUGCUGCAGUGCC
1051	1052	645-663	GCACUGCAAGCAAAUGCCC	GGGCAUUUGCUGCAGUGC
1053	1054	647-665	ACUGCAAGCAAAUGCCCUU	AAGGGCAUUUGCUGCAGU
1055	1056	648-666	CUGCAAGCAAAUGCCCUU	AAAGGGCAUUUGCUGCAG
1057	1058	649-667	UGCAAGCAAAUGCCCUUUC	GAAAGGGCAUUUGCUCGA
1059	1060	650-668	GCAAGCAAAUGCCCUUUC	GGAAAGGGCAUUUGCUCG
1061	1062	651-669	CAAGCAAAUGCCCUUUCU	AGGAAAGGGCAUUUGCUCG
1063	1064	652-670	AAGCAAAUGCCCUUUCUG	CAGGAAAGGGCAUUUGCUC
1065	1066	653-671	AGCAAAUGCCCUUUCUGG	CCAGGAAAGGGCAUUUGCUC
1067	1068	654-672	GCAAAUGCCCUUUCUGGC	GCCAGGAAAGGGCAUUUGC
1069	1070	655-673	CAAAUGCCCUUUCUGGCA	UGCCAGGAAAGGGCAUUUG
1071	1072	656-674	AAUUGCCCUUUCUGGCAG	CUGCCAGGAAAGGGCAUUU
1073	1074	657-675	AAUGCCCUUUCUGGCAGC	GCUGCCAGGAAAGGGCAUU
1075	1076	658-676	AUGCCCUUUCUGGCAGCA	UGCUGCCAGGAAAGGGCAU
1077	1078	659-677	UGCCCUUUCUGGCAGCAC	GUGCUGCCAGGAAAGGGCA
1079	1080	660-678	GCCCUUUCUGGCAGCAC	UGCUGCCAGGAAAGGGGC
1081	1082	661-679	CCCUUUCUGGCAGCACAG	CUGUGCUGCCAGGAAAGGG
1083	1084	662-680	CCUUUCUGGCAGCACAGA	UCUGUGCUGCCAGGAAAGG
1085	1086	663-681	CUUUCUGGCAGCACAGAU	AUCUGUGCUGCCAGGAAAG
1087	1088	664-682	UUUCUGGCAGCACAGAU	CAUCUGUGCUGCCAGGAAA
1089	1090	665-683	UUCUGGCAGCACAGAU	UCAUCUGUGCUGCCAGGAA
1091	1092	666-684	UCCUGGCAGCACAGAU	UUCAUCUGUGCUGCCAGGA
1093	1094	667-685	CCUGGCAGCACAGAU	AUUCAUCUGUGCUGCCAGG
1095	1096	668-686	CUGGCAGCACAGAU	GAUUCAUCUGUGCUGCCAG
1097	1098	670-688	GGCAGCACAGAU	CUGAUUCAUCUGUGCUGCC
1099	1100	672-690	CAGCACAGAU	CUCUGAUUCAUCUGUGCUG
1101	1102	692-710	GGCAGCAGUCUUGCA	UGCAGAAGACACUGCUGCC
1103	1104	693-711	GCAGCAGUCUUGCA	UUGCAGAAGACACUGCUGC
1105	1106	694-712	CAGCAGUCUUGCA	UUUGCAGAAGACACUGCUG
1107	1108	695-713	AGCAGUCUUGCA	CUUUGCAGAAGACACUGCU
1109	1110	696-714	GCAGUCUUGCA	GCUUUGCAGAAGACACUGC
1111	1112	697-715	CAGUCUUGCA	GGCUUUGCAGAAGACACUG
1113	1114	698-716	AGUCUUGCA	UGGCUUUGCAGAAGACACU
1115	1116	699-717	GUCUUGCA	CUGGCUUUGCAGAAGACAC
1117	1118	700-718	UGCUUGCA	ACUGGCUUUGCAGAAGACA
1119	1120	701-719	GUCUUGCA	GACUGGCUUUGCAGAAGAC
1121	1122	702-720	UCUUGCA	AGACUGGCUUUGCAGAAGA
1123	1124	703-721	CUUGCA	AAGACUGGCUUUGCAGAAG
1125	1126	704-722	UUCUGCA	CAAGACUGGCUUUGCAGAA
1127	1128	705-723	UCUGCA	UCAAGACUGGCUUUGCAGA
1129	1130	706-724	CUGCA	CUCAAGACUGGCUUUGCAG
1131	1132	707-725	UGCA	GCUCAAGACUGGCUUUGCA
1133	1134	708-726	GCA	AGCUCAAGACUGGCUUUGC
1135	1136	709-727	CAA	AAGCUCAAGACUGGCUUUG
1137	1138	710-728	AA	GAAGCUCAAGACUGGCUUUG
1139	1140	711-729	AAG	UGAAGCUCAAGACUGGCUU
1141	1142	712-730	AG	CUGAAGCUCAAGACUGGCU
1143	1144	713-731	GCC	CCUGAAGCUCAAGACUGGCG

ES 2 640 260 T3

1145	1146	714-732	CCAGUCUUGAGCUUCAGGA	UCCUGAAGCUC AAGACUGG
1147	1148	715-733	CAGUCUUGAGCUUCAGGAG	CUCCUGAAGCUC AAGACUG
1149	1150	716-734	AGUCUUGAGCUUCAGGAGG	CCUCCUGAAGCUC AAGACU
1151	1152	717-735	GUCUUGAGCUUCAGGAGGA	UCCUCCUGAAGCUC AAGAC
1153	1154	718-736	UCUUGAGCUUCAGGAGGAU	AUCCUCCUGAAGCUC AAGA
1155	1156	719-737	CUUGAGCUUCAGGAGGAUG	CAUCCUCCUGAAGCUC AAG
1157	1158	720-738	UUGAGCUUCAGGAGGAUGU	ACAUCCUCCUGAAGCUC AA
1159	1160	721-739	UGAGCUUCAGGAGGAUGUG	CACAUCCUCCUGAAGCUC A
1161	1162	722-740	GAGCUUCAGGAGGAUGUGC	GCACAUCCUCCUGAAGCUC
1163	1164	723-741	AGCUUCAGGAGGAUGUGCA	UGCACAUCCUCCUGAAGCU
1165	1166	724-742	GCUUCAGGAGGAUGUGCAG	CUGCACAUCCUCCUGAAGC
1167	1168	725-743	CUUCAGGAGGAUGUGCAGG	CCUGCACAUCCUCCUGAAG
1169	1170	726-744	UUCAGGAGGAUGUGCAGGA	UCCUGCACAUCCUCCUGAA
1171	1172	727-745	UCAGGAGGAUGUGCAGGAA	UUCUGCACAUCCUCCUGA
1173	1174	728-746	CAGGAGGAUGUGCAGGAAA	UUUCCUGCACAUCCUCCUG
1175	1176	729-747	AGGAGGAUGUGCAGGAAAU	AUUUCCUGCACAUCCUCCU
1177	1178	730-748	GGAGGAUGUGCAGGAAAUG	CAUUUCCUGCACAUCCUCC
1179	1180	731-749	GAGGAUGUGCAGGAAAUGA	UCAUUUCCUGCACAUCCUC
1181	1182	732-750	AGGAUGUGCAGGAAAUGAA	UUCAUUUCCUGCACAUCCU
1183	1184	733-751	GGAUGUGCAGGAAAUGAAU	AUUCAUUUCCUGCACAUCC
1185	1186	734-752	GAUGUGCAGGAAAUGAAUG	CAUUCAUUUCCUGCACAUUC
1187	1188	735-753	AUGUGCAGGAAAUGAAUGC	GCAUUCAUUUCCUGCACAU
1189	1190	755-773	GUGAGGAAAGAGGUUGCUG	CAGCAACCUCUUUCCUCAC
1191	1192	756-774	UGAGGAAAGAGGUUGCUGA	UCAGCAACCUCUUUCCUCA
1193	1194	757-775	GAGGAAAGAGGUUGCUGAA	UUCAGCAACCUCUUUCCUC
1195	1196	758-776	AGGAAAGAGGUUGCUGAAA	UUUCAGCAACCUCUUUCCU
1197	1198	759-777	GGAAAGAGGUUGCUGAAAC	GUUUUAGCAACCUCUUUCC
1199	1200	760-778	GAAAGAGGUUGCUGAAACC	GGUUUAGCAACCUCUUUC
1201	1202	761-779	AAAGAGGUUGCUGAAACCU	AGUUUAGCAACCUCUUU
1203	1204	762-780	AAGAGGUUGCUGAAACCUC	GAGUUUAGCAACCUCUU
1205	1206	763-781	AGAGGUUGCUGAAACCUCA	UGAGGUUUCAGCAACCUCU
1207	1208	764-782	GAGGUUGCUGAAACCUCAG	CUGAGGUUUCAGCAACCUC
1209	1210	765-783	AGGUUGCUGAAACCUCAGC	GCUGAGGUUUCAGCAACCU
1211	1212	766-784	GGUUGCUGAAACCUCAGCA	UGCUGAGGUUUCAGCAACC
1213	1214	787-805	CCCCAGUGUGGUUAGUGUG	CACACUAACCACACUGGGG
1215	1216	791-809	AGUGUGGUUAGUGUGAAAA	UUUUCACACUAACCACACU
1217	1218	792-810	GUGUGGUUAGUGUGAAAC	GUUUUCACACUAACCACAC
1219	1220	812-830	GAUGGAGGGGAUCCAGUG	CACUGGGAUCCCUCCAUC
1221	1222	813-831	AUGGAGGGGAUCCAGUGG	CCACUGGGAUCCCUCCAUC
1223	1224	833-851	CUGCUGAAGAACUCCAGG	CCUGGAAGUUCUUCAGCAG
1225	1226	834-852	UGCUGAAGAACUCCAGGA	UCCUGGAAGUUCUUCAGCA
1227	1228	835-853	GCUGAAGAACUCCAGGAC	GUCCUGGAAGUUCUUCAGC
1229	1230	836-854	CUGAAGAACUCCAGGACA	UGUCCUGGAAGUUCUUCAG
1231	1232	837-855	UGAAGAACUCCAGGACAU	AUGUCCUGGAAGUUCUUCA
1233	1234	838-856	GAAGAACUCCAGGACAUC	GAUGUCCUGGAAGUUCUUC
1235	1236	839-857	AAGAACUCCAGGACAUCA	UGAUGUCCUGGAAGUUCU
1237	1238	840-858	AGAACUCCAGGACAUCAU	AUGAUGUCCUGGAAGUUCU
1239	1240	841-859	GAACUCCAGGACAUCAUG	CAUGAUGUCCUGGAAGUUC
1241	1242	842-860	AACUCCAGGACAUCAUGC	GCAUGAUGUCCUGGAAGU
1243	1244	843-861	ACUCCAGGACAUCAUGCA	UGCAUGAUGUCCUGGAAGU
1245	1246	844-862	CUCCAGGACAUCAUGCAA	UUGCAUGAUGUCCUGGAAG
1247	1248	845-863	UCCAGGACAUCAUGCAAA	UUUGCAUGAUGUCCUGGAA
1249	1250	846-864	UCCAGGACAUCAUGCAAAA	UUUUGCAUGAUGUCCUGGA
1251	1252	847-865	CCAGGACAUCAUGCAAAAG	CUUUUGCAUGAUGUCCUGG
1253	1254	848-866	CAGGACAUCAUGCAAAAGC	GCUUUUGCAUGAUGUCCUG
1255	1256	849-867	AGGACAUCAUGCAAAAGCA	UGCUUUUGCAUGAUGUCCU
1257	1258	850-868	GGACAUCAUGCAAAAGCAA	UUGCUUUUGCAUGAUGUCC
1259	1260	851-869	GACAUCAUGCAAAAGCAA	UUUGCUUUUGCAUGAUGUC
1261	1262	852-870	ACAUCAUGCAAAAGCAAAG	CUUUGCUUUUGCAUGAUGU
1263	1264	854-872	AUCAUGCAAAAGCAAAGAC	GUCUUUGCUUUUGCAUGAU
1265	1266	855-873	UCAUGCAAAAGCAAAGACC	GGUCUUUGCUUUUGCAUGA
1267	1268	856-874	CAUGCAAAAGCAAAGACCA	UGGUCUUUGCUUUUGCAUG

ES 2 640 260 T3

1269	1270	857-875	AUGCAAAAGCAAAGACCAG	CUGGUCUUUGCUUUUGCAU
1271	1272	858-876	UGCAAAAGCAAAGACCAGA	UCUGGUCUUUGCUUUUGCA
1273	1274	859-877	GCAAAAGCAAAGACCAGAA	UUCUGGUCUUUGCUUUUGC
1275	1276	860-878	CAAAAGCAAAGACCAGAAA	UUUCUGGUCUUUGCUUUUG
1277	1278	861-879	AAAAGCAAAGACCAGAAAG	CUUUCUGGUCUUUGCUUUU
1279	1280	862-880	AAAGCAAAGACCAGAAAGA	UCUUUCUGGUCUUUGCUUU
1281	1282	863-881	AAGCAAAGACCAGAAAGAG	CUCUUUCUGGUCUUUGCUU
1283	1284	864-882	AGCAAAGACCAGAAAGAGU	ACUCUUUCUGGUCUUUGCU
1285	1286	865-883	GCAAAGACCAGAAAGAGUG	CACUCUUUCUGGUCUUUGC
1287	1288	867-885	AAAGACCAGAAAGAGUGUC	GACACUCUUUCUGGUCUUU
1289	1290	868-886	AAGACCAGAAAGAGUGUCU	AGACACUCUUUCUGGUCUU
1291	1292	869-887	AGACCAGAAAGAGUGUCUC	GAGACACUCUUUCUGGUCU
1293	1294	870-888	GACCAGAAAGAGUGUCUCA	UGAGACACUCUUUCUGGUC
1295	1296	871-889	ACCAGAAAGAGUGUCUCAU	AUGAGACACUCUUUCUGGU
1297	1298	872-890	CCAGAAAGAGUGUCUCAUC	GAUGAGACACUCUUUCUGG
1299	1300	875-893	GAAAGAGUGUCUCAUCUUC	GAAGAUAGACACUCUUUC
1301	1302	878-896	AGAGUGUCUCAUCUUCUUC	GAAGAAGAUGAGACACUCU
1303	1304	879-897	GAGUGUCUCAUCUUCUUA	UGAAGAAGAUGAGACACUC
1305	1306	880-898	AGUGUCUCAUCUUCUCAA	UUGAAGAAGAUGAGACACU
1307	1308	881-899	GUGUCUCAUCUUCUUAAG	CUUGAAGAAGAUGAGACAC
1309	1310	882-900	UGUCUCAUCUUCUUAAGA	UCUUGAAGAAGAUGAGACA
1311	1312	883-901	GUCUCAUCUUCUUAAGAU	AUCUUGAAGAAGAUGAGAC
1313	1314	884-902	UCUCAUCUUCUUAAGAU	UAUCUUGAAGAAGAUGAGA
1315	1316	886-904	UCAUCUUCUUAAGAUAA	GUUAUCUUGAAGAAGAUGA
1317	1318	887-905	CAUCUUCUUAAGAUAAUC	AGUUAUCUUGAAGAAGAUG
1319	1320	888-906	AUCUUCUUAAGAUAAUCU	AAGUUAUCUUGAAGAAGAU
1321	1322	889-907	UCUUCUUAAGAUAAUCUUG	CAAGUUAUCUUGAAGAAGA
1323	1324	890-908	CUUCUUAAGAUAAUCUUGC	GCAAGUUAUCUUGAAGAAG
1325	1326	891-909	UUCUUAAGAUAAUCUUGCC	GGCAAGUUAUCUUGAAGAA
1327	1328	892-910	UCUUAAGAUAAUCUUGCCA	UGGCAAGUUAUCUUGAAGA
1329	1330	893-911	CUUUAAGAUAAUCUUGCCAA	UUGGCAAGUUAUCUUGAAG
1331	1332	894-912	UUAAGAUAAUCUUGCCAAA	UUUGGCAAGUUAUCUUGAA
1333	1334	895-913	UCAAGAUAAUCUUGCCAAA	UUUUGGCAAGUUAUCUUGA
1335	1336	896-914	CAAGAUAAUCUUGCCAAA	AUUUUGGCAAGUUAUCUUG
1337	1338	897-915	AAGAUAAUCUUGCCAAA	GAUUUUGGCAAGUUAUCU
1339	1340	898-916	AGAUAAUCUUGCCAAA	AGAUUUUGGCAAGUUAUCU
1341	1342	899-917	GAUAAUCUUGCCAAA	CAGAUUUUGGCAAGUUAUC
1343	1344	900-918	AUAACUUGCCAAA	ACAGAUUUUGGCAAGUUAU
1345	1346	901-919	UAACUUGCCAAA	AACAGAUUUUGGCAAGUUA
1347	1348	902-920	AACUUGCCAAA	AAACAGAUUUUGGCAAGUU
1349	1350	903-921	ACUUGCCAAA	GAAACAGAUUUUGGCAAGU
1351	1352	904-922	CUUGCCAAA	GGAAACAGAUUUUGGCAAG
1353	1354	905-923	UUGCCAAA	UGGAAACAGAUUUUGGCAA
1355	1356	906-924	UGCCAAA	GUGGAAACAGAUUUUGGCA
1357	1358	907-925	GCCAAA	AGUGGAAACAGAUUUUGGC
1359	1360	908-926	CCAAA	AAGUGGAAACAGAUUUUGG
1361	1362	909-927	CAAAA	AAAGUGGAAACAGAUUUUG
1363	1364	910-928	AAAA	AAAAGUGGAAACAGAUUUU
1365	1366	911-929	AAAU	GAAAAGUGGAAACAGAUUU
1367	1368	912-930	AAUC	UGAAAAGUGGAAACAGAUU
1369	1370	913-931	AUCU	CUGAAAAGUGGAAACAGAU
1371	1372	916-934	UGUU	AUACUGAAAAGUGGAAACA
1373	1374	917-935	GUUU	CAUACUGAAAAGUGGAAAC
1375	1376	918-936	UUUU	UCAUACUGAAAAGUGGAAA
1377	1378	919-937	UUCU	AUCAUACUGAAAAGUGGAA
1379	1380	920-938	UCCU	GAUCAUACUGAAAAGUGGA
1381	1382	921-939	CCUU	CGAUCAUACUGAAAAGUGG
1383	1384	925-943	UUUU	GAAACGAUCAUACUGAAAA
1385	1386	929-947	CAGU	CAAAGAAACGAUCAUACUG
1387	1388	930-948	AGUA	UCAAGAAACGAUCAUACU
1389	1390	931-949	GUAU	CUCAAGAAACGAUCAUAC
1391	1392	933-951	AUGA	UUCUCAAGAAACGAUCAU

ES 2 640 260 T3

1393	1394	934-952	UGAUCGUUUCUUUGAGAAA	UUUCUCAAGAAACGAUCA
1395	1396	936-954	AUCGUUUCUUUGAGAAAAA	UUUUUCUCAAGAAACGAU
1397	1398	937-955	UCGUUUCUUUGAGAAAAAA	UUUUUUUCUCAAGAAACGA
1399	1400	938-956	CGUUUCUUUGAGAAAAAAA	UUUUUUUCUCAAGAAACG
1401	1402	939-957	GUUUCUUUGAGAAAAAAAU	AUUUUUUUCUCAAGAAAC
1403	1404	940-958	UUUCUUUGAGAAAAAAAUU	AAUUUUUUUCUCAAGAAA
1405	1406	941-959	UUCUUUGAGAAAAAAAUUG	CAUUUUUUUCUCAAGAA
1407	1408	942-960	UCUUUGAGAAAAAAAUUGA	UCAUUUUUUUCUCAAGA
1409	1410	943-961	CUUUGAGAAAAAAAUUGAU	AUCAUUUUUUUCUCAAG
1411	1412	944-962	UUUGAGAAAAAAAUUGAUG	CAUCAUUUUUUUCUCAAA
1413	1414	945-963	UUGAGAAAAAAAUUGAUGA	UCAUCAUUUUUUUCUCA
1415	1416	946-964	UGAGAAAAAAAUUGAUGAG	CUCAUCAUUUUUUUCUCA
1417	1418	947-965	GAGAAAAAAAUUGAUGAGA	UCUCAUCAUUUUUUUCUC
1419	1420	948-966	AGAAAAAAAUUGAUGAGAA	UUCUCAUCAUUUUUUUCU
1421	1422	949-967	GAAAAAAAUUGAUGAGAAA	UUUCUCAUCAUUUUUUUC
1423	1424	950-968	AAAAAAUUGAUGAGAAAA	UUUUCUCAUCAUUUUUUU
1425	1426	951-969	AAAAAUUGAUGAGAAAAA	UUUUUCUCAUCAUUUUUU
1427	1428	952-970	AAAAUUGAUGAGAAAAAG	CUUUUUCUCAUCAUUUUU
1429	1430	953-971	AAAAUUGAUGAGAAAAAGA	UCUUUUUCUCAUCAUUUU
1431	1432	954-972	AAAUUGAUGAGAAAAAGAA	UUCUUUUUCUCAUCAUUU
1433	1434	955-973	AAUUGAUGAGAAAAAGAAU	AUUCUUUUUCUCAUCAUU
1435	1436	956-974	AUUGAUGAGAAAAAGAAUG	CAUUCUUUUUCUCAUCAU
1437	1438	957-975	UUGAUGAGAAAAAGAAUGA	UCAUUCUUUUUCUCAUCA
1439	1440	958-976	UGAUGAGAAAAAGAAUGAC	GUCAUUCUUUUUCUCAUCA
1441	1442	959-977	GAUGAGAAAAAGAAUGACC	GGUCAUUCUUUUUCUCAUC
1443	1444	960-978	AUGAGAAAAAGAAUGACCA	UGGUCAUUCUUUUUCUCAU
1445	1446	961-979	UGAGAAAAAGAAUGACCAC	GUGGUCAUUCUUUUUCUCA
1447	1448	962-980	GAGAAAAAGAAUGACCACA	UGUGGUCAUUCUUUUUCUC
1449	1450	963-981	AGAAAAAGAAUGACCACAC	GUGUGGUCAUUCUUUUUCU
1451	1452	964-982	GAAAAAGAAUGACCACACC	GGUGUGGUCAUUCUUUUUC
1453	1454	965-983	AAAAAGAAUGACCACACCU	AGGUGUGGUCAUUCUUUU
1455	1456	966-984	AAAAGAAUGACCACACCUA	UAGGUGUGGUCAUUCUUU
1457	1458	967-985	AAAGAAUGACCACACCUAU	AUAGGUGUGGUCAUUCUU
1459	1460	968-986	AAGAAUGACCACACCUAUC	GAUAGGUGUGGUCAUUCU
1461	1462	969-987	AGAAUGACCACACCUAUCG	CGAUAGGUGUGGUCAUUCU
1463	1464	970-988	GAAUGACCACACCUAUCGA	UCGAUAGGUGUGGUCAUUC
1465	1466	971-989	AAUGACCACACCUAUCGAG	CUCGAUAGGUGUGGUCAU
1467	1468	972-990	AUGACCACACCUAUCGAGU	ACUCGAUAGGUGUGGUCAU
1469	1470	976-994	CCACACCUAUCGAGUUUUU	AAAAACUCGAUAGGUGUG
1471	1472	977-995	CACACCUAUCGAGUUUUUA	UAAAAACUCGAUAGGUGUG
1473	1474	978-996	ACACCUAUCGAGUUUUUAA	UUAAAAACUCGAUAGGUGU
1475	1476	979-997	CACCUAUCGAGUUUUUAAA	UUUAAAAACUCGAUAGGUG
1477	1478	980-998	ACCUAUCGAGUUUUUAAAA	UUUUAAAAACUCGAUAGGU
1479	1480	981-999	CCUAUCGAGUUUUUAAAAAC	GUUUUAAAAACUCGAUAGG
1481	1482	982-1000	CUAUCGAGUUUUUAAAAACU	AGUUUUAAAAACUCGAUAG
1483	1484	983-1001	UAUCGAGUUUUUAAAAACUG	CAGUUUUAAAAACUCGAUA
1485	1486	984-1002	AUCGAGUUUUUAAAAACUGU	ACAGUUUUAAAAACUCGAU
1487	1488	985-1003	UCGAGUUUUUAAAAACUGUG	CACAGUUUUAAAAACUCGA
1489	1490	986-1004	CGAGUUUUUAAAAACUGUGA	UCACAGUUUUAAAAACUCG
1491	1492	987-1005	GAGUUUUUAAAAACUGUGAA	UUCACAGUUUUAAAAACUC
1493	1494	988-1006	AGUUUUUAAAAACUGUGAAC	GUUCACAGUUUUAAAAACU
1495	1496	989-1007	GUUUUUAAAAACUGUGAAC	GGUUCACAGUUUUAAAAAC
1497	1498	990-1008	UUUUUAAAAACUGUGAACCG	CGGUUCACAGUUUUAAAA
1499	1500	991-1009	UUUUAAAAACUGUGAACCGG	CCGGUUCACAGUUUUAAAA
1501	1502	992-1010	UUUAAAAACUGUGAACCGGC	GCCGGUUCACAGUUUUAAA
1503	1504	993-1011	UUAAAAACUGUGAACCGGCG	CGCCGGUUCACAGUUUUAA
1505	1506	994-1012	UAAAAACUGUGAACCGGCGA	UCGCCGGUUCACAGUUUUA
1507	1508	995-1013	AAAACUGUGAACCGGCGAG	CUCGCCGGUUCACAGUUUU
1509	1510	996-1014	AAACUGUGAACCGGCGAGC	GCUCGCCGGUUCACAGUUU
1511	1512	997-1015	AACUGUGAACCGGCGAGCA	UGCUCGCCGGUUCACAGUU
1513	1514	998-1016	ACUGUGAACCGGCGAGCAC	GUGCUCGCCGGUUCACAGU
1515	1516	999-1017	CUGUGAACCGGCGAGCACA	UGUGCUCGCCGGUUCACAG

ES 2 640 260 T3

1517	1518	1000-1018	UGUGAACCGGCGAGCACAC	GUGUGCUCGCCGGUUCACA
1519	1520	1001-1019	GUGAACCGGCGAGCACACA	UGUGUGCUCGCCGGUUCAC
1521	1522	1002-1020	UGAACCGGCGAGCACACAU	AUGUGUGCUCGCCGGUUCA
1523	1524	1003-1021	GAACCGGCGAGCACACAUC	GAUGUGUGCUCGCCGGUUC
1525	1526	1004-1022	AACCGGCGAGCACACAUCU	AGAUGUGUGCUCGCCGGUU
1527	1528	1005-1023	ACCGGCGAGCACACAUCUU	AAGAUGUGUGCUCGCCGGU
1529	1530	1006-1024	CCGGCGAGCACACAUCUUC	GAAGAUGUGUGCUCGCCGG
1531	1532	1007-1025	CGGCGAGCACACAUCUCC	GGAAGAUGUGUGCUCGCCG
1533	1534	1008-1026	GGCGAGCACACAUCUCCC	GGGAAGAUGUGUGCUCGCC
1535	1536	1028-1046	AUGGCAGAUAGACUUAUCAG	CUGAAUAGUCAUCUGCCA
1537	1538	1030-1048	GGCAGAUAGACUUAUCAGAC	GUCUGAAUAGUCAUCUGCC
1539	1540	1031-1049	GCAGAUAGACUUAUCAGACU	AGUCUGAAUAGUCAUCUGC
1541	1542	1032-1050	CAGAUAGACUUAUCAGACUC	GAGUCUGAAUAGUCAUCUG
1543	1544	1033-1051	AGAUGACUUAUCAGACUCC	GGAGUCUGAAUAGUCAUCU
1545	1546	1034-1052	GAUGACUUAUCAGACUCCC	GGGAGUCUGAAUAGUCAUC
1547	1548	1035-1053	AUGACUUAUCAGACUCCCU	AGGGAGUCUGAAUAGUCAU
1549	1550	1036-1054	UGACUUAUCAGACUCCUC	GAGGGAGUCUGAAUAGUCA
1551	1552	1037-1055	GACUUAUCAGACUCCCUCA	UGAGGGAGUCUGAAUAGUC
1553	1554	1038-1056	ACUUAUCAGACUCCCUCAU	AUGAGGGAGUCUGAAUAGU
1555	1556	1039-1057	CUUAUCAGACUCCCUCAUC	GAUGAGGGAGUCUGAAUAG
1557	1558	1040-1058	UAUUCAGACUCCCUCAUCA	UGAUGAGGGAGUCUGAAUA
1559	1560	1041-1059	AUUCAGACUCCCUCAUCAC	GUGAUGAGGGAGUCUGAAU
1561	1562	1042-1060	UUCAGACUCCCUCAUCACC	GGUGAUGAGGGAGUCUGAA
1563	1564	1043-1061	UCAGACUCCCUCAUCACCA	UGGUGAUGAGGGAGUCUGA
1565	1566	1044-1062	CAGACUCCCUCAUCACCAA	UUGGUGAUGAGGGAGUCUG
1567	1568	1045-1063	AGACUCCCUCAUCACCAAA	UUUGGUGAUGAGGGAGUCU
1569	1570	1046-1064	GACUCCCUCAUCACCAAAA	UUUUGGUGAUGAGGGAGUC
1571	1572	1047-1065	ACUCCCUCAUCACCAAAAA	UUUUUGGUGAUGAGGGAGU
1573	1574	1048-1066	CUCCCUCAUCACCAAAAAAG	CUUUUUGGUGAUGAGGGAG
1575	1576	1049-1067	UCCCUCAUCACCAAAAAAGC	GCUUUUUGGUGAUGAGGGGA
1577	1578	1050-1068	CCCUCAUCACCAAAAAAGCA	UGCUIUUUGGUGAUGAGGG
1579	1580	1070-1088	GUGUCAGUCUGGUGCAGUA	UACUGCACCAGACUGACAC
1581	1582	1071-1089	UGUCAGUCUGGUGCAGUAA	UUACUGCACCAGACUGACA
1583	1584	1072-1090	GUCAGUCUGGUGCAGUAAU	AUUACUGCACCAGACUGAC
1585	1586	1073-1091	UCAGUCUGGUGCAGUAAUG	CAUJACUGCACCAGACUGA
1587	1588	1074-1092	CAGUCUGGUGCAGUAAUGA	UCAUUACUGCACCAGACUG
1589	1590	1075-1093	AGUCUGGUGCAGUAAUGAC	GUCAUUACUGCACCAGACU
1591	1592	1078-1096	CUGGUGCAGUAAUGACUAC	GUAGUCAUUACUGCACCAG
1593	1594	1079-1097	UGGUGCAGUAAUGACUACC	GGUAGUCAUUACUGCACCA
1595	1596	1081-1099	GUGCAGUAAUGACUACCUA	UAGGUAGUCAUUACUGCAC
1597	1598	1082-1100	UGCAGUAAUGACUACCUAG	CUAGGUAGUCAUUACUGC
1599	1600	1083-1101	GCAGUAAUGACUACCUAGG	CCUAGGUAGUCAUUACUGC
1601	1602	1084-1102	CAGUAAUGACUACCUAGGA	UCCUAGGUAGUCAUUACUG
1603	1604	1085-1103	AGUAAUGACUACCUAGGAA	UUCCUAGGUAGUCAUUACU
1605	1606	1086-1104	GUAUAGACUACCUAGGAAU	AUUCUAGGUAGUCAUUAC
1607	1608	1087-1105	UAUAGACUACCUAGGAAUG	CAUUCUAGGUAGUCAUUA
1609	1610	1088-1106	AAUGACUACCUAGGAAUGA	UCAUUCUAGGUAGUCAUU
1611	1612	1089-1107	AUGACUACCUAGGAAUGAG	CUCAUUCUAGGUAGUCAU
1613	1614	1090-1108	UGACUACCUAGGAAUGAGU	ACUCAUUCUAGGUAGUCA
1615	1616	1091-1109	GACUACCUAGGAAUGAGUC	GACUCAUUCUAGGUAGUC
1617	1618	1092-1110	ACUACCUAGGAAUGAGUCG	CGACUCAUUCUAGGUAGU
1619	1620	1093-1111	CUACCUAGGAAUGAGUCGC	GCGACUCAUUCUAGGUAG
1621	1622	1094-1112	UACCUAGGAAUGAGUCGCC	GGCGACUCAUUCUAGGU
1623	1624	1095-1113	ACCUAGGAAUGAGUCGCCA	UGGCGACUCAUUCUAGGU
1625	1626	1096-1114	CCUAGGAAUGAGUCGCCAC	GUGGCGACUCAUUCUAGG
1627	1628	1097-1115	CUAGGAAUGAGUCGCCACC	GGUGGCGACUCAUUCUAG
1629	1630	1098-1116	UAGGAAUGAGUCGCCACCC	GGGUGGCGACUCAUUCUA
1631	1632	1099-1117	AGGAAUGAGUCGCCACCCA	UGGGUGGCGACUCAUUCU
1633	1634	1100-1118	GGAAUGAGUCGCCACCCAC	GUGGGUGGCGACUCAUUC
1635	1636	1101-1119	GAAUGAGUCGCCACCCACG	CGUGGGUGGCGACUCAUUC
1637	1638	1102-1120	AAUGAGUCGCCACCCACGG	CCGUGGGUGGCGACUCAU
1639	1640	1103-1121	AUGAGUCGCCACCCACGGG	CCCGUGGGUGGCGACUCAU

ES 2 640 260 T3

1641	1642	1104-1122	UGAGUCGCCACCCACGGGU	ACCCGUGGGUGGCGACUCA
1643	1644	1105-1123	GAGUCGCCACCCACGGGUG	CACCCGUGGGUGGCGACUC
1645	1646	1106-1124	AGUCGCCACCCACGGGUGU	ACACCCGUGGGUGGCGACU
1647	1648	1107-1125	GUCGCCACCCACGGGUGUG	CACACCCGUGGGUGGCGAC
1649	1650	1108-1126	UCGCCACCCACGGGUGUGU	ACACACCCGUGGGUGGCGA
1651	1652	1109-1127	CGCCACCCACGGGUGUGUG	CACACACCCGUGGGUGGGC
1653	1654	1110-1128	GCCACCCACGGGUGUGUGG	CCACACACCCGUGGGUGGGC
1655	1656	1111-1129	CCACCCACGGGUGUGUGGG	CCCACACACCCGUGGGUGG
1657	1658	1112-1130	CACCCACGGGUGUGUGGGG	CCCCACACCCGUGGGUGG
1659	1660	1113-1131	ACCCACGGGUGUGUGGGGC	GCCCCACACACCCGUGGGU
1661	1662	1114-1132	CCCACGGGUGUGUGGGGCA	UGCCCCACACACCCGUGGG
1663	1664	1115-1133	CCACGGGUGUGUGGGGCAG	CUGCCCCACACACCCGUGG
1665	1666	1116-1134	CACGGGUGUGUGGGGCAGU	ACUGCCCCACACACCCGUG
1667	1668	1117-1135	ACGGGUGUGUGGGGCAGUU	AACUGCCCCACACACCCGU
1669	1670	1118-1136	CGGGUGUGUGGGGCAGUUA	UAACUGCCCCACACACCCG
1671	1672	1119-1137	GGGUGUGUGGGGCAGUUAU	AUAACUGCCCCACACACCC
1673	1674	1120-1138	GGUGUGUGGGGCAGUUAUG	CAUAACUGCCCCACACACC
1675	1676	1121-1139	GUGUGUGGGGCAGUUAUGG	CAUAACUGCCCCACACAC
1677	1678	1122-1140	UGUGUGGGGCAGUUAUGGA	UCCAUAACUGCCCCACACA
1679	1680	1123-1141	GUGUGGGGCAGUUAUGGAC	GUCCAUAACUGCCCCACAC
1681	1682	1125-1143	GUGGGGCAGUUAUGGACAC	GUGUCCAUAACUGCCCCAC
1683	1684	1126-1144	UGGGGCAGUUAUGGACACU	AGUGUCCAUAACUGCCCCA
1685	1686	1128-1146	GGGCAGUUAUGGACACUUU	AAAGUGUCCAUAACUGCCC
1687	1688	1129-1147	GGCAGUUAUGGACACUUUG	CAAAGUGUCCAUAACUGCC
1689	1690	1130-1148	GCAGUUAUGGACACUUUGA	UCAAGUGUCCAUAACUGC
1691	1692	1131-1149	CAGUUAUGGACACUUUGAA	UUCAAAGUGUCCAUAACUG
1693	1694	1132-1150	AGUUAUGGACACUUUGAAA	UUUCAAGUGUCCAUAACU
1695	1696	1133-1151	GUUAUGGACACUUUGAAAC	GUUUCAAAGUGUCCAUAAC
1697	1698	1134-1152	UUAUGGACACUUUGAAACA	UGUUUCAAAGUGUCCAUA
1699	1700	1135-1153	UAUGGACACUUUGAAACAA	UUGUUUCAAAGUGUCCAUA
1701	1702	1136-1154	AUGGACACUUUGAAACAAC	GUUGUUUCAAAGUGUCCA
1703	1704	1139-1157	GACACUUUGAAACAACAUG	CAUGUUGUUUCAAAGUGUC
1705	1706	1140-1158	ACACUUUGAAACAACAUGG	CCAUGUUGUUUCAAAGUGU
1707	1708	1141-1159	CACUUUGAAACAACAUGGU	ACCAUGUUGUUUCAAAGUG
1709	1710	1142-1160	ACUUUGAAACAACAUGGUG	CACCAUGUUGUUUCAAAGU
1711	1712	1143-1161	CUUUGAAACAACAUGGUGC	GCACCAUGUUGUUUCAAAG
1713	1714	1144-1162	UUUGAAACAACAUGGUGCU	AGCACCAUGUUGUUUCAA
1715	1716	1145-1163	UUGAAACAACAUGGUGCUG	CAGCACCAUGUUGUUUCA
1717	1718	1146-1164	UGAAACAACAUGGUGCUGG	CCAGCACCAUGUUGUUUCA
1719	1720	1147-1165	GAAACAACAUGGUGCUGGG	CCCAGCACCAUGUUGUUUC
1721	1722	1148-1166	AAACAACAUGGUGCUGGGG	CCCCAGCACCAUGUUGUUU
1723	1724	1149-1167	AACAACAUGGUGCUGGGGC	GCCCCAGCACCAUGUUGUU
1725	1726	1150-1168	ACAACAUGGUGCUGGGGCA	UGCCCCAGCACCAUGUUGU
1727	1728	1151-1169	CAACAUGGUGCUGGGGCAG	CUGCCCCAGCACCAUGUUG
1729	1730	1152-1170	AACAUGGUGCUGGGGCAGG	CCUGCCCCAGCACCAUGUU
1731	1732	1153-1171	ACAUGGUGCUGGGGCAGGU	ACCUGCCCCAGCACCAUGU
1733	1734	1154-1172	CAUGGUGCUGGGGCAGGUG	CACCUGCCCCAGCACCAUG
1735	1736	1155-1173	AUGGUGCUGGGGCAGGUGG	CCACCUCCCCAGCACCAU
1737	1738	1156-1174	UGGUGCUGGGGCAGGUGGU	ACCACCUCCCCAGCACCA
1739	1740	1157-1175	GGUGCUGGGGCAGGUGGUA	UACCACCUCCCCAGCACCC
1741	1742	1158-1176	GUGCUGGGGCAGGUGGUAC	GUACCACCUCCCCAGCAC
1743	1744	1159-1177	UGCUGGGGCAGGUGGUACU	AGUACCACCUCCCCAGCA
1745	1746	1160-1178	GCUGGGGCAGGUGGUACUA	UAGUACCACCUCCCCAGC
1747	1748	1161-1179	CUGGGGCAGGUGGUACUAG	CUAGUACCACCUCCCCAG
1749	1750	1162-1180	UGGGGCAGGUGGUACUAGA	UCUAGUACCACCUCCCCA
1751	1752	1166-1184	GCAGGUGGUACUAGAAUA	UAUUUCUAGUACCACCUGC
1753	1754	1167-1185	CAGGUGGUACUAGAAUAU	AUAUUUCUAGUACCACCUG
1755	1756	1168-1186	AGGUGGUACUAGAAUAUU	AAUAUUUCUAGUACCACCU
1757	1758	1169-1187	GGUGGUACUAGAAUAUUU	AAAUAUUUCUAGUACCACC
1759	1760	1170-1188	GUGGUACUAGAAUAUUUC	GAAUAUUUCUAGUACCACC
1761	1762	1171-1189	UGGUACUAGAAUAUUUCU	AGAAUAUUUCUAGUACCA
1763	1764	1172-1190	GGUACUAGAAUAUUUCUG	CAGAAUAUUUCUAGUACC

ES 2 640 260 T3

1765	1766	1173-1191	GUACUAGAAAUUUUCUGG	CCAGAAAUUUUCUAGUAC
1767	1768	1174-1192	UACUAGAAAUUUUCUGGA	UCCAGAAAUUUUCUAGUA
1769	1770	1175-1193	ACUAGAAAUUUUCUGGAA	UUCCAGAAAUUUUCUAGU
1771	1772	1176-1194	CUAGAAAUUUUCUGGAAC	GUUCCAGAAAUUUUCUAG
1773	1774	1177-1195	UAGAAAUUUUCUGGAACU	AGUUCAGAAAUUUUCUA
1775	1776	1178-1196	AGAAAUUUUCUGGAACUA	UAGUUCAGAAAUUUUCU
1777	1778	1179-1197	GAAAUUUUCUGGAACUAG	CUAGUUCAGAAAUUUUC
1779	1780	1180-1198	AAAUUUUCUGGAACUAGU	ACUAGUUCAGAAAUUUU
1781	1782	1181-1199	AAUAAUUCUGGAACUAGUA	UACUAGUUCAGAAAUUU
1783	1784	1183-1201	UAUUUCUGGAACUAGUAAA	UUUACUAGUUCAGAAUA
1785	1786	1186-1204	UUCUGGAACUAGUAAAUUC	GAAUUUACUAGUUCAGAA
1787	1788	1187-1205	UCUGGAACUAGUAAAUUC	GGAUUUACUAGUUCAGAA
1789	1790	1189-1207	UGGAACUAGUAAAUUC	AUGGAUUUACUAGUUC
1791	1792	1190-1208	GGAACUAGUAAAUUC	CAUGGAUUUACUAGUUC
1793	1794	1192-1210	AACUAGUAAAUUC	CACUAGGAUUUACUAGU
1795	1796	1193-1211	ACUAGUAAAUUC	CCACUAGGAUUUACUAGU
1797	1798	1194-1212	CUAGUAAAUUC	UCCACUAGGAUUUACUAG
1799	1800	1195-1213	UAGUAAAUUC	GUCCACUAGGAUUUACUA
1801	1802	1196-1214	AGUAAAUUC	AGUCCACUAGGAUUUACU
1803	1804	1197-1215	GUAAAUUC	AAGUCCACUAGGAUUUAC
1805	1806	1198-1216	UAAAUUC	UAAGUCCACUAGGAUUUA
1807	1808	1199-1217	AAAUUC	CUAAGUCCACUAGGAUUU
1809	1810	1200-1218	AAUUC	UCUAAGUCCACUAGGAUU
1811	1812	1201-1219	AUUC	CUCUAAGUCCACUAGGAU
1813	1814	1202-1220	UUC	GCUCUAAGUCCACUAGGAA
1815	1816	1222-1240	GGAGCUGGCAGACCUCAU	AUGGAGGUCUGCCAGCUCC
1817	1818	1223-1241	GAGCUGGCAGACCUCAUG	CAUGGAGGUCUGCCAGCUC
1819	1820	1224-1242	AGCUGGCAGACCUCAUGG	CCAUGGAGGUCUGCCAGCU
1821	1822	1225-1243	GCUGGCAGACCUCAUGGG	CCAUGGAGGUCUGCCAGC
1823	1824	1226-1244	CUGGCAGACCUCAUGGGA	UCCAUUGGAGGUCUGCCAG
1825	1826	1227-1245	UGGCAGACCUCAUGGGAA	UUCCAUUGGAGGUCUGCCA
1827	1828	1228-1246	GGCAGACCUCAUGGGAAA	UUUCCAUUGGAGGUCUGCC
1829	1830	1229-1247	GCAGACCUCAUGGGAAAG	CUUCCAUUGGAGGUCUGC
1831	1832	1230-1248	CAGACCUCAUGGGAAAGA	UCUUCCAUUGGAGGUCUG
1833	1834	1231-1249	AGACCUCAUGGGAAAGAU	AUCUUCCAUUGGAGGUCU
1835	1836	1232-1250	GACCUCAUGGGAAAGAUG	CAUCUUCCAUUGGAGGUC
1837	1838	1233-1251	ACCUCUUGGGAAAGAU	GCAUCUUCCAUUGGAGGU
1839	1840	1254-1272	CACUCUUGUUUCCUCGUG	CACGAGGAAAACAAGAGUG
1841	1842	1255-1273	ACUCUUGUUUCCUCGUGC	GCACGAGGAAAACAAGAGU
1843	1844	1256-1274	CUCUUGUUUCCUCGUGCU	AGCACGAGGAAAACAAGAG
1845	1846	1257-1275	UCUUGUUUCCUCGUGCUU	AAGCACGAGGAAAACAAGA
1847	1848	1259-1277	UUGUUUCCUCGUGCUUUG	CAAAGCACGAGGAAAACA
1849	1850	1260-1278	UGUUUCCUCGUGCUUUGU	ACAAAGCACGAGGAAAACA
1851	1852	1261-1279	GUUUCCUCGUGCUUUGUG	CACAAAGCACGAGGAAAAC
1853	1854	1262-1280	UUUCCUCGUGCUUUGUGG	CCACAAAGCACGAGGAAAA
1855	1856	1263-1281	UUCCUCGUGCUUUGUGGC	GCCACAAAGCACGAGGAAA
1857	1858	1264-1282	UCCUCGUGCUUUGUGGCC	GGCCACAAAGCACGAGGAA
1859	1860	1265-1283	UCCUCGUGCUUUGUGGCCA	UGGCCACAAAGCACGAGGA
1861	1862	1266-1284	CCUCGUGCUUUGUGGCCAA	UUGGCCACAAAGCACGAGG
1863	1864	1267-1285	CUCGUGCUUUGUGGCCAAU	AUUGGCCACAAAGCACGAG
1865	1866	1268-1286	UCGUGCUUUGUGGCCAAUG	CAUUGGCCACAAAGCACGA
1867	1868	1269-1287	CGUGCUUUGUGGCCAAUGA	UCAUUGGCCACAAAGCACG
1869	1870	1270-1288	GUGCUUUGUGGCCAAUGAC	GUCAUUGGCCACAAAGCAC
1871	1872	1271-1289	UGCUCUUGUGGCCAAUGACU	AGUCAUUGGCCACAAAGCA
1873	1874	1272-1290	GCUUUGUGGCCAAUGACUC	GAGUCAUUGGCCACAAAGC
1875	1876	1273-1291	CUUUGUGGCCAAUGACUCA	UGAGUCAUUGGCCACAAAG
1877	1878	1274-1292	UUUGUGGCCAAUGACUCA	UUGAGUCAUUGGCCACAAA
1879	1880	1275-1293	UUGUGGCCAAUGACUCAAC	GUUGAGUCAUUGGCCACAA
1881	1882	1276-1294	UGUGGCCAAUGACUCAACC	GGUUGAGUCAUUGGCCACA
1883	1884	1277-1295	GUGGCCAAUGACUCAACCC	GGGUUGAGUCAUUGGCCAC
1885	1886	1278-1296	UGGCCAAUGACUCAACCCU	AGGGUUGAGUCAUUGGCCA
1887	1888	1279-1297	GGCCAAUGACUCAACCCUC	GAGGUUGAGUCAUUGGCC

ES 2 640 260 T3

1889	1890	1280-1298	GCCAAUGACUCAACCCUCU	AGAGGGUUGAGUCAUUGGC
1891	1892	1281-1299	CAAUGACUCAACCCUCUU	AAGAGGGUUGAGUCAUUGG
1893	1894	1282-1300	CAAUGACUCAACCCUCUUC	GAAGAGGGUUGAGUCAUUG
1895	1896	1283-1301	AAUGACUCAACCCUCUUCA	UGAAGAGGGUUGAGUCAUU
1897	1898	1284-1302	AUGACUCAACCCUCUUCAC	GUGAAGAGGGUUGAGUCAU
1899	1900	1285-1303	UGACUCAACCCUCUUCACC	GGUGAAGAGGGUUGAGUCA
1901	1902	1286-1304	GACUCAACCCUCUUCACCC	GGGUGAAGAGGGUUGAGUC
1903	1904	1287-1305	ACUCAACCCUCUUCACCCU	AGGGUGAAGAGGGUUGAGU
1905	1906	1288-1306	CUCAACCCUCUUCACCCUG	CAGGGUGAAGAGGGUUGAG
1907	1908	1289-1307	UCAACCCUCUUCACCCUGG	CCAGGGUGAAGAGGGUUGA
1909	1910	1290-1308	CAACCCUCUUCACCCUGGC	GCCAGGGUGAAGAGGGUUG
1911	1912	1291-1309	AACCCUCUUCACCCUGGCU	AGCCAGGGUGAAGAGGGUU
1913	1914	1292-1310	ACCCUCUUCACCCUGGCUA	UAGCCAGGGUGAAGAGGGU
1915	1916	1293-1311	CCCUCUUCACCCUGGCUAA	UUAGCCAGGGUGAAGAGGG
1917	1918	1294-1312	CCUCUUCACCCUGGCUAAG	CUUAGCCAGGGUGAAGAGG
1919	1920	1297-1315	CUUCACCCUGGCUAAGAUG	CAUCUUAGCCAGGGUGAAG
1921	1922	1298-1316	UUCACCCUGGCUAAGAUGA	UCAUCUUAGCCAGGGUGAA
1923	1924	1300-1318	CACCCUGGCUAAGAUGAUG	CAUCAUCUUAGCCAGGGUG
1925	1926	1301-1319	ACCCUGGCUAAGAUGAUGC	GCAUCAUCUUAGCCAGGGU
1927	1928	1302-1320	CCCUGCUAAGAUGAUGCC	GGCAUCAUCUUAGCCAGGG
1929	1930	1303-1321	CCUGGCUAAGAUGAUGCCA	UGGCAUCAUCUUAGCCAGG
1931	1932	1304-1322	CUGGCUAAGAUGAUGCCAG	CUGGCAUCAUCUUAGCCAG
1933	1934	1305-1323	UGGCUAAGAUGAUGCCAGG	CCUGGCAUCAUCUUAGCCA
1935	1936	1306-1324	GGCUAAGAUGAUGCCAGGC	GCCUGGCAUCAUCUUAGCC
1937	1938	1307-1325	GCUAAGAUGAUGCCAGGCU	AGCCUGGCAUCAUCUUAGC
1939	1940	1308-1326	CUAAGAUGAUGCCAGGCUG	CAGCCUGGCAUCAUCUUAG
1941	1942	1309-1327	UAAGAUGAUGCCAGGCUGU	ACAGCCUGGCAUCAUCUUA
1943	1944	1310-1328	AAGAUGAUGCCAGGCUGUG	CACAGCCUGGCAUCAUCUU
1945	1946	1311-1329	AGAUGAUGCCAGGCUGUGA	UCACAGCCUGGCAUCAUCU
1947	1948	1312-1330	GAUGAUGCCAGGCUGUGAG	CUCACAGCCUGGCAUCAUC
1949	1950	1313-1331	AUGAUGCCAGGCUGUGAGA	UCUCACAGCCUGGCAUCAU
1951	1952	1314-1332	UGAUGCCAGGCUGUGAGAU	AUCUCACAGCCUGGCAUCA
1953	1954	1316-1334	AUGCCAGGCUGUGAGAUUU	AAAUCUCACAGCCUGGCAU
1955	1956	1317-1335	UGCCAGGCUGUGAGAUUUA	UAAAUCUCACAGCCUGGCA
1957	1958	1318-1336	GCCAGGCUGUGAGAUUUAC	GUAAAUCUCACAGCCUGGC
1959	1960	1319-1337	CCAGGCUGUGAGAUUUACU	AGUAAAUCUCACAGCCUGG
1961	1962	1320-1338	CAGGCUGUGAGAUUUACUC	GAGUAAAUCUCACAGCCUG
1963	1964	1321-1339	AGGCUGUGAGAUUUACUCU	AGAGUAAAUCUCACAGCCU
1965	1966	1322-1340	GGCUGUGAGAUUUACUCUG	CAGAGUAAAUCUCACAGCC
1967	1968	1323-1341	GCUGUGAGAUUUACUCUGA	UCAGAGUAAAUCUCACAGC
1969	1970	1326-1344	GUGAGAUUUACUCUGAUUC	GAAUCAGAGUAAAUCUCAC
1971	1972	1327-1345	UGAGAUUUACUCUGAUUCU	AGAAUCAGAGUAAAUCUCA
1973	1974	1328-1346	GAGAUUUACUCUGAUUCUG	CAGAAUCAGAGUAAAUCUC
1975	1976	1329-1347	AGAUUUACUCUGAUUCUGG	CCAGAAUCAGAGUAAAUCU
1977	1978	1330-1348	GAUUUACUCUGAUUCUGGG	CCCAGAAUCAGAGUAAAUC
1979	1980	1331-1349	AUUUACUCUGAUUCUGGGA	UCCCAGAAUCAGAGUAAAU
1981	1982	1332-1350	UUUACUCUGAUUCUGGGAA	UUCCCAGAAUCAGAGUAAA
1983	1984	1333-1351	UUACUCUGAUUCUGGGAAC	GUUCCCAGAAUCAGAGUAA
1985	1986	1334-1352	UACUCUGAUUCUGGGAAAC	GGUCCCAGAAUCAGAGUA
1987	1988	1335-1353	ACUCUGAUUCUGGGAAACCA	UGGUCCCAGAAUCAGAGU
1989	1990	1336-1354	CUCUGAUUCUGGGAAACCAU	AUGGUUCCCAGAAUCAGAG
1991	1992	1337-1355	UCUGAUUCUGGGAAACCAUG	CAUGGUUCCCAGAAUCAGA
1993	1994	1338-1356	CUGAUUCUGGGAAACCAUGC	GCAUGGUUCCCAGAAUCAG
1995	1996	1339-1357	UGAUUCUGGGAAACCAUGCC	GGCAUGGUUCCCAGAAUCA
1997	1998	1340-1358	GAUUCUGGGAAACCAUGCCU	AGGCAUGGUUCCCAGAAUC
1999	2000	1341-1359	AUUCUGGGAAACCAUGCCUC	GAGGCAUGGUUCCCAGAAU
2001	2002	1342-1360	UUCUGGGAAACCAUGCCUCC	GGAGGCAUGGUUCCCAGAA
2003	2004	1343-1361	UCUGGGAAACCAUGCCUCCA	UGGAGGCAUGGUUCCCAGA
2005	2006	1344-1362	CUGGGAAACCAUGCCUCCAU	AUGGAGGCAUGGUUCCCAG
2007	2008	1345-1363	UGGGAACCAUGCCUCCAUG	CAUGGAGGCAUGGUUCCC
2009	2010	1346-1364	GGGAACCAUGCCUCCAUGA	UCAUGGAGGCAUGGUUCCC
2011	2012	1348-1366	GAACCAUGCCUCCAUGAUC	GAUCAUGGAGGCAUGGUUC

ES 2 640 260 T3

2013	2014	1349-1367	AACCAUGCCUCCAUGAUCC	GGAUCAUGGAGGCAUGGU
2015	2016	1350-1368	ACCAUGCCUCCAUGAUCCA	UGGAUCAUGGAGGCAUGGU
2017	2018	1351-1369	CCAUGCCUCCAUGAUCCAA	UUGGAUCAUGGAGGCAUGG
2019	2020	1352-1370	CAUGCCUCCAUGAUCCAAG	CUUGGAUCAUGGAGGCAUG
2021	2022	1353-1371	AUGCCUCCAUGAUCCAAGG	CCUUGGAUCAUGGAGGCAU
2023	2024	1354-1372	UGCCUCCAUGAUCCAAGGG	CCCUUGGAUCAUGGAGGCA
2025	2026	1358-1376	UCCAUGAUCCAAGGGAUUC	GAAUCCCUUGGAUCAUGGA
2027	2028	1359-1377	CCAUGAUCCAAGGGAUUCG	CGAAUCCCUUGGAUCAUGG
2029	2030	1360-1378	CAUGAUCCAAGGGAUUCGA	UCGAAUCCCUUGGAUCAUG
2031	2032	1361-1379	AUGAUCCAAGGGAUUCGAA	UUCGAAUCCCUUGGAUCAU
2033	2034	1362-1380	UGAUCCAAGGGAUUCGAAA	UUUCGAAUCCCUUGGAUCA
2035	2036	1363-1381	GAUCCAAGGGAUUCGAAAC	GUUUCGAAUCCCUUGGAUC
2037	2038	1365-1383	UCCAAGGGAUUCGAAACAG	CUGUUUCGAAUCCCUUGGA
2039	2040	1366-1384	CCAAGGGAUUCGAAACAGC	GCUGUUUCGAAUCCCUUGG
2041	2042	1367-1385	CAAGGGAUUCGAAACAGCC	GGCUGUUUCGAAUCCCUUG
2043	2044	1368-1386	AAGGGAUUCGAAACAGCCG	CGGCUGUUUCGAAUCCCUU
2045	2046	1369-1387	AGGGAUUCGAAACAGCCGA	UCGGCUGUUUCGAAUCCCU
2047	2048	1370-1388	GGGAUUCGAAACAGCCGAG	CUCGGCUGUUUCGAAUCCU
2049	2050	1371-1389	GGAUUCGAAACAGCCGAGU	ACUCGGCUGUUUCGAAUCC
2051	2052	1372-1390	GAUUCGAAACAGCCGAGUG	CACUCGGCUGUUUCGAAUC
2053	2054	1373-1391	AUUCGAAACAGCCGAGUGC	GCACUCGGCUGUUUCGAAU
2055	2056	1374-1392	UUCGAAACAGCCGAGUGCC	GGCACUCGGCUGUUUCGAA
2057	2058	1375-1393	UCGAAACAGCCGAGUGCCA	UGGCACUCGGCUGUUUCGA
2059	2060	1376-1394	CGAAACAGCCGAGUGCCAA	UUGGCACUCGGCUGUUUCG
2061	2062	1377-1395	GAAACAGCCGAGUGCCAAA	UUUGGCACUCGGCUGUUUC
2063	2064	1378-1396	AAACAGCCGAGUGCCAAAG	CUUUGGCACUCGGCUGUUU
2065	2066	1379-1397	AACAGCCGAGUGCCAAAGU	ACUUUGGCACUCGGCUGUU
2067	2068	1380-1398	ACAGCCGAGUGCCAAAGUA	UACUUUGGCACUCGGCUGU
2069	2070	1381-1399	CAGCCGAGUGCCAAAGUAC	GUACUUUGGCACUCGGCUG
2071	2072	1383-1401	GCCGAGUGCCAAAGUACAU	AUGUACUUUGGCACUCGGC
2073	2074	1384-1402	CCGAGUGCCAAAGUACAUC	GAUGUACUUUGGCACUCGG
2075	2076	1385-1403	CGAGUGCCAAAGUACAUCU	AGAUGUACUUUGGCACUCG
2077	2078	1386-1404	GAGUGCCAAAGUACAUCUU	AAGAUGUACUUUGGCACUC
2079	2080	1387-1405	AGUGCCAAAGUACAUCUUC	GAAGAUGUACUUUGGCACU
2081	2082	1388-1406	GUGCCAAAGUACAUCUUC	GGAAGAUGUACUUUGGCAC
2083	2084	1389-1407	UGCCAAAGUACAUCUUCG	CGGAAGAUGUACUUUGGCA
2085	2086	1390-1408	GCCAAAGUACAUCUUCG	GCGGAAGAUGUACUUUGGC
2087	2088	1391-1409	CCAAAGUACAUCUUCG	GGCGGAAGAUGUACUUUGG
2089	2090	1392-1410	CAAAGUACAUCUUCG	UGGCGGAAGAUGUACUUUG
2091	2092	1393-1411	AAAGUACAUCUUCG	GUGGCGGAAGAUGUACUUU
2093	2094	1394-1412	AAGUACAUCUUCG	UGUGGCGGAAGAUGUACUU
2095	2096	1395-1413	AGUACAUCUUCG	UUGUGGCGGAAGAUGUACU
2097	2098	1396-1414	GUACAUCUUCG	AUUGUGGCGGAAGAUGUAC
2099	2100	1397-1415	UACAUCUUCG	CAUUGUGGCGGAAGAUGUA
2101	2102	1398-1416	ACAUCUUCG	UCAUUGUGGCGGAAGAUGU
2103	2104	1399-1417	CAUCUUCG	AUCAUUGUGGCGGAAGAUG
2105	2106	1400-1418	AUCUUCG	CAUCAUUGUGGCGGAAGAUG
2107	2108	1401-1419	UCUUCG	ACAUCAUUGUGGCGGAAGA
2109	2110	1402-1420	CUUCG	GACAUCAUUGUGGCGGAAG
2111	2112	1403-1421	UUCG	UGACAUCAUUGUGGCGGAA
2113	2114	1404-1422	UCCG	CUGACAUCAUUGUGGCGGA
2115	2116	1405-1423	CCG	GCUGACAUCAUUGUGGCGG
2117	2118	1406-1424	CGC	GGCUGACAUCAUUGUGGCG
2119	2120	1407-1425	GCC	UGGCUGACAUCAUUGUGGC
2121	2122	1427-1445	CUCAGAGAACUGCUGCAAA	UUUGCAGCAGUUCUCUGAG
2123	2124	1428-1446	UCAGAGAACUGCUGCAAA	CUUUGCAGCAGUUCUCUGA
2125	2126	1429-1447	CAGAGAACUGCUGCAAA	UCUUUGCAGCAGUUCUCUG
2127	2128	1430-1448	AGAGAACUGCUGCAAA	AUCUUUGCAGCAGUUCUCU
2129	2130	1431-1449	GAGAACUGCUGCAAA	GAUCUUUGCAGCAGUUCUC
2131	2132	1432-1450	AGAACUGCUGCAAA	AGAUCUUUGCAGCAGUUCU
2133	2134	1433-1451	GAACUGCUGCAAA	CAGAUCUUUGCAGCAGUUC
2135	2136	1434-1452	AACUGCUGCAAA	UCAGAUCUUUGCAGCAGUU

ES 2 640 260 T3

2137	2138	1435-1453	ACUGCUGCAAAGAUCUGAC	GUCAGAUCUUUGCAGCAGU
2139	2140	1436-1454	CUGCUGCAAAGAUCUGACC	GGUCAGAUCUUUGCAGCAG
2141	2142	1437-1455	UGCUGCAAAGAUCUGACCC	GGGUCAGAUCUUUGCAGCA
2143	2144	1457-1475	UCAGUCCCCAAGAUUGUGG	CCACAAUCUUGGGGACUGA
2145	2146	1458-1476	CAGUCCCCAAGAUUGUGGC	GCCACAAUCUUGGGGACUG
2147	2148	1459-1477	AGUCCCCAAGAUUGUGGCA	UGCCACAAUCUUGGGGACU
2149	2150	1461-1479	UCCCCAAGAUUGUGGCAUU	AAUGCCACAAUCUUGGGGA
2151	2152	1462-1480	CCCCAAGAUUGUGGCAUUU	AAAUGCCACAAUCUUGGGG
2153	2154	1463-1481	CCCAAGAUUGUGGCAUUUG	CAAUUGCCACAAUCUUGGG
2155	2156	1464-1482	CCAAGAUUGUGGCAUUUGA	UCAAAUGCCACAAUCUUGG
2157	2158	1465-1483	CAAGAUUGUGGCAUUUGAA	UUCAAAUGCCACAAUCUUG
2159	2160	1466-1484	AAGAUUGUGGCAUUUGAAA	UUUCAAAUGCCACAAUCUU
2161	2162	1467-1485	AGAUUGUGGCAUUUGAAAC	GUUUCAAUUGCCACAAUCU
2163	2164	1468-1486	GAUUGUGGCAUUUGAAACU	AGUUUCAAUUGCCACAAUC
2165	2166	1469-1487	AUUGUGGCAUUUGAAACUG	CAGUUUCAAUUGCCACAAU
2167	2168	1470-1488	UUGUGGCAUUUGAAACUGU	ACAGUUUCAAUUGCCACAA
2169	2170	1471-1489	UGUGGCAUUUGAAACUGUC	GACAGUUUCAAUUGCCACA
2171	2172	1472-1490	GUGGCAUUUGAAACUGUCC	GGACAGUUUCAAUUGCCAC
2173	2174	1473-1491	UGGCAUUUGAAACUGUCCA	UGGACAGUUUCAAUUGCCA
2175	2176	1474-1492	GGCAUUUGAAACUGUCCA	AUGGACAGUUUCAAUUGCC
2177	2178	1475-1493	GCAUUUGAAACUGUCCA	AAUGGACAGUUUCAAUUGC
2179	2180	1476-1494	CAUUUGAAACUGUCCA	GAAUGGACAGUUUCAAUUG
2181	2182	1477-1495	AUUUGAAACUGUCCA	UGAAUGGACAGUUUCAAU
2183	2184	1479-1497	UUGAAACUGUCCA	AUUGAAUGGACAGUUUCAA
2185	2186	1480-1498	UGAAACUGUCCA	CAUUGAAUGGACAGUUUCA
2187	2188	1481-1499	GAAACUGUCCA	CCAUUGAAUGGACAGUUUC
2189	2190	1482-1500	AAACUGUCCA	UCCAUUGAAUGGACAGUUU
2191	2192	1483-1501	AACUGUCCA	AUCCAUUGAAUGGACAGUU
2193	2194	1484-1502	ACUGUCCA	CAUCCAUUGAAUGGACAGU
2195	2196	1485-1503	CUGUCCA	CCAUCCAUUGAAUGGACAG
2197	2198	1486-1504	UGUCCA	CCCAUCCAUUGAAUGGACA
2199	2200	1487-1505	GUCCA	CCCCAUCCAUUGAAUGGAC
2201	2202	1488-1506	UCCA	GCCCCAUCCAUUGAAUGGA
2203	2204	1508-1526	GUGUGCCCACUGGAAGAGC	GCUCUCCAGUGGGCACAC
2205	2206	1509-1527	UGUGCCCACUGGAAGAGCU	AGCUCUCCAGUGGGCACA
2207	2208	1510-1528	GUGCCCACUGGAAGAGCUG	CAGCUCUCCAGUGGGCAC
2209	2210	1511-1529	UGCCCACUGGAAGAGCUGU	ACAGCUCUCCAGUGGGCA
2211	2212	1512-1530	GCCCACUGGAAGAGCUGUG	CACAGCUCUCCAGUGGGC
2213	2214	1513-1531	CCCACUGGAAGAGCUGUGU	ACACAGCUCUCCAGUGGG
2215	2216	1514-1532	CCACUGGAAGAGCUGUGUG	CACACAGCUCUCCAGUGGG
2217	2218	1515-1533	CACUGGAAGAGCUGUGUGA	UCACACAGCUCUCCAGUG
2219	2220	1516-1534	ACUGGAAGAGCUGUGUGAU	AUCACACAGCUCUCCAGU
2221	2222	1517-1535	CUGGAAGAGCUGUGUGAUG	CAUCACACAGCUCUCCAG
2223	2224	1518-1536	UGGAAGAGCUGUGUGAUGU	ACAUCACACAGCUCUCCA
2225	2226	1519-1537	GGAAGAGCUGUGUGAUGUG	CACAUCACACAGCUCUCC
2227	2228	1520-1538	GAAGAGCUGUGUGAUGUGG	CCACAUCACACAGCUCUUC
2229	2230	1521-1539	AAGAGCUGUGUGAUGUGGC	GCCACAUCACACAGCUCUU
2231	2232	1522-1540	AGAGCUGUGUGAUGUGGCC	GGCCACAUCACACAGCUCU
2233	2234	1523-1541	GAGCUGUGUGAUGUGGCC	GGGCCACAUCACACAGCUC
2235	2236	1524-1542	AGCUGUGUGAUGUGGCCCA	UGGGCCACAUCACACAGCU
2237	2238	1525-1543	GCUGUGUGAUGUGGCCCAU	AUGGGCCACAUCACACAGC
2239	2240	1526-1544	CUGUGUGAUGUGGCCCAUG	CAUGGGCCACAUCACACAG
2241	2242	1527-1545	UGUGUGAUGUGGCCCAUGA	UCAUGGGCCACAUCACACA
2243	2244	1528-1546	GUGUGAUGUGGCCCAUGAG	CUCAUGGGCCACAUCACAC
2245	2246	1529-1547	UGUGAUGUGGCCCAUGAGU	ACUCAUGGGCCACAUCACA
2247	2248	1532-1550	GAUGUGGCCCAUGAGUUUG	CAAACUCAUGGGCCACAUC
2249	2250	1533-1551	AUGUGGCCCAUGAGUUUGG	CCAAACUCAUGGGCCACAUC
2251	2252	1534-1552	UGUGGCCCAUGAGUUUGGA	UCCAACUCAUGGGCCACAUC
2253	2254	1535-1553	GUGGCCCAUGAGUUUGGAG	CUCCAACUCAUGGGCCAC
2255	2256	1536-1554	UGGCCCAUGAGUUUGGAGC	GCUCCAACUCAUGGGCCCA
2257	2258	1537-1555	GGCCCAUGAGUUUGGAGCA	UGCUCCAAACUCAUGGGCC
2259	2260	1538-1556	GCCCAUGAGUUUGGAGCAA	UUGCUCCAAACUCAUGGGCC

ES 2 640 260 T3

2261	2262	1539-1557	CCCAUGAGUUUGGAGCAAU	AUUGCUCCAAACUCAUGGG
2263	2264	1540-1558	CCAUGAGUUUGGAGCAAUC	GAUUGCUCCAAACUCAUGG
2265	2266	1542-1560	AUGAGUUUGGAGCAAUCAC	GUGAUUGCUCCAAACUCAU
2267	2268	1543-1561	UGAGUUUGGAGCAAUCACC	GGUGAUUGCUCCAAACUCA
2269	2270	1545-1563	AGUUUGGAGCAAUCACCUU	AAGGUGAUUGCUCCAAACU
2271	2272	1546-1564	GUUUGGAGCAAUCACCUUC	GAAGGUGAUUGCUCCAAAC
2273	2274	1547-1565	UUUGGAGCAAUCACCUUCG	CGAAGGUGAUUGCUCCAAA
2275	2276	1548-1566	UUGGAGCAAUCACCUUCGU	ACGAAGGUGAUUGCUCCAA
2277	2278	1549-1567	UGGAGCAAUCACCUUCGUG	CACGAAGGUGAUUGCUCCA
2279	2280	1550-1568	GGAGCAAUCACCUUCGUGG	CCACGAAGGUGAUUGCUC
2281	2282	1551-1569	GAGCAAUCACCUUCGUGGA	UCCACGAAGGUGAUUGCUC
2283	2284	1552-1570	AGCAAUCACCUUCGUGGAU	AUCCACGAAGGUGAUUGCUC
2285	2286	1553-1571	GCAAUCACCUUCGUGGAUG	CAUCCACGAAGGUGAUUGC
2287	2288	1554-1572	CAAUCACCUUCGUGGAUGA	UCAUCCACGAAGGUGAUUG
2289	2290	1555-1573	AAUCACCUUCGUGGAUGAG	CUCAUCCACGAAGGUGAUU
2291	2292	1556-1574	AUCACCUUCGUGGAUGAGG	CCUCAUCCACGAAGGUGAU
2293	2294	1557-1575	UCACCUUCGUGGAUGAGGU	ACCUCAUCCACGAAGGUGA
2295	2296	1558-1576	CACCUUCGUGGAUGAGGUC	GACCUCAUCCACGAAGGUG
2297	2298	1559-1577	ACCUUCGUGGAUGAGGUCC	GGACCUCAUCCACGAAGGU
2299	2300	1560-1578	CCUUCGUGGAUGAGGUCCA	UGGACCUCAUCCACGAAGG
2301	2302	1561-1579	CUUCGUGGAUGAGGUCCAC	GUGGACCUCAUCCACGAAG
2303	2304	1562-1580	UUCGUGGAUGAGGUCCACG	CGUGGACCUCAUCCACGAA
2305	2306	1563-1581	UCGUGGAUGAGGUCCACGC	GCGUGGACCUCAUCCACGA
2307	2308	1564-1582	CGUGGAUGAGGUCCACGCA	UGCGUGGACCUCAUCCACG
2309	2310	1565-1583	GUGGAUGAGGUCCACGCAG	CUGCGUGGACCUCAUCCAC
2311	2312	1566-1584	UGGAUGAGGUCCACGCAGU	ACUGCGUGGACCUCAUCCA
2313	2314	1567-1585	GGGAUGAGGUCCACGCAGUG	CACUGCGUGGACCUCAUCC
2315	2316	1568-1586	GAUGAGGUCCACGCAGUGG	CCACUGCGUGGACCUCAUC
2317	2318	1569-1587	AUGAGGUCCACGCAGUGGG	CCCACUGCGUGGACCUCAU
2319	2320	1570-1588	UGAGGUCCACGCAGUGGGG	CCCCACUGCGUGGACCUCA
2321	2322	1571-1589	GAGGUCCACGCAGUGGGGC	GCCCCACUGCGUGGACCUC
2323	2324	1572-1590	AGGUCCACGCAGUGGGGCU	AGCCCCACUGCGUGGACCU
2325	2326	1595-1613	GGGGCUCGAGGCGGAGGGA	UCCCUCCGCCUCGAGCCCC
2327	2328	1596-1614	GGGCUCGAGGCGGAGGGAU	AUCCUCCGCCUCGAGCCC
2329	2330	1597-1615	GGCUCGAGGCGGAGGGAUU	AAUCCCUCCGCCUCGAGCC
2331	2332	1598-1616	GCUCGAGGCGGAGGGAUUG	CAAUCCUCCGCCUCGAGC
2333	2334	1599-1617	CUCGAGGCGGAGGGAUUGG	CCAUCCCUCCGCCUCGAG
2335	2336	1600-1618	UCGAGGCGGAGGGAUUGGG	CCCAUCCCUCCGCCUCGA
2337	2338	1601-1619	CGAGGCGGAGGGAUUGGGG	CCCCAUCCCUCCGCCUCG
2339	2340	1602-1620	GAGGCGGAGGGAUUGGGGA	UCCCAUCCCUCCGCCUC
2341	2342	1603-1621	AGGCGGAGGGAUUGGGGAU	AUCCCAUCCCUCCGCCU
2343	2344	1604-1622	GGCGGAGGGAUUGGGGAUC	GAUCCCAUCCCUCCGCC
2345	2346	1605-1623	GCGGAGGGAUUGGGGAUCG	CGAUCCCAUCCCUCCGC
2347	2348	1606-1624	CGGAGGGAUUGGGGAUCGG	CCGAUCCCAUCCCUCCG
2349	2350	1607-1625	GGAGGGAUUGGGGAUCGGG	CCGAUCCCAUCCCUCC
2351	2352	1608-1626	GAGGGAUUGGGGAUCGGGA	UCCCGAUCCCAUCCCUCC
2353	2354	1609-1627	AGGGAUUGGGGAUCGGGAU	AUCCCGAUCCCAUCCCU
2355	2356	1610-1628	GGGAUUGGGGAUCGGGAUG	CAUCCCGAUCCCAUCC
2357	2358	1611-1629	GAUUGGGGAUCGGGAUGG	CCAUCCCGAUCCCAUCC
2359	2360	1612-1630	GAUUGGGGAUCGGGAUGGA	UCCAUCCCGAUCCCAUCC
2361	2362	1613-1631	AUUGGGGAUCGGGAUGGAG	CUCCAUCCCGAUCCCAU
2363	2364	1614-1632	UUGGGGAUCGGGAUGGAGU	ACUCCAUCCCGAUCCCA
2365	2366	1615-1633	UGGGGAUCGGGAUGGAGUC	GACUCCAUCCCGAUCCCA
2367	2368	1617-1635	GGGAUCGGGAUGGAGUCAU	AUGACUCCAUCCCGAUCC
2369	2370	1618-1636	GGAUCGGGAUGGAGUCAUG	CAUGACUCCAUCCCGAUCC
2371	2372	1619-1637	GAUCGGGAUGGAGUCAUGC	GCAUGACUCCAUCCCGAUC
2373	2374	1620-1638	AUCGGGAUGGAGUCAUGCC	GGCAUGACUCCAUCCCGAU
2375	2376	1621-1639	UCGGGAUGGAGUCAUGCCA	UGGCAUGACUCCAUCCCGA
2377	2378	1622-1640	CGGGAUGGAGUCAUGCCAA	UUGGCAUGACUCCAUCCCG
2379	2380	1623-1641	GGAUGGAGUCAUGCCAAA	UUUGGCAUGACUCCAUCC
2381	2382	1624-1642	GGAUGGAGUCAUGCCAAAA	UUUUGGCAUGACUCCAUC
2383	2384	1625-1643	GAUGGAGUCAUGCCAAAAA	UUUUUGGCAUGACUCCAUC

ES 2 640 260 T3

2385	2386	1626-1644	AUGGAGUCAUGCCAAAAAU	AUUUUUGGCAUGACUCCA
2387	2388	1627-1645	UGGAGUCAUGCCAAAAAUG	CAUUUUUGGCAUGACUCCA
2389	2390	1628-1646	GGAGUCAUGCCAAAAAUGG	CAUUUUUGGCAUGACUCC
2391	2392	1629-1647	GAGUCAUGCCAAAAAUGGA	UCCAUUUUUGGCAUGACUC
2393	2394	1630-1648	AGUCAUGCCAAAAAUGGAC	GUCCAUUUUUGGCAUGACU
2395	2396	1632-1650	UCAUGCCAAAAAUGGACAU	AUGUCCAUUUUUGGCAUGA
2397	2398	1633-1651	CAUGCCAAAAAUGGACAUC	GAUGUCCAUUUUUGGCAUG
2399	2400	1636-1654	GCCAAAAAUGGACAUCAUU	AAUGAUGUCCAUUUUUGGC
2401	2402	1638-1656	CAAAAAUGGACAUCAUUUC	GAAAUGAUGUCCAUUUUUG
2403	2404	1639-1657	AAAAAUGGACAUCAUUUCU	AGAAAUGAUGUCCAUUUUU
2405	2406	1640-1658	AAAAUGGACAUCAUUUCUG	CAGAAAUGAUGUCCAUUUU
2407	2408	1641-1659	AAAUGGACAUCAUUUCUGG	CCAGAAAUGAUGUCCAUUU
2409	2410	1642-1660	AAUGGACAUCAUUUCUGGA	UCCAGAAAUGAUGUCCAUI
2411	2412	1643-1661	AUGGACAUCAUUUCUGGAA	UCCAGAAAUGAUGUCCAUI
2413	2414	1644-1662	UGGACAUCAUUUCUGGAAC	GUUCCAGAAAUGAUGUCCA
2415	2416	1645-1663	GGACAUCAUUUCUGGAACA	UGUCCAGAAAUGAUGUCC
2417	2418	1646-1664	GACAUCAUUUCUGGAACAC	GUGUCCAGAAAUGAUGUC
2419	2420	1647-1665	ACAUCAUUUCUGGAACACU	AGUGUCCAGAAAUGAUGU
2421	2422	1648-1666	CAUCAUUUCUGGAACACU	AAGUGUCCAGAAAUGAUG
2423	2424	1649-1667	AUCAUUUCUGGAACACUUG	CAAGUGUCCAGAAAUGAU
2425	2426	1650-1668	UCAUUUCUGGAACACUUGG	CCAAGUGUCCAGAAAUGA
2427	2428	1651-1669	CAUUUCUGGAACACUUGGC	GCCAAGUGUCCAGAAAUG
2429	2430	1652-1670	AUUUCUGGAACACUUGGCA	UGCCAAGUGUCCAGAAAU
2431	2432	1653-1671	UUUCUGGAACACUUGGCAA	UUGCCAAGUGUCCAGAAA
2433	2434	1654-1672	UUCUGGAACACUUGGCAA	UUUGCCAAGUGUCCAGAA
2435	2436	1655-1673	UCUGGAACACUUGGCAAAG	CUUUGCCAAGUGUCCAGA
2437	2438	1656-1674	CUGGAACACUUGGCAAAGC	GCUUUGCCAAGUGUCCAG
2439	2440	1657-1675	UGGAACACUUGGCAAAGCC	GGCUUUGCCAAGUGUCCA
2441	2442	1658-1676	GGAACACUUGGCAAAGCCU	AGGCUUUGCCAAGUGUCC
2443	2444	1659-1677	GAACACUUGGCAAAGCCUU	AAGGCUUUGCCAAGUGUUC
2445	2446	1660-1678	AACACUUGGCAAAGCCUUU	AAAGGCUUUGCCAAGUGUU
2447	2448	1661-1679	ACACUUGGCAAAGCCUUUG	CAAAGGCUUUGCCAAGUGU
2449	2450	1662-1680	CACUUGGCAAAGCCUUUGG	CAAAGGCUUUGCCAAGUG
2451	2452	1682-1700	UGUGUUGGAGGGUACAUCG	CGAUGUACCCUCCAACACA
2453	2454	1683-1701	GUGUUGGAGGGUACAUCGC	GCGAUGUACCCUCCAACAC
2455	2456	1684-1702	UGUUGGAGGGUACAUCGCC	GGCGAUGUACCCUCCAACA
2457	2458	1685-1703	GUUGGAGGGUACAUCGCCA	UGGCGAUGUACCCUCCAAC
2459	2460	1686-1704	UUGGAGGGUACAUCGCCAG	CUGGCGAUGUACCCUCCA
2461	2462	1687-1705	UGGAGGGUACAUCGCCAGC	GCUGGCGAUGUACCCUCCA
2463	2464	1688-1706	GGAGGGUACAUCGCCAGCA	UGCUGGCGAUGUACCCUCC
2465	2466	1689-1707	GAGGGUACAUCGCCAGCAC	GUGCUGGCGAUGUACCCUC
2467	2468	1690-1708	AGGGUACAUCGCCAGCACG	CGUGCUGGCGAUGUACCCU
2469	2470	1691-1709	GGGUACAUCGCCAGCACGA	UCGUGCUGGCGAUGUACCC
2471	2472	1692-1710	GGUACAUCGCCAGCACGAG	CUCGUGCUGGCGAUGUACC
2473	2474	1693-1711	GUACAUCGCCAGCACGAGU	ACUCGUGCUGGCGAUGUAC
2475	2476	1694-1712	UACAUCGCCAGCACGAGUU	AACUCGUGCUGGCGAUGUA
2477	2478	1695-1713	ACAUCGCCAGCACGAGUUC	GAACUCGUGCUGGCGAUGU
2479	2480	1696-1714	CAUCGCCAGCACGAGUUCU	AGAACUCGUGCUGGCGAUG
2481	2482	1697-1715	AUCGCCAGCACGAGUUCUC	GAGAACUCGUGCUGGCGAU
2483	2484	1698-1716	UCGCCAGCACGAGUUCUCU	AGAGAACUCGUGCUGGCGA
2485	2486	1699-1717	CGCCAGCACGAGUUCUCUG	CAGAGAACUCGUGCUGGCG
2487	2488	1700-1718	GCCAGCACGAGUUCUCUGA	UCAGAGAACUCGUGCUGGC
2489	2490	1701-1719	CCAGCACGAGUUCUCUGAU	AUCAGAGAACUCGUGCUGG
2491	2492	1702-1720	CAGCACGAGUUCUCUGAUU	AAUCAGAGAACUCGUGCUG
2493	2494	1703-1721	AGCACGAGUUCUCUGAUUG	CAAUCAGAGAACUCGUGCUC
2495	2496	1704-1722	GCACGAGUUCUCUGAUUGA	UCAUCAGAGAACUCGUGC
2497	2498	1705-1723	CACGAGUUCUCUGAUUGAC	GUCAUCAGAGAACUCGUG
2499	2500	1707-1725	CGAGUUCUCUGAUUGACAC	GUGUCAUCAGAGAACUCG
2501	2502	1727-1745	GUACGGUCCUAUGCUGCUG	CAGCAGCAUAGGACCGUAC
2503	2504	1728-1746	UACGGUCCUAUGCUGCUGG	CCAGCAGCAUAGGACCGUA
2505	2506	1729-1747	ACGGUCCUAUGCUGCUGGC	GCCAGCAGCAUAGGACCGU
2507	2508	1730-1748	CGGUCCUAUGCUGCUGGCU	AGCCAGCAGCAUAGGACCG

ES 2 640 260 T3

2509	2510	1731-1749	GGUCCUAUGCUGCUGGCCUU	AAGCCAGCAGCAUAGGACC
2511	2512	1732-1750	GUCCUAUGCUGCUGGCCUUC	GAAGCCAGCAGCAUAGGAC
2513	2514	1733-1751	UCCUAUGCUGCUGGCCUUCA	UGAAGCCAGCAGCAUAGGA
2515	2516	1734-1752	CCUAUGCUGCUGGCCUUCAU	AUGAAGCCAGCAGCAUAGG
2517	2518	1735-1753	CUAUGCUGCUGGCCUUCAUC	GAUGAAGCCAGCAGCAUAG
2519	2520	1736-1754	UAUGCUGCUGGCCUUCAUCU	AGAUGAAGCCAGCAGCAUA
2521	2522	1737-1755	AUGCUGCUGGCCUUCAUCUU	AAGAUGAAGCCAGCAGCAU
2523	2524	1738-1756	UGCUGCUGGCCUUCAUCUUC	GAAGAUGAAGCCAGCAGCA
2525	2526	1739-1757	GCUGCUGGCCUUCAUCUJCA	UGAAGAUGAAGCCAGCAGC
2527	2528	1740-1758	CUGCUGGCCUUCAUCUUCAC	GUGAAGAUGAAGCCAGCAG
2529	2530	1741-1759	UGCUGGCCUUCAUCUUCACC	GGUGAAGAUGAAGCCAGCA
2531	2532	1742-1760	GCUGGCCUUCAUCUUCACCA	UGGUGAAGAUGAAGCCAGC
2533	2534	1743-1761	CUGGCCUUCAUCUUCACCAC	GUGGUGAAGAUGAAGCCAG
2535	2536	1744-1762	UGGCCUUCAUCUUCACCACC	GGUGGUGAAGAUGAAGCCA
2537	2538	1745-1763	GGCUUCAUCUUCACCACCU	AGGUGGUGAAGAUGAAGCC
2539	2540	1746-1764	GCUUCAUCUUCACCACCUC	GAGGUGGUGAAGAUGAAGC
2541	2542	1747-1765	CUUCAUCUUCACCACCUCU	AGAGGUGGUGAAGAUGAAG
2543	2544	1748-1766	UUCAUCUUCACCACCUCUC	GAGAGGUGGUGAAGAUGAA
2545	2546	1749-1767	UCAUCUUCACCACCUCUCU	AGAGAGGUGGUGAAGAUGA
2547	2548	1750-1768	CAUCUUCACCACCUCUCUG	CAGAGAGGUGGUGAAGAUG
2549	2550	1751-1769	AUCUUCACCACCUCUCUGC	GCAGAGAGGUGGUGAAGAU
2551	2552	1752-1770	UCUUCACCACCUCUCUGCC	GGCAGAGAGGUGGUGAAGA
2553	2554	1753-1771	CUUCACCACCUCUCUGCCA	UGGCAGAGAGGUGGUGAAG
2555	2556	1754-1772	UUCACCACCUCUCUGCCAC	GUGGCAGAGAGGUGGUGAA
2557	2558	1755-1773	UCACCACCUCUCUGCCACC	GGUGGCAGAGAGGUGGUGA
2559	2560	1756-1774	CACCACCUCUCUGCCACCC	GGGUGGCAGAGAGGUGGUG
2561	2562	1757-1775	ACCACCUCUCUGCCACCCA	UGGGUGGCAGAGAGGUGGU
2563	2564	1758-1776	CCACCUCUCUGCCACCCAU	AUGGGUGGCAGAGAGGUGG
2565	2566	1759-1777	CACCUCUCUGCCACCCAUG	CAUGGGUGGCAGAGAGGUG
2567	2568	1760-1778	ACCUCUCUGCCACCCAUGC	GCAUGGGUGGCAGAGAGGU
2569	2570	1761-1779	CCUCUCUGCCACCCAUGCUC	AGCAUGGGUGGCAGAGAGG
2571	2572	1762-1780	CUCUCUGCCACCCAUGCUG	CAGCAUGGGUGGCAGAGAG
2573	2574	1763-1781	UCUCUGCCACCCAUGCUGC	GCAGCAUGGGUGGCAGAGA
2575	2576	1764-1782	CUCUGCCACCCAUGCUGCU	AGCAGCAUGGGUGGCAGAG
2577	2578	1765-1783	UCUGCCACCCAUGCUGCUG	CAGCAGCAUGGGUGGCAGA
2579	2580	1766-1784	CUGCCACCCAUGCUGCUGG	CCAGCAGCAUGGGUGGCAG
2581	2582	1767-1785	UGCCACCCAUGCUGCUGGC	GCCAGCAGCAUGGGUGGCA
2583	2584	1768-1786	GCCACCCAUGCUGCUGGCCU	AGCCAGCAGCAUGGGUGGC
2585	2586	1769-1787	CCACCAUGCUGCUGGGCUG	CAGCCAGCAGCAUGGGUGG
2587	2588	1770-1788	CACCAUGCUGCUGGGCUGG	CCAGCCAGCAGCAUGGGUG
2589	2590	1771-1789	ACCCAUGCUGCUGGGCUGGA	UCCAGCCAGCAGCAUGGGU
2591	2592	1772-1790	CCCAUGCUGCUGGGCUGGAG	CUCCAGCCAGCAGCAUGGG
2593	2594	1773-1791	CCAUGCUGCUGGGCUGGAGC	GCUCCAGCCAGCAGCAUGG
2595	2596	1774-1792	CAUGCUGCUGGGCUGGAGCC	GGCUCCAGCCAGCAGCAUG
2597	2598	1775-1793	AUGCUGCUGGGCUGGAGCCC	GGGCUCCAGCCAGCAGCAU
2599	2600	1776-1794	UGCUGCUGGGCUGGAGCCCU	AGGGCUCCAGCCAGCAGCA
2601	2602	1777-1795	GCUGCUGGGCUGGAGCCCU	CAGGGCUCCAGCCAGCAGC
2603	2604	1778-1796	CUGCUGGGCUGGAGCCCU	CCAGGGCUCCAGCCAGCAG
2605	2606	1779-1797	UGCUGGGCUGGAGCCCU	UCCAGGGCUCCAGCCAGCA
2607	2608	1780-1798	GCUGGGCUGGAGCCCU	CUCCAGGGCUCCAGCCAGC
2609	2610	1781-1799	CUGGGCUGGAGCCCU	ACUCCAGGGCUCCAGCCAG
2611	2612	1782-1800	UGGCUGGAGCCCU	GACUCCAGGGCUCCAGCCA
2613	2614	1783-1801	GGCUGGAGCCCU	AGACUCCAGGGCUCCAGCC
2615	2616	1784-1802	GCUGGAGCCCU	CAGACUCCAGGGCUCCAGC
2617	2618	1785-1803	CUGGAGCCCU	ACAGACUCCAGGGCUCCAG
2619	2620	1786-1804	UGGAGCCCU	CACAGACUCCAGGGCUCCA
2621	2622	1787-1805	GGAGCCCU	GCACAGACUCCAGGGCUCC
2623	2624	1788-1806	GAGCCCU	CGCACAGACUCCAGGGCUCC
2625	2626	1789-1807	AGCCCU	CCGCACAGACUCCAGGGCU
2627	2628	1790-1808	GCCCU	UCCGCACAGACUCCAGGGC
2629	2630	1792-1810	CCUGGAGUCUGGCGGAUC	GAUCCGCACAGACUCCAGG
2631	2632	1793-1811	CUGGAGUCUGGCGGAUCC	GGAUCCGCACAGACUCCAG

ES 2 640 260 T3

2633	2634	1795-1813	GGAGUCUGUGCGGAUCCUG	CAGGAUCCGCACAGACUCC
2635	2636	1796-1814	GAGUCUGUGCGGAUCCUGA	UCAGGAUCCGCACAGACUC
2637	2638	1797-1815	AGUCUGUGCGGAUCCUGAA	UUCAGGAUCCGCACAGACU
2639	2640	1798-1816	GUCUGUGCGGAUCCUGAAG	CUUCAGGAUCCGCACAGAC
2641	2642	1799-1817	UCUGUGCGGAUCCUGAAGA	UCUUCAGGAUCCGCACAGA
2643	2644	1800-1818	CUGUGCGGAUCCUGAAGAG	CUCUUCAGGAUCCGCACAG
2645	2646	1801-1819	UGUGCGGAUCCUGAAGAGC	GCUCUUCAGGAUCCGCACA
2647	2648	1802-1820	GUGCGGAUCCUGAAGAGCG	CGUCUUCAGGAUCCGCAC
2649	2650	1803-1821	UGCUGAUCCUGAAGAGCGC	GCGUCUUCAGGAUCCGCAC
2651	2652	1804-1822	GCGGAUCCUGAAGAGCGCU	AGCGUCUUCAGGAUCCGC
2653	2654	1805-1823	CGGAUCCUGAAGAGCGCUG	CAGCGUCUUCAGGAUCCG
2655	2656	1806-1824	GGAUCCUGAAGAGCGCUGA	UCAGCGUCUUCAGGAUCC
2657	2658	1807-1825	GAUCCUGAAGAGCGCUGAG	CUCAGCGUCUUCAGGAUC
2659	2660	1808-1826	AUCCUGAAGAGCGCUGAGG	CCUCAGCGUCUUCAGGAU
2661	2662	1809-1827	UCCUGAAGAGCGCUGAGGG	CCCUCAGCGUCUUCAGGA
2663	2664	1810-1828	CCUGAAGAGCGCUGAGGGA	UCCCUCAGCGUCUUCAGG
2665	2666	1811-1829	CUGAAGAGCGCUGAGGGAC	GUCCCUCAGCGUCUUCAG
2667	2668	1812-1830	UGAAGAGCGCUGAGGGACG	CGUCCCUCAGCGUCUUCA
2669	2670	1813-1831	GAAGAGCGCUGAGGGACGG	CCGUCCCUCAGCGUCUUC
2671	2672	1814-1832	AAGAGCGCUGAGGGACGGG	CCCGUCCCUCAGCGUCUU
2673	2674	1815-1833	AGAGCGCUGAGGGACGGGU	ACCCGUCCCUCAGCGUCU
2675	2676	1816-1834	GAGCGCUGAGGGACGGGUG	CACCCGUCCCUCAGCGCUC
2677	2678	1817-1835	AGCGCUGAGGGACGGGUGC	GCACCCGUCCCUCAGCGCU
2679	2680	1818-1836	GCGCUGAGGGACGGGUGCU	AGCACCCGUCCCUCAGCGC
2681	2682	1819-1837	CGCUGAGGGACGGGUGCUU	AAGCACCCGUCCCUCAGCG
2683	2684	1820-1838	GCUGAGGGACGGGUGCUUC	GAAGCACCCGUCCCUCAGC
2685	2686	1821-1839	CUGAGGGACGGGUGCUUCG	CGAAGCACCCGUCCCUCAG
2687	2688	1822-1840	UGAGGGACGGGUGCUUCGC	GCGAAGCACCCGUCCCUCA
2689	2690	1823-1841	GAGGGACGGGUGCUUCGCC	GGCGAAGCACCCGUCCCUC
2691	2692	1824-1842	AGGGACGGGUGCUUCGCCG	CGGCGAAGCACCCGUCCCUC
2693	2694	1825-1843	GGGACGGGUGCUUCGCCGC	GCGGCGAAGCACCCGUCCC
2695	2696	1826-1844	GGACGGGUGCUUCGCCGCC	GGCGGCGAAGCACCCGUCC
2697	2698	1827-1845	GACGGGUGCUUCGCCGCCA	UGGCGGCGAAGCACCCGUC
2699	2700	1828-1846	ACGGGUGCUUCGCCGCCAG	CUGGCGGCGAAGCACCCGU
2701	2702	1829-1847	CGGGUGCUUCGCCGCCAGC	GCUGGCGGCGAAGCACCCG
2703	2704	1830-1848	GGGUGCUUCGCCGCCAGCA	UGCUGGCGGCGAAGCACCC
2705	2706	1831-1849	GGUGCUUCGCCGCCAGCAC	GUGCUGGCGGCGAAGCAC
2707	2708	1832-1850	GUGCUUCGCCGCCAGCACC	GGUGCUGGCGGCGAAGCAC
2709	2710	1833-1851	UGCUCGCCGCCAGCACCA	UGGUGCUGGCGGCGAAGCA
2711	2712	1834-1852	GCUCGCCGCCAGCACCAAG	CUGGUGCUGGCGGCGAAGC
2713	2714	1835-1853	CUUCGCCGCCAGCACCAAGC	GCUGGUGCUGGCGGCGAAG
2715	2716	1836-1854	UUCGCCGCCAGCACCAAGCG	CGCUGGUGCUGGCGGCGAA
2717	2718	1837-1855	UCGCCGCCAGCACCAAGCGC	GCGCUGGUGCUGGCGGCGA
2719	2720	1838-1856	CGCCGCCAGCACCAAGCGCA	UGCUCUGGUGCUGGCGGCG
2721	2722	1839-1857	GCCGCCAGCACCAAGCGCAA	UUGCUCUGGUGCUGGCGGC
2723	2724	1840-1858	CCGCCAGCACCAAGCGCAAC	GUUGCUCUGGUGCUGGCGG
2725	2726	1841-1859	CGCCAGCACCAAGCGCAACG	CGUUGCUCUGGUGCUGGCG
2727	2728	1842-1860	GCCAGCACCAAGCGCAACGU	ACGUUGCUCUGGUGCUGGCG
2729	2730	1865-1883	CUCAUGAGACAGAUGCUGAA	UUAGCAUCUGUCUCAUGAG
2731	2732	1866-1884	UCAUGAGACAGAUGCUGAAU	AUUAGCAUCUGUCUCAUGA
2733	2734	1867-1885	CAUGAGACAGAUGCUGAAUG	CAUUAGCAUCUGUCUCAUG
2735	2736	1868-1886	AUGAGACAGAUGCUGAAUGG	CAUUAGCAUCUGUCUCAU
2737	2738	1869-1887	UGAGACAGAUGCUGAAUGGA	UCCAUUAGCAUCUGUCUCA
2739	2740	1871-1889	AGACAGAUGCUGAAUGGAUG	CAUCCAUUAGCAUCUGUCU
2741	2742	1872-1890	GACAGAUGCUGAAUGGAUGC	GCAUCCAUUAGCAUCUGUC
2743	2744	1873-1891	ACAGAUGCUGAAUGGAUGCC	GGCAUCCAUUAGCAUCUGU
2745	2746	1874-1892	CAGAUGCUGAAUGGAUGCCG	CGGCAUCCAUUAGCAUCUG
2747	2748	1875-1893	AGAUGCUGAAUGGAUGCCGG	CCGGCAUCCAUUAGCAUCU
2749	2750	1876-1894	GAUGCUGAAUGGAUGCCGGC	GCCGGCAUCCAUUAGCAUC
2751	2752	1877-1895	AUGCUGAAUGGAUGCCGGCC	GGCCGGCAUCCAUUAGCAU
2753	2754	1878-1896	UGCUGAAUGGAUGCCGGCCU	AGGCCGGCAUCCAUUAGCA
2755	2756	1879-1897	GCUGAAUGGAUGCCGGCCUC	GAGGCCGGCAUCCAUUAGC

ES 2 640 260 T3

2757	2758	1880-1898	CUAAUGGAUGCCGGCCUCC	GGAGGCCGGCAUCCAUIAG
2759	2760	1881-1899	UAAUGGAUGCCGGCCUCCC	GGGAGGCCGGCAUCCAUIA
2761	2762	1882-1900	AAUGGAUGCCGGCCUCCCU	AGGGAGGCCGGCAUCCAUI
2763	2764	1883-1901	AUGGAUGCCGGCCUCCUG	CAGGGAGGCCGGCAUCCA
2765	2766	1884-1902	UGGAUGCCGGCCUCCUGU	ACAGGGAGGCCGGCAUCCA
2767	2768	1885-1903	GGGAUGCCGGCCUCCUGUU	AACAGGGAGGCCGGCAUCC
2769	2770	1886-1904	GAUGCCGGCCUCCUGUUG	CAACAGGGAGGCCGGCAUC
2771	2772	1887-1905	AUGCCGGCCUCCUGUUGU	ACAACAGGGAGGCCGGCAU
2773	2774	1888-1906	UGCCGGCCUCCUGUUGUC	GACAACAGGGAGGCCGGCA
2775	2776	1889-1907	GCCGGCCUCCUGUUGUCC	GGACAACAGGGAGGCCGGC
2777	2778	1890-1908	CCGGCCUCCUGUUGUCCA	UGGACAACAGGGAGGCCGG
2779	2780	1891-1909	CGGCCUCCUGUUGUCCAC	GUGGACAACAGGGAGGCCG
2781	2782	1892-1910	GGCCUCCUGUUGUCCACU	AGUGGACAACAGGGAGGCC
2783	2784	1893-1911	GCCUCCUGUUGUCCACUG	CAGUGGACAACAGGGAGGC
2785	2786	1894-1912	CCUCCUGUUGUCCACUGC	GCAGUGGACAACAGGGAGG
2787	2788	1895-1913	CUCCUGUUGUCCACUGCC	GGCAGUGGACAACAGGGAG
2789	2790	1896-1914	UCCUGUUGUCCACUGCCC	GGGCAGUGGACAACAGGGA
2791	2792	1897-1915	CCUGUUGUCCACUGCCCC	GGGGCAGUGGACAACAGGG
2793	2794	1898-1916	CCUGUUGUCCACUGCCCCA	UGGGGCAGUGGACAACAGG
2795	2796	1899-1917	CUGUUGUCCACUGCCCCAG	CUGGGGCAGUGGACAACAG
2797	2798	1900-1918	UGUUGUCCACUGCCCCAGC	GCUGGGGCAGUGGACAACA
2799	2800	1901-1919	GUUGUCCACUGCCCCAGCC	GGCUGGGGCAGUGGACAAC
2801	2802	1902-1920	UUGUCCACUGCCCCAGCCA	UGGCUGGGGCAGUGGACAA
2803	2804	1903-1921	UGUCCACUGCCCCAGCCAC	GUGGCUGGGGCAGUGGACA
2805	2806	1904-1922	GUCCACUGCCCCAGCCACA	UGUGGCUGGGGCAGUGGAC
2807	2808	1905-1923	UCCACUGCCCCAGCCACAU	AUGUGGCUGGGGCAGUGGA
2809	2810	1906-1924	CCACUGCCCCAGCCACAUC	GAUGUGGCUGGGGCAGUGG
2811	2812	1907-1925	CACUGCCCCAGCCACAUCA	UGAUGUGGCUGGGGCAGUG
2813	2814	1908-1926	ACUGCCCCAGCCACAUCAU	AUGAUGUGGCUGGGGCAGU
2815	2816	1909-1927	CUGCCCCAGCCACAUCAUC	GAUGAUGUGGCUGGGGCAG
2817	2818	1910-1928	UGCCCCAGCCACAUCAUCC	GGGAUGAUGUGGCUGGGGC
2819	2820	1911-1929	GCCCCAGCCACAUCAUCCC	AGGAUGAUGUGGCUGGGG
2821	2822	1912-1930	CCCCAGCCACAUCAUCCCU	CAGGAUGAUGUGGCUGGG
2823	2824	1913-1931	CCCAGCCACAUCAUCCUG	ACAGGGGAUGAUGUGGCUGG
2825	2826	1914-1932	CCAGCCACAUCAUCCUGU	CACAGGGGAUGAUGUGGCUG
2827	2828	1915-1933	CAGCCACAUCAUCCUGUG	GCACAGGGGAUGAUGUGGCU
2829	2830	1916-1934	AGCCACAUCAUCCUGUGC	CGCACAGGGGAUGAUGUGGC
2831	2832	1917-1935	GCCACAUCAUCCUGUGCG	CCGCACAGGGGAUGAUGUGG
2833	2834	1918-1936	CCACAUCAUCCUGUGCGG	CCCGCACAGGGGAUGAUGUG
2835	2836	1919-1937	CACAUCAUCCUGUGCGGG	ACCCGCACAGGGGAUGAUGU
2837	2838	1920-1938	ACAUCAUCCUGUGCGGGU	CAACCCGCACAGGGGAUGAU
2839	2840	1922-1940	AUCAUCCUGUGCGGGUUG	GCAACCCGCACAGGGGAUGA
2841	2842	1923-1941	UCAUCCUGUGCGGGUUGC	UGCAACCCGCACAGGGGAUG
2843	2844	1924-1942	CAUCCUGUGCGGGUUGCA	CUGCAACCCGCACAGGGGAU
2845	2846	1925-1943	AUCCUGUGCGGGUUGCAG	UCUGCAACCCGCACAGGGGA
2847	2848	1926-1944	UCCUGUGCGGGUUGCAGA	CAUCUGCAACCCGCACAGG
2849	2850	1928-1946	CCUGUGCGGGUUGCAGAUG	GCAUCUGCAACCCGCACAG
2851	2852	1929-1947	CUGUGCGGGUUGCAGAUGC	AGCAUCUGCAACCCGCACA
2853	2854	1930-1948	UGUGCGGGUUGCAGAUGC	CAGCAUCUGCAACCCGCAC
2855	2856	1931-1949	GUGCGGGUUGCAGAUGCUG	GCAGCAUCUGCAACCCGC
2857	2858	1932-1950	UGCGGGUUGCAGAUGCUGC	AGCAGCAUCUGCAACCCGC
2859	2860	1933-1951	GCGGGUUGCAGAUGCUGCU	UAGCAGCAUCUGCAACCCG
2861	2862	1934-1952	CGGGUUGCAGAUGCUGCUA	UUAGCAGCAUCUGCAACCC
2863	2864	1935-1953	GGGUUGCAGAUGCUGCUAA	UUUAGCAGCAUCUGCAACC
2865	2866	1936-1954	GGUUGCAGAUGCUGCUAAA	UUUUAGCAGCAUCUGCAA
2867	2868	1937-1955	GUUGCAGAUGCUGCUAAAA	GUUUUUAGCAGCAUCUGCA
2869	2870	1938-1956	UUGCAGAUGCUGCUAAAAA	UGUUUUUAGCAGCAUCUGC
2871	2872	1939-1957	UGCAGAUGCUGCUAAAAAC	GUGUUUUUAGCAGCAUCUG
2873	2874	1940-1958	GCAGAUGCUGCUAAAAACA	UUAGUUUUUAGCAGCAUUC
2875	2876	1941-1959	CAGAUGCUGCUAAAAACAC	UUUAGUUUUUAGCAGCAUUC
2877	2878	1961-1979	GAAGUCUGUGAUAACUAA	CAUUAGUUUAUCACAGACU
2879	2880	1963-1981	AGUCUGUGAUGAUAACUAG	CAUUAGUUUAUCACAGACU

ES 2 640 260 T3

2881	2882	1965-1983	UCUGUGAUGAACUAAUGAG	CUCAUUAGUUCAUCACAGA
2883	2884	1966-1984	CUGUGAUGAACUAAUGAGC	GCUCAUUAGUUCAUCACAG
2885	2886	1968-1986	GUGAUGAACUAAUGAGCAG	CUGCUCAUUAGUUCAUCAC
2887	2888	1969-1987	UGAUGAACUAAUGAGCAGA	UCUGCUCAUUAGUUCAUCA
2889	2890	1970-1988	GAUGAACUAAUGAGCAGAC	GUCUGCUCAUUAGUUCAUC
2891	2892	1971-1989	AUGAACUAAUGAGCAGACA	UGUCUGCUCAUUAGUUCAU
2893	2894	1972-1990	UGAACUAAUGAGCAGACAU	AUGUCUGCUCAUUAGUUCA
2895	2896	1973-1991	GAACUAAUGAGCAGACAU	UAUGUCUGCUCAUUAGUUC
2897	2898	1974-1992	ACUAAUGAGCAGACAUAA	UUAUGUCUGCUCAUUAGUU
2899	2900	1975-1993	ACUAAUGAGCAGACAUAA	GUUAUGUCUGCUCAUUAGU
2901	2902	1978-1996	AAUGAGCAGACAUAAACAU	GAUGUUAUGUCUGCUCAUU
2903	2904	1979-1997	AUGAGCAGACAUAAACAU	AGAUGUUAUGUCUGCUCAU
2905	2906	1980-1998	UGAGCAGACAUAAACAU	UAGAUGUUAUGUCUGCUC
2907	2908	2000-2018	GUGCAAGCAAUCAAUUACC	GGUAAUUGAUUGCUUGCAC
2909	2910	2001-2019	UGCAAGCAAUCAAUUACCC	GGGUAAUUGAUUGCUUGCA
2911	2912	2002-2020	GCAAGCAAUCAAUUACCCU	AGGGUAAUUGAUUGCUUGC
2913	2914	2004-2022	AAGCAAUCAAUUACCCUAC	GUAGGGUAAUUGAUUGCUU
2915	2916	2024-2042	GUGCCCCGGGGAGAAGAGC	GCUCUUCUCCCCGGGGCAC
2917	2918	2025-2043	UGCCCCGGGGAGAAGAGCU	AGCUCUUCUCCCCGGGGCA
2919	2920	2026-2044	GCCCCGGGGAGAAGAGCUC	GAGCUCUUCUCCCCGGGGC
2921	2922	2027-2045	CCCCGGGGAGAAGAGCUCC	GGAGCUCUUCUCCCCGGGG
2923	2924	2028-2046	CCCGGGGAGAAGAGCUCCU	AGGAGCUCUUCUCCCCGGG
2925	2926	2029-2047	CCGGGGAGAAGAGCUCCUA	UAGGAGCUCUUCUCCCCGG
2927	2928	2030-2048	CGGGGAGAAGAGCUCCUAC	GUAGGAGCUCUUCUCCCCG
2929	2930	2031-2049	GGGGAGAAGAGCUCCUACG	CGUAGGAGCUCUUCUCCCC
2931	2932	2032-2050	GGGAGAAGAGCUCCUACGG	CCGUAGGAGCUCUUCUCCC
2933	2934	2033-2051	GGAGAAGAGCUCCUACGGA	UCCGUAGGAGCUCUUCUCC
2935	2936	2034-2052	GAGAAGAGCUCCUACGGAU	AUCCGUAGGAGCUCUUCUC
2937	2938	2060-2078	ACCCUCACCACACACCCCA	GGGGUGUGUGGUGAGGGGU
2939	2940	2061-2079	CCCCUACCACACACCCCA	UGGGUGUGUGGUGAGGGGG
2941	2942	2062-2080	CCCUACCACACACCCCA	CUGGGGUGUGUGGUGAGGG
2943	2944	2063-2081	CCUACCACACACCCCA	UCUGGGGUGUGUGGUGAGG
2945	2946	2064-2082	CUACCACACACCCCA	AUCUGGGGUGUGUGGUGAG
2947	2948	2065-2083	UACCACACACCCCA	CAUCUGGGGUGUGUGGUGA
2949	2950	2066-2084	CACCACACACCCCA	UCAUCUGGGGUGUGUGGUG
2951	2952	2067-2085	ACCACACACCCCA	AUCAUCUGGGGUGUGUGGU
2953	2954	2068-2086	CCACACACCCCA	CAUCAUCUGGGGUGUGUGG
2955	2956	2069-2087	CACACACCCCA	UCAUCAUCUGGGGUGUGUG
2957	2958	2070-2088	ACACACCCCA	UUCAUCAUCUGGGGUGUGU
2959	2960	2071-2089	CACACCCCA	GUUCAUCAUCUGGGGUGUG
2961	2962	2072-2090	ACACCCCA	AGUUCAUCAUCUGGGGUGU
2963	2964	2073-2091	CACCCCA	UAGUUCAUCAUCUGGGGUG
2965	2966	2074-2092	ACCCCA	GUAGUUCAUCAUCUGGGGU
2967	2968	2076-2094	CCCA	AAGUAGUUCAUCAUCUGGG
2969	2970	2077-2095	CCAGAUUGAUAUACUUC	GAAGUAGUUCAUCAUCUGG
2971	2972	2078-2096	CAGAUUGAUAUACUUC	GGAAGUAGUUCAUCAUCUG
2973	2974	2079-2097	AGAUGAUAUACUUCU	AGGAAGUAGUUCAUCAUCU
2975	2976	2080-2098	GAUGAUAUACUUCU	AAGGAAGUAGUUCAUCAUC
2977	2978	2081-2099	AUGAUAUACUUCU	CAAGGAAGUAGUUCAUCAU
2979	2980	2082-2100	UGAUAUACUUCU	UCAAGGAAGUAGUUCAUCA
2981	2982	2083-2101	GAUAUAUACUUCU	CUCAAGGAAGUAGUUCAUC
2983	2984	2084-2102	AUGAUAUACUUCU	UCUCAAGGAAGUAGUUCAU
2985	2986	2085-2103	UGAUAUACUUCU	UUCUCAAGGAAGUAGUUCA
2987	2988	2086-2104	GAUAUAUACUUCU	AUUCUCAAGGAAGUAGUUC
2989	2990	2087-2105	AUAUAUACUUCU	GAUUCUCAAGGAAGUAGUU
2991	2992	2088-2106	ACUAUAUACUUCU	AGAUUCUCAAGGAAGUAGU
2993	2994	2089-2107	CUAUAUACUUCU	CAGAUUCUCAAGGAAGUAG
2995	2996	2090-2108	UUAUAUACUUCU	GCAGAUUCUCAAGGAAGUA
2997	2998	2091-2109	ACUAUAUACUUCU	AGCAGAUUCUCAAGGAAGU
2999	3000	2117-2135	UGGAAGCAAGUGGGGCUUG	CCAGCCCCACUUGCUUCCA
3001	3002	2118-2136	GGAAGCAAGUGGGGCUUGA	UCCAGCCCCACUUGCUUCC
3003	3004	2119-2137	GAAGCAAGUGGGGCUUGAA	UCCAGCCCCACUUGCUUC

ES 2 640 260 T3

3005	3006	2120-2138	AAGCAAGUGGGGCUGGAAC	GUUCCAGCCCCACUUGCUU
3007	3008	2121-2139	AGCAAGUGGGGCUGGAACU	AGUUCCAGCCCCACUUGCU
3009	3010	2122-2140	GCAAGUGGGGCUGGAACUG	CAGUUCCAGCCCCACUUGC
3011	3012	2123-2141	CAAGUGGGGCUGGAACUGA	UCAGUUCCAGCCCCACUUG
3013	3014	2124-2142	AAGUGGGGCUGGAACUGAA	UUCAGUUCCAGCCCCACUU
3015	3016	2125-2143	AGUGGGGCUGGAACUGAAG	CUUCAGUUCCAGCCCCACU
3017	3018	2126-2144	GUGGGGCUGGAACUGAAGC	GCUUCAGUUCCAGCCCCAC
3019	3020	2127-2145	UGGGGCUGGAACUGAAGCC	GGCUUCAGUUCCAGCCCCA
3021	3022	2147-2165	CAUCCUCAGCUGAGUGCA	UGCACUCAGCUGAGGAAUG
3023	3024	2148-2166	AUUCUCAGCUGAGUGCAA	UUGCACUCAGCUGAGGAAU
3025	3026	2149-2167	UUCUCAGCUGAGUGCAAC	GUUGCACUCAGCUGAGGAA
3027	3028	2150-2168	UCCUCAGCUGAGUGCAACU	AGUUGCACUCAGCUGAGGA
3029	3030	2151-2169	CCUCAGCUGAGUGCAACU	AAGUUGCACUCAGCUGAGG
3031	3032	2152-2170	CUCAGCUGAGUGCAACUUC	GAAGUUGCACUCAGCUGAG
3033	3034	2153-2171	UCAGCUGAGUGCAACUUCU	AGAAGUUGCACUCAGCUGA
3035	3036	2154-2172	CAGCUGAGUGCAACUUCUG	CAGAAGUUGCACUCAGCUG
3037	3038	2155-2173	AGCUGAGUGCAACUUCUGC	GCAGAAGUUGCACUCAGCU
3039	3040	2156-2174	GCUGAGUGCAACUUCUGCA	UGCAGAAGUUGCACUCAGC
3041	3042	2157-2175	CUGAGUGCAACUUCUGCAG	CUGCAGAAGUUGCACUCAG
3043	3044	2158-2176	UGAGUGCAACUUCUGCAGG	CCUGCAGAAGUUGCACUCA
3045	3046	2159-2177	GAGUGCAACUUCUGCAGGA	UCCUGCAGAAGUUGCACUC
3047	3048	2160-2178	AGUGCAACUUCUGCAGGAG	CUCCUGCAGAAGUUGCACU
3049	3050	2161-2179	GUGCAACUUCUGCAGGAGG	CCUCCUGCAGAAGUUGCAC
3051	3052	2162-2180	UGCAACUUCUGCAGGAGGC	GCCUCCUGCAGAAGUUGCA
3053	3054	2163-2181	GCAACUUCUGCAGGAGGCC	GGCCUCCUGCAGAAGUUGC
3055	3056	2164-2182	CAACUUCUGCAGGAGGCCA	UGGCCUCCUGCAGAAGUUG
3057	3058	2165-2183	AACUUCUGCAGGAGGCCAC	GUGGCCUCCUGCAGAAGUU
3059	3060	2166-2184	ACUUCUGCAGGAGGCCACU	AGUGGCCUCCUGCAGAAGU
3061	3062	2167-2185	CUUCUGCAGGAGGCCACUG	CAGUGGCCUCCUGCAGAAG
3063	3064	2168-2186	UUCUGCAGGAGGCCACUGC	GCAGUGGCCUCCUGCAGAA
3065	3066	2169-2187	UCUGCAGGAGGCCACUGCA	UGCAGUGGCCUCCUGCAGA
3067	3068	2170-2188	CUGCAGGAGGCCACUGCAU	AUGCAGUGGCCUCCUGCAG
3069	3070	2171-2189	UGCAGGAGGCCACUGCAUU	AAUGCAGUGGCCUCCUGC
3071	3072	2172-2190	GCAGGAGGCCACUGCAUUU	AAAUGCAGUGGCCUCCUGC
3073	3074	2173-2191	CAGGAGGCCACUGCAUUUU	AAAAUGCAGUGGCCUCCUG
3075	3076	2174-2192	AGGAGGCCACUGCAUUUUG	CAAAAUGCAGUGGCCUCCU
3077	3078	2175-2193	GGAGGCCACUGCAUUUUGA	UAAAAUGCAGUGGCCUCC
3079	3080	2176-2194	GAGGCCACUGCAUUUUGAA	UUCAAAAUGCAGUGGCCUC
3081	3082	2177-2195	AGGCCACUGCAUUUUGAAG	CUUAAAAUGCAGUGGCCU
3083	3084	2178-2196	GGCCACUGCAUUUUGAAGU	ACUUAAAAUGCAGUGGCC
3085	3086	2179-2197	GCCACUGCAUUUUGAAGUG	CACUUAAAAUGCAGUGGC
3087	3088	2180-2198	CCACUGCAUUUUGAAGUGA	UCACUUAAAAUGCAGUGG
3089	3090	2181-2199	CACUGCAUUUUGAAGUGAU	AUCACUUAAAAUGCAGUG
3091	3092	2182-2200	ACUGCAUUUUGAAGUGAUG	CAUCACUUAAAAUGCAGU
3093	3094	2183-2201	CUGCAUUUUGAAGUGAUGA	UCAUCACUUAAAAUGCAG
3095	3096	2184-2202	UGCAUUUUGAAGUGAUGAG	CUCAUCACUUAAAAUGCA
3097	3098	2185-2203	GCAUUUUGAAGUGAUGAGU	ACUCAUCACUUAAAAUGC
3099	3100	2186-2204	CAUUUUGAAGUGAUGAGUG	CACUCAUCACUUAAAAUG
3101	3102	2187-2205	AUUUUGAAGUGAUGAGUGA	UCACUCAUCACUUAAAAU
3103	3104	2188-2206	UUUUGAAGUGAUGAGUGAA	UUCACUCAUCACUUAAAA
3105	3106	2190-2208	UUGAAGUGAUGAGUGAAAG	CUUUCACUCAUCACUUCAA
3107	3108	2191-2209	UGAAGUGAUGAGUGAAAGA	UCUUUCACUCAUCACUUCA
3109	3110	2192-2210	GAAGUGAUGAGUGAAAGAG	CUCUUUCACUCAUCACUUC
3111	3112	2193-2211	AAGUGAUGAGUGAAAGAGA	UCUCUUUCACUCAUCACUU
3113	3114	2194-2212	AGUGAUGAGUGAAAGAGAG	CUCUCUUUCACUCAUCACU
3115	3116	2195-2213	GUGAUGAGUGAAAGAGAGA	UCUCUCUUUCACUCAUCAC
3117	3118	2196-2214	UGAUGAGUGAAAGAGAGAA	UUCUCUCUUUCACUCAUCA
3119	3120	2197-2215	GAUGAGUGAAAGAGAGAAAG	CUUCUCUCUUUCACUCAUC
3121	3122	2198-2216	AUGAGUGAAAGAGAGAAAGU	ACUUCUCUCUUUCACUCAU
3123	3124	2199-2217	UGAGUGAAAGAGAGAAAGUC	GACUUCUCUCUUUCACUCA
3125	3126	2200-2218	GAGUGAAAGAGAGAAAGUCC	GGACUUCUCUCUUUCACUC
3127	3128	2201-2219	AGUGAAAGAGAGAAAGUCCU	AGGACUUCUCUCUUUCACU

ES 2 640 260 T3

3129	3130	2202-2220	GUGAAAGAGAGAAGUCCUA	UAGGACUUCUCUCUUUCAC
3131	3132	2203-2221	UGAAAGAGAGAAGUCCUAU	AUAGGACUUCUCUCUUUCA
3133	3134	2204-2222	GAAAGAGAGAAGUCCUAUU	AAUAGGACUUCUCUCUUUC
3135	3136	2205-2223	AAAGAGAGAAGUCCUAUUU	AAAUAGGACUUCUCUCUUU
3137	3138	2206-2224	AAGAGAGAAGUCCUAUUUC	GAAAUAGGACUUCUCUCUU
3139	3140	2207-2225	AGAGAGAAGUCCUAUUUCU	AGAAAUAGGACUUCUCUCU
3141	3142	2208-2226	GAGAGAAGUCCUAUUUCUC	GAGAAAUAGGACUUCUCUC
3143	3144	2209-2227	AGAGAAGUCCUAUUUCUCA	UGAGAAAUAGGACUUCUCU
3145	3146	2210-2228	GAGAAGUCCUAUUUCUCAG	CUGAGAAAUAGGACUUCUC
3147	3148	2211-2229	AGAAGUCCUAUUUCUCAGG	CCUGAGAAAUAGGACUUCU
3149	3150	2212-2230	GAAGUCCUAUUUCUCAGGC	GCCUGAGAAAUAGGACUUC
3151	3152	2213-2231	AAGUCCUAUUUCUCAGGCU	AGCCUGAGAAAUAGGACUU
3153	3154	2214-2232	AGUCCUAUUUCUCAGGCUU	AAGCCUGAGAAAUAGGACU
3155	3156	2215-2233	GUCCUAUUUCUCAGGCUUG	CAAGCCUGAGAAAUAGGAC
3157	3158	2216-2234	UCCUAUUUCUCAGGCUUGA	UCAAGCCUGAGAAAUAGGA
3159	3160	2217-2235	CCUAUUUCUCAGGCUUGAG	CUCAAGCCUGAGAAAUAGG
3161	3162	2218-2236	CUAUUUCUCAGGCUUGAGC	GCUCAAGCCUGAGAAAUAG
3163	3164	2219-2237	UAUUUCUCAGGCUUGAGCA	UGCUCAAGCCUGAGAAUA
3165	3166	2220-2238	AUUUCUCAGGCUUGAGCAA	UUGCUCAAGCCUGAGAAU
3167	3168	2221-2239	UUUCUCAGGCUUGAGCAAG	CUUGCUCAAGCCUGAGAAA
3169	3170	2222-2240	UUCUCAGGCUUGAGCAAGU	ACUUGCUCAAGCCUGAGAA
3171	3172	2223-2241	UCUCAGGCUUGAGCAAGUU	AACUUGCUCAAGCCUGAGA
3173	3174	2224-2242	CUCAGGCUUGAGCAAGUUG	CAACUUGCUCAAGCCUGAG
3175	3176	2225-2243	UCAGGCUUGAGCAAGUUGG	CCAACUUGCUCAAGCCUGA
3177	3178	2226-2244	CAGGCUUGAGCAAGUUGGU	ACCAACUUGCUCAAGCCUG
3179	3180	2229-2247	GCUUGAGCAAGUUGGUAUC	GAUACCAACUUGCUCUAGC
3181	3182	2231-2249	UUGAGCAAGUUGGUAUCUG	CAGAUACCAACUUGCUCAA
3183	3184	2232-2250	UGAGCAAGUUGGUAUCUGC	GCAGAUACCAACUUGCUC
3185	3186	2233-2251	GAGCAAGUUGGUAUCUGCU	AGCAGAUACCAACUUGCUC
3187	3188	2234-2252	AGCAAGUUGGUAUCUGCUC	GAGCAGAUACCAACUUGCUC
3189	3190	2235-2253	GCAAGUUGGUAUCUGCUCA	UGAGCAGAUACCAACUUGC
3191	3192	2236-2254	CAAGUUGGUAUCUGCUCAG	CUGAGCAGAUACCAACUUG
3193	3194	2237-2255	AAGUUGGUAUCUGCUCAGG	CCUGAGCAGAUACCAACU
3195	3196	2238-2256	AGUUGGUAUCUGCUCAGGC	GCCUGAGCAGAUACCAACU
3197	3198	2239-2257	GUUGGUAUCUGCUCAGGCC	GGCCUGAGCAGAUACCAAC
3199	3200	2240-2258	UUGGUAUCUGCUCAGGCCU	AGGCCUGAGCAGAUACCAA
3201	3202	2241-2259	UGGUAUCUGCUCAGGCCUG	CAGGCCUGAGCAGAUACCA
3203	3204	2242-2260	GGUAUCUGCUCAGGCCUGA	UCAGGCCUGAGCAGAUACC
3205	3206	2243-2261	GUUCUGCUCAGGCCUGAG	CUCAGGCCUGAGCAGAUAC
3207	3208	2244-2262	UAUCUGCUCAGGCCUGAGC	GCUCAGGCCUGAGCAGAU
3209	3210	2245-2263	AUCUGCUCAGGCCUGAGCA	UGCUCAGGCCUGAGCAGAU
3211	3212	2246-2264	UCUGCUCAGGCCUGAGCAU	AUGCUCAGGCCUGAGCAGA
3213	3214	2247-2265	CUGCUCAGGCCUGAGCAUG	CAUGCUCAGGCCUGAGCAG
3215	3216	2248-2266	UGCUCAGGCCUGAGCAUGA	UCAUGCUCAGGCCUGAGCA
3217	3218	2249-2267	GCUCAGGCCUGAGCAUGAC	GUCAUGCUCAGGCCUGAGC
3219	3220	2250-2268	CUCAGGCCUGAGCAUGACC	GGUCAUGCUCAGGCCUGAG
3221	3222	2251-2269	UCAGGCCUGAGCAUGACCU	AGGUCAUGCUCAGGCCUGA
3223	3224	2252-2270	CAGGCCUGAGCAUGACCUC	GAGGUCAUGCUCAGGCCUG
3225	3226	2253-2271	AGGCCUGAGCAUGACCUCA	UGAGGUCAUGCUCAGGCCU
3227	3228	2279-2297	CACUUAACCCCAGGCCAUU	AAUGGCCUGGGGUUAAGUG
3229	3230	2280-2298	ACUUAACCCCAGGCCAUUA	UAAUGGCCUGGGGUUAAGU
3231	3232	2281-2299	CUUAACCCCAGGCCAUUAU	AUAAUGGCCUGGGGUUAAG
3233	3234	2282-2300	UUAACCCCAGGCCAUUAUC	GAUAAUGGCCUGGGGUUA
3235	3236	2283-2301	UAACCCCAGGCCAUUAUCA	UGAUAAUGGCCUGGGGUUA
3237	3238	2284-2302	AACCCCAGGCCAUUAUCAU	AUGAUAAUGGCCUGGGGUU
3239	3240	2285-2303	ACCCCAGGCCAUUAUCAUA	UAUGAUAAUGGCCUGGGGU
3241	3242	2287-2305	CCCAGGCCAUUAUCAUAUC	GAUUGAUAAUGGCCUGGG
3243	3244	2288-2306	CCAGGCCAUUAUCAUAUCC	GGAUUGAUAAUGGCCUGG
3245	3246	2289-2307	CAGGCCAUUAUCAUAUCCA	UGGAUUGAUAAUGGCCUG
3247	3248	2290-2308	AGGCCAUUAUCAUAUCCAG	CUGGAUUGAUAAUGGCCU
3249	3250	2291-2309	GGCCAUUAUCAUAUCCAGA	UCUGGAUUGAUAAUGGCC
3251	3252	2292-2310	GCCAUUAUCAUAUCCAGAU	AUCUGGAUUGAUAAUGGCC

ES 2 640 260 T3

3253	3254	2314-2332	CUUCAGAGUUGUCUUUAUA	UAUAAAGACAACUCUGAAG
3255	3256	2315-2333	UUCAGAGUUGUCUUUAUAU	AUAUAAAGACAACUCUGAA
3257	3258	2316-2334	UCAGAGUUGUCUUUAUAUG	CAUAUAAAGACAACUCUGA
3259	3260	2318-2336	AGAGUUGUCUUUAUAUGUG	CACAUUAAAGACAACUCUCU
3261	3262	2322-2340	UUGUCUUUAUAUGUGAAUU	AAUUCACAUUAAAGACAA
3263	3264	2323-2341	UGUCUUUAUAUGUGAAUUA	UAAUUCACAUUAAAGACA
3265	3266	2324-2342	GUCUUUAUAUGUGAAUUA	UUAUUUCACAUUAAAGAC
3267	3268	2325-2343	UCUUUAUAUGUGAAUUAAG	CUUAAUUCACAUUAAAGA
3269	3270	2326-2344	CUUUUAUAUGUGAAUUAAGU	ACUUAUUUCACAUUAAAG
3271	3272	2327-2345	UUUAUAUGUGAAUUAAGUU	AACUUAAUUCACAUUAAAA
3273	3274	2328-2346	UUAUAUGUGAAUUAAGUUA	UAACUUAAUUCACAUUAAA
3275	3276	2329-2347	UAUAUGUGAAUUAAGUUAU	AUAACUUAAUUCACAUUA
3277	3278	2330-2348	AUAUGUGAAUUAAGUUAUA	UAUAACUUAAUUCACAUAU
3279	3280	2331-2349	UAUGUGAAUUAAGUUAUAU	AUAUAACUUAAUUCACAU
3281	3282	2332-2350	AUGUGAAUUAAGUUAUAUU	AAUAUAACUUAAUUCACAU
3283	3284	2333-2351	UGUGAAUUAAGUUAUAUUA	UAAUAUAACUUAAUUCACA
3285	3286	2334-2352	GUGAAUUAAGUUAUAUUA	UUAUAUAACUUAAUUCAC
3287	3288	2335-2353	UGAAUUAAGUUAUAUUA	UUUAUAUAACUUAAUUC
3289	3290	2336-2354	GAAUUAAGUUAUAUUAUA	AUUUAUAUAACUUAAUUC
3291	3292	2337-2355	AAUUAAGUUAUAUUAUAUU	AAUUUAUAUAACUUAAUU
3293	3294	2338-2356	AUUAAGUUAUAUUAUAUUU	AAAUUAUAUAACUUAAU
3295	3296	2339-2357	UUAAGUUAUAUUAUAUUUU	AAAAUUAUAUAACUUAA
3297	3298	2340-2358	UAAGUUAUAUUAUAUUUUU	UAAAAUUAUAUAACUUA
3299	3300	2341-2359	AAGUUAUAUUAUAUUUUUA	UUAAAAUUAUAUAACUU
3301	3302	2342-2360	AGUUAUAUUAUAUUUUUAU	AUUAAAAUUAUAUAACU
3303	3304	2343-2361	GUUAUAUUAUAUUUUUAUC	GAUUAAAAUUAUAUAAC
3305	3306	2345-2363	UAUAUUAUAUAUUUAUCUA	UAGAUUAAAAUUAUAUA
3307	3308	2346-2364	AUAUUAUAUAUAUUUAUCUA	AUAGAUUAAAAUUAUAU
3309	3310	2347-2365	UAUUAUAUAUAUAUUUAUA	UAUAGAUUAAAAUUAUA
3311	3312	2348-2366	AUUUAUAUAUAUAUUUAUAG	CUAUAUAUAUAUAUAUA
3313	3314	2349-2367	UUAAAAUUAUAUAUUUAUAGU	ACUAUAUAUAUAUAUAUA
3315	3316	2350-2368	UAAAAUUAUAUAUUUAUAGUA	UACUAUAUAUAUAUAUA
3317	3318	2351-2369	AAAUUUUAUAUAUUUAUAGUAA	UUACUAUAUAUAUAUAUA
3319	3320	2354-2372	UUUUUAUAUAUAUUUAUAGUAAAA	UUUUUAUAUAUAUAUAUA
3321	3322	2355-2373	UUUAUAUAUAUAUUUAUAGUAAAAAC	GUUUUUUAUAUAUAUAUA
3323	3324	2356-2374	UUUAUAUAUAUAUUUAUAGUAAAAACA	UGUUUUUAUAUAUAUAUA
3325	3326	2357-2375	UAAUAUAUAUAUAUUUAUAGUAAAAACAU	AUGUUUUUAUAUAUAUA
3327	3328	2358-2376	AAUAUAUAUAUAUUUAUAGUAAAAACAU	UAUGUUUUUAUAUAUAUA
3329	3330	2359-2377	AUCUAUAUAUAUAUUUAUAGUAAAAACAUAG	CUAUGUUUUUAUAUAUAUA
3331	3332	2360-2378	UCUAUAUAUAUAUUUAUAGUAAAAACAUAGU	ACUAUGUUUUUAUAUAUAUA
3333	3334	2361-2379	CUAUAUAUAUAUAUUUAUAGUAAAAACAUAGUC	GACUAUGUUUUUAUAUAUAUA
3335	3336	2362-2380	UAUAUAUAUAUAUUUAUAGUAAAAACAUAGUCC	GGACUAUGUUUUUAUAUAUA
3337	3338	2363-2381	AUAUAUAUAUAUAUUUAUAGUAAAAACAUAGUCCU	AGGACUAUGUUUUUAUAUAUA
3339	3340	2364-2382	UAGUAUAUAUAUAUUUAUAGUAAAAACAUAGUCCUG	CAGGACUAUGUUUUUAUAUAUA
3341	3342	2365-2383	AGUAUAUAUAUAUUUAUAGUAAAAACAUAGUCCUGG	CCAGGACUAUGUUUUUAUAUAUA
3343	3344	2366-2384	GUUAUAUAUAUAUUUAUAGUAAAAACAUAGUCCUGGA	UCCAGGACUAUGUUUUUAUAUAUA
3345	3346	2367-2385	UAAAAUAUAUAUAUUUAUAGUAAAAACAUAGUCCUGGAA	UCCAGGACUAUGUUUUUAUAUAUA
3347	3348	2368-2386	AAAAUAUAUAUAUUUAUAGUAAAAACAUAGUCCUGGAAA	UUUCCAGGACUAUGUUUUUAUAUAUA
3349	3350	2369-2387	AAAUAUAUAUAUUUAUAGUAAAAACAUAGUCCUGGAAAAU	AUUUCCAGGACUAUGUUUUUAUAUAUA
3351	3352	2370-2388	AAUAUAUAUAUUUAUAGUAAAAACAUAGUCCUGGAAAAUA	UAUUUCCAGGACUAUGUUUUUAUAUAUA
3353	3354	2371-2389	AACAUAUAUAUUUAUAGUAAAAACAUAGUCCUGGAAAAUUA	UUUUUCCAGGACUAUGUUUUUAUAUAUA
3355	3356	2372-2390	ACAUAUAUAUUUAUAGUAAAAACAUAGUCCUGGAAAAUUAU	UUUAUUUCCAGGACUAUGUUUUUAUAUAUA
3357	3358	2373-2391	CAUAUAUAUUUAUAGUAAAAACAUAGUCCUGGAAAAUUAUA	AUUUAUUUCCAGGACUAUGUUUUUAUAUAUA
3359	3360	2374-2392	AUAUAUAUUUAUAGUAAAAACAUAGUCCUGGAAAAUUAUAU	AAUUUAUUUCCAGGACUAUGUUUUUAUAUAUA
3361	3362	2375-2393	UAGUUAUAUUUAUAGUAAAAACAUAGUCCUGGAAAAUUAUAUUC	GAAUUUAUUUCCAGGACUAUGUUUUUAUAUAUA
3363	3364	2377-2395	GUCCUGGAAAAUUAUAUUCUU	AAGAAUUUAUUUCCAGGACUAUGUUUUUAUAUAUA
3365	3366	2378-2396	UCCUGGAAAAUUAUAUUCUU	CAAGAAUUUAUUUCCAGGACUAUGUUUUUAUAUAUA

**Ejemplo 9. Supresión de precursores de porfirinas utilizando ARNip de ALAS1 en un paradigma de tratamiento agudo**

Se utilizó el modelo de ratón de AIP (remítase al Ejemplo 5) para investigar si el ARNip de ALAS1 funcionaría en un paradigma de tratamiento agudo para reducir los niveles ya elevados de ALA y PBG que estarían presentes, por

ejemplo, cuando un paciente humano con porfiria padece un ataque agudo. La administración del ARNip de la formulación LNP11 AD-53558 con una dosis de 1 mg/kg 12 horas después de la última dosis de fenobarbital redujo rápidamente los niveles de ALA y PBG en plasma de ratón, mientras que en los animales tratados con control de Luc los niveles siguieron subiendo (FIG. 14). Estos resultados indican que el ARNip de ALAS es eficaz a la hora de tratar un ataque agudo. El ARNip de ALAS1 fue eficaz a la hora de reducir y prevenir incrementos adicionales de los niveles de ALA y PBG.

#### **Ejemplo 10. ARNip que tienen ALAS1 como diana**

Se diseñaron y produjeron secuencias de ARNip modificadas y no modificadas adicionales que tenían como diana el ARNip de ALAS1, según se ha descrito en el Ejemplo 2. Se evaluó la actividad *in vitro* de los dúplex modificados según se describe a continuación.

#### **Métodos**

##### *Transfección mediada por lípidos*

Para Hep3B, PMH y hepatocitos de *Cynomolgus* primarios, la transfección se llevó a cabo añadiendo 14.8 µl de Opti-MEM más 0.2 µl de Lipofectamine RNAiMax por pocillo (Invitrogen, Carlsbad CA., número de catálogo 13778-150) a 5 µl de cada dúplex de ARNip en un pocillo individual en una placa de 96 pocillos. A continuación, la mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 20 minutos. A continuación, se añadieron 80 µl de medio de cultivo completo sin antibiótico que contenían el número adecuado de células a la mezcla de ARNip. Las células se incubaron durante 24 horas antes de la purificación del ARN.

Se llevaron a cabo experimentos de dosis única con una concentración final del dúplex de 1 µM, 500 nM, 20 nM, 10 nM y 0.2 nM para GalNAc modificado.

##### *Transfección de captación libre*

Hepatocitos de *Cynomolgus* primarios conservados criológicamente (Celsis In Vitro Technologies, M003055-P) se descongelaron a 37 °C en un baño de agua inmediatamente antes de su uso y se suspendieron de nuevo con una concentración de  $0.26 \times 10^6$  células/ml en medio InVitroGRO CP (para placas) (Celsis In Vitro Technologies, número de catálogo Z99029). Durante las transfecciones, las células se colocaron en una placa de colágeno de 96 pocillos BD BioCoat (BD, 356407) con una concentración de 25 000 células por pocillo y se incubaron a 37 °C en una atmósfera de un 5% de CO<sub>2</sub>. Se realizaron experimentos de captación libre añadiendo 10 µl de dúplex de ARNip en PBS por pocillo en una placa de 96 pocillos (96p). A continuación, se añadieron 90 µl de medio de cultivo completo que contenía el número adecuado de células para el tipo celular al ARNip. Las células se incubaron durante 24 horas antes de la purificación del ARN. Se llevaron a cabo experimentos de dosis única con una concentración final del dúplex de 1 µM, 500 nM, 20 nM y 10 nM.

##### *Aislamiento de ARN total utilizando el kit de aislamiento de ARNm DYNABEADS (Invitrogen, componente n.º: 610-12)*

Las células se recolectaron y lisaron en 150 µl de tampón de lisis/unión, a continuación se mezclaron durante 5 minutos a 850 rpm utilizando un instrumento Eppendorf Thermomixer (la velocidad de mezclado fue la misma a lo largo de todo el proceso). Se añadieron diez microlitros de microesferas magnéticas y 80 µl de mezcla de tampón de lisis/unión a una placa de fondo redondo y se mezclaron durante 1 minuto. Las microesferas magnéticas se capturaron utilizando un soporte magnético y se retiró el sobrenadante sin que se alteraran las microesferas. Después de retirar el sobrenadante, las células lisadas se añadieron a las microesferas remanentes y se mezclaron durante 5 minutos. Después de retirar el sobrenadante, las microesferas magnéticas se lavaron 2 veces con 150 µl de tampón de lavado A y se mezclaron durante 1 minuto. Las microesferas se capturaron de nuevo y se retiró el sobrenadante. A continuación, las microesferas se lavaron con 150 µl de tampón de lavado B, se capturaron y se retiró el sobrenadante. A continuación, las microesferas se lavaron con 150 µl de tampón de elución, se capturaron y se retiró el sobrenadante. Finalmente, se permitió que las microesferas se secaran durante 2 minutos. Después del secado, se añadieron 50 µl de tampón de elución y se mezclaron durante 5 minutos a 70 °C. Las microesferas se capturaron con un imán durante 5 minutos. Se retiraron 45 µl de sobrenadante y se añadieron a otra placa de 96 pocillos.

##### *Síntesis de ADNc utilizando el kit de transcripción inversa de ADNc de alta capacidad de ABI (Applied Biosystems, Foster City, CA, n.º de catálogo 4368813)*

Se preparó una mezcla patrón de 2 µl de 10X tampón, 0.8 µl de 25X dNTPs, 2 µl de cebadores aleatorios, 1 µl de transcriptasa inversa, 1 µl de inhibidor de RNasa y 3.2 µl de H<sub>2</sub>O por reacción. Se mezclaron volúmenes iguales de mezcla patrón y ARN para obtener un volumen final de 12 µl para las muestras cribadas *in vitro* o 20 µl para las muestras cribadas *in vivo*. El ADNc se generó utilizando un ciclador térmico Bio-Rad C-1000 o S-1000 (Hercules, CA) mediante los pasos siguientes: 25 °C durante 10 minutos, 37 °C durante 120 minutos, 85 °C durante 5 segundos y se mantiene a 4 °C.

PCR a tiempo real

Se añadieron 2 µl de ADNc a una mezcla patrón que contenía 2 µl de H<sub>2</sub>O, 0.5 µl de una sonda TaqMan de GAPDH (Life Technologies, número de catálogo 4326317E para células Hep3B, número de catálogo 352339E para hepatocitos de ratón primarios o una sonda adaptada para hepatocitos primarios de cinomólogo), 0.5 µl de una sonda TaqMan C5 (Life Technologies, número de catálogo Hs00167441\_m1 para células Hep3B o Mm00457879\_m1 para hepatocitos de ratón primarios o una sonda adaptada para hepatocitos primarios de cinomólogo) y 5 µl de una mezcla patrón para una sonda Lightcycler 480 (Roche, número de catálogo 04887301001) por pocillo en una placa de 384 pocillos (384 p) (Roche, número de catálogo 04887301001). Se llevó a cabo una PCR a tiempo real en un sistema de PCR a tiempo real Roche LC480 (Roche) utilizando el ensayo  $\Delta\Delta C_t$ (RQ). Para el cribado *in vitro*, cada dúplex se evaluó con dos réplicas biológicas, a menos que se indique de otro modo, y cada PCR a tiempo real se llevó a cabo en réplicas técnicas por duplicado. Para el cribado *in vivo*, cada dúplex se evaluó en uno o más experimentos (3 ratones por grupo) y cada PCR a tiempo real se llevó a cabo en réplicas técnicas por duplicado.

Para calcular el factor de cambio relativo en los niveles de ARNm de ALAS1, los datos a tiempo real se analizaron utilizando el método de  $\Delta\Delta C_t$  y se normalizaron respecto a los ensayos realizados con células transfectadas con AD-1955 10 nM o células transfectadas con vector vacío. Los valores de CI<sub>50</sub> se calcularon utilizando un modelo de ajuste de 4 parámetros empleando XLFit y se normalizaron respecto a células transfectadas con AD-1955 para el mismo intervalo de dosis o respecto a su propia dosis más baja.

Las secuencias sentido y antisentido de AD-1955 son:

SENTIDO: cuuAcGcuGAGuAcuucGAdTsdT (SEQ ID NO:3682)

ANTISENTIDO: UCGAAGuACUcAGCGuAAGdTsdT (SEQ ID NO:3683).

Las secuencias de los dúplex y de las hebras individuales de los ARNip modificados y no modificados se proporcionan en la Tabla 14 y la Tabla 15, respectivamente.

**Tabla 14: Secuencias de los dúplex y de las hebras individuales modificadas de ALAS1 humano**

SEQ ID NO: (sentido)	SEQ ID NO: (anti-sentido)	Nombre del dúplex	Secuencia sentido (5'-3')	Secuencia antisentido (5'-3')	Sitios diana de la secuencia antisentido en NM_000688.4
3371	3372	AD-58848	CfsasUfgCfcAfaAfAfAfUfgAfcAfuCfaUfL96	asUfsgAfuGfuCfcAfuuUfuGfgCfaUfgsAfc	1635-1657
3373	3374	AD-58849	AfsusUfuUfgAfaGfUfGfaUfgAfgUfgAfaAfl96	usUfsuCfaCfuCfaUfcacUfuCfaAfaAfuGfsc	2189-2211
3375	3376	AD-58850	AfsgsUfuAfuAfuUfAfAfaUfuUfuAfaUfcUfL96	asGfsaUfuAfaAfaUfuuaAfuAfaCfusUfsa	2344-2366
3377	3378	AD-58851	GfscsAfuUfuUfgAfAfGfuGfaUfgAfgUfgAfl96	usCfsaCfuCfaUfcAfcuuCfaAfaAfuGfcsAfg	2187-2209
3379	3380	AD-58852	GfsasAfcUfaAfuGfAfGfcAfgAfcAfuAfaCfl96	gsUfsuAfuGfuCfuGfcucAfuUfaGfuUfcsAfsu	1975-1997
3381	3382	AD-58853	AfsasUfgAfcCfaCfAfCfcUfaUfcGfaGfuUfL96	asAfsuUfcGfaUfaGfgugUfgGfuCfaUfscCfsu	973-995
3383	3384	AD-58854	UfsasAfaUfuUfuAfAfUfcUfaUfaGfuAfaAfl96	usUfsuAfcUfaUfaGfaUfaAfaUfuUfasAfsu	2352-2374
3385	3386	AD-58855	UfsusCfaGfuAfuGfAfUfcGfuUfuCfuUfgGfl96	csAfsaAfgAfaAfcGfaucAfuAfcUfgAfasAfsa	929-951
3387	3388	AD-58856	CfsasCfuUfuUfcAfGfUfaUfgAfuCfGfuUfL96	asAfsaCfGfuCfaUfacuGfaAfaAfgUfgsGfsa	924-946
3389	3390	AD-58857	AfsasAfuCfuGfuUfUfcCfcAfcUfuUfuCfaGfl96	csUfsgAfaAfaGfuGfgaaAfcAfgAfuUfscUfsg	913-935
3391	3392	AD-58858	CfsasUfuUfgAfaAfCfUfgUfcCfaUfuCfaAfl96	usUfsgAfaUfgGfaCfaguUfuCfaAfaUfgsCfsc	1478-1500
3393	3394	AD-58859	CfscsUfaUfcGfaGfUfUfuUfuAfaAfaCfuGfl96	csAfsuUfuUfuAfaAfaacUfcGfaUfaGfgsUfsg	983-1005
3395	3396	AD-58861	GfsasCfcAfgAfaAfGfAfgUfgUfcUfcAfuCfl96	gsAfsuGfaGfaCfaCfucuUfuCfuGfgUfcsUfsu	872-894
3397	3398	AD-58862	AfscsCfaGfaAfaGfAfGfuGfuCfuCfaUfcUfl96	asGfsaUfgAfgAfcAfcucUfuUfcUfgGfusCfsu	873-895

ES 2 640 260 T3

3399	3400	AD-58863	AfscsUfaAfuGfaGfCfAfgAfcAfuAfaCfaUfL96	asUfsgUfuAfuGfuCfugCufAfuUfaGfusUfsc	1977-1999
3401	3402	AD-58864	UfsasGfuAfaAfaAfCfAfuAfgUfcCfuGfgAfL96	usCfscAfgGfaCfuAfuguUfuUfuAfcUfasUfsa	2366-2388
3403	3404	AD-58865	UfsasUfuUfcUfgGfAfAfcUfaGfuAfaUfuUfL96	asAfsuUfuAfcUfaGfuucCfaGfaAfaUfasUfsu	1185-1207
3405	3406	AD-58867	UfsusCfuGfcAfaAfGfCfAfgUfcUfuGfaGfL96	csUfscAfaGfaCfuGfgcuUfuGfcAfgAfasGfsa	706-728
3407	3408	AD-58868	GfsasGfgAfaAfgAfGfGfuUfgCfuGfaAfaCfL96	gsUfsuUfcAfgCfaAfccuUfuUfcUfcsAfsc	759-781
3409	3410	AD-58869	GfsgsUfaCfuAfgAfAfaAfuUfuCfuGfgAfL96	usCfscAfgAfaAfuUuuCfuAfgUfaCfcsAfsc	1174-1196
3411	3412	AD-58870	GfsasCfaUfcAfuGfCfAfaAfaGfcAfaUfgAfL96	usCfsuUfuGfcUfuUfugCfuGfaUfgUfcsCfsu	853-875
3413	3414	AD-58871	AfsasAfuUfuUfaAfUfCfuAfuAfgUfaAfaAfL96	usUfsuUfaCfuAfuAfgauUfaAfaAfuUfasAfsa	2353-2375
3415	3416	AD-58873	CfsasUfgAfuCfcAfAfGfgGfaUfuCfgAfaAfL96	usUfsuCfgAfaUfcCfcuuGfgAfuCfaUfgsGfsa	1362-1384
3417	3418	AD-58874	AfsgsAfcCfaGfaAfAfGfaGfuGfuCfuCfaUfL96	asUfsgAfgAfcAfcUfcuuUfcUfgGfuCfusUfsu	871-893
3419	3420	AD-58875	AfsusCfcUfgAfaGfAfGfcGfcUfgAfgGfgAfL96	usCfscCfuCfaGfcGfcucUfuCfaGfgAfusCfsc	1810-1832
3421	3422	AD-58876	GfsusCfuGfuGfaUfGfAfaCfuAfaUfgAfgCfL96	gsCfsuCfaUfuAfgUfucaUfcAfcAfgAfcUfsu	1966-1988
3423	3424	AD-58877	CfsasGfaAfaGfaGfUfGfuCfuCfaUfcUfuCfL96	gsAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcUfuUfcUfsgsGfsu	875-897
3425	3426	AD-58878	AfscsUfuUfuCfaGfUfAfuGfaUfcGfuUfuCfL96	gsAfsaAfcGfaUfcAfuacUfgAfaAfaGfusGfsg	925-947
3427	3428	AD-58879	UfscsAfuGfcCfaAfAfaUfgGfaCfaUfcAfL96	usGfsaUfgUfcCfaUfuuuUfgGfcAfuGfasCfsu	1634-1656
3429	3430	AD-58880	AfsasUfaUfuUfcUfGfGfaAfcUfaGfuAfaAfL96	usUfsuAfcUfaGfuUfccaGfaAfaUfaUfusUfsc	1183-1205
3431	3432	AD-58881	CfsusUfcUfuCfaAfGfAfaAfaCfuUfgCfaAfL96	usGfsgCfaAfgUfuAfcuuUfgAfaGfaAfgsAfsu	892-914
3433	3434	AD-58882	UfsusUfcAfgUfaUfGfAfuCfuUfuUfuUfuUfL96	asAfsaGfaAfaCfgAfucaUfaCfuGfaAfasAfg	928-950
3435	3436	AD-58883	CfscsCfaGfuGfuGfGfUfuAfgUfgUfgAfaAfL96	usUfsuCfaCfaCfuAfaccAfcAfcUfgGfgsGfsc	790-812
3437	3438	AD-58884	GfscsUfgUfgAfgAfUfUfuAfcUfcUfgAfuUfL96	asAfsuCfaGfaGfuAfaaCfuCfaCfaGfcsCfsu	1325-1347
3439	3440	AD-58885	AfsgsGfcUfuGfaGfCfAfaGfuUfgGfuAfaUfL96	gsAfsuAfcCfaAfcUfugCufAfaGfcCfusGfsa	2229-2251
3441	3442	AD-58886	GfsasAfaGfaGfuGfUfCfuCfaUfcUfuCfuUfL96	asAfgAfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsUfsg	877-899
3443	3444	AD-58887	AfsusUfuCfuGfgAfAfcUfuAfgUfaAfaUfuCfL96	gsAfsaUfuUfaCfuAfguuCfcAfgAfaAfusAfsu	1186-1208
3445	3446	AD-58888	UfsgsUfgAfuGfuGfGfCfcCfaUfgAfgUfuUfL96	asAfsaCfuCfaUfgGfgccAfcAfuCfaCfasCfsa	1531-1553
3447	3448	AD-58889	AfsasGfaGfaGfaAfGfUfcCfuAfuUfuCfuUfL96	gsAfgAfaAfuAfgGfacuUfcUfcUfcUfusUfsc	2208-2230
3449	3450	AD-58890	UfsgsGfcAfgCfaCfAfGfaUfgAfaUfcAfgAfL96	usCfsuGfaUfuCfaUfcugUfgCfuGfcCfasGfsg	671-693
3451	3452	AD-58891	AfsusGfaUfcGfuUfUfCfuUfuGfaGfaAfaAfL96	usUfsuUfcUfcAfaAfgaaAfcGfaUfcAfusAfcsc	935-957
3453	3454	AD-58892	UfscsUfgGfaAfcUfAfGfuAfaAfuUfcCfaUfL96	asUfsgGfaAfuUfuAfcuaGfuUfcCfaGfasAfsa	1189-1211
3455	3456	AD-59095	GfscsCfcAfuUfcUfUfAfuCfcCfGfAfgUfL96	asCfsuCfGfGfAfuAfagaAfuGfgsgsc	360-382
3457	3458	AD-59096	GfsgsAfaCfcAfuGfCfCfuCfcAfuGfaUfL96	asUfscAfuGfgAfgGfcauGfgUfuscs	1347-1369
3459	3460	AD-59097	UfsgsGfaGfuCfuGfUfGfcGfgAfuCfuUfL96	asGfsgAfuCfcGfcAfcagAfcUfscscsa	1794-1816
3461	3462	AD-59098	CfsasCfcCfaCfGfGfUfgUfgUfgGfgAfaUfL96	usCfscCfaCfaCfaCfccgUfgGfgsusg	1112-1134

ES 2 640 260 T3

3463	3464	AD-59099	GfsgsAfgUfcUfgUfGfCfGfGfaUfcCfuAfL96	usAfsGfGfaUfcCfGfCfacaGfaCfuscs	1795-1817
3465	3466	AD-59100	CfsasAfaAfcUfgCfCfCfCfaGfaUfgAfL96	usCfsaUfcUfuGfgGfgcaGfuUfusug	428-450
3467	3468	AD-59101	GfscsCfuCfcAfuGfAfUfcCfaAfgGfgAfL96	usCfscCfuUfgGfaUfcuGfgAfgsgsc	1355-1377
3469	3470	AD-59102	CfsasUfcAfuCfcCfUfGfuGfcGfgGfuUfL96	asAfsCfcCfcGfcAfcAfgggAfuGfasug	1921-1943
3471	3472	AD-59103	AfscsCfcAfcGfgGfUfGfuGfuGfgGfgAfL96	usCfscCfcAfcAfcAfcAfcGfuGfgsgsu	1113-1135
3473	3474	AD-59104	CfsasCfaUfcAfuCfCfCfuGfuGfcGfgAfL96	usCfscGfcAfcAfgGfgauGfaUfgsusg	1919-1941
3475	3476	AD-59105	CfsasGfaAfaGfaGfUfGfuCfuCfaUfcUfL96	asGfsaUfgAfgAfcAfcucUfuUfcsusg	873-895
3477	3478	AD-59106	CfscsUfcCfaUfgAfUfCfCfaGfgGfaUfL96	asUfscCfcUfuGfgAfucaUfgGfasgsg	1356-1378
3479	3480	AD-59107	UfsgsCfcCfaUfuCfUfUfaUfcCfcGfaAfL96	usUfscGfgGfaUfaAfgaaUfgGfgscsa	359-381
3481	3482	AD-59108	CfsusUfcAfcCfcUfGfGfcUfaAfgAfuAfL96	usAfsuCfuUfaGfcCfaggGfuGfasasg	1297-1319
3483	3484	AD-59109	AfsusCfaUfcCfcUfGfUfgCfGfgUfuAfL96	usAfsaCfcCfGfCfaCfaggGfaUfgsasg	1922-1944
3485	3486	AD-59110	AfsgsAfaAfgAfgUfGfUfcUfcAfuCfuUfL96	asAfsGfAfuGfaGfaCfacuCfuUfuscsu	874-896
3487	3488	AD-59111	CfsusCfcAfuGfaUfCfCfaAfgGfgAfuUfL96	asAfsuCfcCfuUfgGfaucAfuGfgsasg	1357-1379
3489	3490	AD-59112	CfscsAfuUfcUfuAfUfCfCfGfgAfgUfcAfL96	usGfsaCfuCfGfgAfuuaGfaAfusgsgg	362-384
3491	3492	AD-59113	CfsasCfcCfuGfgCfUfAfaGfaUfgAfuAfL96	usAfsuCfaUfcUfuAfgccAfgGfgsusg	1300-1322
3493	3494	AD-59114	UfscsAfuCfcCfuGfUfGfcGfgGfuUfgAfL96	usCfsaAfcCfcGfcAfcagGfgAfusgsa	1923-1945
3495	3496	AD-59115	AfsasGfaGfuGfuCfUfCfaUfcUfuCfuUfL96	asAfsGfAfaGfaUfgAfgacAfcUfcsusu	877-899
3497	3498	AD-59116	GfsusCfaUfgCfcAfAfAfaAfuGfgAfcAfL96	usGfsuCfcAfuUfuUfuggCfaUfgsasg	1631-1653
3499	3500	AD-59117	CfsasUfuCfuUfaUfCfCfCfGfaGfuCfcAfL96	usGfsgAfcUfcGfgGfauaAfgAfasusg	363-385
3501	3502	AD-59118	AfscsCfcUfgGfcUfAfAfgAfuGfaUfgAfL96	usCfsaUfcAfuCfuUfagcCfaGfgsgsu	1301-1323
3503	3504	AD-59119	CfsusCfuUfcAfcCfCfUfgGfcUfaAfgAfL96	usCfsuUfaGfcCfaGfgguGfaAfgsasg	1295-1317
3505	3506	AD-59120	AfsusGfcCfaAfaAfAfUfgGfaCfaUfcAfL96	usGfsaUfgUfcCfaUfuuuUfgGfcsasg	1634-1656
3507	3508	AD-59121	UfsgsCfcCfcAfaGfAfUfgAfuGfgAfuUfL96	asUfscCfcAfuCfaUfcuuGfgGfgscsa	434-456
3509	3510	AD-59122	GfsasAfcCfaUfgCfCfUfcCfaUfgAfuAfL96	usAfsuCfaUfgGfaGfgcaUfgGfususc	1348-1370
3511	3512	AD-59123	UfscsUfuCfaCfcCfUfGfgCfuAfaGfaUfL96	asUfscUfuAfgCfcAfgggUfgAfasgsa	1296-1318
3513	3514	AD-59124	UfsgsCfcAfaAfaAfUfGfgAfcAfuCfaUfL96	asUfsgAfuGfuCfcAfuuuUfuGfgscsa	1635-1657
3515	3516	AD-59125	CfscsAfgAfaAfgAfGfUfgUfcUfcAfuAfL96	usAfsuGfaGfaCfaCfucuUfuCfusgsgg	872-894
3517	3518	AD-59126	GfsasAfaCfuGfuCfCfAfuUfcAfaUfgAfL96	usCfsaUfuGfaAfuGfgacAfgUfususc	1481-1503
3519	3520	AD-59127	UfscsAfcCfcUfgGfCfUfaAfgAfuGfaUfL96	asUfscAfuCfuUfaGfccaGfgGfusgsga	1299-1321
3521	3522	AD-59128	CfscsCfuGfgAfgUfCfUfgUfgCfGfaUfL96	asUfscCfGfCfaCfaGfacuCfcAfgsgsgg	1791-1813
3523	3524	AD-59129	GfsasAfaGfaGfuGfUfCfuCfaUfcUfuAfL96	usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcUfususc	875-897
3525	3526	AD-59130	UfsgsGfaGfcCfcUfGfGfaGfuCfuGfuAfL96	usAfsCfAfgAfcUfcCfaggGfcUfcscsa	1786-1808

**Tabla 15: Secuencias de los dúplex y de las hebras individuales no modificadas de ALAS1 humano**

SEQ ID NO: (sentido)	SEQ ID NO: (anti-sentido)	Nombre del dúplex	Secuencia sentido (5'-3')	Secuencia antisentido (5'-3')	Sitios diana de la secuencia antisentido en NM_000688.4
3684	3527	AD-58848	CAUGCCAAAAAUGGACAUCAU	AUGAUGUCCAUUUUUGGCAUGAC	1635-1657
3528	3529	AD-58849	AUUUUGAAGUGAUGAGUGAAA	UUUCACUCAUCACUUCAAAAUGC	2189-2211
3530	3531	AD-58850	AGUUUAUUAAAAUUUAUCU	AGAUUAAAAUUUAUAUAACUUA	2344-2366
3532	3533	AD-58851	GCAUUUUGAAGUGAUGAGUGA	UCACUCAUCACUUCAAAAUGCAG	2187-2209
3534	3535	AD-58852	GAACUAAUGAGCAGACAUAAC	GUUAUGUCUGCUCAUUAGUUCAU	1975-1997
3536	3537	AD-58853	AAUGACCACACCUAUCGAGUU	AACUCGAUAGGUGUGGUCAUUCU	973-995
3538	3539	AD-58854	UAAUUUUUAAUCUAUGUAAA	UUUACUAUAGAUUAAAAUUUAAU	2352-2374
3540	3541	AD-58855	UUCAGUAUGAUCGUUUCUUUG	CAAAGAAACGAUCAUACUGAAAA	929-951
3542	3543	AD-58856	CACUUUUCAGUAUGAUCGUUU	AAACGAUCAUACUGAAAAGUGGA	924-946
3544	3545	AD-58857	AAAUCUGUUUCCACUUUUCAG	CUGAAAAGUGGAAACAGAUUUUG	913-935
3546	3547	AD-58858	CAUUUGAAACUGUCCAUAUCA	UUGAAUGGACAGUUUCAAAUGCC	1478-1500
3548	3549	AD-58859	CCUAUCGAGUUUUUAAAACUG	CAGUUUUAAAACUCGAUAGGUG	983-1005
3550	3551	AD-58861	GACCAGAAAGAGUGUCUCAUC	GAUGAGACACUCUUUCUGGUCUU	872-894
3552	3553	AD-58862	ACCAGAAAGAGUGUCUCAUCU	AGAUGAGACACUCUUUCUGGUCU	873-895
3554	3555	AD-58863	ACUAAUGAGCAGACAUACAUC	AUGUUUUGUCUGCUCAUUAGUUC	1977-1999
3556	3557	AD-58864	UAGUAAAACAUAAGUCCUGGA	UCCAGGACUAUGUUUUUACUAUA	2366-2388
3558	3559	AD-58865	UAUUUCUGGAACUAGUAAAUU	AAUUUACUAGUCCAGAAAUAUU	1185-1207
3560	3561	AD-58867	UUCUGCAAAGCCAGUCUUGAG	CUCAAGACUGGCUUUGCAGAAGA	706-728
3562	3563	AD-58868	GAGGAAAGAGGUUGCUGAAAC	GUUUCAGCAACCUCUUUCUCAC	759-781
3564	3565	AD-58869	GGUACUAGAAAUAUUUCUGGA	UCCAGAAAUAUUUCUAGUACCAC	1174-1196
3566	3567	AD-58870	GACAUCAUGCAAAAAGCAAAGA	UCUUUGCUUUUGCAUGAUGUCCU	853-875
3568	3569	AD-58871	AAAUUUUAAUCUAUAGUAAAA	UUUUACUAUAGAUUAAAAUUUAA	2353-2375
3570	3571	AD-58873	CAUGAUCCAAGGGAUUCGAAA	UUUCGAAUCCCUUGGAUCAUGGA	1362-1384
3572	3573	AD-58874	AGACCAGAAAGAGUGUCUCAU	AUGAGACACUCUUUCUGGUCUUU	871-893
3574	3575	AD-58875	AUCCUGAAGAGCGCUGAGGGA	UCCUCAGCGCUCUUCAGGAUCC	1810-1832
3576	3577	AD-58876	GUCUGUGAUGAACUAUUGAGC	GCUCAUUAGUUCAUCACAGACUU	1966-1988
3578	3579	AD-58877	CAGAAAGAGUGUCUCAUCUUC	GAAGAUGAGACACUCUUUCUGGU	875-897
3580	3581	AD-58878	ACUUUUCAGUAUGAUCGUUUC	GAAACGAUCAUACUGAAAAGUGG	925-947
3582	3583	AD-58879	UCAUGCCAAAAAUGGACAUCA	UGAUGUCCAUUUUUGGCAUGACU	1634-1656
3584	3585	AD-58880	AAUAUUUCUGGAACUAGUAAA	UUUACUAGUCCAGAAAUAUUUC	1183-1205
3586	3587	AD-58881	CUUCUUAAGAUACUUGCCA	UGGCAAGUUAUCUUGAAGAAGAU	892-914
3588	3589	AD-58882	UUUCAGUAUGAUCGUUUCUUU	AAAGAAACGAUCAUACUGAAAAG	928-950
3590	3591	AD-58883	CCCAGUGUGGUUAGUGUGAAA	UUUCACACUAACCACACUGGGGC	790-812
3592	3593	AD-58884	GCUGUGAGAUUUACUCUGAUU	AAUCAGAGUAAAUCUCACAGCCU	1325-1347
3594	3595	AD-58885	AGGCUUGAGCAAGUUGGUAUC	GAUACCAACUUGCUCUAGCCUGA	2229-2251

ES 2 640 260 T3

3596	3597	AD-58886	GAAAGAGUGUCUCAUCUUCUU	AAGAAGAUGAGACACUCUUCUG	877-899
			AUUUCUGGAAACUAGUAAAUUC	GAAUUUACUAGUCCAGAAAUAU	1186-1208
3598	3599	AD-58887			
			UGUGAUGUGGCCCAUGAGUUU	AAACUCAUGGGCCACAUCACACA	1531-1553
3600	3601	AD-58888			
			AAGAGAGAAGUCCUAAUUUCUC	GAGAAAUAGGACUUCUCUCUUUC	2208-2230
3602	3603	AD-58889			
			UGGCAGCACAGAUGAAUCAGA	UCUGAUUCAUCUGUGCUGCCAGG	671-693
3604	3605	AD-58890			
			AUGAUCGUUUCUUUGAGAAAA	UUUUCUCAAAAGAAACGAUCAUAC	935-957
3606	3607	AD-58891			
			UCUGGAACUAGUAAAUUCCAU	AUGGAUUUACUAGUUCAGAAA	1189-1211
3608	3609	AD-58892			
			GCCCAUUCUUAUCCCGAGU	ACUCGGGAUAAGAAUGGGC	360-382
3610	3611	AD-59095			
			GGAACCAUGCCUCAUGAU	AUCAUGGAGGCAUGGUUCC	1347-1369
3612	3613	AD-59096			
			UGGAGUCUGUGCGGAUCCU	AGGAUCCGCACAGACUCCA	1794-1816
3614	3615	AD-59097			
			CACCCACGGGUGUGUGGGA	UCCACACACCCGUGGGUG	1112-1134
3616	3617	AD-59098			
			GGAGUCUGUGCGGAUCCUA	UAGGAUCCGCACAGAUCC	1795-1817
3618	3619	AD-59099			
			CAAACUGCCCAAGAUGA	UCAUCUUGGGGCAGUUUUG	428-450
3620	3621	AD-59100			
			GCCUCAUGAUCCAAGGGA	UCCCUUGGAUCAUGGAGGC	1355-1377
3622	3623	AD-59101			
			CAUCAUCCUGUGCGGGUU	AACCCGCACAGGGAUGAUG	1921-1943
3624	3625	AD-59102			
			ACCACGGGUGUGUGGGA	UCCCCACACACCCGUGGGU	1113-1135
3626	3627	AD-59103			
			CACAUCAUCCUGUGCGGA	UCCGCACAGGGAUGAUGUG	1919-1941
3628	3629	AD-59104			
			CAGAAAGAGUGUCUCAUCU	AGAUGAGACACUCUUCUG	873-895
3630	3631	AD-59105			
			CCUCAUGAUCCAAGGGAU	AUCCCUUGGAUCAUGGAGG	1356-1378
3632	3633	AD-59106			
			UGCCCAUUCUUAUCCCGAA	UUCGGGAUAAGAAUGGGCA	359-381
3634	3635	AD-59107			
			CUUCACCCUGGCUAAGAU	UAUCUUAGCCAGGGUGAAG	1297-1319
3636	3637	AD-59108			
			AUCAUCCUGUGCGGGUUA	UAACCCGCACAGGGAUGAU	1922-1944
3638	3639	AD-59109			
			AGAAAGAGUGUCUCAUCUU	AAGAUGAGACACUCUUCU	874-896
3640	3641	AD-59110			
			CUCCAUGAUCCAAGGGAU	AAUCCCUUGGAUCAUGGAG	1357-1379
3642	3643	AD-59111			
			CCAUCUUAUCCCGAGUCA	UGACUCGGGAUAAGAAUGG	362-384
3644	3645	AD-59112			
			CACCCUGGCUAAGAUGAU	UAUCAUCUUAGCCAGGGUG	1300-1322
3646	3647	AD-59113			
			UCAUCCUGUGCGGGUUGA	UCAACCCGCACAGGGAUGA	1923-1945
3648	3649	AD-59114			
			AAGAGUGUCUCAUCUUCUU	AAGAAGAUGAGACACUCUU	877-899
3650	3651	AD-59115			
			GUCAUGCCAAAAUGGACA	UGUCCAUUUUUGGAUGAC	1631-1653
3652	3653	AD-59116			
			CAUUCUUAUCCCGAGUCCA	UGGACUCGGGAUAAGAAUG	363-385
3654	3655	AD-59117			
			ACCCUGGCUAAGAUGAUGA	UCAUCAUCUUAGCCAGGGU	1301-1323
3656	3657	AD-59118			
			CUCUUCACCCUGGCUAAGA	UCUUAGCCAGGGUGAAGAG	1295-1317
3658	3659	AD-59119			
			AUGCCAAAAUGGACAUCA	UGAUGUCCAUUUUUGGCAU	1634-1656
3660	3661	AD-59120			
			UGCCCAAGAUGAUGGAAU	AUUCCAUCAUCUUGGGGCA	434-456
3662	3663	AD-59121			
			GAACCAUGCCUCAUGAU	UAUCAUGGAGGCAUGGUUC	1348-1370
3664	3665	AD-59122			
			UCUUCACCCUGGCUAAGAU	AUCUUAGCCAGGGUGAAGA	1296-1318
3666	3667	AD-59123			
			UGCCAAAAUGGACAUCAU	AUGAUGUCCAUUUUUGGCA	1635-1657
3668	3669	AD-59124			
			CCAGAAAGAGUGUCUCAUA	UAUGAGACACUCUUCUGG	872-894
3670	3671	AD-59125			

ES 2 640 260 T3

3672	3673	AD-59126	GAAACUGUCCAUUCAUGA	UCAUUGAAUGGACAGUUUC	1481-1503
3674	3675	AD-59127	UCACCCUGGCUAAGAUGAU	AUCAUCUUAGCCAGGGUGA	1299-1321
3676	3677	AD-59128	CCCUGGAGUCUGUGCGGAU	AUCCGCACAGACUCCAGGG	1791-1813
3678	3679	AD-59129	GAAAGAGUGUCUCAUCUUA	UAAGAUGAGACACUCUUUC	875-897
3680	3681	AD-59130	UGGAGCCCUGGAGUCUGUA	UACAGACUCCAGGGCUCCA	1786-1808

En la Tabla 16 se proporcionan los resultados de los ensayos *in vitro*. La Tabla 16 también indica las especies diana de cada uno de los ARNip.

**Tabla 16: Resultados de los ensayos funcionales**

ID del dúplex	Especies diana	Tipo	Captación libre en cino.				Transfección en cino.		Transfección en Hep3b	
			1 $\mu$ M, media	500 nM	20 nM, media	10 nM	20 nM, media	0.2 nM, media	10 nM, media	0.1 nM, media
AD-58848	Ratón/Rata/Rh/H	21/23	131.6	176.0	104.4	128.0	43.5	44.8	25.3	76.8
AD-58849	H/Rh	21/23	91.9	88.1	92.2	105.0	29.4	35.4	11.5	47.1
AD-58850	H/Rh	21/23	79.4	103.4	80.0	111.2	NA	62.2	31.3	72.0
AD-58851	H/Rh	21/23	99.7	74.7	94.8	104.7	NA	40.7	8.6	81.3
AD-58852	H/Rh	21/23	108.1	91.8	103.3	111.9	101.1	128.8	43.4	129.0
AD-58853	H/Rh	21/23	74.8	67.7	84.2	93.5	24.7	52.9	14.1	61.2
AD-58854	H/Rh	21/23	145.9	124.1	106.6	115.3	119.0	83.9	85.0	84.0
AD-58855	H/Rh	21/23	81.5	97.9	92.7	101.8	39.5	40.3	15.3	67.6
AD-58856	H/Rh	21/23	74.1	90.6	84.6	82.6	22.4	30.7	8.7	33.3
AD-58857	H/Rh	21/23	64.7	91.4	62.3	87.1	22.0	31.6	9.8	106.3
AD-58858	H/Rh	21/23	67.4	91.7	68.6	98.3	27.9	40.3	17.4	44.8
AD-58859	H/Rh	21/23	71.2	77.2	92.4	90.1	19.1	34.3	13.1	39.7
AD-58861	H/Rh	21/23	104.6	107.2	102.0	100.6	25.9	35.1	18.0	69.8
AD-58862	H/Rh	21/23	66.8	77.0	68.7	88.5	20.3	31.1	24.2	49.9
AD-58863	H/Rh	21/23	70.8	66.8	76.8	98.5	21.5	29.7	8.7	54.9
AD-58864	H/Rh	21/23	76.2	85.6	83.7	100.8	60.4	61.0	56.4	87.3
AD-58865	H/Rh	21/23	67.9	77.9	95.9	98.4	21.3	38.6	15.5	81.4
AD-58867	H/Rh	21/23	95.9	93.3	107.0	97.5	32.3	42.7	16.6	79.8
AD-58868	H/Rh	21/23	95.2	92.1	116.2	94.7	54.6	69.2	61.5	105.9
AD-58869	H/Rh	21/23	65.0	78.2	75.8	88.2	17.4	25.0	13.0	63.9
AD-58870	H/Rh	21/23	69.4	92.3	81.0	88.1	29.2	43.8	33.7	79.1
AD-58871	H/Rh	21/23	61.2	77.3	88.2	77.0	71.2	73.2	36.7	110.3
AD-58873	H/Rh	21/23	95.2	100.9	83.3	94.6	54.2	52.8	36.6	73.3
AD-58874	H/Rh	21/23	75.8	76.8	63.8	85.3	22.3	31.2	15.0	38.2
AD-58875	H/Rh	21/23	80.7	88.7	78.6	97.9	48.6	73.6	61.2	90.6
AD-58876	H/Rh	21/23	90.8	93.1	82.5	100.2	41.1	56.9	21.2	58.7
AD-58877	H/Rh	21/23	68.3	85.1	51.2	78.7	18.5	46.6	11.9	27.4
AD-58878	H/Rh	21/23	78.3	68.3	81.2	91.2	24.1	23.4	6.2	37.1
AD-58879	H/Rh	21/23	87.9	94.1	79.7	95.4	32.0	47.8	15.7	82.5
AD-58880	H/Rh	21/23	74.9	72.2	88.9	88.1	20.1	27.5	14.0	60.7
AD-58881	H/Rh	21/23	85.9	76.8	78.8	118.0	22.2	36.7	27.6	71.6
AD-58882	H/Rh	21/23	54.1	53.4	60.3	85.8	14.6	27.2	8.2	23.8
AD-58883	H/Rh	21/23	80.4	69.9	75.7	80.3	31.8	25.8	12.3	63.0
AD-58884	H/Rh	21/23	57.7	55.3	64.8	78.2	20.0	30.0	11.8	68.9
AD-58885	H/Rh	21/23	101.8	91.8	104.1	101.5	85.9	71.9	61.8	71.2
AD-58886	Ratón/Rata/Rh/H	21/23	47.1	58.0	36.3	93.3	16.0	26.6	9.2	32.0
AD-58887	H/Rh	21/23	73.6	98.7	82.6	95.2	28.5	33.5	12.8	65.2
AD-58888	H/Rh	21/23	90.2	69.9	69.4	85.6	46.9	45.0	16.6	72.0
AD-58889	H/Rh	21/23	83.6	98.6	82.4	92.2	36.5	40.3	31.6	99.4
AD-58890	H/Rh	21/23	69.5	95.4	84.2	88.2	50.8	45.6	21.7	92.9
AD-58891	H/Rh	21/23	62.8	75.7	75.4	109.2	23.6	34.3	15.6	55.8
AD-58892	H/Rh	21/23	60.2	92.9	89.8	92.9	22.8	43.3	20.2	75.6
AD-59095	Ratón/Rata/Rh/H	nonadecámero	88.9	NA	132.8	NA	48.3	97.4	54.3	99.0
AD-59096	Ratón/Rata/Rh/H	nonadecámero	95.5	NA	90.5	NA	105.7	138.6	131.4	120.7

AD-59097	Ratón/Rata/Rh/H	nonadecámara	92.5	NA	84.2	NA	75.0	NA	94.7	108.5
AD-59098	Ratón/Rata/Rh/H	nonadecámara	84.0	NA	87.7	NA	109.3	NA	130.0	87.3
AD-59099	Ratón/Rata/Rh/H	nonadecámara	89.7	NA	90.0	NA	77.8	85.4	46.8	74.9
AD-59100	Ratón/Rata/Rh/H	nonadecámara	84.8	NA	144.3	NA	70.6	108.1	91.5	117.6
AD-59101	Ratón/Rata/Rh/H	nonadecámara	79.0	NA	103.8	NA	89.8	102.9	124.2	107.0
AD-59102	Ratón/Rata/Rh/H	nonadecámara	85.9	NA	100.6	NA	72.2	68.5	87.9	95.1
AD-59103	Ratón/Rata/Rh/H	nonadecámara	86.0	NA	91.1	NA	93.0	81.3	130.0	96.0
AD-59104	Ratón/Rata/Rh/H	nonadecámara	92.6	NA	96.9	NA	94.9	91.4	124.4	83.1
AD-59105	Ratón/Rata/Rh/H	nonadecámara	48.9	NA	101.7	NA	18.4	48.9	17.0	34.7
AD-59106	Ratón/Rata/Rh/H	nonadecámara	63.2	NA	76.7	NA	28.5	40.7	28.6	46.4
AD-59107	Ratón/Rata/Rh/H	nonadecámara	71.4	NA	68.7	NA	37.1	45.3	26.8	63.6
AD-59108	Ratón/Rata/Rh/H	nonadecámara	70.7	NA	85.1	NA	89.9	84.8	139.2	101.7
AD-59109	Ratón/Rata/Rh/H	nonadecámara	86.1	NA	83.4	NA	84.9	96.2	131.7	86.7
AD-59110	Ratón/Rata/Rh/H	nonadecámara	70.8	NA	119.7	NA	38.5	60.4	67.4	80.3
AD-59111	Ratón/Rata/Rh/H	nonadecámara	66.1	NA	76.5	NA	52.2	61.0	69.7	87.6
AD-59112	Ratón/Rata/Rh/H	nonadecámara	71.2	NA	80.2	NA	91.2	83.4	127.4	89.0
AD-59113	Ratón/Rata/Rh/H	nonadecámara	67.0	NA	77.8	NA	49.1	59.0	66.8	91.4
AD-59114	Ratón/Rata/Rh/H	nonadecámara	81.7	NA	79.3	NA	96.3	88.0	129.6	72.4
AD-59115	Ratón/Rata/Rh/H	nonadecámara	40.4	NA	69.6	NA	19.6	35.7	9.3	16.9
AD-59116	Ratón/Rata/Rh/H	nonadecámara	72.2	NA	78.3	NA	53.5	77.8	70.1	107.8
AD-59117	Ratón/Rata/Rh/H	nonadecámara	70.7	NA	75.6	NA	75.8	74.9	129.0	103.5
AD-59118	Ratón/Rata/Rh/H	nonadecámara	68.8	NA	75.9	NA	81.4	82.1	114.1	89.7
AD-59119	Ratón/Rata/Rh/H	nonadecámara	64.9	NA	86.5	NA	85.1	125.1	122.8	124.8
AD-59120	Ratón/Rata/Rh/H	nonadecámara	63.5	NA	75.1	NA	29.9	52.0	16.1	54.1
AD-59121	Ratón/Rata/Rh/H	nonadecámara	67.6	NA	72.0	NA	88.8	77.4	108.0	103.1
AD-59122	Ratón/Rata/Rh/H	nonadecámara	60.2	NA	62.3	NA	25.1	45.3	16.2	54.8
AD-59123	Ratón/Rata/Rh/H	nonadecámara	68.6	NA	108.2	NA	59.2	84.6	80.0	97.7
AD-59124	Ratón/Rata/Rh/H	nonadecámara	47.5	NA	56.5	NA	23.9	40.0	9.8	18.9
AD-59125	Ratón/Rata/Rh/H	nonadecámara	45.4	NA	47.2	NA	15.2	40.7	14.7	15.1
AD-59126	Ratón/Rata/Rh/H	nonadecámara	64.3	NA	74.6	NA	51.6	57.1	35.5	54.4
AD-59127	Ratón/Rata/Rh/H	nonadecámara	103.4	NA	105.8	NA	94.0	156.4	135.9	113.7
AD-59128	Ratón/Rata/Rh/H	nonadecámara	102.4	NA	81.4	NA	66.3	89.3	60.2	74.9
AD-59129	Ratón/Rata/Rh/H	nonadecámara	41.3	NA	38.8	NA	17.9	41.4	8.6	12.6
AD-59130	Ratón/Rata/Rh/H	nonadecámara	58.3	NA	80.8	NA	94.9	78.3	106.7	88.0

La Tabla 17 ilustra los valores de CI<sub>50</sub> de dúplex de ARNip de ALAS1 seleccionados. Los valores de CI<sub>50</sub> se determinaron a partir de la desactivación de ALAS1 expresado de forma endógena en la línea celular Hep3B, 24 horas después de la transfección de cada dúplex de ARNip modificado para ALAS1 (remítase a la Tabla 14). Al menos siete dúplex, que incluyeron AD-58882, AD-58878, AD-58886, AD-58877, AD-59115, AD-58856 y AD-59129, presentaron uniformemente valores de CI<sub>50</sub> inferiores a 0.1 nM, lo cual indica que estos dúplex fueron particularmente eficaces a la hora de suprimir la expresión de ALAS1.

5

**Tabla 17: Valores de CI<sub>50</sub> de dúplex de ARNip de ALAS1 seleccionados**

ID del dúplex	CI <sub>50</sub> para 384 p (nM)	CI <sub>50</sub> para 96 p (nM)
AD-58882	0.008	0.014
AD-58878	0.040	0.031
AD-58886	0.037	0.033
AD-58877	0.031	0.034
AD-59115	0.093	0.052
AD-58856	0.061	0.066
AD-59129	0.085	0.071
AD-59124	0.572	0.078
AD-58874	0.140	0.102
AD-59125	0.118	0.115
AD-59105	0.511	0.144
AD-59120	180.592	0.498
AD-59122	36.646	0.646
AD-59106	7.906	0.847
AD-59126	n/a	1.014
AD-59107	n/a	1.971

**Ejemplo 11. Actividad de ALAS1-GaINAc en un modelo de ratón de inducción de AIP con fenobarbital**

Se utilizó el modelo de ratón de AIP para investigar el efecto de un ARNip que era un conjugado de ALAS1-GalNAc. El ARNip tenía la secuencia del dúplex AD-58632 (remítase a la Tabla 20).

**Tabla 20: Secuencias del dúplex de ARNip de ALAS1 AD-58632**

SEQ ID NO: (sentido)	SEQ ID NO: (anti-sentido)	Sitios diana de la secuencia antisentido	Nombre del dúplex	Secuencia sentido (5'-3')	Secuencia antisentido (5'-3')
4149	4150	877-899	AD-58632	GfsasAfaGfaGfuGfUfCfuCfaUfcUfuCfuUfL96	asAfsGfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsusg

5 El día 1, los ratones con AIP o bien no se trataron (referencia) o se les inyectó por vía subcutánea solución salina o el conjugado de ALAS1-GalNAc con una dosis de 20 mg/kg. Los días 2, 3 y 4, los ratones no se trataron (referencia) o se trataron con inyecciones IP de fenobarbital. El día 5, se tomaron muestras de plasma y se midieron los niveles de ALA y PBG utilizando un ensayo de LC-MS. Como se muestra en la FIG. 15, el conjugado de ALAS1-GalNAc mitigó la producción de ALA y PBG en plasma aproximadamente un 84 y 80%, respectivamente. Estos resultados indican que el tratamiento con un conjugado de ALAS1-GalNAc fue eficaz a la hora de prevenir los incrementos de ALA y PBG en plasma asociados con los ataques agudos inducidos por fenobarbital en este modelo animal de AIP.

**Ejemplo 12. Otros ARNip que tienen ALAS1 como diana e inhiben la expresión de ALAS1**

Se diseñaron y produjeron secuencias de ARNip modificadas que tenían como diana el ARNip de ALAS1, según se ha descrito en el Ejemplo 2. Las secuencias se proporcionan en la Tabla 18. Se evaluó la actividad *in vitro* de los dúplex modificados según se describe a continuación.

15 **Tabla 18: Secuencias de los dúplex y de las hebras individuales modificadas de ALAS1 humano**

SEQ ID NO: (sentido)	SEQ ID NO: (anti-sentido)	Nombre del dúplex	Secuencia sentido (5'-3')	Secuencia antisentido (5'-3')	Sitios diana de la secuencia antisentido en NM_000688.4
3685	3686	AD-59453	CAGGCAAUCUCUGUUGUdTdT	AACAACAGAGAUUUGCCUGdTdT	402-420
3687	3688	AD-59395	GAAAAAAUUGAUGAGAAAdTdT	UUUCUCAUCAUUUUUUUCdTdT	949-967
3689	3690	AD-59477	GGAAAGAUGCCGCACUCUdTdT	AAGAGUGCGGAUCUUUCCdTdT	1242-1260
3691	3692	AD-59492	UGUCUCAUCUUCUUCAGAdTdT	UCUUGAAGAAGAUGAGACAdTdT	882-900
3693	3694	AD-59361	ACAUCUACGUGCAAGCAAAdTdT	AUUGCUUGCACGUAGAUdTdT	1992-2010
3695	3696	AD-59462	UUCUCUGAUUGACACCGUAdTdT	UACGGUGUCAUUCAGAGAdTdT	1711-1729
3697	3698	AD-59433	GCUGCUGGCUUCAUCUAdTdT	UGAAGAUGAAGCCAGCAGCdTdT	1739-1757
3699	3700	AD-59424	AGCGCAACGUCAAACUCAUdTdT	AUGAGUUUGACGUUGCGCUdTdT	1851-1869
3701	3702	AD-59414	UAUUUCUGGAACUAGUAAAdTdT	UUUACUAGUUCAGAAAAdTdT	1183-1201
3703	3704	AD-59539	GGUUGUGUUGGAGGGUACAdTdT	UGUACCCUCCAACACAACCCdTdT	1679-1697
3705	3706	AD-59400	GUGUCAGUCUGGUGCAGUAdTdT	UACUGCACCCAGACUGACAdTdT	1070-1088
3707	3708	AD-59551	CUUUGUGGCCAAUGACUCAdTdT	UGAGUCAUUGGCCACAAAGdTdT	1273-1291
3709	3710	AD-59482	AGAUGCUGCUAAAAACACAdTdT	UGUGUUUUUAGCAGCAUCUdTdT	1942-1960
3711	3712	AD-59448	GAGUCAUGCCAAAAUUGAdTdT	UCCAUUUUUGGCAUGACUCdTdT	1629-1647
3713	3714	AD-59392	CUGUGCGGAUCCUGAAGAGdTdT	CUCUUCAGGAUCCGCACAGdTdT	1800-1818
3715	3716	AD-59469	CACUUUGAAACAACAUUGGdTdT	ACCAUGUUGUUUCAAGUGdTdT	1141-1159
3717	3718	AD-59431	AAGUGAUGAGUGAAAGAGAdTdT	UCUCUUUCACUCAUCAUdTdT	2193-2211
3719	3720	AD-59423	AUCUGCUAGUCACAUUGGAAdTdT	UUCCAUGUGACUAGCAGAUdTdT	2103-2121
3721	3722	AD-59517	UGGGCAGGUGGUACUAGAdTdT	UCUAGUACCACCUGCCCAAdTdT	1162-1180
3723	3724	AD-59578	GCAGAUGACUAAUUCAGACUdTdT	AGUCUGAAUAGUCAUCUGCdTdT	1031-1049
3725	3726	AD-59495	GCCUCAUUCUCAGCUGAGdTdT	CUCAGCUGAGGAAUGAGGCdTdT	2143-2161
3727	3728	AD-59432	GUAUGAUCGUUUUCUUGAGdTdT	CUCAAAGAAACGAUCAUAdTdT	931-949
3729	3730	AD-59382	UAUCCAGAUGGUCUUCAGAdTdT	UCUGAAGACCAUCUGGAUAdTdT	2302-2320
3731	3732	AD-59472	UAGUGUGAAAACCGAUGGAdTdT	UCCAUCGGUUUUCACACUAdTdT	799-817
3733	3734	AD-59459	UCCCAUGGCAGAUACUAdTdT	UAGUCAUCUGCCAUGGGGAdTdT	1023-1041
3735	3736	AD-59413	CCACUGCAGCAGUACACUAdTdT	UAGUGUACUGCUGCAGUGGdTdT	483-501
3737	3738	AD-59478	CUGUGAACC GGCGAGCACAdTdT	UGUGCUCGCCGUUCACAGdTdT	999-1017
3739	3740	AD-59376	GGUCCUAUGCUGCUGGCUUdTdT	AAGCCAGCAGCAUAGGACCCdTdT	1731-1749
3741	3742	AD-59556	AGCCUUUGGUUGUUGGAdTdT	UCCAACACAACCAAAGGCUdTdT	1672-1690

3743	3744	AD-59399	AAUCCAUGUGGACUAGAdTdT	UCUAAGUCCACAUGGAAUdTdT	1200-1218
3745	3746	AD-59474	CCAGGGCACUGCAAGCAAAdTdT	UUUGCUUGCAGUGCCCUUGdTdT	640-658
3747	3748	AD-53542	cuuuucAGuAuGAucGuudTsdT	AAACGAUcAuACUGAAAAGdTsdt	924-942
3749	3750	AD-59480	GAAUCAGAGAGGCAGCAGUdTdT	ACUGCUGCCUCUCUGAUUCdTdT	682-700
3751	3752	AD-59549	GCAAAGAUCUGACCCUCAdTdT	UGAGGGGUCAGAUUUUGCdTdT	1441-1459
3753	3754	AD-59515	GGAGAAGAGCUCCUACGGAdTdT	UCCGUAGGAGCUCUUCUCdTdT	2033-2051
3755	3756	AD-59427	CCAUGAGUUUGGAGCAAUCdTdT	GAUUGCUCCAAACUCAUGGdTdT	1540-1558
3757	3758	AD-59390	CUUUGAGAAAAAUUGAUdTdT	AUCAUUUUUUUCUCAAGdTdT	943-961
3759	3760	AD-59511	UGAGCAGACAUAAUCAUCAdTdT	UAGAUGUUUUGUCUGCUCAdTdT	1980-1998
3761	3762	AD-59532	CGUGCAAGCAAUCAUUAcTdT	GUAAUUGAUUGCUUGCACGdTdT	1999-2017
3763	3764	AD-59562	AAAGCAAAGACCAGAAAGAdTdT	UCUUUCUGGUCUUUGCUUdTdT	862-880
3765	3766	AD-59513	GGAUGUGCAGGAAAUGAUdTdT	AUUCAUUUCCUGCACAUCdTdT	733-751
3767	3768	AD-59362	CAGCAUACUUCUGAACAUdTdT	AUGUUCAGGAAGUAUGCUGdTdT	321-339
3769	3770	AD-53541	GcAGcAcAGAuGAAucAGAdTsdT	UCUGAUUcAUCUGUGCUGCdTsdt	671-689
3771	3772	AD-59490	UCUGUUGUUCUUGCCCAAdTdT	UUGGGCAUAGAACAACAGAdTdT	412-430
3773	3774	AD-59422	UGAGACAGAUGCUAUUGAdTdT	UCCAUUAGCAUCUGUCUCAdTdT	1869-1887
3775	3776	AD-59467	GCCAAUGACUCAACCCUCUdTdT	AGAGGGUUGAGUCAUUGGCdTdT	1280-1298
3777	3778	AD-59579	GAGUGCAACUUCUGCAGGAdTdT	UCCUGCAGAAGUUGCACUCdTdT	2159-2177
3779	3780	AD-59426	GUGAAAGAGAGUAGUUCUAdTdT	UAGGACUUCUCUCUUUCAdTdT	2202-2220
3781	3782	AD-59363	UAACUUGCCAAAAUCGUAdTdT	AACAGAUUUUGGCAAGUAdTdT	901-919
3783	3784	AD-59436	AAGCCAGUCUUGAGCUUCAdTdT	UGAAGCUCAAAGACUGGCUUdTdT	711-729
3785	3786	AD-53536	cAuuuuucAGuAuGAucGudTsdT	ACGAUcAuACUGAAAAGUGdTsdt	922-940
3787	3788	AD-59491	GCAGCAGUGUCUUCUGCAAdTdT	UUGCAGAAGACACUGCUGCdTdT	693-711
3789	3790	AD-59500	UCCUGAACAUUGGAGAGUGUdTdT	ACACUCUCCAUGUUCAGGAdTdT	330-348
3791	3792	AD-59394	AUUUCUGGAACACUUGGCAdTdT	UGCCAAGUGUCCAGAAAAdTdT	1652-1670
3793	3794	AD-59441	CAGUACACUACCAACAGAUdTdT	AUCUGUUGGUAGUGUACUGdTdT	492-510
3795	3796	AD-59365	GCAUGACCUCAAUUUUUCdTdT	GAAAUAAUUGAGGUCAUGCdTdT	2261-2279
3797	3798	AD-59411	AGAACUGCUGCAAAGAUUCdTdT	AGAUCUUUGCAGCAGUUCUdTdT	1432-1450
3799	3800	AD-59544	CACCCAGAUGAUGAACUAdTdT	UAGUUCAUCAUCUGGGUGdTdT	2073-2091
3801	3802	AD-59428	GAUCCAAGGGAUUGCAAAdTdT	GUUUCCGAUCCCUUGGAUCdTdT	1363-1381
3803	3804	AD-59471	CUCAUCACCAAAAAGCAAGdTdT	CUUGCUUUUUGGUGAUGAGdTdT	1052-1070
3805	3806	AD-59518	ACAACAUGGUGCUGGGGCAdTdT	UGCCCAGCACCAUGUUGUdTdT	1150-1168
3807	3808	AD-53547	GAucGuuuuuuuGAGAAAAdTsdT	UUUUUCuAAAGAAACGAUCdTsdt	935-953
3809	3810	AD-59573	CAGCACGAGUUCUCUGAUUdTdT	AAUCAGAGAACUCGUGCUGdTdT	1702-1720
3811	3812	AD-59473	AAUGAUGUCAGCCACCUCAdTdT	UGAGGUGGCUGACAUCAUUdTdT	1412-1430
3813	3814	AD-59412	AGUUUUGGACACUUUGAAAdTdT	UUUCAAAAGUGUCCAUAACUdTdT	1132-1150
3815	3816	AD-59522	GAUGAUGAACUACUCCUdTdT	AAGGAAGUAGUUAUCAUCdTdT	2080-2098
3817	3818	AD-59502	GCAGGAAUUGAUGCCGUGdTdT	CACGGCAUUCAUUUCUGCdTdT	739-757
3819	3820	AD-59499	UCUUCAAGAUAAUCUUGCCAdTdT	UGGCAAGUUUAUCUUGAAGAdTdT	892-910
3821	3822	AD-59520	CGAUGGAGGGGAUCCGAdTdT	ACUGGGAUCCCUCCAGCAdTdT	811-829
3823	3824	AD-59581	CCAAAAAGCAAGUGUCAGUdTdT	ACUGACACUUGCUUUUUGGdTdT	1059-1077
3825	3826	AD-59461	GAUUGGGGAUCGGGAUGGAdTdT	UCCAUCCGAUCCCAAUCdTdT	1612-1630
3827	3828	AD-59370	CCCUGGAGUCUGUGCGGAUdTdT	AUCCGCACAGACUCCAGGGdTdT	1791-1809
3829	3830	AD-53540	GuuGucuuuAuAuGuGAAdTsdT	AUUcAcAuAuAAAGAcAAAdTsdt	2321-2339
3831	3832	AD-59574	CGGGCAUUGUCCACUGCAGdTdT	CUGCAGUGGACAAUGCCCGdTdT	473-491
3833	3834	AD-59375	UAUUCAGACUCCUCAUCAdTdT	UGAUGAGGGAGUCUGAAUAdTdT	1040-1058
3835	3836	AD-59387	CACUGCAUUUUGAAGUGAUdTdT	AUCACUUCAAAUGCAGUGdTdT	2181-2199
3837	3838	AD-59397	CCAGAAAAGAGUGUCUCAUCdTdT	GAUGAGACACUCUUCUGGdTdT	872-890
3839	3840	AD-59396	AGGCGGAGGGAUUGGGGAUdTdT	AUCCCAAUCCCUCCGCCUdTdT	1603-1621
3841	3842	AD-59393	AGACUCCAUGGGAAAGAUdTdT	AUCUUUCCCAUGGAGGUCUdTdT	1231-1249
3843	3844	AD-59483	GCAGGAGGCCACUGCAUUUdTdT	AAAUGCAGUGGCCUCCUGCdTdT	2172-2190
3845	3846	AD-59430	AUCUGUUUCCACUUUUCAGdTdT	CUGAAAAGUGGAAACAGAUdTdT	913-931
3847	3848	AD-59463	AGAGAAGUCCAUUUUCUCAdTdT	UGAGAAAUAGGACUUCUCUdTdT	2209-2227
3849	3850	AD-53534	GucuuucAGAGuuGucuuuAdTsdT	uAAAGAcAACUCUGAAGAcTsdt	2312-2330
3851	3852	AD-59514	GGCUGGAACUGAAGCCUCAdTdT	UGAGGCUUCAGUUCAGCCdTdT	2130-2148
3853	3854	AD-59575	GCCAUUAUCAUAUCCAGAUdTdT	AUCUGGAUUAUGAUAAUGGCdTdT	2292-2310
3855	3856	AD-59364	AGCAGGCCCCAGUGUGGUUdTdT	AACCACACUGGGGCCUGCUdTdT	781-799
3857	3858	AD-59402	UCAGCUGAGUGCAACUUCUdTdT	AGAAGUUGCACUCAGCUGAdTdT	2153-2171
3859	3860	AD-59479	GAGCACACAUCUCCCAUCdTdT	AUGGGGAAGAUGUGUCUCdTdT	1011-1029
3861	3862	AD-59481	ACUUCAGGACAUUCCAGAdTdT	UGCAUGAUUCCUGGAAUGdTdT	843-861
3863	3864	AD-59530	CCUAUCGAGUUUUAAAACdTdT	GUUUUAAAACUCGAUAGGdTdT	981-999
3865	3866	AD-59582	CUUCCUUGAGAAUCUGCUAdTdT	UAGCAGAUUCUCAAGGAAGdTdT	2092-2110

ES 2 640 260 T3

3867	3868	AD-59506	ACCAACAGAUCAAAGAAACdTdT	GUUUCUUUGAUCUGUUGGUdTdT	501-519
3869	3870	AD-59567	UAACCCCAGGCCAUUAUCAdTdT	UGAUAAUGGCCUGGGGUUAdTdT	2283-2301
3871	3872	AD-59485	CCAUGCCUCCAUGAUCCAAdTdT	UUGGAUCAUGGAGGCAUGGdTdT	1351-1369
3873	3874	AD-59525	UGAUGAACUAAUUGAGCAGAdTdT	UCUGCUCAUJAGUUAUCAdTdT	1969-1987
3875	3876	AD-59566	CCUGAAGAGCGCUGAGGGAdTdT	UCCCUCAGCGCUCUUCAGGdTdT	1810-1828
3877	3878	AD-59580	AACACUUGGCAAAGCCUUdTdT	AAAGGCUUUGCCAAGUGUdTdT	1660-1678
3879	3880	AD-59512	UCUGCAGAAAGCAGGCAAAdTdT	UUUGCCUGCUUUCUGCAGAdTdT	391-409
3881	3882	AD-59475	CCGGCCUCCCUGUUGUCCAdTdT	UGGACAACAGGGGAGGCCGdTdT	1890-1908
3883	3884	AD-59438	CAUCAUCCUUGUGCGGGUdTdT	AACCCGCACAGGGAUGAUdTdT	1921-1939
3885	3886	AD-59442	UGUGCGGGUUGCAGAUGCdTdT	AGCAUCUGCAACCCGCACAdTdT	1930-1948
3887	3888	AD-59516	GGAAAGAGGUUGCUGAAAcTdT	GUUUCAGCAACCUCUUCCdTdT	759-777
3889	3890	AD-59429	AGGUCCACGCAGUGGGGCUdTdT	AGCCCCACUGCGUGGACCUdTdT	1572-1590
3891	3892	AD-59510	UGCCGUGAGGAAAGAGGUdTdT	AACCUCUUCCUCACGGCAdTdT	751-769
3893	3894	AD-59457	GCUAAUGGAUGCCGGCCUCdTdT	GAGGCCGGCAUCCAUIAGCAdTdT	1879-1897
3895	3896	AD-59434	GAAGCAAGUGGGGCUGGAAdTdT	UUCAGCCCCACUUGCUUCdTdT	2119-2137
3897	3898	AD-59454	CAUCUUCGGCCACAAUGAUdTdT	AUCAUUGUGGCGGAAGAUdTdT	1399-1417
3899	3900	AD-59468	AUUUCUCAGGCUUGAGCAAdTdT	UUGCUCAGCCUGAGAAAUdTdT	2220-2238
3901	3902	AD-59565	CCCGAGUCCCCAGGCCUUdTdT	AAGGCCUGGGGGACUCGGGdTdT	372-390
3903	3904	AD-59416	CAAGCAAUCCCCUUCCUdTdT	AGGAAAGGGCAUUUGCUUdTdT	651-669
3905	3906	AD-59420	CCCCUCAGUCCCCAAGAUdTdT	AACUUGGGGCAUUGGGGdTdT	1453-1471
3907	3908	AD-59552	CUACGGUGCCCCGGGAGAdTdT	UCUCCCCGGGGCACCGUAGdTdT	2019-2037
3909	3910	AD-59558	AAAACUGCCCCAAGAUGAUdTdT	AUCAUCUUGGGGAGUUUdTdT	429-447
3911	3912	AD-59404	ACAAAACUGCUAAGGCCAdTdT	UUGGCCUUAGCAGUUUUGUdTdT	540-558
3913	3914	AD-59455	GAUUCUGGGAACCAUGCCUdTdT	AGGCAUGGUUCCCAGAAUCdTdT	1340-1358
3915	3916	AD-59496	CCAGAUGGCACACAGCUUCdTdT	GAAGCUGUGGCCAUCUGGdTdT	593-611
3917	3918	AD-59446	AGGGAUUCGAAACAGCCGAdTdT	UCGGCUGUUUCGAAUCCUdTdT	1369-1387
3919	3920	AD-59435	CUCUGCAGUCCUCAGCGCAdTdT	UGCGCUGAGGACUGCAGAGdTdT	109-127
3921	3922	AD-59419	CCGCCGCCUCUGCAGUCCUdTdT	AGGACUGCAGAGGGCGGCGdTdT	102-120
3923	3924	AD-59533	CUGGCUGGAGCCUUGAGUdTdT	ACUCCAGGGCUCCAGCCAGdTdT	1781-1799
3925	3926	AD-59366	GACAUCAUGCAAAGCAAAdTdT	UUUGCUUUUGCAUGAUGCdTdT	851-869
3927	3928	AD-59521	GCUUGAGCAAGUUGGUUUCdTdT	GAUACCAACUUGCUCAAGCAdTdT	2229-2247
3929	3930	AD-59563	CAGGCUGUGAGAUUUACUCdTdT	GAGUAAAUCUCACAGCCUGdTdT	1320-1338
3931	3932	AD-59534	AGAGCUGUGUGAUGUGGCCdTdT	GGCCACAUCACACAGCUCUdTdT	1522-1540
3933	3934	AD-59407	GGAGCUGGCAGACCUCCAAdTdT	AUGGAGGUCUGCCAGCUCCdTdT	1222-1240
3935	3936	AD-59445	AUCCCAGUGGACUGCUGAAAdTdT	UUCAGCAGUCCACUGGGAUdTdT	822-840
3937	3938	AD-59546	GUCAAAUCUAGAGACAGAdTdT	UCUGUCUCAUGAGUUUGACdTdT	1859-1877
3939	3940	AD-59456	CUUUCUGGCAGCACAGAUdTdT	AUCUGUGCUGCCAGGAAAGdTdT	663-681
3941	3942	AD-59503	CCCUCGGCCAGUGAGAAAdTdT	UUUCUCACUGGCCGGAGGGdTdT	520-538
3943	3944	AD-59536	CUACCUAGGAAUGAGUCGCdTdT	GCGACUCAUCCUAGGUAGdTdT	1093-1111
3945	3946	AD-59385	CCCAAGAUUGGCAUUGUdTdT	CAAAUGCCACAUAUUGGdTdT	1463-1481
3947	3948	AD-59367	GAGCAAUCACCUUCGUGAdTdT	UCCACGAAGGUAGUUGCUCdTdT	1551-1569
3949	3950	AD-59458	UGCCCAUUCUUAUCCCGAdTdT	CUCGGGAUAAGAAUGGGCAdTdT	359-377
3951	3952	AD-59381	AAGGCCAAGGUCCAACAGAdTdT	UCUGUUGGACCUUGGCCUdTdT	551-569
3953	3954	AD-59538	CACACAGCUUCCGUCUGGAdTdT	UCCAGACGGAAGCUGUGUdTdT	601-619
3955	3956	AD-59421	UUAUGGGGUCGAGGCGGAdTdT	UCCGCCUCGAGCCCCAUAdTdT	1591-1609
3957	3958	AD-59388	UGUCUUCUGCAAAGCCAGUdTdT	ACUGGCUUUGCAGAAGACAdTdT	700-718
3959	3960	AD-59444	AGGCCUGAGCAUGACCUAdTdT	UGAGGUCAUGCUCAGGCCUdTdT	2253-2271
3961	3962	AD-59528	AUGUGAAUUAAGUUAUAdTdT	AAUUAUAUUAAUUCACAUdTdT	2332-2350
3963	3964	AD-59498	ACUGCUGAAGAACUCCAGdTdT	CUGGAAGUUCUUCAGCAGUdTdT	832-850
3965	3966	AD-59497	UGAGAAAGACAAAACUGCUdTdT	AGCAGUUUUGCUUUCUAdTdT	532-550
3967	3968	AD-59384	UCAGCCACCUAGAGAAACUdTdT	AGUUCUCUGAGGUGGCUAGdTdT	1419-1437
3969	3970	AD-59452	GGCAACGAGCGUUUCGUUdTdT	AAACGAAACGCUUGCUUGCCdTdT	51-69
3971	3972	AD-59379	CCUGAUGGAUCCAGCAGAdTdT	UCUGCUGGGAUCCAUCAGGdTdT	572-590
3973	3974	AD-59529	UGUGCCCACUGGAAGAGCUdTdT	AGCUCUUCAGUGGGCACAdTdT	1509-1527
3975	3976	AD-59389	CCACAGGAGCCAGCAUACUdTdT	AGUAUGCUGGCUCCUGUGdTdT	311-329
3977	3978	AD-59585	GUGGUACUAGAAAUUUUCdTdT	GAAAUUUUCUAGUACCACdTdT	1170-1188
3979	3980	AD-59570	UUCGCCGUCGCCAUUCUdTdT	AAGAAUGGGCAGCGGCCAdTdT	351-369
3981	3982	AD-59415	CCGCCAGCACCAGCGCAAcTdT	GUUGCGCUGGUGCUGGGGdTdT	1840-1858
3983	3984	AD-59505	CGCUGAGGGACGGGUGCUdTdT	AAGCACCCGUCCUCAGCCdTdT	1819-1837
3985	3986	AD-59557	UGGACUUCUCGACUUGAGUdTdT	ACUCAAGUCGAGAUGCCAdTdT	69-87
3987	3988	AD-59548	AAAGAAACCCUCCGGCCAdTdT	UGGCCGAGGGGUUUCUUdTdT	512-530
3989	3990	AD-59487	UUGACACCGUACGGUCCUAdTdT	UAGGACCGUACGGUGUCAAdTdT	1719-1737

ES 2 640 260 T3

3991	3992	AD-59550	CCCUCUACCCUGGCUAAdTdT	UUAGCCAGGGUGAAGAGGGdTdT	1293-1311
3993	3994	AD-59572	CCCCCAGGCCUUUCUGCAGdTdT	CUGCAGAAAGGCCUGGGGGdTdT	379-397
3995	3996	AD-59554	AUGCCCAAACUGCCCCAAdTdT	UUGGGGCAGUUUUGGGCAUdTdT	423-441
3997	3998	AD-59437	CUUGAGUGCCCGCCUCCUdTdT	AAGGAGGCGGGCACUCAAGdTdT	81-99
3999	4000	AD-59584	GGGUACAUCGCCAGCAGAdTdT	UCGUGCUGGGCGAUGUACCCdTdT	1691-1709
4001	4002	AD-59373	GUGUGGGGCAGUUAUGGACdTdT	GUCCAUAACUGCCCCACAdTdT	1123-1141
4003	4004	AD-59545	ACAUAUGUCCUGGAAUAAAdTdT	UUUAUUUCCAGGACUAUGUdTdT	2372-2390
4005	4006	AD-59547	AUCCCAGCAGAGUCCAGAUdTdT	AUCUGGACUCUGCUGGGAUdTdT	580-598
4007	4008	AD-59470	CUAGAUUCUUUCCACAGAdTdT	UCCUGUGGAAAGAAUCUAGdTdT	300-318
4009	4010	AD-59417	UUGUUUUCUCUGUCUUUGdTdT	CAAAGCACGAGGAAAACAAdTdT	1259-1277
4011	4012	AD-59535	CCUCCUUCGCCGCCGCCUCdTdT	GAGGCGGCGGCGAAGGAGdTdT	93-111
4013	4014	AD-59507	UGAGGCUGCUCGCCGACAAdTdT	UUGUCCGGGAGCAGCCUCAdTdT	31-49
4015	4016	AD-59519	CCAACAGACUCCUGAUGGAdTdT	UCCAUCAGGAGUCUGUUGGdTdT	562-580
4017	4018	AD-59391	UCACAUGGAAGCAAGUGGGdTdT	CCCACUUGCUUCCAUGUGAdTdT	2112-2130
4019	4020	AD-59537	CAUUCAAUGGAUGGGGCGGdTdT	CCGCCCAUCCAUUGAAUGdTdT	1490-1508
4021	4022	AD-59450	AGGAAUGAGUCGCCACCCAdTdT	UGGGUGGCGACUCAUUCUdTdT	1099-1117
4023	4024	AD-59449	UGGACUUAAGAGCGGGAGCUdTdT	AGCUCCCGCUCUAAGUCCAdTdT	1209-1227
4025	4026	AD-59418	CUAAAAACACAGAAGUCUGdTdT	CAGACUUCUGUGUUUUUAGdTdT	1950-1968
4027	4028	AD-59561	CCCUCACCACACACCCAGdTdT	CUGGGUGUGUGGUGGAGGGdTdT	2062-2080
4029	4030	AD-59460	AAUCCUUGCUUCAGGACUdTdT	AGUCCCUGAAGCAAGGAUdTdT	171-189
4031	4032	AD-59409	UUGUGGCAUUUGAAACUGUdTdT	ACAGUUUCAAAUGCCACAAdTdT	1470-1488
4033	4034	AD-59476	UCAAUUACCCUACGGUGCCdTdT	GGCACCGUAGGGUAAUUGAdTdT	2010-2028
4035	4036	AD-59406	CAAGCCAGCCCCUCGGGCAdTdT	UGCCCGAGGGGCGUGCUUGdTdT	460-478
4037	4038	AD-59569	GAGUCUUCUCCUGCCUGGAUdTdT	AUCCAGGCAGGGAAGACUCdTdT	259-277
4039	4040	AD-59451	UGGAGAGUGUUGUUCGCCGdTdT	CGGCGAACAAACACUCUCCAdTdT	339-357
4041	4042	AD-59553	ACCCCUUGCCUGCCACAAGdTdT	CUUGUGGCAGGCAAGGGGUdTdT	621-639
4043	4044	AD-59372	CUGGAUGGAUGAGUGGCUUdTdT	AAGCCACUCAUCCAUCAGdTdT	272-290
4045	4046	AD-59377	CAAGAUGAUGGAAGUUGGGdTdT	CCCAACUCCAUCUUCUUGdTdT	439-457
4047	4048	AD-59531	UUUCGUUUGGACUUCUCGAdTdT	UCGAGAAGUCCAACGAAAdTdT	62-80
4049	4050	AD-59560	UCAUCUACACCACUUCUdTdT	AGAGAGGUGGUGAAGAUAAdTdT	1749-1767
4051	4052	AD-59489	UGCCAGUUCUUCGCCGUCGdTdT	CAGCGGAAGAACUGGGCAdTdT	132-150
4053	4054	AD-59540	AAAAAUGGACAUCAUUUCUdTdT	AGAAAUGAUGUCCAUUUUUdTdT	1639-1657
4055	4056	AD-59378	CUUGAGCUUCAGGAGGAUGdTdT	CAUCCUCCUGAAGCUCUAGdTdT	719-737
4057	4058	AD-59403	CCUCUCUGCCACCCAUGCdTdT	AGCAUGGGUGGCAGAGAGGdTdT	1761-1779
4059	4060	AD-59493	AAAGUCAGGAUCCCUAAGAdTdT	UCUUAGGGAUCCUGACUUUdTdT	242-260
4061	4062	AD-59374	CGACCACGGAGGAAUCCUdTdT	AAGGAUCCUCCGUGGUCGdTdT	159-177
4063	4064	AD-59380	UUCGUCUGGACACCCCUUdTdT	AAGGGGUGUCCAGACGGAAdTdT	609-627
4065	4066	AD-59576	CCACCAUGCUGCUGGCUGdTdT	CAGCCAGCAGCAUGGGUGGdTdT	1769-1787
4067	4068	AD-59425	UGAGAAAAAGAAUACCAdTdT	UGGGUCAUUUUUUCUAdTdT	961-979
4069	4070	AD-59509	UAAGAUGAUGCCAGGCUUdTdT	ACAGCCUGGCAUUAUAdTdT	1309-1327
4071	4072	AD-59488	AGUUUAUUAUUUUUUAUdTdT	AUUAAAAUUUAUUAACUdTdT	2342-2360
4073	4074	AD-59486	UCUUCGCGCUGUGGGGACAdTdT	UGUCCCCACAGCGGGAAGAdTdT	140-158
4075	4076	AD-59465	UGCCACAAGCCAGGGCACUdTdT	AGUGCCUUGGCUUGUGGAdTdT	631-649
4077	4078	AD-59484	AGCGCAGUUAUGCCAGUdTdT	AACUGGGCAUAACUGCGCUdTdT	122-140
4079	4080	AD-59368	GGACCAGGAGAAAGUCAGGdTdT	CCUGACUUUCUCCUGGUCCdTdT	232-250
4081	4082	AD-59464	UGUCCACUGCCCCAGCCAdTdT	GUGGCUGGGGAGUGGACAdTdT	1903-1921
4083	4084	AD-59386	AUCGCGGCCUGAGGCUGCUdTdT	AGCAGCCUCAGGCCGCGAUdTdT	22-40
4085	4086	AD-59439	GGGGAUGUGGGGACCAGGAdTdT	UCCUGGUCCCCACAUCCCCdTdT	222-240
4087	4088	AD-59440	CUGGAAAUAAAUUCUUGCUdTdT	AGCAAGAAUUUAUUUCCAGdTdT	2380-2398
4089	4090	AD-59542	UUGAAACUGUCCAUCUAdTdT	AUUGAAUGGACAGUUUCAAdTdT	1479-1497
4091	4092	AD-59559	GUGGGGACACGACCAGGAdTdT	UCCGUGGUCGUGUCCCCAdTdT	150-168
4093	4094	AD-59586	CGCAGUGGGGCUUUAUGGGdTdT	CCCAUAAAGCCCCACUGCGdTdT	1579-1597
4095	4096	AD-59408	UUGUCUUUAUAUGUGAAUdTdT	AAUUCACAUUAUAAAGACAAdTdT	2322-2340
4097	4098	AD-59568	UCACCCUGGCUAAGAUGAUdTdT	AUCAUCUUAGCCAGGGUGAdTdT	1299-1317
4099	4100	AD-59398	GUAUCUGCUCAGGCCUGAGdTdT	CUCAGGCCUGAGCAGAUACdTdT	2243-2261
4101	4102	AD-59508	AUGAGUGGCUUCUUCUCCAdTdT	UGGAGAAGAAGCCACUCAUdTdT	280-298
4103	4104	AD-59523	GAAGUUGGGGCCAAGCCAGdTdT	CUGGCUUGGCCCAACUUCdTdT	449-467
4105	4106	AD-59410	UCAGGGACUCGGGACCCUGdTdT	CAGGGUCCCGAGUCCUAGAdTdT	181-199
4107	4108	AD-59541	UCCUACGGAUUGCCCCACdTdT	GUGGGGGCAAUCCGUAGGAdTdT	2043-2061
4109	4110	AD-59524	UUACUCUGAUUCUGGAAAdTdT	GUUCCAGAAUCAGAGUAdTdT	1333-1351
4111	4112	AD-59501	AUCCCUAAGAGUCUUCUCCUdTdT	AGGGAAGACUCUUAAGGAUdTdT	251-269
4113	4114	AD-59383	UGCCAAAGUACAUCUUCGdTdT	CGGAAGAUGUACUUUGCAdTdT	1389-1407

4115	4116	AD-59577	UCCUCGGGUUUAGGGGAUGdTdT	CAUCCCCUAAACCCGAGGAdTdT	210-228
4117	4118	AD-59447	UGCUGAAACCUACAGCAGGCdTdT	GCCUGCUGAGGUUUCAGCAdTdT	769-787
4119	4120	AD-59555	CCACCCACGGGUGUGUGGGdTdT	CCCACACACCCGUGGGUGGdTdT	1111-1129
4121	4122	AD-59405	UGGUGCAGUAAUGACUACCdTdT	GGUAGUCAUUACUGCACCAdTdT	1079-1097
4123	4124	AD-59371	UUCUCCACCUAGAUUCUUdTdT	AAAGAAUCUAGGUGGAGAAdTdT	292-310
4125	4126	AD-59443	UAAGGCGCCGGCGAUCGCGdTdT	CGCGAUCGCCGGCGCCUUAdTdT	9-27
4127	4128	AD-59401	UGGAACUAGUAAAUCCAAdTdT	AUGGAAUUUACUAGUCCAAdTdT	1189-1207
4129	4130	AD-59494	GGACCCUUCUGGACCCUUdTdT	AAGGGGUCCAGCAGGGUCCdTdT	192-210
4131	4132	AD-59504	UCAAUUUAUUACUUAACCdTdT	GGUUAAGUGAAAUAUUAGdTdT	2269-2287
4133	4134	AD-59369	CCCGACAAGGGCAACGAGdTdT	CUCGUUGCCCUUGUCCGGdTdT	41-59
4135	4136	AD-59571	UUUUAAAACUGUGAACCgGdTdT	CCGGUUCACAGUUUUAAAAdTdT	991-1009
4137	4138	AD-59527	GUGCUUCGCCGCCAGCACCdTdT	GGUGCUGGCGGCGAAGCACdTdT	1832-1850
4139	4140	AD-59466	UGGACCCCUUCCUCGGGUUdTdT	AACCCGAGGAAGGGGUCCAdTdT	201-219
4141	4142	AD-59526	CUGUAUUAUAAGGCGCCGGdTdT	CCGGCGCCUUAUAUACAGdTdT	1-19
4143	4144	AD-59543	UUGCCCCACCCUCACCAdTdT	UGGUGAGGGGUGGGGGCAAdTdT	2052-2070
4145	4146	AD-59564	AUGGGGCGGUGUGCCACUdTdT	AGUGGGCACACCGCCCAUdTdT	1500-1518
4147	4148	AD-59583	CUAUAGUAAAACAUAGUCdTdT	GACUAUGUUUUUACUAUAGdTdT	2361-2379

La actividad *in vitro* de los ARNip para suprimir el ARNm de ALAS1 se evaluó en un cribado de dosis única en células Hep3B que se habían transfectado utilizando Lipofectamine2000 como reactivo de transfección. Los experimentos de dosis única se llevaron a cabo con una concentración del dúplex 10 nM y se analizaron mediante un ensayo de ADN ramificado (ADNr). Los resultados se muestran en la Tabla 19 y se expresan como el porcentaje de ARNm remanente.

5

**Tabla 19: Supresión del ARNm de ALAS1 evaluada mediante un ensayo de ADNr**

Dúplex	% de ARNm remanente	Desv. est.
AD-59453	11.2	1.5
AD-59395	12.7	1.1
AD-59477	14.5	2.0
AD-59492	14.8	2.1
AD-59361	15.1	4.9
AD-59462	15.4	2.6
AD-59433	15.8	2.7
AD-59424	16.0	1.7
AD-59414	16.1	1.3
AD-59539	16.2	2.6
AD-59400	16.2	1.8
AD-59551	16.3	2.3
AD-59482	16.6	2.1
AD-59448	16.6	3.7
AD-59392	16.9	3.5
AD-59469	16.9	2.2
AD-59431	17.0	2.0
AD-59423	17.1	3.8
AD-59517	17.2	1.5
AD-59578	17.3	3.1
AD-59495	17.7	3.7
AD-59432	17.7	2.8
AD-59382	17.9	3.2
AD-59472	18.6	3.5
AD-59459	18.7	3.8
AD-59413	18.8	2.4
AD-59478	18.9	3.0
AD-59376	18.9	3.2
AD-59556	18.9	2.4
AD-59399	19.0	4.1
AD-59474	19.4	1.6
AD-53542	19.4	1.7
AD-59480	19.6	1.6
AD-59549	19.7	2.1
AD-59515	19.8	4.4
AD-59427	19.9	3.2

ES 2 640 260 T3

AD-59390	19.9	3.4
AD-59511	19.9	2.2
AD-59532	20.0	2.4
AD-59562	20.2	2.6
AD-59513	20.3	3.9
AD-59362	20.6	2.5
AD-53541	20.6	2.2
AD-59490	20.7	2.3
AD-59422	20.8	4.5
AD-59467	21.2	2.3
AD-59579	21.2	3.3
AD-59426	21.7	2.3
AD-59363	21.7	2.7
AD-59436	21.7	2.7
AD-53536	21.9	1.5
AD-59491	21.9	2.6
AD-59500	22.2	2.8
AD-59394	22.3	10.1
AD-59441	22.3	2.6
AD-59365	22.4	4.2
AD-59411	22.5	2.9
AD-59544	22.5	2.1
AD-59428	22.7	4.7
AD-59471	22.9	5.0
AD-59518	22.9	2.3
AD-53547	22.9	1.5
AD-59573	23.0	4.2
AD-59473	23.2	1.8
AD-59412	23.4	2.5
AD-59522	23.4	3.3
AD-59502	23.6	2.7
AD-59499	23.6	1.6
AD-59520	23.8	3.8
AD-59581	23.9	6.0
AD-59461	24.3	4.2
AD-59370	24.3	5.6
AD-53540	24.4	2.1
AD-59574	24.5	2.0
AD-59375	24.6	2.3
AD-59387	24.8	7.2
AD-59397	24.9	9.6
AD-59396	25.0	10.2
AD-59393	25.3	11.6
AD-59483	25.4	3.8
AD-59430	25.5	1.8
AD-59463	25.6	4.8
AD-53534	25.9	3.1
AD-59514	26.2	5.7
AD-59575	26.2	3.2
AD-59364	26.2	4.5
AD-59402	26.3	3.1
AD-59479	26.3	2.5
AD-59481	26.4	2.2
AD-59530	26.4	4.4
AD-59582	26.6	3.9
AD-59506	27.0	4.1
AD-59567	27.3	1.1
AD-59485	27.7	4.7
AD-59525	28.3	3.1
AD-59566	28.5	0.6
AD-59580	28.7	7.1
AD-59512	29.5	2.5

ES 2 640 260 T3

AD-59475	29.6	4.2
AD-59438	29.6	3.3
AD-59442	29.9	2.8
AD-59516	30.4	3.8
AD-59429	30.8	4.3
AD-59510	31.3	1.9
AD-59457	31.4	1.2
AD-59434	31.6	3.5
AD-59454	32.0	1.9
AD-59468	32.2	3.2
AD-59565	32.4	1.5
AD-59416	32.7	1.7
AD-59420	33.2	3.1
AD-59552	33.2	2.2
AD-59558	33.8	3.8
AD-59404	34.0	5.4
AD-59455	34.8	1.3
AD-59496	34.9	5.2
AD-59446	35.5	1.7
AD-59435	35.9	1.2
AD-59419	36.0	1.4
AD-59533	36.7	3.7
AD-59366	36.7	6.0
AD-59521	36.9	4.3
AD-59563	36.9	4.1
AD-59534	36.9	3.3
AD-59407	37.1	4.7
AD-59445	37.2	3.2
AD-59546	37.9	4.9
AD-59456	38.3	4.0
AD-59503	38.8	5.0
AD-59536	39.8	4.2
AD-59385	39.9	13.7
AD-59367	40.0	3.6
AD-59458	40.0	3.4
AD-59381	40.3	9.9
AD-59538	40.8	4.9
AD-59421	40.9	6.4
AD-59388	41.0	9.1
AD-59444	41.1	2.7
AD-59528	41.9	3.3
AD-59498	42.2	3.3
AD-59497	42.4	4.9
AD-59384	42.7	17.6
AD-59452	42.7	3.1
AD-59379	43.6	2.6
AD-59529	43.8	4.8
AD-59389	44.1	6.4
AD-59585	44.3	3.2
AD-59570	45.1	4.0
AD-59415	46.6	2.3
AD-59505	47.5	6.2
AD-59557	48.1	4.4
AD-59548	49.9	4.0
AD-59487	50.7	3.2
AD-59550	50.8	5.8
AD-59572	51.1	4.0
AD-59554	51.3	6.0
AD-59437	52.2	4.8
AD-59584	54.9	2.7
AD-59373	55.3	20.1
AD-59545	55.4	3.4

ES 2 640 260 T3

AD-59547	55.9	4.7
AD-59470	56.0	2.7
AD-59417	56.4	7.7
AD-59535	57.6	5.1
AD-59507	58.8	4.7
AD-59519	59.1	5.6
AD-59391	60.1	12.5
AD-59537	60.6	9.1
AD-59450	60.7	7.2
AD-59449	61.6	6.8
AD-59418	61.8	8.4
AD-59561	62.2	7.2
AD-59460	62.8	4.7
AD-59409	64.4	9.0
AD-59476	65.2	5.6
AD-59406	65.6	3.5
AD-59569	66.7	7.6
AD-59451	66.9	2.9
AD-59553	67.2	8.8
AD-59372	67.3	25.6
AD-59377	68.7	5.1
AD-59531	68.7	9.0
AD-59560	68.7	12.7
AD-59489	69.6	8.9
AD-59540	70.1	10.1
AD-59378	70.6	14.1
AD-59403	71.4	3.3
AD-59493	72.3	3.5
AD-59374	75.9	5.1
AD-59380	76.4	11.1
AD-59576	77.5	16.2
AD-59425	77.9	10.6
AD-59509	78.0	3.2
AD-59488	78.6	7.1
AD-59486	79.4	5.0
AD-59465	79.5	5.1
AD-59484	79.8	3.2
AD-59368	80.0	11.9
AD-59464	80.2	9.3
AD-59386	80.6	33.2
AD-59439	80.9	4.0
AD-59440	82.2	1.9
AD-59542	83.3	10.6
AD-59559	83.7	9.1
AD-59586	83.8	11.5
AD-59408	86.3	2.8
AD-59568	86.8	4.2
AD-59398	87.4	24.9
AD-59508	87.5	2.5
AD-59523	87.6	11.8
AD-59410	88.8	8.3
AD-59541	88.9	10.8
AD-59524	89.5	12.1
AD-59501	89.9	5.1
AD-59383	90.8	27.4
AD-59577	91.1	2.3
AD-59447	91.3	12.9
AD-59555	91.7	3.4
AD-59405	92.5	5.7
AD-59371	93.5	31.7
AD-59443	93.8	9.0
AD-59401	94.5	7.1

## ES 2 640 260 T3

AD-59494	95.1	9.1
AD-59504	96.8	11.7
AD-59369	96.8	4.8
AD-59571	97.4	7.0
AD-59527	98.6	7.8
AD-59466	99.7	14.0
AD-59526	102.9	4.6
AD-59543	103.7	3.0
AD-59564	103.7	12.1
AD-59583	112.4	13.2

Los doscientos treinta y dos dúplex que se evaluaron suprimieron el ARNm de ALAS1 en diferentes grados en este ensayo de dosis única. De acuerdo con este ensayo, al menos cuatro de los dúplex (AD-59453, AD-59395, AD-59477 y AD-59492) suprimieron el ARNm de ALAS1 un 85% o más, 39 de los dúplex suprimieron el ARNm de ALAS1 un 80% o más, 101 de los dúplex suprimieron el ARNm de ALAS1 un 70% o más y 152 de los dúplex suprimieron el ARNm de ALAS1 un 50% o más. Por el contrario, algunos dúplex no mostraron ninguna supresión apreciable en este ensayo.

5

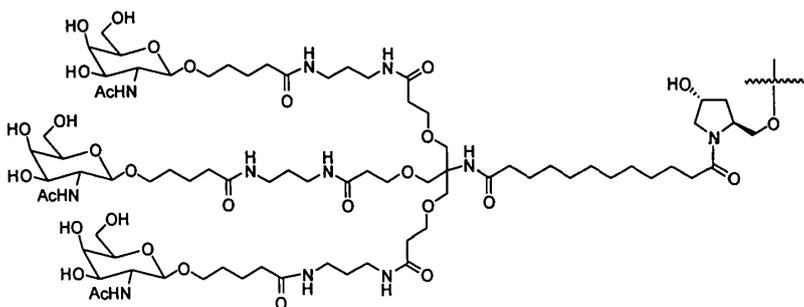
## REIVINDICACIONES

1. Un ácido ribonucleico bicatenario (ARNbc) para inhibir la expresión de ALAS1, donde el ARNbc comprende:

- (i) una hebra antisentido complementaria respecto a al menos los nucleótidos 871-889 de la SEQ ID NO: 1;
- (ii) una hebra sentido que comprende al menos 15 nucleótidos contiguos de la SEQ ID NO:1295; y
- (iii) un ligando que comprende uno o más derivados de tipo N-acetilgalactosamina (GalNAc).

2. El ARNbc de la reivindicación 1, donde dicho ARNbc comprende al menos un nucleótido modificado, donde al menos uno de los nucleótidos modificados se selecciona a partir del grupo constituido por: un nucleótido con una modificación de tipo 2'-O-metilo, un nucleótido que comprende un grupo 5'-fosforotioato, un nucleótido terminal unido a un derivado de tipo colesterilo o un grupo de tipo bisdecilamida del ácido dodecanoico, un nucleótido con una modificación de tipo 2'-desoxi-2'-fluoro, un nucleótido con una modificación de tipo 2'-desoxi, un nucleótido bloqueado, un nucleótido que no sea básico, un nucleótido con una modificación de tipo 2'-amino, un nucleótido con una modificación de tipo 2'-alquilo, un nucleótido de tipo morfolino, un fosforamidato y un nucleótido que comprende una base que no sea natural.

3. El ARNbc de la reivindicación 1 o 2, donde la estructura del derivado de tipo GalNAc es como la que se muestra a continuación y está unida al extremo 3' de la hebra sentido del ARNbc



4. El ARNbc de la reivindicación 1, 2 o 3, donde la hebra antisentido comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 1296.

5. El ARNbc de la reivindicación 4, donde la hebra sentido comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 1295.

6. El ARNbc de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, que comprende una región dúplex con una longitud de 15 a 30 pares de bases.

7. El ARNbc de la reivindicación 6, donde dicha región dúplex tiene una longitud de 19 a 23 pares de bases.

8. El ARNbc de cualquiera de las reivindicaciones 1-7, donde cada hebra tiene una longitud que no es superior a 30 nucleótidos.

9. Una composición farmacéutica para inhibir la expresión de un gen ALAS1, comprendiendo la composición el ARNbc de cualquiera de las reivindicaciones 1-8, donde dicha composición se administra preferentemente por vía intravenosa o subcutánea.

10. Un método para inhibir la expresión de ALAS1 en una célula, comprendiendo el método:

- (a) introducir en la célula el ARNbc de cualquiera de las reivindicaciones 1-8, y
- (b) mantener la célula del paso (a) durante un tiempo suficiente para obtener la degradación del transcrito de ARNm de un gen ALAS1, de este modo se inhibe la expresión del gen ALAS1 en la célula,

donde se excluye cualquier método de tratamiento del cuerpo humano o animal mediante terapia.

11. Un método para reducir el nivel de una porfirina o un precursor de una porfirina en una célula, que comprende poner en contacto la célula con el ARNbc de cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en una cantidad eficaz para reducir el nivel de la porfirina o el precursor de la porfirina en la célula, donde se excluye cualquier método de tratamiento del cuerpo humano o animal mediante terapia.

- 5 12. Un ARNbc de cualquiera de las reivindicaciones 1-8 o una composición farmacéutica de la reivindicación 9 para su uso en un método para tratar un trastorno relacionado con la expresión de ALAS1, donde se ha de administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de dicho ARNbc o dicha composición a un sujeto que necesite dicho tratamiento.
13. El ARNbc para su uso de la reivindicación 12, donde
- (a) el sujeto corre el riesgo de desarrollar, o se le ha diagnosticado, una porfiria;
  - (b) dicho método
  - (i) mejora un síntoma asociado con un trastorno relacionado con ALAS1 (p. ej., una porfiria),
  - 10 (ii) inhibe la expresión de ALAS1 en el sujeto,
  - (iii) reduce el nivel de un precursor de porfirina o una porfirina en el sujeto,
  - (iv) reduce la frecuencia de ataques agudos de síntomas asociados con una porfiria en el sujeto, o
  - (v) reduce la incidencia de ataques agudos de síntomas asociados con una porfiria en el sujeto cuando el sujeto se expone a un factor precipitante;
  - 15 (c) la porfiria es una porfiria hepática seleccionada entre porfiria intermitente aguda (AIP), coproporfiria hereditaria (HCP), porfiria variegata (VP), porfiria debida a la deficiencia de ALA-deshidratasa (ADP) y porfiria hepatoeritropoyética;
  - (d) el ARNbc se ha de administrar antes, durante o después de un ataque agudo de porfiria;
  - 20 (e) el ARNbc se ha de administrar durante un pródromo, donde preferentemente el pródromo se caracteriza por dolor, náusea, síntomas psicológicos, inquietud o insomnio; o
  - (f) el sujeto presenta un nivel elevado de ALA y/o PBG.
14. Una célula in vitro o ex vivo que comprende el ARNbc de cualquiera de las reivindicaciones 1-8.

FIG. 1

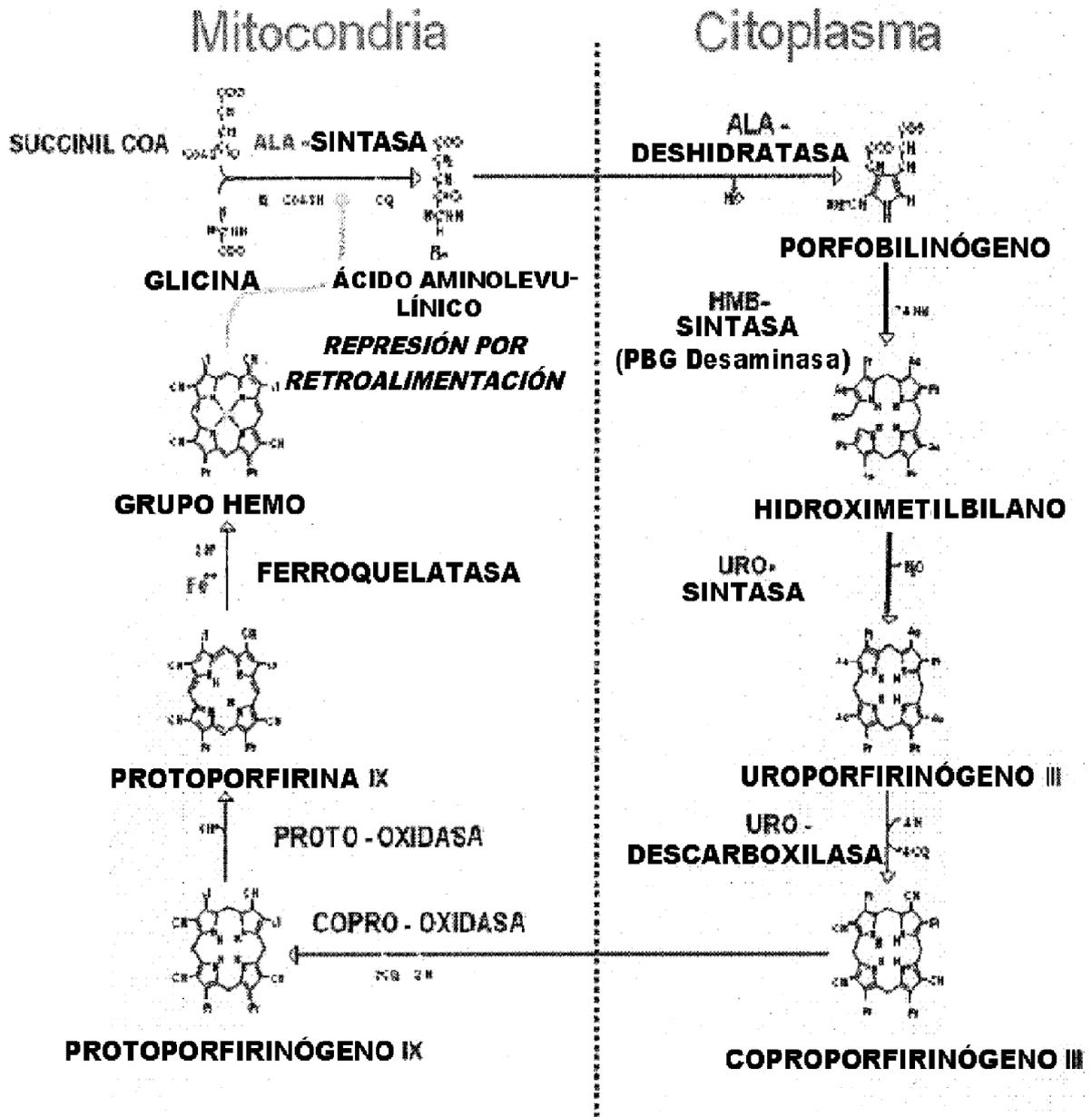


FIG. 2A

Enzima, localización cromosómica	Reacción catalizada	Porfiria asociada	Tipo de porfiria	Patrón hereditario típico	Síntomas típicos
δ-aminolevulinato (ALA) sintasa 1 3p21	Glicina + SuccinilCoA ↓ ácido δ-aminolevulinico (ALA)				
δ-aminolevulinato (ALA) sintasa 2 (ALAS2) (especifica para eritroides) Xp11.21	Glicina + SuccinilCoA ↓ ácido δ-aminolevulinico (ALA)	Anemia sideroblástica relacionada con X (XLSA), Protoporfiria relacionada con X (XLP)	Eritropoyética	Relacionado con X	
δ-aminolevulinato deshidratasa (ALAD) 9q34	ácido δ-aminolevulinico (ALA) ↓ Porfobilinógeno (PBG)	Porfiria debida a la deficiencia de ALA-deshidratasa (ADP o porfiria de Doss)	Hepática	Recesivo autosómico	Dolor abdominal, neuropatía
PBG desaminasa (PBGD) o Hidroximetilbilano sintasa (HMBS) 11q23	Porfobilinógeno (PBG) ↓ Hidroximetilbilano (HMB)	Porfiria intermitente aguda	Hepática	Dominante autosómico	Dolor abdominal periódico, neuropatía periférica, trastornos psiquiátricos, taquicardia

FIG. 2B

Uroporfirinógeno III Sintasa (UROS) 10q26	Hidroximetilbilano ↓ Uroporfirinógeno III (URO)	Porfiria eritropoyética congenital	Eritropoyética	Recesivo autosómico	Fotosensibilidad severa con eritema, hinchazón y formación de ampollas. Anemia hemolítica, esplenomegalia
Uroporfirinógeno descarboxilasa (UROD) 1q34	Uroporfirinógeno III (URO) ↓ Coprofirinógeno III	Porfiria cutánea tardía (PCT)	Hepática	Dominante autosómico o esporádico	Fotosensibilidad con vesículas y ampollas
Coprofirinógeno III oxidasa (CPOX)3q12	Coprofirinógeno III (COPRO) ↓ Protoporfirinógeno IX	Coproporfiria hereditaria (HCP)	Hepática	Dominante autosómico	Fotosensibilidad, síntomas neurológicos, cólico
Protoporfirinógeno oxidasa (PPOX) 1q14	Protoporfirinógeno IX (PROTO) ↓ Protoporfirina IX	Porfiria variegata (VP)	Mixta	Dominante autosómico	Fotosensibilidad, síntomas neurológicos, retraso en el desarrollo
Ferroquelatasa 18q21.3	Protoporfirina IX ↓ Grupo hemo	Protoporfiria eritropoyética (EPP)	Eritropoyética	Recesivo autosómico	Fotosensibilidad con lesiones en la piel, cálculos biliares, insuficiencia hepática moderada

FIG. 3A

1 ctgtatatta aggcgcgggc gatcgggcc tgaggctgct cccggacaag ggcaacgagc  
 61 gtttcgtttg gacttctcga cttgagtgcc cgcctccttc gccgcgcgct ctgcagtcct  
 121 cagcgcagtt atgccagtt ctccccgctg tggggacacg accacggagg aatccttget  
 181 tcagggactc gggaccctgc tggaccctt cctcgggttt aggggatgtg gggaccagga  
 241 gaaagtccag atcccctaaga gtcttcctcg cctggatgga tgagtggctt cttctccacc  
 301 tagattcttt ccacaggagc cagcatactt cctgaacatg gagagtgttg ttcgccgctg  
 361 cccattctta tcccaggtcc cccaggcctt totgcagaaa gcaggcaaat ctctgttgtt  
 421 ctatgoccaa aactgoccca agatgatgga agttggggcc aagccagccc ctccggcatt  
 481 gtccactgca gcagtacact accaacagat caaagaaacc cctccggcca gtgagaaaga  
 541 caaaactgct aaggccaagg tccaacagac tctgatgga tcccagcaga gtccagatgg  
 601 cacacagctt ccgtctggac accccttgcc tgcacaagc cagggcactg caagcaaatg  
 661 ccttttctg gcagcacaga tgaatcagag aggcagcagt gtcttctgca aagccagtct  
 721 tgagcttcag gaggatgtgc aggaaatgaa tgcctgagg aaagaggttg ctgaaacctc  
 781 agcaggcccc agtgtggtta gtgtgaaac cgatggaggg gatcccagtg gactgctgaa  
 841 gaacttccag gacatcatgc aaaagcaag accagaaaga gtgtctcatc ttcttcaaga  
 901 taacttgcca aaatctgttt ccacttttca gtatgatcgt ttctttgaga aaaaaattga  
 961 tgagaaaaag aatgaccaca cctatcgagt ttttaaaact gtgaaccggc gagcacacat  
 1021 cttccccatg gcagatgact attcagactc cctcatcacc aaaaagcaag tgtcagtctg  
 1081 gtgcagtaat gactacctag gaatgagtcg ccaccacgg gtgtgtgggg cagttatgga  
 1141 cactttgaaa caacatggtg ctggggcagg tggtagtaga aatatttctg gaactagtaa  
 1201 attccatgtg gacttagagc gggagctggc agacctccat gggaaagatg ccgcactctt  
 1261 gttttcctcg tgctttgtgg ccaatgactc aacctcttc acctggcta agatgatgcc  
 1321 aggctgtgag atttactctg attctgggaa ccatgcctcc atgatccaag ggattcgaaa  
 1381 cagccgagtg ccaaagtaca tcttcgcca caatgatgtc agccacctca gagaactgct  
 1441 gcaaagatct gaccctcag tcccacaagat tgtggcattt gaaactgtcc attcaatgga  
 1501 tggggcgggtg tgcccactgg aagagctgtg tgatgtggcc catgagtttg gagcaatcac  
 1561 cttcgtggat gagggtccacg cagtggggct ttatggggct cgaggcggag ggattgggga  
 1621 tcgggatgga gtcatgocaa aaatggacat catttctgga acacttgga aagccttggg  
 1681 ttgtgttggg ggtacatcg ccagcacgag ttctctgatt gacaccgtac ggtcctatgc  
 1741 tgctggcttc atcttcaaca cctctctgcc acccatgctg ctggctggag cctggagtc  
 1801 tgtgcggatc ctgaagagcg ctgagggacg ggtgcttcgc cgcagcacc agcgcacgt  
 1861 caaactcatg agacagatgc taatggatgc cggcctcct gttgtccact gcccagcca  
 1921 catcatccct gtgcgggttg cagatgctgc taaaaacaca gaagtctgtg atgaactaat  
 1981 gagcagacat aacatctacg tgcaagcaat caattacct acggtgcccc ggggagaaga  
 2041 gctcctacgg attgccccca ccctcacca cacaccacag atgatgaact acttcttga  
 2101 gaatctgcta gtcacatgga agcaagtggg gctggaactg aagcctcatt cctcagctga  
 2161 gtgcaacttc tgcaaggagg cactgcattt tgaagtgatg agtgaaagag agaagtccta  
 2221 tttctcagge ttgagcaagt tggtagctgc tcaggcctga gcatgacctc aattatttca

FIG. 3B

```
2281 cttaacccca ggcattatc atatccagat ggtcttcaga gttgtcttta tatgtgaatt
2341 aagttatatt aaattttaat ctatagtaaa aacatagtcc tggaaataaa ttcttgctta
2401 aatggtg
      (SEQ ID NO:1)
```

FIG. 4A

1 cagaagaagg cagcgcccaa ggogcatgog cagcggtcac tcccgtgtga tattaaggcg  
 61 cgggcatcg cggcctgagg ctgctcccgg acaagggcaa cgagcgtttc gtttggactt  
 121 ctgacttga gtgcccgcct ccttcgccgc cgcctctgca gtccctcagcg cagttatgcc  
 181 cagttcttcc cgtgtgggg acacgaccac ggaggaatcc ttgcttcagg gactcgggac  
 241 cctgctggac cccttcctcg ggttagggg atgtggggac caggagaaag tcaggatccc  
 301 taagagtctt ccctgcctgg atggatgagt ggcttcttct ccacctagat tctttccaca  
 361 ggagccagca tacttcctga acatggagag tgttgttcgc cgtgccecat tcttatcccg  
 421 agtccccag gcctttctgc agaaagcagg caaatctctg ttgttctatg cccaaaactg  
 481 cccaagatg atggaagtg gggccaagcc agcccctcg gcattgtcca ctgcagcagt  
 541 aactaccaa cagatcaaag aaacccctcc ggccagtgag aaagacaaaa ctgctaaggc  
 601 caaggtccaa cagactcctg atggatccca gcagagtcca gatggcacac agcttccgctc  
 661 tggacacccc ttgctgcca caagccaggg cactgcaagc aaatgcctt tccctggcagc  
 721 acagatgaat cagagaggca gcagtgtctt ctgcaaagcc agtcttgagc ttcaggagga  
 781 tgtgcaggaa atgaatgccg tgaggaaaga ggttgcctgaa acctcagcag gcccagtggt  
 841 ggttagtggtg aaaaccgatg gaggggatcc cagtggactg ctgaagaact tccaggacat  
 901 catgcaaaaag caaagaccag aaagagtgtc tcatcttctt caagataact tgccaaaatc  
 961 tgtttccact tttcagtatg atcgtttctt tgagaaaaaa attgatgaga aaaagaatga  
 1021 ccacacctat cgagttttta aaactgtgaa ccggcgagca cacatcttcc ccatggcaga  
 1081 tgactattca gactccctca tcaccaaaaa gcaagtgtca gtctgggtgca gtaatgacta  
 1141 cctaggaatg agtcgccacc cacgggtgtg tggggcagtt atggacactt tgaacaaca  
 1201 tgggtgctggg gcaggtggta ctagaatat ttctggaact agtaaattcc atgtggactt  
 1261 agagcgggag ctggcagacc tccatgggaa agatgocgca ctcttgtttt cctcgtgctt  
 1321 tgtggccaat gactcaacc tcttcacctt ggctaagatg atgccaggct gtgagattta  
 1381 ctctgattct gggaaacctg cctccatgat ccaagggatt cgaaacagcc gagtgccaaa  
 1441 gtacatcttc cgcacaatg atgtcagcca cctcagagaa ctgctgcaaa gatctgaccc  
 1501 ctcagtcctc aagattgtgg catttgaaac tgtccattca atggatgggg cgggtgtgcc  
 1561 actggaagag ctgtgtgatg tggcccatga gtttggagca atcaccttcg tggatgaggt  
 1621 ccacgcagtg gggctttatg gggctcgagg cggagggatt ggggatcggg atggagtcat  
 1681 gccaaaaatg gacatcattt ctggaaact tggcaaagcc tttggttggtg ttggagggtg  
 1741 catcgccagc acgagttctc tgattgacac cgtacggctc tatgctgctg gcttcatctt  
 1801 caccacctct ctgccacca tgctgctggc tggagccctg gagtctgtgc ggatcctgaa  
 1861 gagecgtgag ggacgggtgc ttgcgcgcca gcaccagcgc aacgtcaaac tcatgagaca  
 1921 gatgctaata gatgcggcc tcctgttgtt ccaactgccc agccacatca tcctgtgog  
 1981 ggttgcagat gctgctaaaa acacagaagt ctgtgatgaa ctaatgagca gacataacat  
 2041 ctacgtgcaa gcaatcaatt accctacggt gcccgggga gaagagctcc tacggattgc  
 2101 cccacacctc caccacacac ccagatgat gaactacttc cttgagaate tgctagtcac  
 2161 atggaagcaa gtggggctgg aactgaagcc tcatctctca gctgagtgca acttctgcag  
 2221 gaggccaact cattttgaag tgatgagtga aagagagaag tcttatttct caggcttgag

FIG. 4B

```
2281 caagttgga tctgctcagg cctgagcatg acctcaatta tttcacttaa ccccaggcca  
2341 ttatcatatc cagatggtct tcagagttgt ctttatatgt gaattaagtt atattaaatt  
2401 ttaatctata gtaaaaacat agtctctggaa ataaattctt gcttaaagtg tgaaaaaa  
(SEQ ID NO:382)
```

FIG. 5

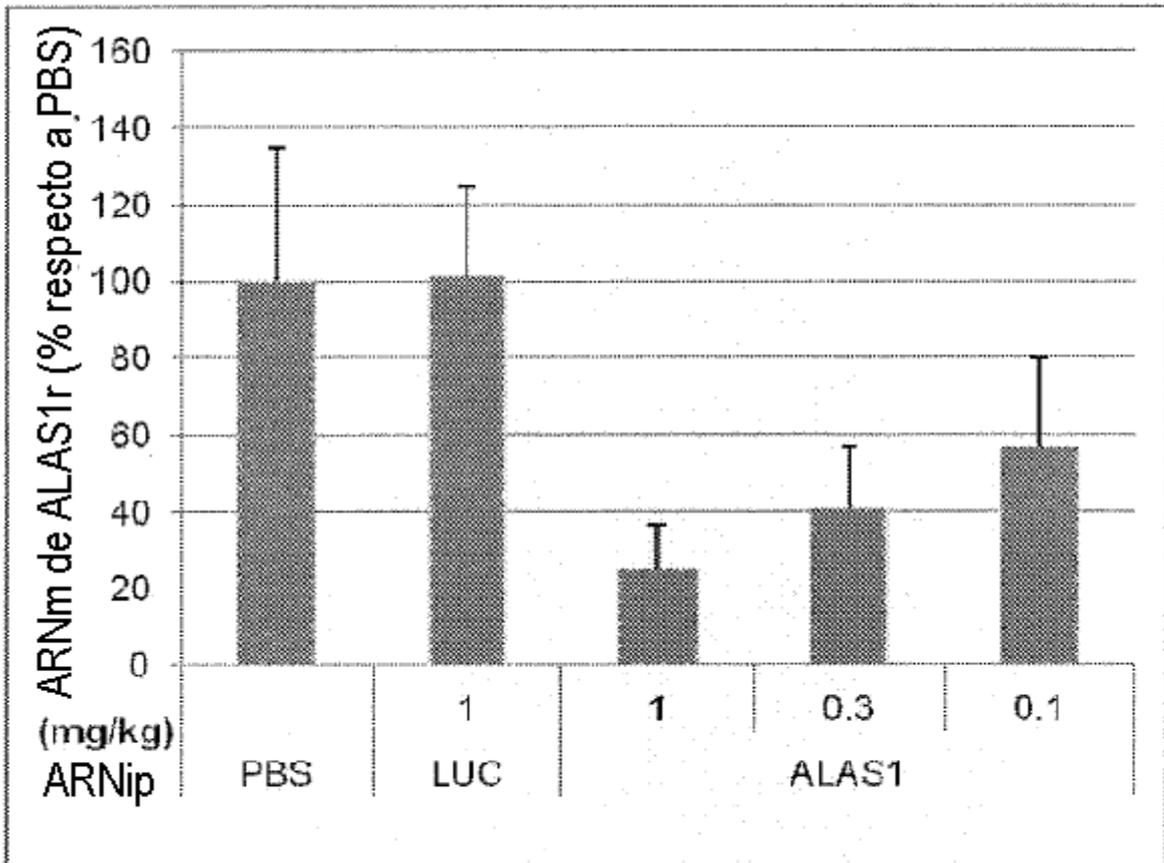


FIG. 6

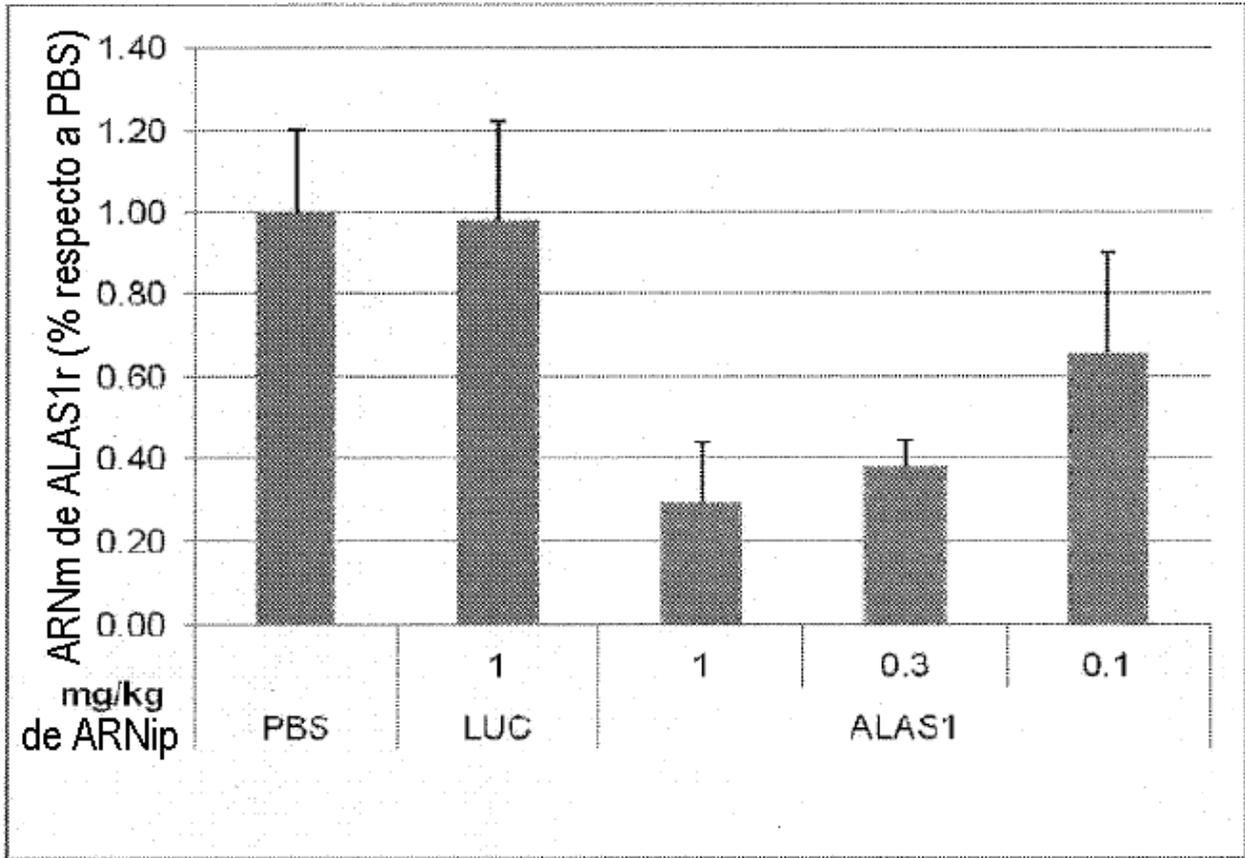


FIG. 7

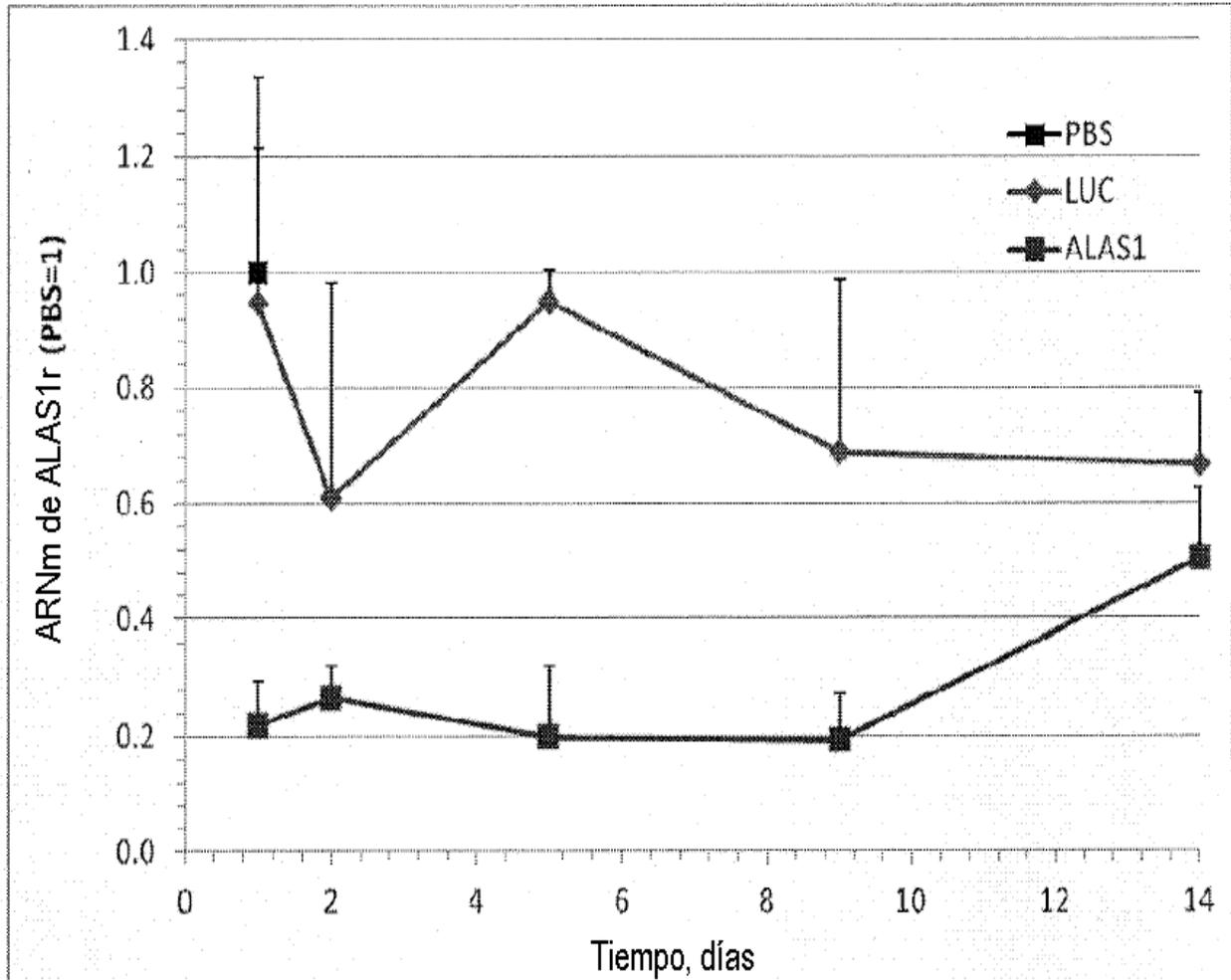


FIG. 8

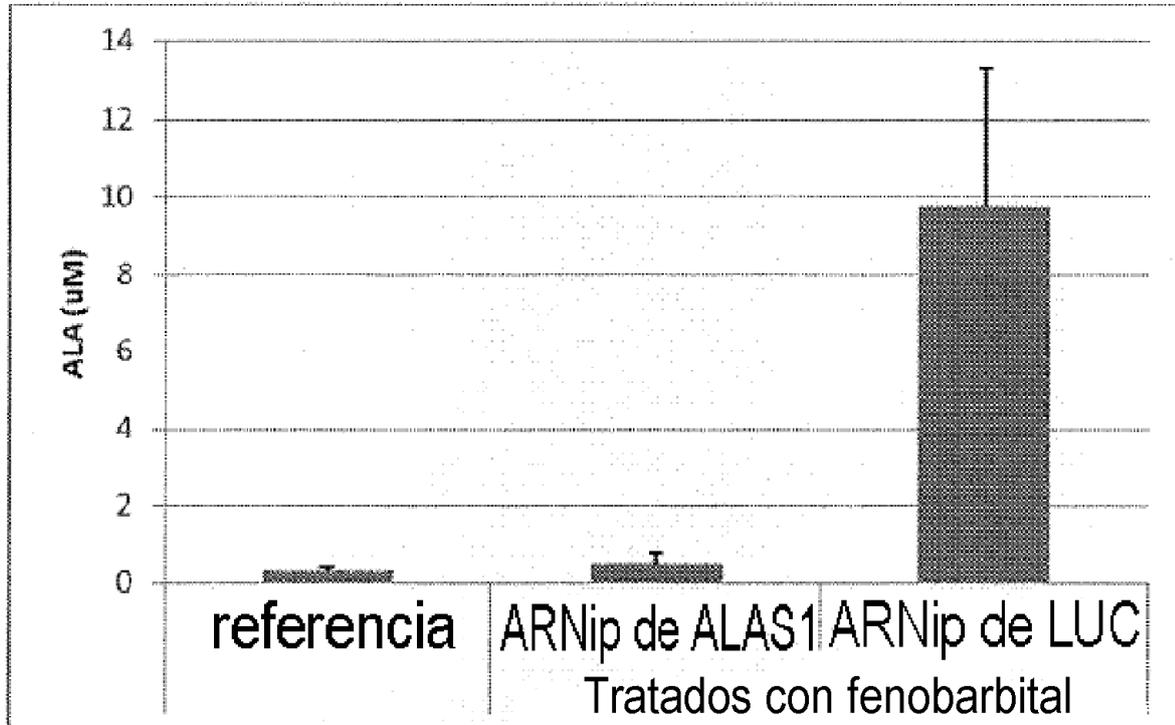


FIG. 9

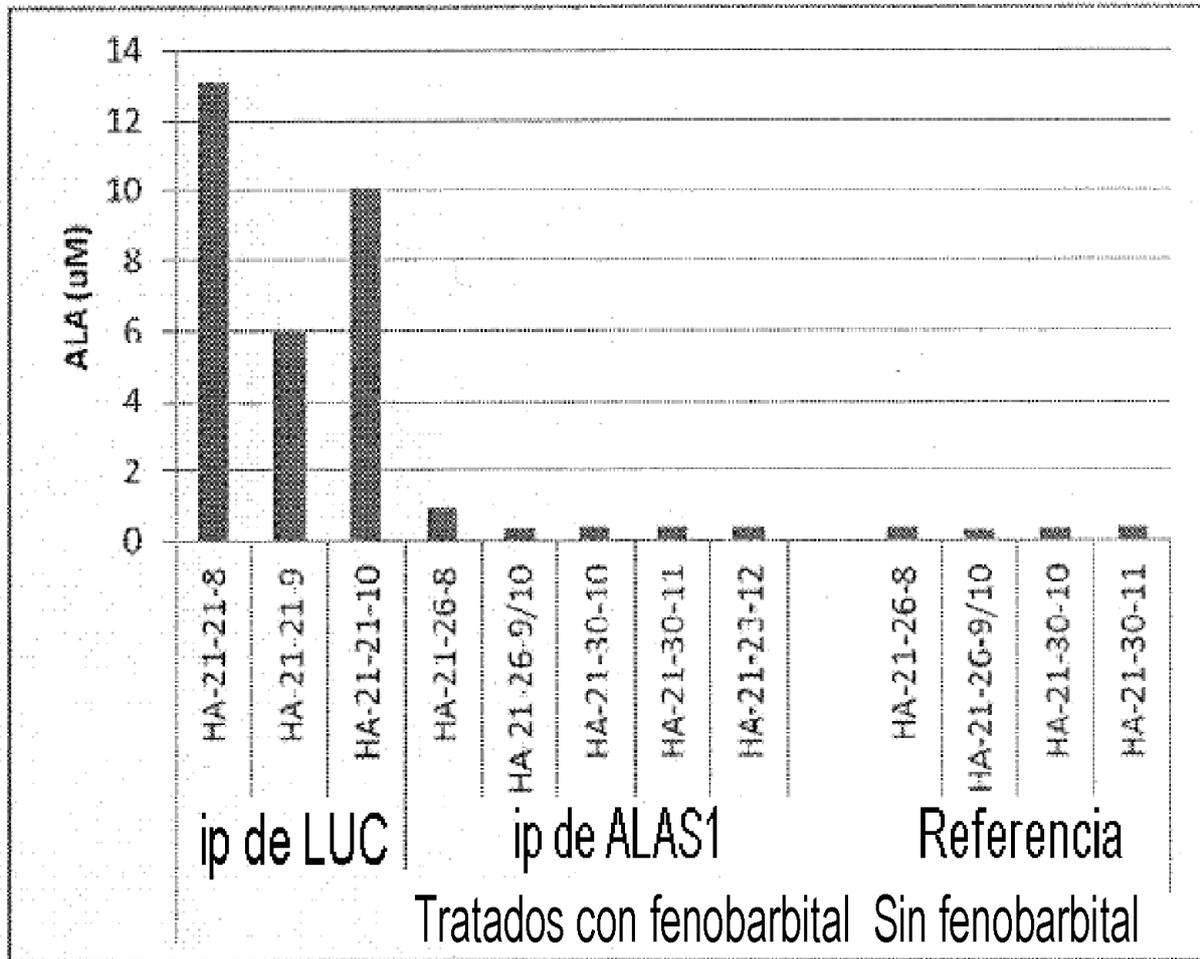


FIG. 10

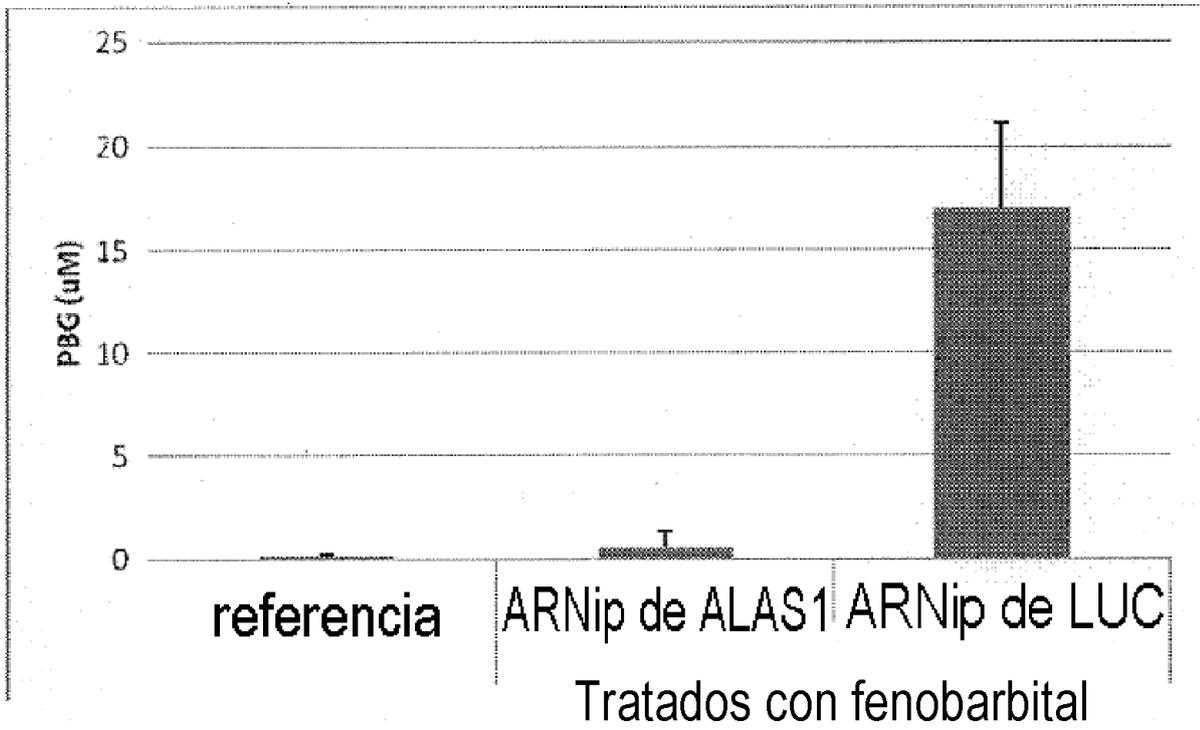


FIG. 11

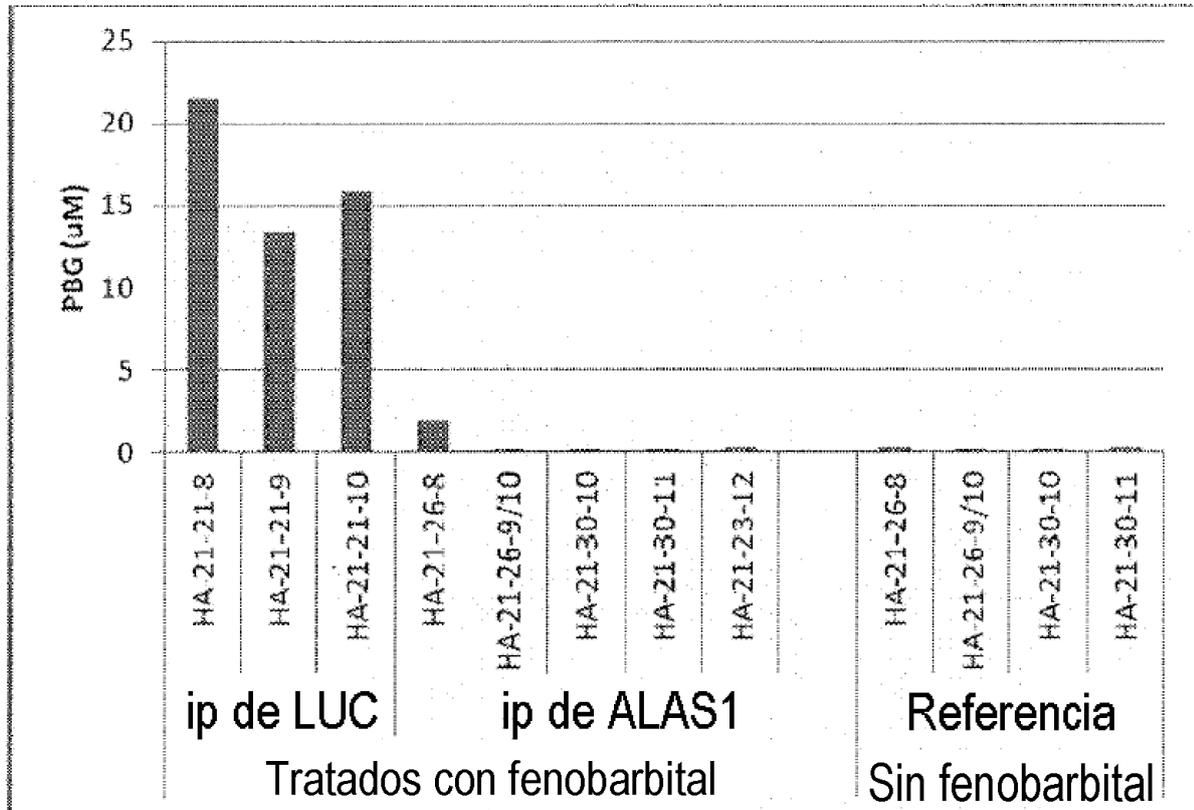


FIG. 12

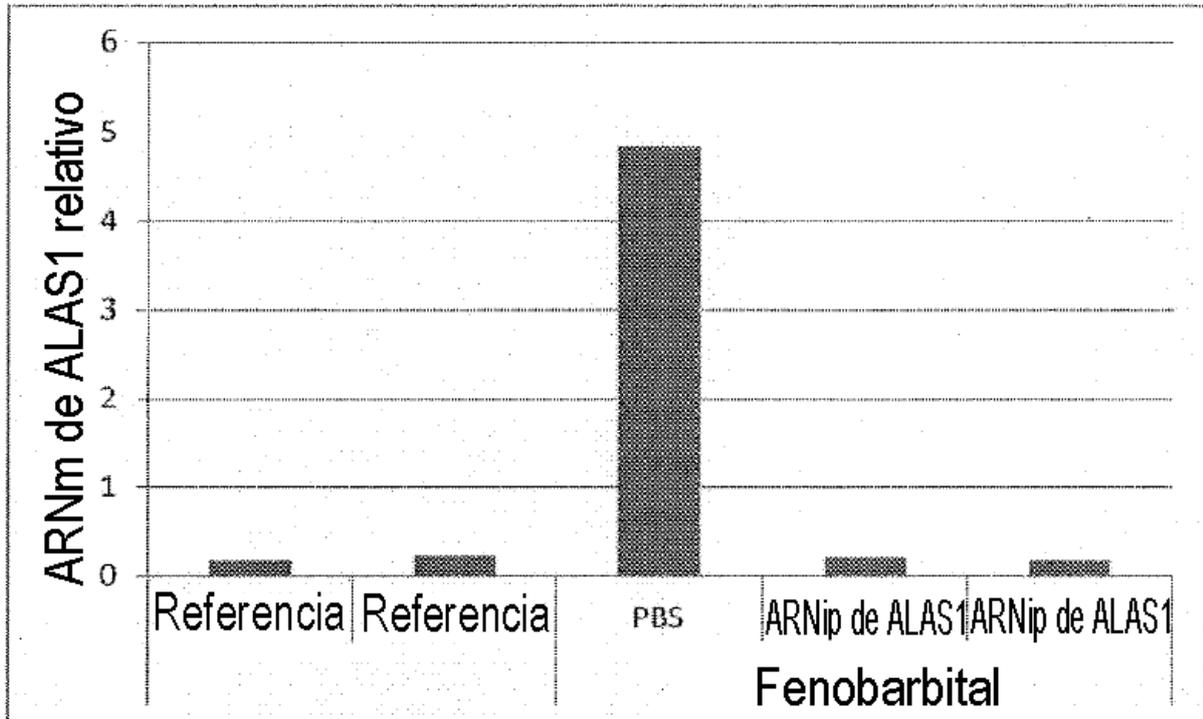


FIG. 13

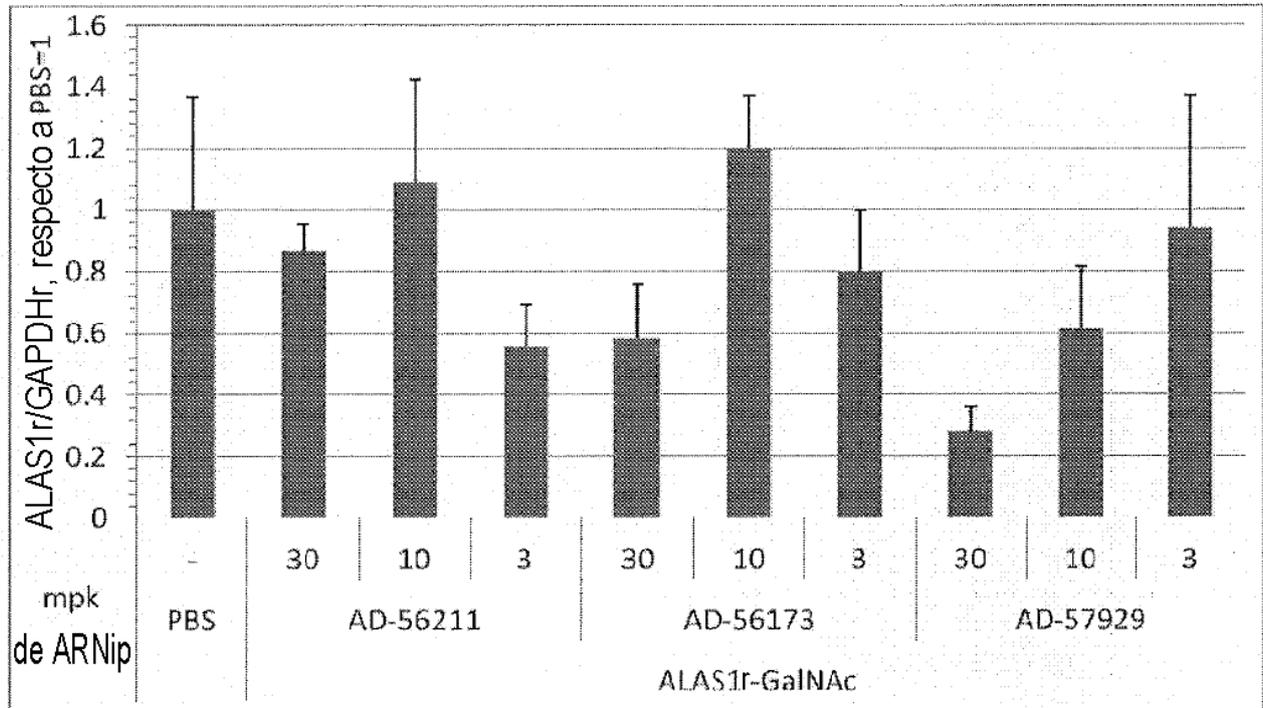


FIG. 14

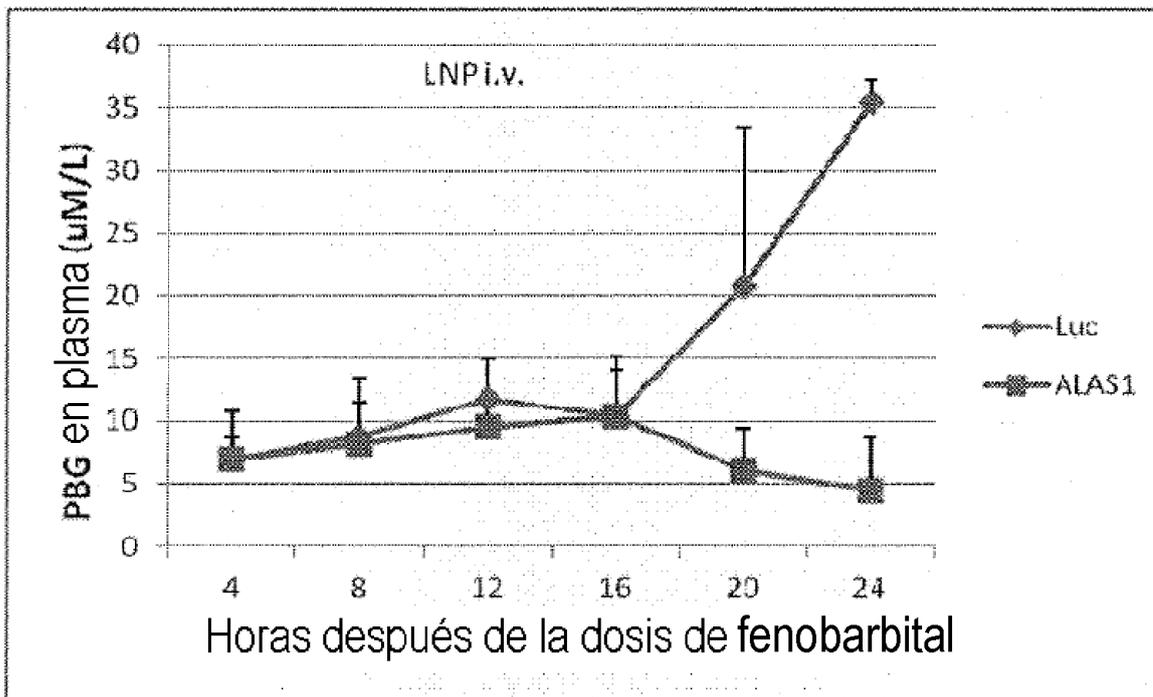
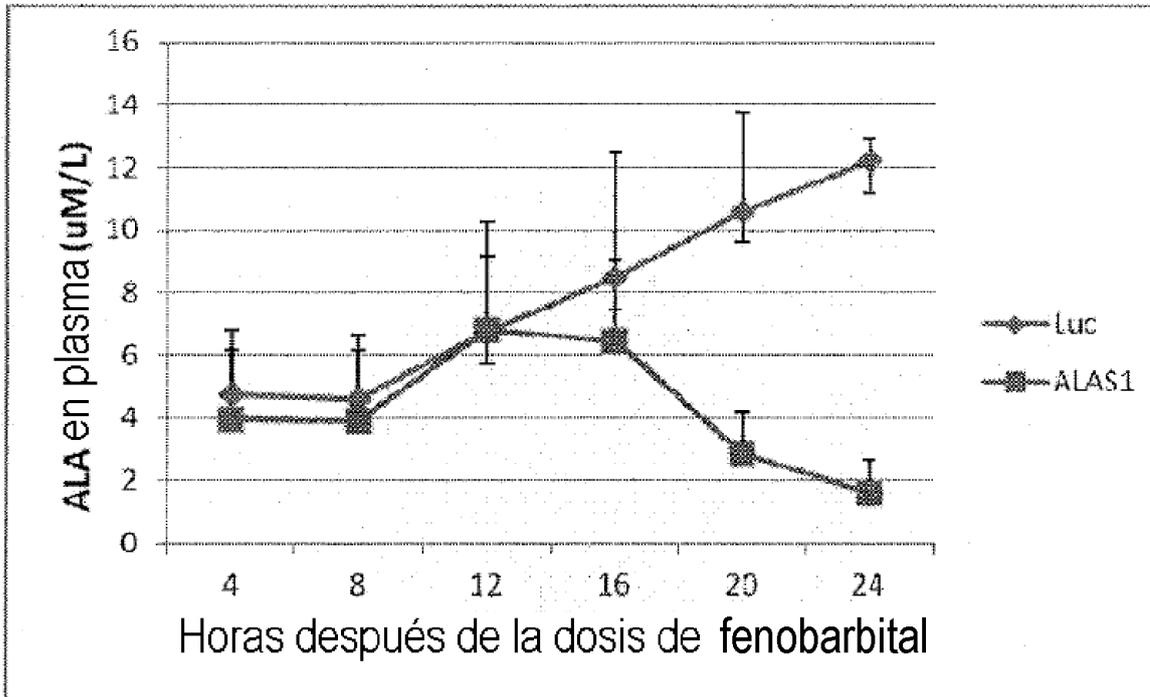


FIG. 15

