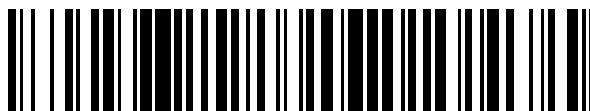


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 740 129**

51 Int. Cl.:

C12N 15/113 (2010.01)

A61K 31/712 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

A61K 31/713 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.09.2009** **E 16156744 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.05.2019** **EP 3109321**

54 Título: **Composiciones formuladas en lípidos y métodos de inhibición de la expresión del gen de suero amiloide A**

30 Prioridad:

25.09.2008 US 100195 P

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

05.02.2020

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**HINKLE, GREGORY;
DE FOUGEROLLES, ANTONIN y
NOVOBRANTSEVA, TATIANA**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 740 129 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 formuladas en lípidos y métodos de inhibición de la expresión del gen de suero amiloide A

Campo

5 La presente invención se define por las reivindicaciones. Generalmente, en el presente documento se describen ácido nucleico bicatenario (ARNbc) formulado en lípidos que se dirige a un gen de suero amiloide A (SAA) y métodos de uso del ARNbc para inhibir la expresión de SAA.

Antecedentes

10 El suero amiloide A (SAA) es una apolipoproteína asociada a HDL de 104 aminoácidos cuyo nivel en la sangre se eleva hasta 1000 veces en respuesta a diversas lesiones que incluyen traumatismo, inflamación y neoplasia. Las proteínas SAA participan en el metabolismo y transporte del colesterol, la inhibición de la proliferación de linfocitos y células endoteliales, la inducción de metaloproteínasa de la matriz y la modulación de la respuesta inflamatoria mediante tanto actividades anti como pro-inflamatorias. Las citocinas pro-inflamatorias, tales como IL-1 β , IL-6 y TNF α , desencadenan la inflamación y estimulan la producción de proteínas de fase aguda, que incluyen SAA1 y SAA2.

15 El hígado es el principal sitio de expresión de SAA, y la expresión de SAA extrahepática también se ha descrito en lesiones ateroescleróticas humanas, en los cerebros de pacientes con enfermedad de Alzheimer y en tejidos sinoviales de pacientes con artritis reumatoide. También se ha encontrado que los niveles de SAA son elevados en el suero de pacientes con una amplia variedad de tumores malignos, que son los mayores en aquellos con carcinoma metastásico de sitios primarios desconocidos. También se ha encontrado que el ARNm y la proteína de SAA se expresan localmente en tejidos de carcinoma de colon humano y en carcinomas epiteliales.

20 Se han descrito cuatro loci de SAA, todos mapeados al cromosoma 11p. Dos de los loci (SAA1 y SAA2) codifican SAA de fase aguda (A-SAA), que presentan un espectacular aumento transitorio en la concentración en suero en respuesta a estímulos inflamatorios; un tercer locus (SAA3) define un pseudogén; y un cuarto locus (SAA4) codifica un SAA constitutivamente expresado (C-SAA), que responde solo moderadamente a estímulos inflamatorios. SAA3 se expresa en ratones y otras especies de mamífero, pero no se expresa en seres humanos. SAA1 y SAA2 son 95 % homólogos en tanto sus regiones codificantes como no codificantes, y se inducen coordinadamente en respuesta a inflamación. Los A-SAA son los precursores circulantes del producto de escisión insoluble amiloide A que se deposita en los principales órganos en amiloidosis secundaria (también denominada amiloidosis AA, o amiloidosis reactiva), una enfermedad progresiva y mortal que es una consecuencia ocasional de afecciones inflamatorias crónicas o episódicas tales como artritis reumatoide y lepra.

25 Se ha mostrado que las moléculas de ARN bicatenario (ARNbc) bloquean la expresión génica en un mecanismo regulador altamente conservado conocido como interferencia por ARN (iARN). El documento de patente WO 99/32619 (Fire et al.) desveló que el uso de un ARNbc de al menos 25 nucleótidos de longitud inhibía la expresión de genes en *C. elegans*. También se ha mostrado que ARNbc degrada el ARN diana en otros organismos, que incluyen plantas (véase, por ejemplo, el documento de patente WO 99/53050, Waterhouse et al.; y el documento de patente WO 99/61631, Heifetz et al.), *Drosophila* (véase, por ejemplo, Yang, D., et al., Curr. Biol. (2000) 10:1191-1200) y mamíferos (véanse los documentos de patente WO 00/44895, Limmer; y DE 101 00 586.5, Kreutzer et al.).

30 Se describen en el documento de patente WO 2006/071691 un ARNbc (ARNip) que se dirige a SAA1 y diversas modificaciones químicas del mismo, una conjugación de dicho ARNip con un resto funcional, un medicamento para tratar un trastorno asociado a SAA1 que comprende dicho ARNip y un método basado en ARNip de atenuación de la expresión de SAA1 en el ojo de un sujeto. La administración de ARNip específicos que se dirigen a SAA4 en la inhibición de la expresión de SAA se describe en el documento de patente WO 2003/012027.

Sumario

35 La presente invención se define por las reivindicaciones. Por consiguiente, la presente invención se refiere en un primer aspecto a un ácido ribonucleico bicatenario (ARNbc), en donde dicho ARNbc comprende una hebra codificante y una hebra no codificante que comprende una región de complementariedad que es complementaria a al menos una parte de un ARNm que codifica suero amiloide A (SAA), en donde (i) el ARNbc consiste en SEQ ID NOs: 225 y 226 o consiste en GccGAAGcuucuuuucGuudTdT (SEQ ID NO: 69) y AACGAAAAGAAGCUUCGGCdTdT (SEQ ID NO: 70), (ii) el ARNbc consiste en SEQ ID NOs: 233 y 234 o consiste en GuuccuuGgGAGGcuuuudTdT (SEQ ID NO: 77) y AAAAGCCUCGCcAAGGAACdTdT (SEQ ID NO: 78), (iii) el ARNbc consiste en SEQ ID NOs: 189 y 190 o consiste en cuGAGAAuAcuGAGcuucdTdT (SEQ ID NO: 33) y GAAGCUcAGuAUUUCUcAGdTdT (SEQ ID NO: 34), (iv) el ARNbc consiste en SEQ ID NOs: 227 y 228 o consiste en GAAGcuucuuuucGuuccdTdT (SEQ ID NO: 71) y AGGAACGAAAAGAAGCUUCdTdT (SEQ ID NO: 72), (v) el ARNbc consiste en SEQ ID NOs: 221 y 222 o consiste en ccccAAucAcuuccGAccdTdT (SEQ ID NO: 65) y AGGUCGGAAGUGAUUGGGGdTdT (SEQ ID NO: 66), (vi) el ARNbc consiste en SEQ ID NOs: 169 y 170 o consiste en cccAAucAcuuccGAccuGdTdT (SEQ ID NO: 13) y cAGGUCGGAAGUGAUUGGGdTdT (SEQ ID NO: 14), (vii) el ARNbc consiste en SEQ ID NOs: 167 y 168 o consiste en AAuAcuuccAuGcucGGGGdTdT (SEQ ID NO: 11) y CCCCAGcAUGGAAGuAUUdTdT

(SEQ ID NO: 12), o (viii) el ARNbc consiste en AuAcuuccAuGcucGGGGGdTdT (SEQ ID NO: 99) y CCCCCGAGcAUGGAAGuAUdTdT (SEQ ID NO: 100), en donde c es 2'-O-metilcitidina-3'-fosfato, dT es 2'-desoxitimidina-3'-fosfato y u es 2'-O-metiluridina-3'-fosfato. En un segundo aspecto, la presente invención se refiere a una célula no humana, no embrionaria y/o aislada que contiene el ARNbc de la invención. En un tercer aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica para inhibir expresión de un gen de SAA que comprende el ARNbc de la invención. En un cuarto aspecto, la presente invención se refiere a un método de inhibición de la expresión de SAA en una célula, comprendiendo el método: (a) introducir en la célula el ARNbc de la invención; y (b) mantener la célula producida en la etapa (a) durante un tiempo suficiente para obtener la degradación del transcrito de ARNm de un gen de SAA, inhibiendo así la expresión del gen de SAA en la célula, en donde se excluye cualquier método de tratamiento del cuerpo humano o animal por terapia. En un quinto aspecto, la presente invención se refiere a un ARNbc de la invención para su uso en el tratamiento de un trastorno asociado a la expresión de SAA en un ser humano.

En el presente documento también se desvelan composiciones que contienen ácido ribonucleico bicatenario (ARNbc) y métodos de inhibición de la expresión de un gen de SAA, tal como uno o ambos de SAA1 y SAA2, tal como en una célula o mamífero. En el presente documento también se desvelan composiciones y métodos de tratamiento de afecciones y enfermedades patológicas provocadas por la expresión de un gen de SAA, tal como amiloidosis. Los ARNbc incluidos en las composiciones también desveladas en el presente documento incluyen un ARNbc que tiene una hebra de ARN (la hebra no codificante) que tiene una región que es inferior a 30 nucleótidos de longitud, generalmente 19-24 nucleótidos de longitud, y que es complementaria a al menos parte de un transcrito de ARNm de un gen de SAA.

Un ARNbc para inhibir la expresión de un gen de SAA puede incluir al menos dos hebras que son complementarias entre sí. El ARNbc incluye una hebra codificante y una hebra no codificante. La hebra no codificante incluye una secuencia de nucleótidos que es complementaria a al menos parte de un ARNm que codifica SAA, y la región de complementariedad es inferior a 30 nucleótidos de longitud, y al menos 15 nucleótidos de longitud. Generalmente, el ARNbc es 19 a 24, por ejemplo, 19 a 21 nucleótidos de longitud. El ARNbc, tras ponerse en contacto con una célula que expresa SAA, inhibe la expresión de un gen de SAA al menos 40 %, tal como cuando se ensaya por un método como se describe en el presente documento.

Por ejemplo, las moléculas de ARNbc también desveladas en el presente documento pueden incluir una hebra codificante que se selecciona del grupo que consiste en las secuencias codificante de la Tabla 2 y una hebra no codificante que se selecciona del grupo que consiste en las secuencias no codificantes de la Tabla 2. Las moléculas de ARNbc también desveladas en el presente documento pueden incluir nucleótidos que existen de forma natural o pueden incluir al menos un nucleótido modificado, tal como un nucleótido modificado con 2'-O-metilo, un nucleótido que tiene un grupo 5'-fosforotioato y un nucleótido terminal unido a un derivado de colesterilo. Alternativamente, el nucleótido modificado se puede elegir del grupo de: un nucleótido modificado con 2'-desoxi-2'-flúor, un nucleótido modificado con 2'-desoxi, un nucleótido bloqueado, un nucleótido abásico, nucleótido modificado con 2'-amino, nucleótido modificado con 2'-alquilo, nucleótido de morfolino, un fosforamidado y un nucleótido que comprende una base no natural. Generalmente, dicha secuencia modificada se basará en una primera secuencia de dicho ARNbc seleccionada del grupo que consiste en las secuencias codificantes de la Tabla 2 y una segunda secuencia seleccionada del grupo que consiste en las secuencias no codificantes de la Tabla 2.

El ARNbc puede incluir una hebra codificante que incluye al menos 15 nucleótidos contiguos de una secuencia de hebra codificante seleccionada de la Tabla 2. El ARNbc puede incluir una hebra no codificante que incluye al menos 15 nucleótidos contiguos de una secuencia no codificante seleccionada de la Tabla 2.

La hebra codificante puede incluir 15 o más nucleótidos contiguos de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 127, SEQ ID NO: 95, SEQ ID NO: 105, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 155, SEQ ID NO: 193, SEQ ID NO: 283, SEQ ID NO: 251, SEQ ID NO: 261, SEQ ID NO: 215, SEQ ID NO: 179, o SEQ ID NO: 311. La hebra no codificante puede incluir 15 o más nucleótidos contiguos de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 128, SEQ ID NO: 96, SEQ ID NO: 106, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 156, SEQ ID NO: 194, SEQ ID NO: 284, SEQ ID NO: 252, SEQ ID NO: 262, SEQ ID NO: 216, SEQ ID NO: 180, o SEQ ID NO: 312. La hebra codificante puede consistir en SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 127, SEQ ID NO: 95, SEQ ID NO: 105, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 155, SEQ ID NO: 193, SEQ ID NO: 283, SEQ ID NO: 251, SEQ ID NO: 261, SEQ ID NO: 215, SEQ ID NO: 179, o SEQ ID NO: 311 y la hebra no codificante puede consistir en SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 128, SEQ ID NO: 96, SEQ ID NO: 106, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 156, SEQ ID NO: 194, SEQ ID NO: 284, SEQ ID NO: 252, SEQ ID NO: 262, SEQ ID NO: 216, SEQ ID NO: 180, o SEQ ID NO: 312. El ARNbc puede ser 18397, 18379, 18445, 18420, 18415, 18431, o 18326. El ARNbc se puede dirigir a SEQ ID NO: 193, SEQ ID NO: 283, SEQ ID NO: 251, SEQ ID NO: 261, SEQ ID NO: 215, SEQ ID NO: 179, o SEQ ID NO: 311.

El ARNbc se puede conjugar con un ligando. El ARNbc se puede formular en una formulación de lípidos. El ARNbc se puede formular en una formulación de LNP, una formulación de LNP01, una formulación de LÍPIDO A-SNALP, o una formulación de SNALP.

5 La administración del ARNbc a una célula puede dar como resultado aproximadamente 97 %, 95 %, 92 %, 89 % o 74 % de inhibición de la expresión de ARNm de SAA como se mide por un ensayo de PCR en tiempo real. La administración del ARNbc a una célula puede dar como resultado aproximadamente 89 %, 87 %, 83 %, 68 % o 54 % de inhibición de la expresión de ARNm de SAA como se mide por un ensayo de ADN ramificado. La administración del ARNbc a una célula puede dar como resultado aproximadamente 100 %, 99 % o 93 % de inhibición de la expresión de proteínas de SAA como se mide por un ensayo de ELISA. El ARNbc puede tener una CI_{50} inferior a 10 pM. La administración del ARNbc puede reducir la expresión de proteínas de SAA aproximadamente 80 % en ratones en comparación con un control de ARNip.

10 El ARNbc puede incluir un nucleótido protuberante. El ARNbc puede incluir un nucleótido protuberante dTdT. El ARNbc puede comprender dos nucleótidos protuberantes dTdT en el extremo 3' de la hebra codificante y la hebra no codificante.

La hebra codificante puede tener 21 nucleótidos de longitud. La hebra no codificante puede tener 21 nucleótidos de longitud. El ARNbc puede comprender uno o más 2'-O-metilcitidina-5'-fosfatos y/o uno o más 2'-O-metiluridina-5'-fosfatos.

15 En el presente documento también se desvela una célula que contiene al menos uno de los ARNbc desvelados en el presente documento. La célula es generalmente una célula de mamífero, tal como una célula humana.

20 En el presente documento también se desvela una composición farmacéutica para inhibir la expresión de un gen de SAA en un organismo, generalmente un sujeto humano. La composición incluye normalmente uno o más de los ARNbc descritos en el presente documento y un excipiente farmacéuticamente aceptable o vehículo de administración. La composición se puede usar para tratar amiloidosis, por ejemplo, amiloidosis AA (secundaria o reactiva).

25 La composición farmacéutica se pueden formular para administración de una pauta posológica descrita en el presente documento, por ejemplo, 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 cada semana. La composición farmacéutica se puede mantener durante un mes o más, por ejemplo, uno, dos, tres, o seis meses, o un año o más.

30 Una composición que contiene un ARNbc desvelado en el presente documento, es decir, un ARNbc que se dirige a SAA, se pueden administrar con un agente terapéutico no ARNbc, tal como un agente conocido para tratar amiloidosis, o un síntoma de la amiloidosis. Por ejemplo, un ARNbc desvelado en el presente documento se puede administrar con un agente para el tratamiento de un trastorno inflamatorio, tal como artritis inflamatoria crónica, o un agente para el tratamiento de disfunción renal. Los agentes a modo de ejemplo para el tratamiento de artritis inflamatoria crónica incluyen productos biológicos de anti-citocina, tales como anakinra, tocilizumab, etanercept, infliximab, adlimumab, certolizumab, rituxan, rituximab, clorambucilo y eprodisato (Neurochem, Canadá). Los agentes a modo de ejemplo para el tratamiento de disfunción renal incluyen, por ejemplo, diuréticos, inhibidores de ECA (enzima convertidora de angiotensina), ARBs (agentes bloqueantes del receptor de angiotensina), diálisis en insuficiencia renal terminal (ESRD) y trasplante renal.

35 Un ARNbc de SAA se puede administrar a un paciente, y entonces el agente no ARNbc se puede administrar al paciente (o viceversa). Un ARNbc de SAA y el agente terapéutico no ARNbc se pueden administrar al mismo tiempo.

En el presente documento también se desvela un método de inhibición de la expresión de un gen de SAA en una célula realizando las siguientes etapas:

40 (a) introducir en la célula un ácido ribonucleico bicatenario (ARNbc), en donde el ARNbc incluye al menos dos secuencias que son complementarias entre sí. El ARNbc tiene una hebra codificante que tiene una primera secuencia y una hebra no codificante que tiene una segunda secuencia; la hebra no codificante tiene una región de complementariedad que es complementaria a al menos una parte de un ARNm que codifica SAA, y donde la región de complementariedad es inferior a 30 nucleótidos de longitud, generalmente 19-24 nucleótidos de longitud, y donde el ARNbc, tras el contacto con una célula que expresa un SAA, inhibe la expresión de un gen de SAA al menos 40 %;

y

45 (b) mantener la célula producida en la etapa (a) durante un tiempo suficiente para obtener la degradación del transcrito de ARNm de gen de SAA, inhibiendo así la expresión de un gen de SAA en la célula.

50 El método puede ser para inhibir la expresión génica en una célula tumoral.

55 En el presente documento también se desvelan métodos de tratamiento, prevención o gestión de procesos patológicos mediados por la expresión de SAA, tales como amiloidosis, por ejemplo, amiloidosis AA. El método puede incluir administrar a un paciente en necesidad de tal tratamiento, prevención o gestión una cantidad terapéuticamente o profilácticamente eficaz de uno o más de los ARNbc desvelados en el presente documento. El paciente puede tener amiloidosis. La administración del ARNbc que se dirige a SAA puede aliviar o puede mitigar la

5 gravedad de al menos un síntoma de un trastorno mediado por SAA en el paciente. El paciente puede tener artritis psoriásica, artritis juvenil crónica, espondilitis anquilosante, síndrome de Behcet, síndrome de Reiter, enfermedad de Still del adulto, enfermedad inflamatoria del intestino, fiebres periódicas hereditarias, tuberculosis, osteomielitis, bronquiectasia, lepra, pielonefritis, úlceras de decúbito, enfermedad de Whipple, acné conglobata, hipo/agammaglobulinemia con inmunodeficiencia común variable, fibrosis quística, hepatoma, carcinoma renal, enfermedad de Castleman, enfermedad de Hodgkin, leucemia de células pilosas del adulto, enfermedad de Waldenström, una neoplasia, infecciones crónicas, una enfermedad inflamatoria crónica, artritis crónica, septicemia crónica, un síndrome de fiebre periódica, fiebre mediterránea familiar o enfermedad de Crohn.

10 En el presente documento también se desvela un vector para inhibir la expresión de un gen de SAA en una célula. El vector puede incluir al menos una secuencia reguladora operativamente unida a una secuencia de nucleótidos que codifica al menos una hebra de un ARNbc desvelado en el presente documento.

En el presente documento también se desvela una célula que contiene un vector para inhibir la expresión de un gen de SAA en una célula. El vector incluye una secuencia reguladora operativamente unida a una secuencia de nucleótidos que codifica al menos una hebra de uno del ARNbc.

15 En el presente documento también se desvela una composición que contiene un ARNbc de SAA, en combinación con un segundo ARNbc que se dirige a un segundo gen implicado en una enfermedad patológica, y útil para tratar la enfermedad, por ejemplo, amiloidosis.

20 Los detalles de la presente divulgación se exponen en los dibujos adjuntos y la descripción a continuación. Otras características, objetos y ventajas de la presente divulgación serán evidentes a partir de la descripción y dibujos, y de las reivindicaciones.

Breve descripción de los dibujos

Las FIGs. 1A y 1B son gráficos que muestran el efecto de las citocinas IL-1 β y IL-6 sobre los niveles de ARNm y de proteína de SAA en cultivo de células HepB3.

25 La FIG. 2 es un gráfico de barras que ilustra los niveles de ARNm de SAA en células HepB3 tras la administración de ARNip de SAA candidatos.

La FIG. 3 es un gráfico de barras que ilustra los niveles de proteína de SAA en células HepB3 tras la administración de ARNip de SAA candidatos.

Las FIGs. 4A-4G son gráficos que ilustran curvas de respuesta a dosis para ARNip de SAA seleccionados.

30 La FIG. 5 es un gráfico que muestra que los niveles de SAA aumentaron en todos los ratones probados 24 horas después de la inyección de LPS en comparación con los niveles de SAA previos a la inyección de LPS.

La FIG. 6 es un gráfico que muestra que 18445 formulado en LNP01 y 18445 formulado en SNALP regularon significativamente por disminución los niveles de SAA en comparación con controles.

La FIG. 7 es un gráfico que muestra que la expresión de SAA1h puede durar durante aproximadamente 2 semanas después de una única inyección de adenovirus de SAA1h.

35 La FIG. 8 es una fotografía que muestra una construcción para la expresión de SAA1h en hepatocitos.

La FIG. 9 es un gráfico que muestra la expresión de SAA1h en ratones tras inyección hidrodinámica.

La FIG. 10 es una fotografía que muestra una construcción que se diseñó para la expresión del transgén SAA1h.

Descripción detallada

40 La presente divulgación proporciona ARNbc y métodos de uso de los ARNbc para inhibir la expresión de un gen de SAA en una célula o un mamífero donde el ARNbc se dirige a un gen de SAA. Los ARNbc desvelados en el presente documento se pueden dirigir tanto a un gen de SAA1 como a un gen de SAA2. En el presente documento también se desvelan composiciones y métodos de tratamiento de afecciones y enfermedades patológicas, tales como una amiloidosis, en un mamífero provocado por la expresión de un gen de SAA. El ARNbc se dirige a la degradación específica de secuencia de ARNm mediante un proceso conocido como interferencia por ARN (iARN).

45 Los ARNbc de las composiciones desveladas en el presente documento incluyen una hebra de ARN (la hebra no codificante) que tiene una región que es inferior a 30 nucleótidos de longitud, generalmente 19-24 nucleótidos de longitud, y es sustancialmente complementaria a al menos parte de un transcrito de ARNm de un gen de SAA. El uso de estos ARNbc permite la degradación dirigida de ARNm de genes que participan en patologías asociadas a una respuesta inflamatoria (por ejemplo, una respuesta inflamatoria de fase aguda) en mamíferos. Las dosificaciones muy bajas de ARNbc de SAA en particular pueden mediar específicamente y eficientemente en iARN, dando como resultado la significativa inhibición de la expresión de un gen de SAA. Usando ensayos basados en

50

células, los presentes inventores han demostrado que el ARNbc que se dirige a SAA puede mediar específicamente y eficientemente en iARN, dando como resultado la significativa inhibición de la expresión de un gen de SAA. Así, los métodos y composiciones que incluyen estos ARNbc son útiles para tratar procesos patológicos que se pueden mediar regulando por disminución SAA, tal como en el tratamiento de amiloidosis.

5 Los ARNbc de las composiciones pueden incluir una hebra codificante que incluye al menos 15, 16, 17, 18, 19, 20, o 21 o más nucleótidos de una secuencia de hebra codificante seleccionada de la Tabla 2. Los ARNbc de las composiciones pueden incluir una hebra no codificante que incluye al menos 15, 16, 17, 18, 19, 20, o 21 o más nucleótidos de una secuencia de hebra codificante seleccionada de la Tabla 2. La hebra codificante puede incluir 15, 16, 17, 18, 19, 20, o 21 o más nucleótidos contiguos de SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 127, SEQ ID NO: 95, SEQ ID NO: 105, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 23, o SEQ ID NO: 155. La hebra no codificante puede incluir 15, 16, 17, 18, 19, 20, o 21 o más nucleótidos contiguos de SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 128, SEQ ID NO: 96, SEQ ID NO: 106, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 24, o SEQ ID NO: 156.

10 Los ARNbc de las composiciones se pueden dirigir a 15, 16, 17, 18, 19, 20, o 21 o más nucleótidos contiguos de un ARNm de SAA, SEQ ID NO: 286, SEQ ID NO: 220, SEQ ID NO: 230, SEQ ID NO: 324, SEQ ID NO: 223, SEQ ID NO: 386 y/o SEQ ID NO: 373.

15 El ARNbc se puede conjugar con un ligando. El ARNbc se puede formular en una formulación de lípidos. El ARNbc se puede formular en una formulación de LNP, una formulación de LNP01, una formulación de de Lípido A-SNALP, o una formulación de SNALP.

20 Los ARNbc de las composiciones, cuando se administran a una célula, pueden dar como resultado aproximadamente 50-100 %, 97 %, 95 %, 92 %, 89 %, o 74 % de inhibición de la expresión de ARNm de SAA como se mide por un ensayo de PCR en tiempo real. Los ARNbc de las composiciones, cuando se administran a una célula, pueden dar como resultado aproximadamente 50-100 %, 89 %, 87 %, 83 %, 68 %, o 54 % de inhibición de la expresión de ARNm de SAA como se mide por un ensayo de ADN ramificado. Los ARNbc de las composiciones, cuando se administran a una célula, pueden dar como resultado aproximadamente 50-100 %, 100 %, 99 %, o 93 % de inhibición de la expresión de proteínas de SAA como se mide por un ensayo de ELISA. Los ARNbc de las composiciones tienen una CI_{50} inferior a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, o 15 pM. Los ARNbc de las composiciones pueden reducir la expresión de proteínas de SAA aproximadamente 40, 50, 60, 70, 80, o 90 % en ratones en comparación con un control de ARNip.

25 Los métodos y composiciones que contienen un ARNbc de SAA son útiles para tratar procesos patológicos mediados por la expresión de SAA, tal como trastornos asociados a la inflamación, tales como amiloidosis. Otros procesos patológicos pueden incluir artritis psoriásica, artritis juvenil crónica, espondilitis anquilosante, síndrome de Behcet, síndrome de Reiter, enfermedad de Still del adulto, enfermedad inflamatoria del intestino, fiebres periódicas hereditarias, tuberculosis, osteomielitis, bronquiectasia, lepra, pielonefritis, úlceras de decúbito, enfermedad de Whipple, acné conglobata, hipo/agammaglobulinemia con inmunodeficiencia común variable, fibrosis quística, hepatoma, carcinoma renal, enfermedad de Castleman, enfermedad de Hodgkin, leucemia de células pilosas del adulto, enfermedad de Waldenström, una neoplasia, infecciones crónicas, una enfermedad inflamatoria crónica, artritis crónica, septicemia crónica, un síndrome de fiebre periódica, fiebre mediterránea familiar, o enfermedad de Crohn.

30 La siguiente descripción detallada desvela cómo preparar y usar las composiciones que contienen ARNbc para inhibir la expresión de un gen de SAA, así como las composiciones y los métodos de tratamiento de las enfermedades y trastornos provocados por la expresión de estos genes. Las composiciones farmacéuticas desveladas en el presente documento incluyen un ARNbc que tiene una hebra no codificante que comprende una región de complementariedad que tiene menos de 30 nucleótidos de longitud, generalmente 19-24 nucleótidos de longitud, y es sustancialmente complementaria a al menos parte de un transcrito de ARN de un gen de SAA, junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Las composiciones desveladas en el presente documento también incluyen un ARNbc que tiene una hebra no codificante que tiene una región de complementariedad que tiene menos de 30 nucleótidos de longitud, generalmente 19-24 nucleótidos de longitud, y es sustancialmente complementaria a al menos parte de un transcrito de ARN de un gen de SAA.

35 Por consiguiente, en algunos aspectos, se desvelan en el presente documento las composiciones farmacéuticas que contienen un ARNbc de SAA y un vehículo farmacéuticamente aceptable, los métodos de uso de las composiciones para inhibir la expresión de un gen de SAA, y los métodos de uso de las composiciones farmacéuticas para tratar enfermedades provocadas por la expresión de un gen de SAA.

I. Definiciones

40 Por comodidad, se proporciona a continuación el significado de ciertos términos y expresiones usados en la memoria descriptiva, ejemplos y reivindicaciones adjuntas. Si existe una evidente discrepancia entre el uso de un término en otras partes de esta memoria descriptiva y su definición proporcionada en esta sección, debe prevalecer la definición en esta sección.

"G", "C", "A" y "U" representan cada uno generalmente un nucleótido que contiene guanina, citosina, adenina y uracilo como base, respectivamente. "T" y "dT" se usan indistintamente en el presente documento y se refieren a un desoxirribonucleótido en donde la nucleobase es timina, por ejemplo, desoxirribotimina. Sin embargo, se entenderá que el término "ribonucleótido" o "nucleótido" o "desoxirribonucleótido" también se pueden referir a un nucleótido modificado, como se detalla adicionalmente más adelante, o un resto de sustitución sustituto. El experto conoce bien que la guanina, citosina, adenina y uracilo se pueden sustituir por otros restos sin alterar sustancialmente las propiedades de apareamiento de bases de un oligonucleótido que comprende un nucleótido que lleva dicho resto de sustitución. Por ejemplo, sin limitación, un nucleótido que comprende inosina como su base se puede aparearse con bases con nucleótidos que contienen adenina, citosina o uracilo. Por tanto, los nucleótidos que contienen uracilo, guanina o adenina se pueden sustituir en las secuencias de nucleótidos de la presente divulgación por un nucleótido que contiene, por ejemplo, inosina. También se desvelan en el presente documento secuencias que comprenden dichos restos de sustitución.

Como se usa en el presente documento, "suero amiloide A" ("SAA") se refiere a un gen de SAA1 o SAA2 (por ejemplo, un gen de SAA1 o SAA2 endógeno) en una célula. SAA1 también se conoce como suero amiloide A1, MGC111216, PIG4, SAA y proteína 4 inducible por la proteína tumoral p53 (TP53I4). La secuencia de dos transcritos de ARNm de SAA1 humano alternativos se puede encontrar en NM_000331.3 y NM_199161.2. La secuencia de ARNm de SAA1 de ratón se puede encontrar en NM_009117.3. Una secuencia de ADNc de trazado tipo SAA de longitud casi completa individual de mono cinomolgo es Mfa#S27795076 (*Macaca fascicularis*).

SAA2 también se conoce como suero amiloide A2 y SAA. La secuencia de dos transcritos de ARNm de SAA2 humano alternativos se puede encontrar en NM_001127380.1 y NM_030754.3. La secuencia de ARNm de SAA2 de ratón está en NM_011314.1.

Como se usa en el presente documento, "secuencia diana" se refiere a una porción contigua de la secuencia de nucleótidos de una molécula de ARNm formada durante la transcripción de un gen de SAA, que incluye ARNm que es un producto del procesamiento de ARN de un producto de transcripción primario. La secuencia diana es complementaria a la secuencia no codificante de ARNbc y así tiene la misma secuencia que la secuencia codificante de ARNbc, menos cualquier nucleótido protuberante que esté presente en la hebra codificante.

Como se usa en el presente documento, el término "hebra que comprende una secuencia" se refiere a un oligonucleótido que comprende una cadena de nucleótidos que se describe por la secuencia referida usando la nomenclatura convencional de nucleótidos.

Como se usa en el presente documento, y a menos que se indique lo contrario, el término "complementario", cuando se usa 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 dúplex en ciertas condiciones con un oligonucleótido o polinucleótido que comprende la segunda secuencia de nucleótidos, como se entenderá por el experto. Dichas condiciones pueden, por ejemplo, ser condiciones rigurosas, donde las condiciones rigurosas pueden incluir: NaCl 400 mM, PIPES 40 mM a pH 6,4, EDTA 1 mM, 50 °C o 70 °C durante 12-16 horas, seguido por lavado. Se pueden aplicar otras condiciones, tales como condiciones fisiológicamente relevantes que se pueden encontrar dentro de un organismo. El experto será capaz de determinar el conjunto de condiciones más apropiadas para una prueba de complementariedad de dos secuencias según la aplicación definitiva de los nucleótidos hibridados.

Esto incluye el apareamiento de bases del oligonucleótido o polinucleótido que comprende la primera secuencia de nucleótidos con el oligonucleótido o polinucleótido que comprende la segunda secuencia de nucleótidos a lo largo de la longitud entera de la primera y segunda secuencia de nucleótidos. Dichas secuencias se pueden denominar "completamente complementarias" entre sí en el presente documento. Sin embargo, donde una primera secuencia se denomina "sustancialmente complementaria" con respecto a una segunda secuencia en el presente documento, las dos secuencias pueden ser completamente complementarias, o pueden formar uno o más, pero generalmente no más de 4, 3 o 2, pares de bases erróneamente apareados tras la hibridación, mientras que retienen la capacidad para hibridarse en las condiciones más relevantes para su aplicación definitiva. Sin embargo, donde dos oligonucleótidos se diseñan para formar, tras la hibridación, uno o más nucleótidos protuberantes monocatenarios, dichos nucleótidos protuberantes no se deben considerar como apareamientos erróneos con respecto a la determinación de la complementariedad. Por ejemplo, un ARNbc que comprende un oligonucleótido de 21 nucleótidos de longitud y otro oligonucleótido de 23 nucleótidos de longitud, en donde el oligonucleótido más largo comprende una secuencia de 21 nucleótidos que es completamente complementaria al oligonucleótido más corto, se puede todavía denominar "completamente complementario" para los fines descritos en el presente documento.

Las secuencias "complementarias", como se usa en el presente documento, también pueden incluir, o estar formadas completamente a partir de, pares de bases no de Watson-Crick y/o pares de bases formadas a partir de nucleótidos no naturales y modificados, en tanto que se cumplan los requisitos anteriores con respecto a su capacidad para hibridarse. Dichos pares de bases no de Watson-Crick incluyen, pero no se limitan a, apareamiento de bases G:U de Wobble o Hoogsteen.

Los términos "complementario", "completamente complementario" y "sustancialmente complementario", en el presente documento, se pueden usar con respecto al apareamiento de bases entre la hebra codificante y la hebra no codificante de un ARNbc, o entre la hebra no codificante de un ARNbc y una secuencia diana, como se entenderá del contexto de su uso.

- 5 Como se usa en el presente documento, un polinucleótido que es "sustancialmente complementario a al menos parte de" un ARN mensajero (ARNm) se refiere a un polinucleótido que es sustancialmente complementario a una porción contigua del ARNm de interés (por ejemplo, un ARNm que codifica SAA, tal como SAA1 o SAA2) que incluye una 5' UTR, un marco de lectura abierto (ORF), o una 3' UTR. Por ejemplo, un polinucleótido es complementario a al menos una parte de un ARNm de SAA si la secuencia es sustancialmente complementaria a una porción no interrumpida de un ARNm que codifica SAA.

10 El término "ARN bicatenario" o "ARNbc", como se usa en el presente documento, se refiere a un complejo de moléculas de ácidos ribonucleicos, que tiene una estructura de dúplex que comprende dos hebras de ácido nucleico antiparalelas y sustancialmente complementarias, como se ha definido anteriormente. En general, la mayoría de los nucleótidos de cada hebra son ribonucleótidos, pero como se describe en detalle en el presente documento, cada una o ambas hebras también pueden incluir al menos un no ribonucleótido, por ejemplo, un desoxirribonucleótido y/o un nucleótido modificado. Además, como se usa en esta memoria descriptiva, "ARNbc" puede incluir modificaciones químicas a los ribonucleótidos, que incluyen modificaciones sustanciales en múltiples nucleótidos y que incluyen todos los tipos de modificaciones desveladas en el presente documento o conocidas en la técnica. Cualquiera de dichas modificaciones, como se usa en una molécula de tipo ARNip, está englobada por "ARNbc" a efectos de esta memoria descriptiva y reivindicaciones.

15 Las dos hebras que forman la estructura de dúplex pueden ser porciones diferentes de una molécula de ARN mayor, o pueden ser moléculas de ARN separadas. Si las dos hebras son parte de una molécula mayor y, por tanto, están conectadas por una cadena de nucleótidos sin interrumpir entre el extremo 3' de una hebra y el extremo 5' de la otra hebra respectiva que forma la estructura de dúplex, la cadena de ARN de conexión se denomina un "bucle de horquilla". Si las dos hebras están conectadas covalentemente por medios distintos de una cadena de nucleótidos sin interrumpir entre el extremo 3' de una hebra y el extremo 5' de la otra hebra respectiva que forma la estructura de dúplex, la estructura de conexión se denomina un "conector". Las hebras de ARN pueden tener el mismo número de nucleótidos o uno diferente. El máximo número de pares de bases es el número de nucleótidos en la hebra más corta del ARNbc menos cualquier nucleótido protuberante que esté presente en el dúplex. Además de la estructura de dúplex, un ARNbc puede comprender uno o más nucleótidos protuberantes. El término "ARNip" también se usa en el presente documento para referirse a un ARNbc como se ha descrito anteriormente.

20 Como se usa en el presente documento, un "nucleótido protuberante" se refiere al nucleótido o nucleótidos sin aparear que sobresalen de la estructura de dúplex de un ARNbc cuando un extremo 3' de una hebra del ARNbc se extiende más allá del extremo 5' de la otra hebra, o viceversa. "Romo" o "extremo romo" significa que no existen nucleótidos sin aparear en ese extremo del ARNbc, es decir, ningún nucleótido protuberante. Un ARNbc "de extremos romos" es un ARNbc que es bicatenario a lo largo de su longitud entera, es decir, ningún nucleótido protuberante en ningún extremo de la molécula. La secuencia mostrada en la columna "Secuencia sin química (5'-3')" de la Tabla 2 (ARNip de SAA; más adelante) puede incluir uno o más nucleótidos protuberantes comprendidos en uno o más nucleótidos. En un aspecto, el nucleótido protuberante es un nucleótido protuberante de 3' de dos nucleótidos que comprende la secuencia NN, donde NN puede ser cualquier nucleótido, por ejemplo, C, A, G, T. El nucleótido protuberante puede incluir uno o más fosforotioatos en el nucleótido protuberante, por ejemplo, el dT del extremo 3' del nucleótido protuberante puede tener un fosforotioato. El nucleótido protuberante puede ser dTsdT.

25 El término "hebra no codificante" se refiere a la hebra de un ARNbc que incluye una región que es sustancialmente complementaria a una secuencia diana. Como se usa en el presente documento, el término "región de complementariedad" se refiere a la región en la hebra no codificante que es sustancialmente complementaria a una secuencia, por ejemplo una secuencia diana, como se define en el presente documento. Si la región de complementariedad no es completamente complementaria a la secuencia diana, los apareamientos erróneos son más tolerados en las regiones terminales y, si están presentes, son generalmente en una región o regiones terminales, por ejemplo, dentro de 6, 5, 4, 3 o 2 nucleótidos del extremo 5' y/o 3'.

30 El término "hebra codificante", como se usa en el presente documento, se refiere a la hebra de un ARNbc que incluye una región que es sustancialmente complementaria a una región de la hebra no codificante.

35 "Introducir en una célula", cuando se refiere a un ARNbc, significa facilitar la captación o absorción en la célula, como es entendido por los expertos en la técnica. La absorción o captación de ARNbc puede ocurrir mediante procesos celulares difusivos o activos sin ayuda, o por agentes auxiliares o dispositivos. El significado de este término no se limita a células *in vitro*; un ARNbc también puede ser "introducido en una célula", en donde la célula es parte de un organismo vivo. En dicho caso, la introducción en la célula incluirá la administración al organismo. Por ejemplo, para la administración *in vivo*, el ARNbc se puede inyectar en un sitio de tejido o administrar por vía sistémica. La introducción *in vitro* en una célula incluye métodos conocidos en la técnica tales como electroporación y lipofección.

Los términos "silenciar", "inhibir la expresión de", "regular por disminución la expresión de", "suprimir la expresión de", y similares, en tanto que se refieran a un gen de SAA, se refieren en el presente documento a la supresión al menos parcial de la expresión de un gen de SAA, como se manifiesta por una reducción de la cantidad de ARNm que se puede aislar y/o detectar a partir de una primera célula o grupo de células en las que se transcribe un gen de SAA y que ha sido tratado de forma que se inhibe la expresión de un gen de SAA, en comparación con una segunda célula o grupo de células sustancialmente idéntico a la primera célula o grupo de células, pero que no ha sido tratado así (células de control). El grado de inhibición se expresa normalmente en términos de

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

Alternativamente, el grado de inhibición se puede dar en términos de una reducción de un parámetro que está funcionalmente ligado a la transcripción de genes de SAA, por ejemplo, la cantidad de proteína codificada por un gen de SAA que es secretada por una célula, o el número de células que presentan un cierto fenotipo, por ejemplo, apoptosis. En principio, se puede determinar el silenciamiento del gen de SAA en cualquier célula que exprese a diana, ya sea constitutivamente o por ingeniería genómica, y por cualquier ensayo apropiado. Sin embargo, cuando se necesita una referencia para determinar si un ARNbc dado inhibe la expresión de un gen de SAA un cierto grado y, por tanto, está englobado por la presente divulgación, los ensayos proporcionados en los ejemplos de más adelante deben servir de dicha referencia.

Por ejemplo, en ciertos casos, la expresión de un gen de SAA se suprime al menos aproximadamente 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 % o 50 % por la administración del oligonucleótido bicatenario desvelado en el presente documento. Un gen de SAA se puede suprimir al menos aproximadamente 60 %, 70 % o 80 % por la administración del oligonucleótido bicatenario desvelado en el presente documento. Un gen de SAA se puede suprimir al menos aproximadamente 85 %, 90 % o 95 % por la administración del oligonucleótido bicatenario desvelado en el presente documento. Las Tablas 3, 4 y 5, y las FIGs. 2 y 3 indican un intervalo de inhibición de la expresión obtenida en ensayos *in vitro* y *ex vivo* usando diversas moléculas de ARNbc de SAA a diversas concentraciones.

Como se usa en el presente documento en el contexto de la expresión de SAA, los términos "tratar", "tratamiento", y similares, se refieren al alivio de o a la mitigación de los procesos patológicos mediados por la expresión de SAA. En el contexto de la presente divulgación, en tanto que se refiera a cualquiera de las otras afecciones citadas en el presente documento más adelante (distintas de los procesos patológicos mediados por la expresión de SAA), los términos "tratar", "tratamiento", y similares, significan aliviar o mitigar al menos un síntoma asociado a dicha afección, o a ralentizar o invertir la progresión de dicha afección, tal como el ralentizamiento y progresión de amiloidosis.

Como se usa en el presente documento, las expresiones "cantidad terapéuticamente eficaz" y "cantidad profilácticamente eficaz" se refieren a una cantidad que proporciona un beneficio terapéutico en el tratamiento, prevención o gestión de los procesos patológicos mediados por la expresión de SAA o un síntoma abierto de los procesos patológicos mediados por la expresión de SAA. La cantidad específica que es terapéuticamente eficaz se puede determinar fácilmente por un profesional médico habitual, y puede variar dependiendo de factores conocidos en la técnica, tales como, por ejemplo, el tipo de procesos patológicos mediados por la expresión de SAA, los antecedentes y la edad del paciente, el estadio de los procesos patológicos mediados por la expresión de SAA, y la administración de otros procesos antipatológicos mediados por la expresión de agentes de SAA.

Como se usa en el presente documento, una "composición farmacéutica" comprende una cantidad farmacológicamente eficaz de un ARNbc y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Como se usa en el presente documento, "cantidad farmacológicamente eficaz", "cantidad terapéuticamente eficaz" o simplemente "cantidad eficaz" se refiere a esa cantidad de un ARN eficaz para producir el resultado farmacológico, terapéutico o preventivo previsto. Por ejemplo, si un tratamiento clínico dado se considera eficaz cuando existe una reducción de al menos 25 % en un parámetro medible asociado a una enfermedad o trastorno, una cantidad terapéuticamente eficaz de un fármaco para el tratamiento de esa enfermedad o trastorno es la cantidad necesaria para efectuar una reducción de al menos 25 % en ese parámetro. Por ejemplo, una cantidad terapéuticamente eficaz de un ARNbc que se dirige a SAA puede reducir al menos 25 % los niveles de suero SAA. En otro ejemplo, una cantidad terapéuticamente eficaz de un ARNbc que se dirige a SAA puede mejorar al menos 25 % la función renal.

El término "vehículo farmacéuticamente aceptable" se refiere a un vehículo para administración de un agente terapéutico. Dichos vehículos incluyen, pero no se limitan a, solución salina, solución salina tamponada, dextrosa, agua, glicerol, etanol, y sus combinaciones. El término excluye específicamente medio de cultivo celular. Para los fármacos administrados por vía oral, los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, excipientes farmacéuticamente aceptables tales como diluyentes inertes, agentes disgregantes, aglutinantes, agentes lubricantes, edulcorantes, aromatizantes, agentes colorantes y conservantes. Los diluyentes inertes adecuados incluyen carbonato sódico y cálcico, fosfato sódico y cálcico, y lactosa, mientras que el almidón de maíz y el ácido alginico son agentes disgregantes adecuados. Los aglutinantes pueden incluir almidón y gelatina, mientras

que el agente lubricante, si está presente, generalmente será 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 retardar la absorción en el tubo gastrointestinal.

5 Como se usa en el presente documento, una "célula transformada" es una célula en la que se ha introducido un vector a partir del cual se puede expresar una molécula de ARNbc.

II. Ácido ribonucleico bicatenario (ARNbc)

10 Como se describe con más detalle en el presente documento, la presente divulgación proporciona moléculas de ácido ribonucleico bicatenario (ARNbc) para inhibir la expresión de un gen de SAA en una célula o mamífero, por ejemplo, en un ser humano que tiene una amiloidosis, donde el ARNbc incluye una hebra no codificante que tiene una región de complementariedad que es complementaria a al menos una parte de un ARNm formado en la expresión de un gen de SAA, y donde la región de complementariedad es inferior a 30 nucleótidos de longitud, generalmente 19-24 nucleótidos de longitud, y donde dicho ARNbc, tras el contacto con una célula que expresa dicho gen de SAA, inhibe la expresión de dicho gen de SAA al menos 30 % como se ensaya por, por ejemplo, un método basado en PCR o ADN ramificado (ADNr), o por un método basado en proteínas, tal como por transferencia Western. La expresión de un gen de SAA se puede reducir al menos 30 % cuando se mide por un ensayo como se describe en los ejemplos más adelante. Por ejemplo, se puede ensayar la expresión de un gen de SAA en cultivo celular, tal como en células HepB3, midiendo niveles de SAA de ARNm, tal como por ensayo de ADNr o TaqMan, o midiendo niveles de proteína, tal como por ensayo de ELISA. El ARNbc de la presente divulgación puede incluir además uno o más nucleótidos protuberantes monocatenarios.

20 El ARNbc se puede sintetizar por métodos convencionales conocidos en la técnica como se trata adicionalmente más adelante, por ejemplo, por uso de un sintetizador de ADN automático, tal como están comercialmente disponibles de, por ejemplo, Biosearch, Applied Biosystems, Inc. El ARNbc incluye dos hebras de ARN que son suficientemente complementarias para hibridarse para formar una estructura de dúplex. Una hebra del ARNbc (la hebra no codificante) incluye una región de complementariedad que es sustancialmente complementaria, y generalmente completamente complementaria, a una secuencia diana, derivada de la secuencia de un ARNm formado durante la expresión de un gen de SAA, la otra hebra (la hebra codificante) incluye una región que es complementaria a la hebra no codificante, de forma que las dos hebras se hibridan y forman una estructura de dúplex cuando se combinan en condiciones adecuadas. Opcionalmente, la región de la hebra no codificante que es sustancialmente complementaria a una secuencia de un ARNm de SAA es sustancialmente complementaria a tanto un ARNm de SAA1 como de SAA2. Generalmente, la estructura de dúplex tiene entre 15 y 30, más generalmente entre 18 y 25, aún más generalmente entre 19 y 24, y lo más generalmente entre 19 y 21 pares de bases de longitud. Similarmente, la región de complementariedad con la secuencia diana tiene entre 15 y 30, o entre 25 y 30, o entre 18 y 25, o entre 19 y 24, o entre 19 y 21, o 19, 20 o 21 pares de bases de longitud. El dúplex puede tener 19 pares de bases de longitud. El dúplex puede tener 21 pares de bases de longitud. Cuando se usan dos ARNip diferentes en combinación, las longitudes de dúplex pueden ser idénticas o se pueden diferenciar.

35 Cada hebra del ARNbc desvelado en el presente documento tiene generalmente entre 15 y 30, o entre 18 y 25, o 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 nucleótidos de longitud. En otros casos, cada hebra puede tener 25-30 nucleótidos de longitud. Cada hebra del dúplex puede ser de la misma longitud o de diferentes longitudes. Cuando se usan dos ARNip diferentes en combinación, las longitudes de cada hebra de cada ARNip pueden ser idénticas o se pueden diferenciar.

40 El ARNbc desvelado en el presente documento puede incluir uno o más nucleótido(s) protuberante(s) monocatenario(s) de uno o más nucleótidos. Al menos un extremo del ARNbc puede tener un nucleótido protuberante monocatenario de 1 a 4, generalmente 1 o 2 nucleótidos. La hebra no codificante del ARNbc puede tener 1-10 nucleótidos protuberantes cada uno en el extremo 3' y el extremo 5' sobre la hebra codificante. La hebra codificante del ARNbc puede tener 1-10 nucleótidos protuberantes cada uno en el extremo 3' y el extremo 5' sobre la hebra no codificante.

45 Generalmente, el ARNbc incluye dos nucleótidos protuberantes en 3'. La hebra no codificante del ARNbc puede tener un nucleótido protuberante en el extremo 3', y el extremo 5' puede ser romo. La hebra codificante del ARNbc puede tener un nucleótido protuberante en el extremo 3' y el extremo 5' puede ser romo. Ambos extremos del ARNbc pueden ser romos. Uno o más de los nucleótidos en el nucleótido protuberante se pueden sustituir con un nucleósido tiofosfato.

50 Un gen de SAA puede ser un gen de SAA humano. La hebra codificante del ARNbc puede ser una de las secuencias codificantes de la Tabla 2, y la hebra no codificante puede ser una de las secuencias no codificantes de la Tabla 2. Los agentes no codificantes alternativos que se dirigen en cualquier parte a la secuencia diana proporcionada en la Tabla 2 se pueden determinar fácilmente usando la secuencia diana y la secuencia de SAA flanqueante.

55 El experto conoce bien que los ARNbc que tienen una estructura de dúplex de entre 20 y 23, pero específicamente 21 pares de bases, han sido aclamados como particularmente eficaces en la inducción de interferencia por ARN

(Elbashir et al., EMBO 2001, 20:6877-6888). Sin embargo, otros han encontrado que también puede ser eficaz el ARNbc más corto o más largo. En el contexto de la divulgación anterior, en virtud de la naturaleza de las secuencias de oligonucleótidos proporcionadas en la Tabla 2, los ARNbc desvelados en el presente documento pueden incluir al menos una hebra de una longitud descrita en su interior. Se puede esperar razonablemente que el ARNbc más corto
 5 tenga una de las secuencias de la Tabla 2 menos solo algunos nucleótidos en uno o ambos extremos que pueden ser similarmente eficaces en comparación con el ADNbc descrito anteriormente. Por tanto, se contemplan por la presente divulgación los ARNbc que tienen una secuencia parcial de al menos 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, o 22 o más nucleótidos contiguos de una de las secuencias de la Tabla 2, y que se diferencian en su capacidad para inhibir la expresión de un gen de SAA en un ensayo como se describe en el presente documento más adelante no más de 5,
 10 10, 15, 20, 25, o 30 % de inhibición de un ARNbc que comprende la secuencia entera. Además, se pueden preparar fácilmente los ARNbc que se escinden dentro de una secuencia diana de SAA deseada usando la secuencia no codificante de SAA correspondiente y una secuencia codificante complementaria.

Además, los ARNbc proporcionados en la Tabla 2 identifican un sitio en un ARNm de SAA (por ejemplo, en un ARNm de SAA1 y/o de SAA2) que es susceptible a escisión basada en iARN. Como tal, la presente divulgación
 15 caracteriza además ARNbc que se dirigen dentro de la secuencia dirigida por uno de los agentes desvelados en el presente documento. Como se usa en el presente documento, se dice que un segundo ARNbc se dirige dentro de la secuencia de un primer ARNbc si el segundo ARNbc escinde el mensajero en cualquier parte dentro del ARNm que es complementario a la hebra no codificante del primer ARNbc. Dicho segundo ARNbc generalmente consistirá en al menos 15 nucleótidos contiguos de una de las secuencias proporcionadas en la Tabla 2 acoplados a secuencias de nucleótidos adicionales tomadas desde la región contigua hasta la secuencia seleccionada en un gen de SAA1 o
 20 SAA2. Por ejemplo, los últimos 15 nucleótidos de SEQ ID NO: 1 combinados con los seis siguientes nucleótidos del gen de SAA diana producen un agente de una única hebra de 21 nucleótidos que se basa en una de las secuencias proporcionadas en la Tabla 2.

El ARNbc desvelado en el presente documento puede contener uno o más apareamientos erróneos con la
 25 secuencia diana. El ARNbc desvelado en el presente documento puede contener no más de 3 apareamientos erróneos. Si la hebra no codificante del ARNbc contiene apareamientos erróneos con una secuencia diana, es preferible que el área de apareamiento erróneo no se sitúe en el centro de la región de complementariedad. Si la hebra no codificante del ARNbc contiene apareamientos erróneos con la secuencia diana, es preferible que el apareamiento erróneo se limite a 5 nucleótidos desde cualquier extremo, por ejemplo 5, 4, 3, 2, o 1 nucleótidos
 30 desde cualquiera del extremo 5' o 3' de la región de complementariedad. Por ejemplo, para una hebra de ARNbc de 23 nucleótidos que es complementaria a una región de un gen de SAA, el ARNbc generalmente no contiene ningún apareamiento erróneo dentro los 13 nucleótidos centrales. Los métodos descritos en el presente documento se pueden usar para determinar si un ARNbc que contiene un apareamiento erróneo con una secuencia diana es eficaz en inhibir la expresión de un gen de SAA. Es importante la consideración de la eficacia de ARNbc con
 35 apareamientos erróneos en inhibir la expresión de un gen de SAA, especialmente si la región de complementariedad particular en un gen de SAA se conoce por tener variación polimórfica de secuencias dentro de la población.

Modificaciones

El ARNbc se puede modificar químicamente para potenciar estabilidad. Los ácidos nucleicos desvelados en el
 40 presente documento se pueden sintetizar y/o modificar por métodos bien establecidos en la técnica, tales como aquellos descritos en "Current protocols in Nucleic acid chemistry", Beaucage, S.L. et al. (Edrs.), John Wiley & Sons, Inc., New York, NY, EE.UU. Los ejemplos específicos de compuestos de ARNbc útiles en la presente divulgación incluyen ARNbc que contienen esqueletos modificados o enlaces internucleosídicos no naturales. Como se define en esta memoria descriptiva, los ARNbc que tienen esqueletos modificados incluyen los que retienen un átomo de fósforo en el esqueleto y los que no tienen un átomo de fósforo en el esqueleto. A efectos de esta memoria
 45 descriptiva, y como se cita algunas veces en la técnica, también se puede considerar que los ARNbc modificados que no tienen un átomo de fósforo en su esqueleto internucleosido son oligonucleosidos.

Los esqueletos de ARNbc modificados incluyen, por ejemplo, fosforotioatos, fosforotioatos quirales, fosforoditioatos, fosfotriésteres, aminoalquilfosfotriésteres, metil y otros alquil fosfonatos que incluyen 3'-alquilfosfonatos y fosfonatos quirales, fosfinatos, fosforamidatos que incluyen 3'-aminofosforamidato y aminoalquilfosforamidatos,
 50 tionofosforamidatos, tionalquilfosfonatos, tionalquilfosfotriésteres y boranofosfatos que tienen enlaces 3'-5' normales, análogos unidos en 2'-5' de estos, y los que tienen polaridad invertida en donde los pares adyacentes de unidades de nucleosidos se unen 3'-5' a 5'-3' o 2'-5' a 5'-2'. También se incluyen diversas sales, sales mixtas y formas de ácido libre.

Las patentes de EE.UU. representativas que enseñan la preparación de los enlaces que contienen fósforo anteriores
 55 incluyen, pero no se limitan a, las patentes de EE.UU. Nº 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; y 5.625.050.

Los esqueletos de ARNbc modificados que no incluyen un átomo de fósforo en ellos tienen esqueletos que se
 60 forman por enlaces internucleosídicos de alquilo o cicloalquilo de cadena corta, heteroátomos mixtos y enlaces internucleosídicos de alquilo o cicloalquilo, u uno o más enlaces internucleosídicos heteroatómicos o heterocíclicos

de cadena corta. Estos incluyen los que tienen enlaces morfolino (formados en parte a partir de la porción de azúcar de un nucleósido); esqueletos de siloxano; esqueletos de sulfuro, sulfóxido y sulfona; esqueletos de formacetilo y tioformacetilo; esqueletos de metilformacetilo y tioformacetilo; esqueletos que contienen alqueno; esqueletos de sulfamato; esqueletos de metilimino y metilhidrazino; esqueletos de sulfonato y sulfonamida; esqueletos de amida; y otros que tienen partes componentes mixtas de N, O, S y CH₂.

Las patentes de EE.UU. representativas que enseñan la preparación de los oligonucleósidos anteriores incluyen, pero no se limitan a, las patentes de EE.UU. N^o 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.

En otros miméticos de ARNbc adecuados, tanto el azúcar como el enlace internucleosídico, *es decir*, el esqueleto, de las unidades de nucleótido se sustituyen por grupos novedosos. Las unidades de base se mantienen para la hibridación con un compuesto diana de ácido nucleico apropiado. Dicho compuesto oligomérico, un mimético de ARNbc que se ha mostrado que tiene excelentes propiedades de hibridación, se denomina un ácido nucleico peptídico (PNA). En compuestos de PNA, el esqueleto de azúcar de un ARNbc se sustituye por un esqueleto que contiene amida, en particular un esqueleto de aminoetilglicina. Las nucleobases son retenidas y se unen directamente o indirectamente a átomos de nitrógeno aza de la porción de amida del esqueleto. Las patentes de EE.UU. representativas que enseñan la preparación de compuestos de PNA incluyen, pero no se limitan a, las patentes de EE.UU. N^o 5.539.082; 5.714.331; y 5.719.262. La enseñanza adicional de compuestos de PNA se puede encontrar en Nielsen et al., Science, 1991, 254, 1497-1500.

En el presente documento también se desvelan ARNbc con esqueletos de fosforotioato y oligonucleósidos con esqueletos de heteroátomo, y en particular --CH₂--NH--CH₂--, --CH₂--N(CH₃)--O--CH₂-- [conocido como un esqueleto de metilimino (metilimino) o MMI], --CH₂--O--N(CH₃)--CH₂--, --CH₂--N(CH₃)--N(CH₃)--CH₂-- y --N(CH₃)--CH₂--CH₂-- [en donde el esqueleto de fosfodiéster nativo se representa como --O--P--O--CH₂--] de la patente de EE.UU. N^o 5.489.677 anteriormente citada, y los esqueletos de amida de la patente de EE.UU. N^o 5.602.240 anteriormente citada. También se desvelan ARNbc que tienen estructuras de esqueleto de morfolino de la patente de EE.UU. N^o 5.034.506 anteriormente citada.

Los ARNbc modificados también pueden contener uno o más restos de azúcar sustituidos. Los ARNbc preferidos comprenden uno de los siguientes en la posición 2': OH; F; O-, S- o N-alquilo; O-, S- o N-alquenilo; O-, S- o N-alquinilo; u O-alquil-O-alquilo, en donde el alquilo, alqueno y alquinilo se pueden ser alquilo C1 a C10 o alqueno C2 a C10 sustituidos o sin sustituir y alquinilo. Particularmente se prefieren O[(CH₂)_nO]_mCH₃, O(CH₂)_nOCH₃, O(CH₂)_nNH₂, O(CH₂)_nCH₃, O(CH₂)_nONH₂ y O(CH₂)_nON[(CH₂)_nCH₃]₂, donde n y m son desde 1 hasta aproximadamente 10. Otros ARNbc preferidos comprenden uno de los siguientes en la posición 2': alquilo inferior C1 a C10, alquilo inferior sustituido, alcarilo, aralquilo, O-alcarilo u O-aralquilo, SH, SCH₃, OCN, Cl, Br, CN, CF₃, SOCH₃, SO₂CH₃, ONO₂, NO₂, N₃, NH₂, heterocicloalquilo, heterocicloalcarilo, aminoalquilamino, polialquilamino, sililo sustituido, un grupo de escisión de ARN, un grupo indicador, un intercalador, un grupo para mejorar las propiedades farmacocinéticas de un ARNbc, o un grupo para mejorar las propiedades farmacodinámicas de un ARNbc, y otros sustituyentes que tienen propiedades similares. Una modificación preferida incluye 2'-metoxietoxi (2'-O--CH₂CH₂OCH₃, 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. Una modificación preferida adicional incluye 2'-dimetilaminoetoxi, es decir, un grupo O(CH₂)₂ON(CH₃)₂, también conocido como 2'-DMAOE, como se describe en los ejemplos en el presente documento más adelante, y 2'-dimetilaminoetoxietoxi (también conocido en la técnica como 2'-O-dimetilaminoetoxietilo o 2'-DMAEOE), es decir, 2'-O--CH₂--O--CH₂--N(CH₂)₂, también descrito en los ejemplos en el presente documento más adelante.

Otras modificaciones incluyen 2'-metoxi (2'-OCH₃), 2'-aminopropoxi (2'-OCH₂CH₂CH₂NH₂) y 2'-flúor (2'-F). También se pueden hacer modificaciones similares en otras posiciones en el ARNbc, particularmente la posición 3' del azúcar en el nucleótido del extremo 3' o en los ARNbc unidos en 2'-5' y la posición 5' del nucleótido del extremo 5'. Los ARNbc también pueden tener miméticos de azúcar tales como restos de ciclobutilo en lugar del azúcar de pentofuranosilo. Las patentes de EE.UU. representativas que enseñan la preparación de dichas estructuras de azúcar modificadas incluyen, pero no se limitan a, las patentes de EE.UU. N^o 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, ciertas de las cuales son del mismo solicitante que la presente solicitud.

Los ARNbc también pueden incluir modificaciones o sustituciones de nucleobases (frecuentemente denominadas en la materia simplemente como "base"). Como se usa en el presente documento, las nucleobases "sin modificar" o "naturales" incluyen las bases de purina adenina (A) y guanina (G), y las bases de pirimidina timina (T), citosina (C) y uracilo (U). Las nucleobases modificadas incluyen otras nucleobases sintéticas y naturales tales como 5-metilcitosina (5-me-C), 5-hidroximetil citosina, xantina, hipoxantina, 2-aminoadenina, 6-metilo y otros derivados de alquilo de adenina y guanina, 2-propilo y otros derivados de alquilo de adenina y guanina, 2-tiouracilo, 2-tiotimina y 2-tiocitosina, 5-halouracilo y citosina, 5-propinil uracilo y citosina, 6-azo uracilo, citosina y timina, 5-uracilo (pseudouracilo), 4-tiouracilo, 8-halógeno, 8-amino, 8-tiol, 8-tioalquilo, 8-hidroxilo y otras adeninas y guaninas sustituidas en 8, 5-halógeno, particularmente 5-bromo, 5-trifluorometilo y otros uracilos y citosinas sustituidos en 5,

7-metilguanina y 7-metiladenina, 8-azaguanina y 8-azaadenina, 7-deazaguanina y 7-daazaadenina y 3-deazaguanina y 3-deazaadenina. Las nucleobases adicionales incluyen las desveladas en la patente de EE.UU. Nº 3.687.808, las desveladas en The Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering, páginas 858-859, Kroschwitz, J. L., ed. John Wiley & Sons, 1990, las desveladas por Englisch et al., *Angewandte Chemie, International Edition*, 1991, 30, 613, y las desveladas por Sanghvi, Y. S., Capítulo 15, *DsRNA Research and Applications*, páginas 289-302, Crooke, S. T. y Lebleu, B., Ed., CRC Press, 1993. Ciertas de estas nucleobases son particularmente útiles para aumentar la afinidad de unión de los compuestos oligoméricos desvelados en el presente documento. Estas incluyen pirimidinas sustituidas en 5, 6-azapirimidinas y purinas sustituidas en N-2, N-6 y O-6, que incluyen 2-aminopropiladenina, 5-propiniluracilo y 5-propinilcitosina. Se ha mostrado que las sustituciones de 5-metilcitosina aumentan la estabilidad del dúplex de ácido nucleico 0,6-1,2 °C. (Sanghvi, Y. S., Crooke, S. T. y Lebleu, B., Eds., *DsRNA Research and Applications*, CRC Press, Boca Raton, 1993, pp. 276-278) y son sustituciones de bases a modo de ejemplo, incluso más particularmente cuando se combinan con modificaciones de 2'-O-metoxietilazúcar.

Las patentes de EE.UU. representativas que enseñan la preparación de ciertas de las nucleobases modificadas anteriormente indicadas, así como otras nucleobases modificadas, incluyen, pero no se limitan a, la patente de EE.UU. Nº 3.687.808 anteriormente citada, así como las patentes de EE.UU. Nº 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; y la patente de EE.UU. Nº 5.750.692.

Conjugados

Otra modificación de los ARNbc desvelados en el presente documento implica unir químicamente al ARNbc uno o más restos o conjugados que potencian la actividad, distribución celular o captación celular del ARNbc. Dichos restos incluyen, pero no se limitan a, restos de lípido 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, por ejemplo, hexil-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, por ejemplo, restos dodecanodiol 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, por ejemplo, di-hexadecil-rac-glicerol o 1,2-di-O-hexadecil-rac-glicero-3-H-fosfonato de trietil-amonio (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 adamantanoacético (Manoharan et al., *Tetrahedron Lett.*, 1995, 36:3651-3654), un resto palmitilo (Mishra et al., *Biochim. Biophys. Acta*, 1995, 1264:229-237), o un resto octadecilamina o hexilamino-carboniloxicolesterol (Crooke et al., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1996, 277:923-937).

Las patentes de EE.UU. representativas que enseñan la preparación de dichos conjugados de ARNbc incluyen, pero no se limitan a, las patentes de EE.UU. Nº 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 5.688.941.

No es necesario que todas las posiciones en un compuesto dado estén uniformemente modificadas, y de hecho más de una de las modificaciones anteriormente mencionadas se puede incorporar en un único compuesto o incluso en un único nucleósido dentro de un ARNbc. En el presente documento también se desvelan compuestos de ARNbc que son compuestos quiméricos. Los compuestos de ARNbc "quiméricos" o "quimeras", en el contexto de la presente divulgación, son compuestos de ARNbc, particularmente ARNbc, que contienen dos o más regiones químicamente distintas, cada una constituida de al menos una unidad de monómero, es decir, un nucleótido en el caso de un compuesto de ARNbc. Estos ARNbc normalmente contienen al menos una región en donde el ARNbc se modifica para conferir al ARNbc elevada resistencia a la degradación por nucleasas, elevada captación celular y/o elevada afinidad de unión por el ácido nucleico diana. Una región adicional del ARNbc puede servir de sustrato para enzimas capaces de escindir híbridos de ARN:ADN o ARN:ARN. A modo de ejemplo, RNasa H es una endonucleasa celular que escinde la hebra de ARN de un dúplex de ARN:ADN. La activación de RNasa H, por tanto, da como resultado la escisión de la diana de ARN, potenciando así enormemente la eficiencia de inhibición por ARNbc de la expresión génica. Por consiguiente, frecuentemente se pueden obtener resultados comparables con ARNbc más cortos cuando se usan ARNbc quiméricos, en comparación con desoxiARNbc de fosforotioato que se hibridan con la misma región diana. La escisión de la diana de ARN se puede detectar rutinariamente por electroforesis en gel y, si fuera necesario, técnicas de hibridación de ácidos nucleicos asociadas conocidas en la técnica.

En ciertos casos, el ARNbc se puede modificar por un grupo no de ligando. Se han conjugado varias moléculas no de ligando con ARNbc para potenciar la actividad, distribución celular o captación celular del ARNbc, y están disponibles en la bibliografía científica procedimientos para realizar dichas conjugaciones. Dichos restos no de ligando tienen restos de lípido incluidos, tales como colesterol (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, por ejemplo, hexil-S-tritilitol (Manoharan et al., Ann. N.Y. Acad. Sci., 1992, 660:306; Manoharan et al., Bioorg. Med. Chem. Lett., 1993, 3:2765), un tiocolesterol (Oberhauser et al., Nucl. Acids Res., 1992, 20:533), una cadena alifática, por ejemplo, restos de dodecanodiol 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, por ejemplo, di-hexadecil-rac-glicerol o 1,2-di-O-hexadecil-rac-glicero-3-H-fosfonato de trietilamonio (Manoharan et al., Tetrahedron Lett., 1995, 36:3651; Shea et al., Nucl. Acids Res., 1990, 18:3777), una poliamina o una cadena de polietilenglicol (Manoharan et al., Nucleosides & Nucleotides, 1995, 14:969), o ácido adamantanoacético (Manoharan et al., Tetrahedron Lett., 1995, 36:3651), un resto palmitilo (Mishra et al., Biochim. Biophys. Acta, 1995, 1264:229), o un resto octadecilamina o hexilamino-carbonil-oxicolesterol (Crooke et al., J. Pharmacol. Exp. Ther., 1996, 277:923). Se han enumerado anteriormente las patentes de Estados Unidos representativas que enseñan la preparación de dichos conjugados de ARNbc. Los protocolos de conjugación típicos implican la síntesis de ARNbc que lleva un conector de amino en una o más posiciones de la secuencia. El grupo amino se hace reaccionar entonces con la molécula que se conjuga usando reactivos de acoplamiento o activación apropiados. La reacción de conjugación se puede realizar ya sea con el ARNbc todavía unido al soporte sólido o tras la escisión del ARNbc en fase de disolución. La purificación del conjugado de ARNbc por HPLC normalmente proporciona el conjugado puro.

ARNbc codificados por vector

En otro aspecto, las moléculas de ARNbc de SAA se expresan a partir de unidades de transcripción insertadas en vectores de ADN o ARN (véase, por ejemplo, Couture, A, et al., TIG. (1996), 12:5-10; Skillern, A., et al., publicación PCT internacional N° WO 00/22113, Conrad, publicación PCT internacional N° WO 00/22114, y Conrad, patente de EE.UU. N° 6.054.299). Estos transgenes se pueden introducir como una construcción lineal, un plásmido circular o un vector viral, que se pueden incorporar y heredar como un transgén integrado en el genoma del hospedador. El transgén también se pueden construir para permitir que sea heredado como un plásmido extracromosómico (Gassmann, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1995) 92:1292).

Se pueden transcribir las hebras individuales de un ARNbc por promotores en dos vectores de expresión separados y co-transfectar en una célula diana. Alternativamente, cada hebra individual del ARNbc se puede transcribir por promotores, ambos de los cuales se localizan sobre el mismo plásmido de expresión. Se puede expresar un ARNbc como una repetición invertida unida por una secuencia de polinucleótidos conectora de forma que el ARNbc tenga una estructura de tallo y bucle.

Los vectores de expresión de ARNbc recombinante generalmente son plásmidos de ADN o vectores virales. Se pueden construir vectores virales que expresan ARNbc basándose en, pero no se limitan a, virus adeno-asociados (para una revisión, véase Muzyczka, et al., Curr. Topics Micro. Immunol. (1992) 158:97-129); adenovirus (véase, por ejemplo, Berkner, et al., BioTechniques (1998) 6:616), Rosenfeld et al. (1991, Sciencia 252:431-434), y Rosenfeld et al. (1992), Cell 68:143-155); o alfavirus, así como otros conocidos en la técnica. Se han usado retrovirus para introducir una variedad de genes en muchos tipos diferentes de células, que incluyen células epiteliales, *in vitro* y/o *in vivo* (véase, por ejemplo, Eglitis, et al., Sciencia (1985) 230:1395-1398; Danos y Mulligan, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1998) 85:6460-6464; Wilson et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:3014-3018; Armentano et al., 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:61416145; Huber et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:8039-8043; Ferry et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:8377-8381; Chowdhury et al., 1991, Sciencia 254:1802-1805; van Beusechem et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:7640-19; Kay et al., 1992, Human Gene Therapy 3:641-647; Dai et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10892-10895; Hwu et al., 1993, J. Immunol. 150:4104-4115; patente de EE.UU. N° 4.868.116; patente de EE.UU. N° 4.980.286; solicitud PCT WO 89/07136; solicitud PCT WO 89/02468; solicitud PCT WO 89/05345; y solicitud PCT WO 92/07573). Se pueden producir vectores retrovirales recombinantes capaces de transducir y expresar genes insertados en el genoma de una célula transfectando el genoma retroviral recombinante en líneas celulares de encapsidación adecuadas tales como PA317 y Psi-CRIP (Comette et al., 1991, Human Gene Therapy 2:5-10; Cone et al., 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6349). Se pueden usar vectores adenovirales recombinantes para infectar una amplia variedad de células y tejidos en hospedadores susceptibles (por ejemplo, rata, hámster, perro y chimpancé) (Hsu et al., 1992, J. Infectious Disease, 166:769), y también tienen la ventaja de no requerir células mitóticamente activas para infección.

Se puede usar cualquier vector viral capaz de aceptar las secuencias para la(s) molécula(s) de ARNbc a expresar, por ejemplo vectores derivados de adenovirus (AV); virus adeno-asociado (AAV); retrovirus (por ejemplo, lentivirus (LV), rabdovirus, virus de la leucemia murina); virus del herpes, y similares. Se puede modificar el tropismo de los vectores por pseudotipificación de los vectores con proteínas de la envoltura u otros antígenos de superficie de otros virus, o sustituyendo diferentes proteínas de la cápside viral, según convenga.

Por ejemplo, los vectores lentivirales desvelados en el presente documento se pueden pseudotipificar con proteínas de la superficie del virus de la estomatitis vesicular (VSV), rabia, Ébola, Mokola, y similares. Los vectores de AAV desvelados en el presente documento se pueden preparar para dirigirse a diferentes células por manipulación de los vectores para expresar diferentes serotipos de la proteína de la cápside. Por ejemplo, un vector de AAV que expresa una cápside de serotipo 2 sobre un genoma de serotipo 2 se denomina AAV 2/2. Este gen de la cápside de serotipo 2 en el vector AAV 2/2 se puede sustituir por un gen de la cápside de serotipo 5 para producir un vector AAV 2/5.

Las técnicas para construir vectores de AAV que expresan diferentes serotipos de proteína de la cápside están dentro de la experiencia en la técnica; véase, por ejemplo, Rabinowitz J E et al. (2002), J Virol 76:791-801.

5 La selección de vectores virales recombinantes adecuados para su uso según la presente divulgación, métodos de inserción de secuencias de ácidos nucleicos para expresar el ARNbc en el vector y métodos de suministro del vector viral a las células de interés están dentro de la experiencia en la materia. Véanse, por ejemplo, Dornburg R (1995), Gene Therap. 2: 301-310; Eglitis M A (1988), Biotechniques 6: 608-614; Miller A D (1990), Hum Gene Therap. 1: 5-14; Anderson W F (1998), Nature 392: 25-30; y Rubinson D A et al., Nat. Genet. 33: 401-406.

10 Los vectores virales se pueden derivar de AV y AAV. El ARNbc desvelado en el presente documento se puede expresar como dos moléculas de ARN monocatenarias complementarias separadas de un vector de AAV recombinante que tiene, por ejemplo, ya sean los promotores de ARN U6 o H1, o el promotor del citomegalovirus (CMV).

Un vector de AV adecuado para expresar el ARNbc desvelado en el presente documento, un método de construcción del vector de AV recombinante y un método de administración del vector en células diana se describen en Xia H et al. (2002), Nat. Biotech. 20: 1006-1010.

15 Los vectores de AAV adecuados para expresar el ARNbc desvelado en el presente documento, métodos de construcción del vector de AV recombinante y métodos de administración de los vectores en 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; la patente de EE.UU. N° 5.252.479; la patente de EE.UU. N° 5.139.941; solicitud de patente internacional N° WO 94/13788; y solicitud de patente internacional N° WO 93/24641.

20 El promotor que conduce la expresión de ARNbc en ya sea un plásmido de ADN o vector viral desvelado en el presente documento puede ser una ARN polimerasa I eucariota (por ejemplo, promotor de ARN ribosómico), ARN polimerasa II (por ejemplo, promotor temprano del CMV o promotor de actina o promotor de ARNnp U1) o generalmente el promotor de ARN polimerasa III (por ejemplo, promotor de ARNnp U6 o de ARN 7SK) o un promotor procarriota, por ejemplo el promotor T7, siempre que el plásmido de expresión también codifique la ARN polimerasa T7 requerida para la transcripción a partir de un promotor T7. El promotor también puede dirigir la expresión transgénica al páncreas (véase, por ejemplo, la secuencia reguladora de insulina para el páncreas (Bucchini et al., 1986, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:2511-2515)).

30 Además, se puede regular con precisión la expresión del transgén, por ejemplo, usando una secuencia reguladora inducible y sistemas de expresión tales como una secuencia reguladora que es sensible a ciertos reguladores fisiológicos, por ejemplo, niveles de glucosa circulante, u hormonas (Docherty et al., 1994, FASEB J. 8:20-24). Dichos sistemas de expresión inducibles, adecuados para el control de la expresión transgénica en células o en mamíferos, incluyen la regulación por ecdisona, por estrógeno, progesterona, tetraciclina, inductores químicos de dimerización e isopropil-beta-D1-tiogalactopiranosido (EPTG). Un experto en la técnica sería capaz de elegir la secuencia reguladora/promotora apropiada basándose en el uso previsto del transgén de ARNbc.

35 Generalmente, los vectores recombinantes capaces de expresar moléculas de ARNbc se administran como se describe más adelante, y persisten en las células diana. Alternativamente, se pueden usar vectores virales que proporcionan la expresión transitoria de moléculas de ARNbc. Dichos vectores se pueden administrar repetidamente según sea necesario. Una vez expresados, los ARNbc se unen al ARN diana y modulan su función o expresión. La administración de ARNbc que expresan vectores puede ser sistémica, tal como por administración intravenosa o intramuscular, por administración a células diana explantadas del paciente, seguido por reintroducción en el paciente, o por cualquier otro medio que permita la introducción en una célula diana deseada.

40 Los plásmidos de ADN de expresión de ARNbc normalmente se transfectan en células diana como un complejo con vehículos de lípidos catiónicos (por ejemplo, Oligofectamine) o vehículos no basados en lípidos catiónicos (por ejemplo, Transit-TKOTM). También se contemplan por la presente divulgación transfecciones de múltiples lípidos para las inactivaciones mediadas por ARNbc que se dirigen a diferentes regiones de un único gen de SAA o múltiples genes de SAA durante un periodo de una semana o más. Se puede monitorizar la introducción satisfactoria de vectores en células hospedadoras usando diversos métodos conocidos. Por ejemplo, se puede señalar la transfección transitoria con un indicador, tal como un marcador fluorescente, tal como proteína verde fluorescente (GFP). Se puede garantizar la transfección estable de células *ex vivo* usando marcadores que proporcionan la célula transfectada con resistencia a factores ambientales específicos (por ejemplo, antibióticos y fármacos), tales como resistencia a higomicina B.

45 También se pueden insertar en vectores moléculas de ARNbc específicas de SAA y usar como vectores de terapia génica para pacientes humanos. Los vectores de terapia génica se pueden administrar a un sujeto por, por ejemplo, inyección intravenosa, administración local (véase la patente de EE.UU. 5.328.470) o por inyección estereotáctica (véase, por ejemplo, Chen et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:3054-3057). La preparación farmacéutica del vector de terapia génica puede incluir el vector de terapia génica en un diluyente aceptable, o puede incluir una matriz de liberación lenta en la que se incorpora el vehículo de administración génica. Alternativamente, si el vector de administración génica completa se puede producir intacto a partir de células recombinantes, por ejemplo,

vectores retrovirales, la preparación farmacéutica puede incluir una o más células que producen el sistema de administración génica.

III. Composiciones farmacéuticas que contienen ARNbc

5 En el presente documento también se desvelan composiciones farmacéuticas que contienen un ARNbc, como se describe en el presente documento, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. La composición farmacéutica que contiene el ARNbc es útil para tratar una enfermedad o trastorno asociado a la expresión o actividad de un gen de SAA, tal como los procesos patológicos mediados por la expresión de SAA. Dichas composiciones farmacéuticas se formulan basándose en el modo de administración. Un ejemplo es las composiciones que se formulan para administración sistémica mediante administración parenteral, por ejemplo, por administración intravenosa (IV). Otro ejemplo es las composiciones que se formulan para administración directa en el parénquima cerebral, por ejemplo, por infusión en el cerebro, tal como por infusión de bomba continua.

15 En general, una dosis adecuada de ARNbc estará en el intervalo de 0,01 a 200,0 miligramos por kilogramo de peso corporal del receptor por día, generalmente en el intervalo de 0,1 a 50 o 0,1 a 5,0 mg por kilogramo de peso corporal por día. Por ejemplo, el ARNbc se puede administrar a 0,01 mg/kg, 0,05 mg/kg, 0,1 mg/kg, 0,2 mg/kg, 0,3 mg/kg, 0,4 mg/kg, 0,5 mg/kg, 0,6 mg/kg, 0,7 mg/kg, 0,8 mg/kg, 0,9 mg/kg, 1,0 mg/kg, 1,1 mg/kg, 1,2 mg/kg, 1,3 mg/kg, 1,4 mg/kg, 1,5 mg/kg, 1,6 mg/kg, 1,7 mg/kg, 1,8 mg/kg, 1,9 mg/kg, 2 mg/kg, 3 mg/kg, 5,0 mg/kg, 10 mg/kg, 20 mg/kg, 30 mg/kg, 40 mg/kg, o 50 mg/kg por dosis única. La composición farmacéutica se puede administrar una vez al día o el ARNbc se puede administrar como dos, tres o más sub-dosis a intervalos apropiados a lo largo del día o incluso usando infusión continua o administración mediante una formulación de liberación controlada. En ese caso, el ARNbc contenido en cada sub-dosis debe ser correspondientemente más pequeño para lograr la dosis diaria total. La unidad de dosificación también puede ser combinada para administración durante varios días, por ejemplo, usando una formulación de liberación sostenida convencional que proporciona la liberación sostenida del ARNbc durante un periodo de varios días. Se conocen bien en la técnica las formulaciones de liberación sostenida y son particularmente útiles para la administración de agentes en un sitio particular, tal como se podrían usar con los agentes de la presente divulgación. Aquí, la unidad de dosificación contiene un múltiplo correspondiente de la dosis diaria.

20 El efecto de una dosis única sobre los niveles de SAA (o tanto los niveles de SAA1 como de SAA2) es de larga duración, de forma 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.

30 La presente divulgación incluye composiciones farmacéuticas que se pueden administrar por inyección directamente en el cerebro. La inyección puede ser por inyección estereotáctica en una región particular del cerebro (por ejemplo, la sustancia negra, corteza, hipocampo, estriado o globo pálido), o el ARNbc se puede administrar en múltiples regiones del sistema nervioso central (por ejemplo, en múltiples regiones del cerebro, y/o en la médula espinal). El ARNbc también se puede administrar en regiones difusas del cerebro (por ejemplo, administración difusa a la corteza del cerebro).

35 Un ARNbc que se dirige a SAA se puede administrar a modo de una cánula u otro dispositivo de administración que tiene un extremo implantado en un tejido, por ejemplo, el cerebro, por ejemplo, la sustancia negra, corteza, hipocampo, estriado, cuerpo caloso o globo pálido del cerebro. La cánula se puede conectar a un depósito de la composición de ARNbc. El flujo o administración pueden estar mediados por una bomba, por ejemplo, una bomba osmótica o minibomba, tal como una bomba Alzet (Durect, Cupertino, CA). Se pueden implantar una bomba y depósito en un área remota del tejido, por ejemplo, en el abdomen, y la administración se efectúa por un conducto que conduce desde la bomba o depósito hasta el sitio de liberación. La infusión de la composición de ARNbc en el cerebro puede ser durante varias horas o durante varios días, por ejemplo, durante 1, 2, 3, 5 o 7 días o más. Los dispositivos para la administración al cerebro se describen, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. N° 6.093.180 y 5.814.014.

40 El experto apreciará que ciertos factores pueden influir en la dosificación y el momento preciso requerido para tratar eficazmente un sujeto, que incluye, pero no se limitan a, la gravedad de la enfermedad o trastorno, tratamientos previos, la salud general y/o edad del sujeto, y otras enfermedades presentes. Además, el tratamiento de un sujeto con una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición puede incluir un único tratamiento o una serie de tratamientos. Se pueden hacer estimaciones de las dosificaciones y semividas *in vivo* eficaces para el ARNbc individual englobado por la presente divulgación usando metodologías convencionales o basándose en pruebas *in vivo* usando un modelo animal apropiado, como también se describe en cualquier parte en el presente documento.

45 Los avances en la genética del ratón han generado varios modelos de ratón para el estudio de diversas enfermedades humanas, tales como procesos patológicos mediados por la expresión de SAA. Dichos modelos se usan para pruebas *in vivo* de ARNbc, así como para determinar una dosis terapéuticamente eficaz. Un modelo de ratón adecuado es, por ejemplo, un ratón que contiene un plásmido que expresa SAA1 o SAA2 humano, por ejemplo, de un vector adenoviral. Otro modelo de ratón adecuado es un ratón transgénico que lleva un transgén que expresa SAA1 o SAA2 humano.

Se pueden usar los datos obtenidos de ensayos de cultivo celular y estudios en animales en la formulación de un intervalo de dosificación para su uso en seres humanos. La dosificación de las composiciones desveladas en el presente documento se encuentra generalmente dentro de un intervalo de concentraciones circulantes que incluye la DE50 con poca o ninguna toxicidad. La dosificación puede variar dentro de este intervalo dependiendo de la forma farmacéutica empleada y la vía de administración utilizada. Para cualquier compuesto usado en los métodos desvelados en el presente documento, la dosis terapéuticamente eficaz se puede estimar inicialmente a partir de ensayos de cultivo celular. Se puede formular una dosis en modelos animales para lograr un intervalo de concentración plasmática circulante del compuesto o, cuando convenga, del producto de polipéptido de una secuencia diana (por ejemplo, logrando una concentración reducida del polipéptido) que incluye la CI50 (es decir, la concentración del compuesto de prueba que logra una inhibición al 50 % de los síntomas) como se determina en cultivo celular. Dicha información se pueden usar para determinar con más exactitud dosis útiles en seres humanos. Los niveles en plasma se pueden medir, por ejemplo, por cromatografía líquida de alta resolución.

Los ARNbc desvelados en el presente documento se pueden administrar en combinación con otros agentes conocidos eficaces en el tratamiento de procesos patológicos mediados por la expresión de genes diana. En cualquier caso, el médico que administra puede ajustar la cantidad y el momento preciso de la administración de ARNbc basándose en los resultados observados usando medidas estándar de eficacia conocidas en la técnica o descritas en el presente documento.

Administración

En el presente documento también se desvelan composiciones y formulaciones farmacéuticas que incluyen los compuestos de ARNbc desvelados en el presente documento. Las composiciones farmacéuticas desveladas en el presente documento se pueden administrar de varias formas que dependen de si se desea tratamiento local o sistémico y del área que se va a tratar. La administración puede ser tópica, pulmonar, por ejemplo, por inhalación o insuflación de polvos o aerosoles, que incluyen por nebulizador; intratraqueal, intranasal, epidérmica y transdérmica, oral o parenteral. La administración parenteral incluye inyección intravenosa, intrarterial, subcutánea, intraperitoneal o intramuscular o infusión; o intracraneal, por ejemplo, administración intraparenquima, intratecal o intraventricular.

Las composiciones farmacéuticas y formulaciones para administración tópica pueden incluir parches transdérmicos, pomadas, lociones, cremas, geles, gotas, supositorios, esprays, líquidos y polvos. Pueden ser necesarios o deseables vehículos farmacéuticos convencionales, bases acuosas, en polvo u aceitosas, espesantes y similares. También pueden ser útiles preservativos recubiertos, guantes y similares. Las formulaciones tópicas adecuadas incluyen aquellas en las que los ARNbc desvelados en el presente documento están en mezcla con un agente de administración tópica tal como lípidos, liposomas, ácidos grasos, ésteres de ácidos grasos, esteroides, agentes quelantes y tensioactivos. Los lípidos y liposomas adecuados incluyen neutros (por ejemplo, dioleoilfosfatidiletanolamina DOPE, dimiristoilfosfatidilcolina DMPC, diestearoilfosfatidilcolina), negativos (por ejemplo, dimiristoilfosfatidilglicerol DMPG) y catiónicos (por ejemplo, dioleoiltrimetilaminopropilo DOTAP y dioleoilfosfatidiletanolamina DOTMA). Los ARNbc desvelados en el presente documento se pueden encapsular dentro de liposomas o pueden formar complejos con los mismos, en particular con liposomas catiónicos. Alternativamente, los ARNbc se pueden complejar con lípidos, en particular con lípidos catiónicos. Los ácidos grasos y ésteres adecuados incluyen, pero no se limitan a, ácido araquidónico, ácido oleico, ácido eicosanoico, ácido láurico, ácido caprílico, ácido cáprico, ácido mirístico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido linoleico, ácido linoléico, ácido linolénico, dicaprato, tricaprato, monooleína, dilaurina, 1-monocaprato de glicerilo, 1-dodecilazacloheptan-2-ona, una acilcarnitina, una acilcolina, o un éster de alquilo C1-10 (por ejemplo, miristato de isopropilo IPM), monoglicérido, diglicérido o sal farmacéuticamente aceptable del mismo. Las formulaciones tópicas se describen con detalle en la patente de EE.UU. N° 6.747.014.

Las composiciones y formulaciones para administración por vía oral incluyen polvos o gránulos, micropartículas, nanopartículas, suspensiones o disoluciones en agua o medios no acuosos, cápsulas, cápsulas de gel, sobres, comprimidos o minicomprimidos. Pueden ser deseables espesantes, aromatizantes, diluyentes, emulsionantes, adyuvantes de dispersión o aglutinantes. Las formulaciones orales pueden ser aquellas en las que los ARNbc desvelados en el presente documento se administran conjuntamente con uno o más potenciadores de la penetración, tensioactivos y quelantes. Los tensioactivos adecuados incluyen ácidos grasos y/o ésteres o sales de los mismos, ácidos biliares y/o sales de los mismos. Los ácidos/sales biliares adecuados incluyen ácido quenodesoxicólico (CDCA) y ácido ursodesoxicólico (UDCA), ácido cólico, ácido dehidrocólico, ácido desoxicólico, ácido glucólico, ácido glicólico, ácido glicodesoxicólico, ácido taurocólico, ácido taurodesoxicólico, tauro-24,25-dihidro-fusidato 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 linoléico, dicaprato, tricaprato, monooleína, dilaurina, 1-monocaprato de glicerilo, 1-dodecilazacloheptan-2-ona, una acilcarnitina, una acilcolina, o un monoglicérido, un diglicérido o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo (por ejemplo, sodio). Se pueden usar combinaciones de potenciadores de la penetración, por ejemplo, sales/ácidos grasos en combinación con ácidos/sales biliares. Una combinación a modo de ejemplo es la sal de sodio del ácido láurico, ácido cáprico y UDCA. Los potenciadores de la penetración adicionales incluyen polioxietileno-9-lauril éter, polioxietileno-20-cetil éter. Los ARNbc desvelados en el presente documento se pueden administrar por vía oral, en forma granulada que incluye partículas secadas por pulverización, o complejados para formar micro o nanopartículas. Los agentes de complejación de ARNbc incluyen

poli-aminoácidos; poliiiminas; poliacrilatos; polialquilacrilatos, polioxetanos, polialquilcianoacrilatos; gelatinas cationizadas, albúminas, almidones, acrilatos, polietilenglicoles (PEG) y almidones; polialquilcianoacrilatos; poliiiminas derivatizadas con DEAE, polulanos, celulosas y almidones. Los agentes complejantes adecuados incluyen quitosano, N-trimetilquitosano, poli-L-lisina, polihistidina, poliornitina, poliesperminas, protamina, polivinilpiridina, politioidietilaminometilileno P(TDAE), poliaminoestireno (por ejemplo, p-amino), poli(metilcianoacrilato), poli(etilcianoacrilato), poli(butilcianoacrilato), poli(isobutilcianoacrilato), poli(isohexilcianoacrilato), DEAE-metacrilato, DEAE-hexilacrilato, DEAE-acrilamida, DEAE-albúmina y DEAE-dextrano, polimetilacrilato, polihexilacrilato, poli(ácido D,L-láctico), poli(ácido DL-láctico-co-glicólico (PLGA), alginato y polietilenglicol (PEG). Las formulaciones orales para ARNbc y su preparación se describen con detalle en la patente de EE.UU. 6.887.906, publicación de EE.UU. N° 20030027780 y la patente de EE.UU. N° 6.747.014.

Las composiciones y formulaciones para administración parenteral, intraparenquimatosa (en el cerebro), intratecal, intraventricular o intrahepática pueden incluir disoluciones acuosas estériles que también pueden contener tampones, diluyentes y otros aditivos adecuados tales como, pero no se limitan a, potenciadores de la penetración, compuestos de vehículo y otros vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables.

Las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación incluyen, pero no se limitan a, disoluciones, emulsiones y formulaciones que contienen liposomas. Estas composiciones se pueden generar a partir de una variedad de componentes que incluyen, pero no se limitan a, líquidos previamente formados, sólidos auto-emulsionantes y semisólidos auto-emulsionantes. Se prefieren particularmente formulaciones que se dirigen al hígado cuando se tratan trastornos hepáticos tales como carcinoma hepático.

Las formulaciones farmacéuticas de la presente divulgación, que se pueden presentar convenientemente en forma farmacéutica unitaria, se pueden preparar según técnicas convencionales bien conocidas en la industria farmacéutica. Dichas técnicas incluyen la etapa de poner en asociación los principios activos con el (los) vehículo(s) farmacéutico(s) o excipiente(s). En general, las formulaciones se preparan poniendo uniforme e íntimamente en asociación los principios activos con vehículos líquidos o vehículos sólidos finamente divididos, o ambos, y entonces, si fuera necesario, moldeando el producto.

Formulaciones liposomales

Existen muchas estructuras organizadas de tensioactivos, además de microemulsiones, que se han estudiado y usado para la formulación de fármacos. Estas incluyen monocapas, micelas, bicapas y vesículas. Las vesículas, tales como liposomas, han atraído gran interés debido a su especificidad y la duración de acción que ofrecen desde el punto de vista de la administración de fármacos. Como se usa en la presente divulgación, el término "liposoma" significa una vesícula compuesta de lípidos anfifílicos dispuestos en una bicapa o bicapas esféricas.

Los liposomas son vesículas unilaminares o multilaminares que tienen una membrana formada de un material lipófilo y un interior acuoso. La porción acuosa contiene la composición a administrar. Los liposomas catiónicos poseen la ventaja de ser capaces de fusionarse con la pared celular. Los liposomas no catiónicos, aunque no son capaces de fusionarse tan eficientemente con la pared celular, son recogidos por macrófagos *in vivo*.

Para cruzar intactas la piel del mamífero, las vesículas de lípido deben pasar a través de una serie de poros finos, cada uno con un diámetro inferior a 50 nm, bajo la influencia de un gradiente transdérmico adecuado. Por tanto, se desea usar un liposoma que sea altamente deformable y capaz de pasar a través de dichos poros finos.

Las ventajas adicionales 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 los fármacos encapsulados en sus compartimentos internos del metabolismo y la degradación (Rosoff, en *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volumen 1, p. 245). Consideraciones importantes en la preparación de formulaciones de liposomas son la carga superficial del lípido, tamaño de vesículas y el volumen acuoso de los liposomas.

Los liposomas son útiles para la transferencia y administración de principios activos al sitio de acción. Debido a que la membrana liposomal es estructuralmente similar a las membranas biológicas, cuando los liposomas se aplican a un tejido, los liposomas empiezan a fusionarse con las membranas celulares y a medida que avanza la fusión del liposoma y la célula, se vacían los contenidos liposomales en la célula donde puede actuar el agente activo.

Las formulaciones liposomales han sido el objetivo de una amplia investigación como modo de administración para muchos fármacos. Existe una evidencia cada vez mayor de que para la administración tópica, los liposomas presentan varias ventajas con respecto a otras formulaciones. Dichas ventajas incluyen efectos secundarios reducidos relacionados con la alta absorción sistémica del fármaco administrado, elevada 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.

Varios informes han detallado la capacidad de los liposomas para administrar agentes que incluyen ADN de alto peso molecular en la piel. Se han administrado a la piel compuestos que incluyen analgésicos, anticuerpos,

hormonas y ADN de alto peso molecular. La mayoría de las aplicaciones produjeron el direccionamiento de la epidermis superior.

Los liposomas se clasifican en dos amplias clases. Los liposomas catiónicos son liposomas positivamente cargados que interaccionan con las moléculas de ADN negativamente cargadas para formar un complejo estable. El complejo de ADN positivamente cargado/liposoma se une a la superficie celular negativamente cargada y es internalizado en un endosoma. Debido al pH ácido dentro del endosoma, se rompen los liposomas, liberando su contenido en el citoplasma celular (Wang et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1987, 147, 980-985).

Los liposomas que son sensibles al pH o están negativamente cargados atrapan el ADN en vez de complejarse con él. Puesto que tanto el ADN como el lípido están similarmente cargados, ocurre la repulsión en vez de la formación de complejos. Sin embargo, algo del ADN es atrapado dentro del interior acuoso de estos liposomas. Se han usado liposomas sensibles al pH para administrar ADN que codifica el gen de timidina cinasa a monocapas de células en cultivo. Se detectó la expresión del gen exógeno en las células diana (Zhou et al., *Journal of Controlled Release*, 1992, 19, 269-274).

Un tipo principal de composición liposomal incluye fosfolípidos distintos de fosfatidilcolina naturalmente derivada. Se pueden formar composiciones de liposomas neutros, por ejemplo, a partir de dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC) o dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC). Generalmente se forman composiciones de liposomas aniónicos a partir de dimiristoilfosfatidilglicerol, mientras que los liposomas fusogénicos aniónicos se forman principalmente a partir de dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE). Otro tipo de composición liposomal 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 fosfolípido y/o fosfatidilcolina y/o colesterol.

Varios estudios han evaluado la administración tópica de formulaciones de fármacos liposomales a la piel. La administración de liposomas que contienen interferón a piel de cobaya produjo una reducción de las llagas del herpes de piel, mientras que la administración de interferón mediante otros medios (por ejemplo, como una disolución o como una emulsión) fue ineficaz (Weiner et al., *Journal of Drug Targeting*, 1992, 2, 405-410). Además, un estudio adicional probó la eficacia del interferón administrado como parte de una formulación liposomal a la administración de interferón usando un sistema acuoso, y llegó a la conclusión de que la formulación liposomal era superior a la administración acuosa (du Plessis et al., *Antiviral Research*, 1992, 18, 259-265).

También se han examinado sistemas liposomales no iónicos para determinar su utilidad en la administración de fármacos a la piel, en particular sistemas que comprenden tensoactivo no iónico y colesterol. Se usaron formulaciones liposomales no iónicas que comprendían Novasome™ I (dilaurato de glicerilo/colesterol/polioxietileno-10-estearil éter) y Novasome™ II (diestearato de glicerilo/colesterol/polioxietileno-10-estearil éter) para administrar ciclosporina-A en la dermis de la piel de ratón. Los resultados indicaron que dichos sistemas liposomales no iónicos fueron eficaces en facilitar la deposición de 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 "estéricamente estabilizados", un término que, como se usa en el presente documento, se refiere a liposomas que comprenden uno o más lípidos especializados que, cuando se incorporan en liposomas, dan como resultado vidas en circulación potenciadas con respecto a liposomas que carecen de dichos lípidos especializados. Los ejemplos de liposomas estéricamente estabilizados son aquellos en los que parte de la porción de lípido formadora de vesícula del liposoma (A) comprende uno o más glucolípidos, tales como monosialogangliósido G_{M1} , o (B) se derivatiza con uno o más polímeros hidrófilos, tales como un resto de polietilenglicol (PEG). Aunque no se desea quedar ligado a teoría particular alguna, se cree en la técnica que, al menos para los liposomas estéricamente estabilizados que contienen gangliósidos, esfingomielina o lípidos derivados de PEG, la semivida en circulación potenciada de estos liposomas estéricamente estabilizados deriva de una captación reducida en células del sistema reticuloendotelial (RES) (Allen et al., *FEBS Letters*, 1987, 223, 42; Wu et al., *Cancer Research*, 1993, 53, 3765).

Se conocen en la técnica diversos liposomas que comprenden uno o más glucolípidos. Papahadjopoulos et al. (*Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1987, 507, 64) informaron de la capacidad del monosialogangliósido G_{M1} , sulfato de galactocerebrósido y fosfatidilinositol para mejorar las semividas en sangre de liposomas. Estos hallazgos se expusieron por Gabizon et al. (*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1988, 85, 6949). La patente de EE.UU. N° 4.837.028 y el documento de patente WO 88/04924, ambos por Allen et al., desvelan liposomas que comprenden (1) esfingomielina y (2) el gangliósido G_{M1} o un éster de sulfato de galactocerebrósido. La patente de EE.UU. N° 5.543.152 (Webb et al.) desvela liposomas que comprenden esfingomielina. En el documento de patente WO 97/13499 (Lim et al.) se desvelan liposomas que comprenden 1,2-sn-dimiristoilfosfatidilcolina.

Se conocen en la técnica muchos liposomas que comprenden lípidos derivatizados con uno o más polímeros hidrófilos, y métodos de su preparación. Sunamoto et al. (*Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 1980, 53, 2778) describieron liposomas que comprenden un detergente no iónico, 2C1215G, que contiene un resto de PEG. Illum et al. (*FEBS Lett.*, 1984, 167, 79) observaron que el recubrimiento hidrófilo de partículas de poliestireno con glicoles poliméricos da como resultado semividas en sangre significativamente potenciadas. Se describen por Sears (patentes de EE.UU. N° 4.426.330 y 4.534.899) fosfolípidos sintéticos modificados por la unión de grupos carboxílicos de

polialquilenglicoles (por ejemplo, PEG). Klibanov et al. (FEBS Lett., 1990, 268, 235) describieron experimentos que demostraban que los liposomas que comprenden fosfatidiletanolamina (PE) derivatizada con PEG o estearato de PEG tienen aumentos significativos en las semividas de circulación en sangre. Blume et al. (Biochimica et Biophysica Acta, 1990, 1029, 91) extendieron dichas observaciones a otros fosfolípidos derivatizados con PEG, por ejemplo, DSPE-PEG, formados a partir de la combinación de diestearoilfosfatidiletanolamina (DSPE) y PEG. Los liposomas que tienen restos de PEG covalentemente unidos sobre su superficie externa se describen en la patente europea N° EP 0 445 131 B1 y el documento de patente WO 90/04384 por Fisher. Las composiciones de liposomas que contienen 1-20 por ciento en moles de PE derivatizado con PEG, y métodos de uso de las mismas, se describen por Woodle et al. (patentes de EE.UU. N° 5.013.556 y 5.356.633) y Martin et al. (patente de EE.UU. N° 5.213.804 y la patente europea EP 0 496 813 B1). Los liposomas que comprenden varios otros conjugados de lípido-polímero se desvelan en el documento WO 91/05545 y la patente de EE.UU. N° 5.225.212 (ambos a Martin et al.) y en el documento de patente WO 94/20073 (Zalipsky et al.) Los liposomas que comprenden lípidos de ceramida modificados con PEG se describen en el documento de patente WO 96/10391 (Choi et al.). La patente de EE.UU. N° 5.540.935 (Miyazaki et al.) y la patente de EE.UU. N° 5.556.948 (Tagawa et al.) describen liposomas que contienen PEG que se pueden derivatizar adicionalmente con restos funcionales sobre sus superficies.

Se conocen en la técnica varios liposomas que comprenden ácidos nucleicos. El documento de patente WO 96/40062 por Thierry et al. desvela métodos de encapsulación de ácidos nucleicos de alto peso molecular en liposomas. La patente de EE.UU. N° 5.264.221 por Tagawa et al. desvelan liposomas unidos a proteína y afirma que el contenido de dichos liposomas puede incluir un ARNbc. La patente de EE.UU. N° 5.665.710 por Rahman et al. describe ciertos métodos de encapsulación de oligodesoxinucleótidos en liposomas. El documento de patente WO 97/04787 por Love et al. desvela liposomas que comprenden ARNbc dirigido al gen raf.

Los transferosomas son otro tipo más de liposomas, y son agregados de lípidos altamente deformables que son candidatos atractivos para vehículos de administración de fármaco. Los transferosomas se pueden describir como gotitas de lípido que son tan altamente deformables que son fácilmente capaces de penetrar a través de poros que son más pequeños que la gotita. Los transferosomas son adaptables al entorno en que se usan, por ejemplo, son auto-optimizantes (adaptables a la forma de poros en la piel), auto-reparadores, frecuentemente llegan a sus dianas sin fragmentarse, y frecuentemente se auto-cargan. Para preparar transferosomas es posible añadir activadores del borde superficial, normalmente tensioactivos, a una composición liposomal convencional. Los transferosomas se han usado para administrar albúmina de suero a la piel. Se ha mostrado que la administración de albúmina de suero mediada por transferosomas es tan eficaz como la inyección subcutánea de una disolución que contiene albúmina de suero.

Los tensioactivos encuentran una amplia aplicación en formulaciones tales como emulsiones (incluyendo microemulsiones) y liposomas. La forma más común de clasificar y ordenar las propiedades de los muchos tipos diferentes de tensioactivos, tanto naturales como sintéticos, es por el uso del equilibrio hidrófilo/lipófilo (HLB). La naturaleza del grupo hidrófilo (también conocido como la "cabeza") proporciona el medio más útil para clasificar los diferentes tensioactivos usados en formulaciones (Rieger, en Pharmaceutical Dosage Forms, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 1988, p. 285).

Si la molécula de tensioactivo no está ionizada, se clasifica como un tensioactivo no iónico. Los tensioactivos no iónicos encuentran una amplia aplicación en productos farmacéuticos y cosméticos y son utilizables durante un amplio intervalo de valores de pH. En general, sus valores de HLB oscilan desde 2 hasta aproximadamente 18 dependiendo de su estructura. Los tensioactivos no iónicos incluyen ésteres no iónicos tales como ésteres de etilenglicol, ésteres de propilenglicol, ésteres de glicerilo, ésteres de poliglicerilo, ésteres de sorbitano, ésteres de sacarosa y ésteres etoxilados. También están incluidas en esta clase alcanolamidas no iónicas y éteres tales como etoxilatos de alcoholes grasos, alcoholes propoxilados y polímeros de bloque etoxilados/propoxilados. Los tensioactivos de polioxietileno son los miembros más populares de la clase de tensioactivos no iónicos.

Si la molécula de tensioactivo lleva una carga negativa cuando se disuelve o dispersa en agua, el tensioactivo se clasifica como aniónico. Los tensioactivos aniónicos incluyen carboxilatos tales como jabones, lactilatos de acilo, acilamidas de aminoácidos, ésteres de ácido sulfúrico tales como sulfatos de alquilo y sulfatos de alquilo etoxilados, sulfonatos tales como alquilbencenosulfonatos, isetionatos de acilo, tauratos de acilo y sulfosuccinatos, y fosfatos. Los miembros más importantes de la clase de tensioactivos aniónicos son los sulfatos de alquilo y los jabones.

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

Si la molécula de tensioactivo tiene la capacidad de llevar tanto una carga positiva como negativa, el tensioactivo se clasifica como anfótero. Los tensioactivos anfóteros incluyen derivados de ácido acrílico, alquilamidas sustituidas, N-alquilbetaínas y fosfatidas.

Se ha revisado el uso de tensioactivos en medicamentos, formulaciones y en emulsiones (Rieger, en Pharmaceutical Dosage Forms, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 1988, p. 285).

SNALPs

Un ARNbc desvelado en el presente documento puede estar completamente encapsulado en la formulación de lípidos para formar un SPLP, pSPLP, SNALP, u otra partícula de ácido nucleico-lípido. Como se usa en el presente documento, el término "SNALP" se refiere a una partícula de ácido nucleico-lípido estable, que incluye SPLP. Como se usa en el presente documento, el término "SPLP" se refiere a una partícula de ácido nucleico-lípido que comprende ADN de plásmido encapsulado dentro de una vesícula de lípido. SNALPs y SPLPs normalmente contienen un lípido catiónico, un lípido no catiónico y un lípido que previene la agregación de la partícula (por ejemplo, un conjugado de PEG-lípido). Los SNALPs y SPLPs son extremadamente útiles para administraciones sistémicas, ya que presentan extendidas vidas en circulación tras la inyección intravenosa (i.v.) y se acumulan en sitios distales (por ejemplo, sitios físicamente separados del sitio de administración). Los SPLPs incluyen "pSPLP", que incluyen un complejo de agente de condensación-ácido nucleico encapsulado como se expone en la publicación PCT N° WO 00/03683. Las partículas de la presente divulgación normalmente tienen un diámetro medio de aproximadamente 50 nm a aproximadamente 150 nm, más normalmente aproximadamente 60 nm a aproximadamente 130 nm, más normalmente aproximadamente 70 nm a aproximadamente 110 nm, lo más normalmente aproximadamente 70 a aproximadamente 90 nm, y son sustancialmente no tóxicas. Además, los ácidos nucleicos cuando están presentes en las partículas de ácido nucleico-lípido de la presente divulgación son resistentes en disolución acuosa a la degradación con una nucleasa. Las partículas de ácido nucleico-lípido y su método de preparación se desvelan en, por ejemplo, las patentes de EE.UU. N° 5.976.567; 5.981.501; 6.534.484; 6.586.410; 6.815.432; y la publicación PCT N° WO 96/40964.

La relación entre lípido y fármaco (relación masa/masa) (por ejemplo, relación entre lípido y ARNbc) puede estar en el intervalo de desde aproximadamente 1:1 hasta aproximadamente 50:1, desde aproximadamente 1:1 hasta aproximadamente 25:1, desde aproximadamente 3:1 hasta aproximadamente 15:1, desde aproximadamente 4:1 hasta aproximadamente 10:1, desde aproximadamente 5:1 hasta aproximadamente 9:1, o aproximadamente 6:1 a aproximadamente 9:1, o 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, o 11:1.

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-dioleoiloxi)propil)-N,N,N-trimetilamonio (DOTAP), cloruro de N-(1-(2,3-dioleoiloxi)propil)-N,N,N-trimetilamonio (DOTMA), N,N-dimetil-2,3-dioleoiloxi)propilamina (DODMA), 1,2-dilinoileiloxi-N,N-dimetilaminopropano (DLinDMA), 1,2-dilinoileniloxi-N,N-dimetilaminopropano (DLenDMA), 1,2-dilinoileilcarbamoiloxi-3-dimetilaminopropano (Dlin-C-DAP), 1,2-dilinoileiloxi-3-(dimetilamino)acetoxipropano (Dlin-DAC), 1,2-dilinoileiloxi-3-morfolinopropano (Dlin-MA), 1,2-dilinoileil-3-dimetilaminopropano (DLinDAP), 1,2-dilinoileil-3-dimetilaminopropano (Dlin-S-DMA), 1-linoileil-2-linoileiloxi-3-dimetilaminopropano (Dlin-2-DMAP), sal de cloruro de 1,2-dilinoileiloxi-3-trimetilaminopropano (Dlin-TMA.Cl), sal de cloruro de 1,2-dilinoileil-3-trimetilaminopropano (Dlin-TAP.Cl), 1,2-dilinoileiloxi-3-(N-metilpiperazino)propano (Dlin-MPZ), o 3-(N,N-dilinoileilamino)-1,2-propanodiol (DlinAP), 3-(N,N-dioleilamino)-1,2-propanodiol (DOAP), 1,2-dilinoileiloxo-3-(2-N,N-dimetilamino)etoxipropano (Dlin-EG-DMA), 1,2-dilinoileniloxi-N,N-dimetilaminopropano (DLinDMA), 2,2-dilinoileil-4-dimetilaminometil-[1,3]-dioxolano (Dlin-K-DMA) o sus análogos, o una mezcla de los mismos. El lípido catiónico puede comprender desde aproximadamente 20 % en moles hasta aproximadamente 60 % en moles o aproximadamente 40 % en moles, 50 % en moles, 51 % en moles, 52 % en moles, 53 % en moles, 54 % en moles, 55 % en moles, 56 % en moles, 57 % en moles, 58 % en moles, 59 % en moles, o 60 % en moles, del lípido total presente en la partícula.

El lípido catiónico 2,2-dilinoileil-4-dimetilaminoetil-[1,3]-dioxolano (Lípido A) se pueden usar para preparar nanopartículas de lípido-ARNip.

La partícula de lípido-ARNip puede incluir 40 % de 2, 2-dilinoileil-4-dimetilaminoetil-[1,3]-dioxolano (Lípido A): 10 % de DSPC: 40 % de colesterol: 10 % de PEG-C-DOMG (porcentaje en moles) con un tamaño de partículas de 63,0 ± 20 nm y una relación ARNip/lípido 0,027.

El lípido no catiónico puede ser un lípido aniónico o un lípido neutro que incluye, pero no se limita a, diestearoilfosfatidilcolina (DSPC), dioleoilfosfatidilcolina (DOPC), dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), dioleoilfosfatidilglicerol (DOPG), dipalmitoilfosfatidilglicerol (DPPG), dioleoil-fosfatidiletanolamina (DOPE), palmitoiloleoilfosfatidilcolina (POPC), palmitoiloleoil-fosfatidiletanolamina (POPE), 4-(N-maleimidometil)-ciclohexano-1-carboxilato de dioleoil-fosfatidiletanolamina (DOPE-mal), dipalmitoilfosfatidiletanolamina (DPPE), dimiristoilfosfoetanolamina (DMPE), diestearoil-fosfatidil-etanolamina (DSPE), 16-O-monometil PE, 16-O-dimetil PE, 18-1-trans PE, 1-estearoil-2-oleoil-fosfatidiletanolamina (SOPE), colesterol, o una mezcla de los mismos. El lípido no catiónico puede ser desde aproximadamente 5 % en moles hasta aproximadamente 90 % en moles, aproximadamente 10 % en moles, o aproximadamente 58 % en moles si se incluye colesterol, del lípido total presente en la partícula. El lípido no catiónico puede ser aproximadamente desde aproximadamente 7 % en moles hasta aproximadamente 8 % en moles, o 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9 o 8,0 % en moles.

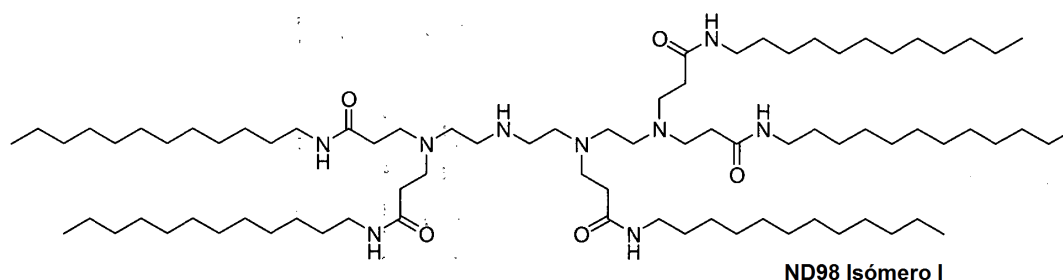
El lípido conjugado que inhibe la agregación de partículas puede ser, por ejemplo, un polietilenglicol (PEG)-lípido que incluye, sin limitación, un PEG-diacilglicerol (DAG), un PEG-dialquiloilpropilo (DAA), un PEG-fosfolípido, un PEG-ceramida (Cer), o una mezcla de los mismos. El conjugado de PEG-DAA puede ser, por ejemplo, un PEG-dilauriloilpropilo (Ci₂), un PEG-dimiristiloilpropilo (Ci₄), un PEG-dipalmitiloilpropilo (Ci₆), o un PEG-

diesteariloxipropilo (C₈). El lípido conjugado que previene la agregación de partículas puede ser desde 0 % en moles hasta aproximadamente 20 % en moles o aproximadamente 2 % en moles del lípido total presente en la partícula.

5 La partícula de ácido nucleico-lípido puede incluir además colesterol a, por ejemplo, aproximadamente 10 % en moles a aproximadamente 60 % en moles o aproximadamente 48 % en moles del lípido total presente en la partícula.

LNP01

10 Se pueden usar el lipidoide ND98-4HCl (MW 1487) (Fórmula 1), colesterol (Sigma-Aldrich) y PEG-ceramida C16 (Avanti Polar Lipids) para preparar nanopartículas de lípido-ARNip (es decir, partículas de LNP01). Se pueden preparar disoluciones madre de cada uno en etanol del siguiente modo: ND98, 133 mg/mL; colesterol, 25 mg/mL, PEG-ceramida C16, 100 mg/mL. Entonces se pueden combinar las disoluciones madre de ND98, colesterol y PEG-ceramida C16 en una relación molar, por ejemplo, 42:48:10. La disolución de lípido combinada se puede mezclar con ARNip acuoso (por ejemplo, en acetato sódico a pH 5) de forma que la concentración de etanol final sea aproximadamente 35-45 % y la concentración de acetato sódico final sea aproximadamente 100-300 mM. Las nanopartículas de lípido-ARNip normalmente se forman espontáneamente tras la mezcla. Dependiendo de la distribución deseada del tamaño de partículas, la mezcla de nanopartículas resultante se puede extruir a través de una membrana de policarbonato (por ejemplo, corte de 100 nm) usando, por ejemplo, una prensa extrusora de cilindro térmico, tal como prensa extrusora Lipex (Northern Lipids, Inc). En algunos casos, se puede omitir la etapa de extrusión. Se pueden llevar a cabo la retirada del etanol y el intercambio de tampón simultáneo, por ejemplo, por diálisis o filtración de flujo tangencial. El tampón se puede intercambiar con, por ejemplo, solución salina tamponada con fosfato (PBS) a aproximadamente pH 7, por ejemplo, aproximadamente pH 6,9, aproximadamente pH 7,0, aproximadamente pH 7,1, aproximadamente pH 7,2, aproximadamente pH 7,3, o aproximadamente pH 7,4.



Fórmula 1

Se describen formulaciones de LNP01, por ejemplo, en la publicación de solicitud internacional N° WO 2008/042973.

25 Las formulaciones de lípido-ARNip a modo de ejemplo adicionales son del siguiente modo:

	Lípido catiónico	Conjugado de lípido catiónico/lípido no catiónico/Colesterol/PEG-lípido Relación lípido:ARNip	Proceso
SNALP	1,2-Dilinoleniloxi-N,N-dimetilaminopropano (DLinDMA)	DLinDMA/DPPC/Colesterol/PEG-cDMA (57,1/7,1/34,4/1,4) lípido:ARNip ~ 7:1	
SNALP-LÍPIDO A	2,2-Dilinoil-4-dimetilaminoetil-[1,3]-dioxolano (LÍPIDO A)	LÍPIDO A/DPPC/Colesterol/PEG-cDMA 57,1/7,1/34,4/1,4 lípido:ARNip ~ 7:1	
LNP05	2,2-Dilinoil-4-dimetilaminoetil-[1,3]-dioxolano (LÍPIDO A)	LÍPIDO A/DSPC/Colesterol/PEG-DMG 57,5/7,5/31,5/3,5 lípido:ARNip ~ 6:1	Extrusión
LNP06	2,2-Dilinoil-4-dimetilaminoetil-[1,3]-dioxolano (LÍPIDO A)	LÍPIDO A/DSPC/Colesterol/PEG-DMG 57,5/7,5/31,5/3,5 lípido:ARNip ~ 11:1	Extrusión

	Lípido catiónico	Conjugado de lípido catiónico/lípido no catiónico/Colesterol/PEG-lípido Relación lípido:ARNip	Proceso
LNP07	2,2-Dilinoil-4-dimetilaminoetil-[1,3]-dioxolano (LÍPIDO A)	LÍPIDO A/DSPC/Colesterol/PEG-DMG 60/7,5/31/1,5, lípido:ARNip ~ 6:1	Mezcla en línea
LNP08	2,2-Dilinoil-4-dimetilaminoetil-[1,3]-dioxolano (LÍPIDO A)	LÍPIDO A/DSPC/Colesterol/PEG-DMG 60/7,5/31/1,5, lípido:ARNip ~ 11:1	Mezcla en línea
LNP09	2,2-Dilinoil-4-dimetilaminoetil-[1,3]-dioxolano (LÍPIDO A)	LÍPIDO A/DSPC/Colesterol/PEG-DMG 50/10/38,5/1,5 Lípido:ARNip 10:1	Mezcla en línea
LNP10	(3aR,5s,6aS)-N,N-dimetil-2,2-di((9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienil)tetrahydro-3aH-ciclopenta[d][1,3]dioxol-5-amina (ALN100)	ALN100/DSPC/Colesterol/PEG-DMG 50/10/38,5/1,5 Lípido:ARNip 10:1	Mezcla en línea
LNP11	4-(Dimetilamino)butanoato de (6Z,9Z,28Z,31Z)-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	Mezcla en línea
LNP12	1,1'-(2-(4-(2-(2-(bis(2-hidroxidodecil)amino)etil)(2-hidroxidodecil)amino)etil)piperazin-1-il)etilazanediii)didodecan-2-ol (Tech G1)	Tech G1/DSPC/Colesterol/PEG-DMG 50/10/38,5/1,5 Lípido:ARNip 10:1	Mezcla en línea

5 Las composiciones de la presente divulgación se pueden formular en cualquiera de las muchas posibles formas farmacéuticas tales como, pero no se limitan a, comprimidos, cápsulas, cápsulas de gel, jarabes líquidos, geles blandos, supositorios y enemas. Las composiciones de la presente divulgación también se pueden formular como suspensiones en medios acuosos, no acuosos o mixtos. Las suspensiones acuosas pueden contener sustancias adicionales que aumentan la viscosidad de la suspensión que incluyen, por ejemplo, carboximetilcelulosa de sodio, sorbitol y/o dextrano. La suspensión también puede contener estabilizadores.

Emulsiones

10 Las composiciones de la presente divulgación se pueden preparar y formular como emulsiones. Las emulsiones son normalmente sistemas heterogéneos de un líquido dispersado en otro en forma de gotitas que normalmente superan 0,1 µm de diámetro (Idson, en *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volumen 1, p. 199; Rosoff, en *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., Volumen 1, p. 245; Block in *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volumen 2, p. 335; Higuchi et al., en *Remington's Pharmaceutical Sciences*, Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1985, p. 301). Las emulsiones son frecuentemente sistemas bifásicos que comprenden dos fases líquidas inmiscibles íntimamente mezcladas y dispersadas entre sí. En general, las emulsiones pueden ser de tanto la variedad de agua en aceite (w/o) como de aceite en agua (o/w). Cuando una fase acuosa se divide finamente en y se dispersa como minúsculas gotitas en una fase aceitosa a granel, la composición resultante se denomina una emulsión de agua en aceite (w/o). Alternativamente, cuando una fase aceitosa está finamente dividida en y dispersada como minúsculas gotitas en una fase acuosa a granel, la composición resultante se denomina una emulsión de aceite en agua (o/w). Las emulsiones pueden contener componentes adicionales, además de las fases dispersadas, y el fármaco activo que puede estar presente como una disolución en tanto la fase acuosa, fase aceitosa como en sí misma como una fase separada. También pueden estar presentes en las emulsiones según se necesiten excipientes farmacéuticos tales como emulsionantes, estabilizadores, colorantes y antioxidantes. Las emulsiones farmacéuticas también pueden ser emulsiones múltiples que comprenden más de dos fases tales como, por ejemplo, en el caso de emulsiones de aceite en agua en aceite (o/w/o) y agua en aceite en agua (w/o/w). Dichas formulaciones complejas frecuentemente proporcionan ciertas ventajas que no tienen las emulsiones binarias simples. Las emulsiones múltiples en las que gotitas de aceite individuales de una emulsión o/w encierran pequeñas gotitas de agua constituyen una emulsión w/o/w. Asimismo, un sistema de gotitas de aceite encerradas en glóbulos de agua estabilizados en una fase continua aceitosa proporciona una emulsión o/w/o.

35 Las emulsiones se caracterizan por poca o ninguna estabilidad termodinámica. Frecuentemente, la fase dispersada o discontinua de la emulsión está bien dispersada en la fase externa o continua y se mantiene en esta forma mediante 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 bases de pomada y cremas del estilo emulsión. Otros medios de

estabilizar emulsiones conllevan el uso de emulsionantes que se pueden incorporar en cualquier fase de la emulsión. Los emulsionantes se pueden clasificar ampliamente en cuatro categorías: tensioactivos sintéticos, emulsionantes que existen de forma natural, bases de absorción y sólidos finamente dispersados (Idson, en *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volumen 1, p. 199).

Los tensioactivos sintéticos, también conocidos como agentes tensioactivos, han encontrado una amplia aplicabilidad en la formulación de emulsiones y se han revisado en la bibliografía (Rieger, en *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volumen 1, p. 285; Idson, en *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 1988, volumen 1, p. 199). Los tensioactivos normalmente son anfifílicos y comprenden una porción hidrófila y una hidrófoba. La relación entre la naturaleza hidrófila y la hidrófoba del tensioactivo se ha denominado el equilibrio hidrófilo/lipófilo (HLB) y es una valiosa herramienta en la clasificación y selección de tensioactivos en la preparación de formulaciones. Los tensioactivos se pueden clasificar en diferentes clases basándose en la naturaleza del grupo hidrófilo: no iónico, aniónico, catiónico y anfótero (Rieger, en *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volumen 1, p. 285).

Los emulsionantes que existen de forma natural usados en las formulaciones en emulsión incluyen lanolina, cera de abeja, fosfatidas, lecitina y goma arábiga. Las bases de absorción poseen propiedades hidrófilas de forma que puedan absorber agua para formar emulsiones w/o que todavía retienen sus consistencias semisólidas, tales como lanolina anhidra y vaselina hidrófila. También se han usado sólidos finamente divididos como buenos emulsionantes, especialmente en combinación con tensioactivos y en preparaciones viscosas. Estos incluyen sólidos inorgánicos polares, tales como hidróxidos de metales pesados, arcillas no hinchables tales como bentonita, atapulgita, hectorita, caolín, montmorillonita, silicato de aluminio coloidal y silicato de magnesio y aluminio coloidal, pigmentos y sólidos no polares tales como carbono o triestearato de glicerilo.

También están incluidos en las formulaciones en emulsión una gran variedad de materiales no emulsionantes y contribuyen a 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 and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volumen 1, p. 335; Idson, en *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volumen 1, p. 199).

Los coloides hidrófilos o hidrocoloides incluyen gomas que existen de forma natural y polímeros sintéticos tales como polisacáridos (por ejemplo, goma arábiga, agar, ácido alginico, carragenina, goma guar, goma karaya y tragacanto), derivados de celulosa (por ejemplo, carboximetilcelulosa y carboxipropilcelulosa) y polímeros sintéticos (por ejemplo, carbómeros, éteres de celulosa y polímeros de carboxivinilo). Estos se dispersan o hinchan en agua para formar disoluciones coloidales que estabilizan las emulsiones formando fuertes películas interfaciales alrededor de las gotitas de fase dispersada y aumentando la viscosidad de la fase externa.

Puesto que las emulsiones contienen frecuentemente varios componentes tales como hidratos de carbono, proteínas, esteroides y fosfatidas que pueden soportar fácilmente el crecimiento de microbios, estas formulaciones frecuentemente incorporan conservantes. Los conservantes comúnmente usados incluidos en las formulaciones en emulsión incluyen metilparabeno, propilparabeno, sales de amonio cuaternario, cloruro de benzalconio, ésteres de ácido p-hidroxibenzoico y ácido bórico. También se añaden comúnmente antioxidantes a las formulaciones en emulsión para prevenir el deterioro de la formulación. Los antioxidantes usados pueden ser secuestrantes 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 sinergistas de antioxidantes tales como ácido cítrico, ácido tartárico y lecitina.

Se ha revisado la aplicación de formulaciones en emulsión mediante las vías dermatológica, oral y parenteral y los métodos para su fabricación en la bibliografía (Idson, en *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volumen 1, p. 199). Las formulaciones en emulsión para administración oral se han usado muy ampliamente debido a la facilidad de formulación, además de la eficacia desde un punto de vista de la absorción y biodisponibilidad (Rosoff, en *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volumen 1, p. 245; Idson, en *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volumen 1, p. 199). Los laxantes de base de aceite mineral, vitaminas liposolubles y preparaciones nutritivas ricas en grasas están entre los materiales que se han administrado comúnmente por vía oral como emulsiones o/w.

Se pueden formular las composiciones de ARNbc y ácidos nucleicos como microemulsiones. Una microemulsión se puede definir como un sistema de agua, aceite y anfifilo que es una disolución líquida ópticamente isotrópica y termodinámicamente estable única (Rosoff, en *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volumen 1, p. 245). Normalmente, las microemulsiones son sistemas que se preparan dispersando primero un aceite en una disolución de tensioactivo acuoso y a continuación añadiendo una cantidad suficiente de un cuarto componente, generalmente un alcohol de longitud de cadena intermedia para formar un sistema transparente. Por tanto, también se han descrito microemulsiones como

dispersiones isotrópicamente claras termodinámicamente estables, de dos líquidos inmiscibles que se estabilizan por películas interfaciales de moléculas tensioactivas (Leung y Shah, en: *Controlled Release of Drugs: Polymers and Aggregate Systems*, Rosoff, M., Ed., 1989, VCH Publishers, New York, páginas 185-215). Las microemulsiones se preparan comúnmente mediante una combinación de tres a cinco componentes que incluyen aceite, agua, tensioactivo, co-tensioactivo y electrolito. Si la microemulsión es del tipo agua en aceite (w/o) o aceite en agua (o/w) depende de las propiedades del aceite y tensioactivo usados y de la estructura y el empaquetamiento geométrico de las cabezas polares y colas de hidrocarburo de las moléculas de tensioactivo (Schott, en *Remington's Pharmaceutical Sciences*, Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1985, p. 271).

El enfoque fenomenológico que utiliza diagramas de fases se ha estudiado ampliamente y ha dado un amplio conocimiento, para un experto en la materia, de cómo formular microemulsiones (Rosoff, en *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volumen 1, p. 245; Block, en *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volumen 1, p. 335). En comparación con emulsiones convencionales, las microemulsiones ofrecen la ventaja de solubilizar fármacos insolubles en agua en una formulación de gotitas termodinámicamente estables que se forman espontáneamente.

Los tensioactivos usados en la preparación de microemulsiones incluyen, pero no se limitan a, tensioactivos iónicos, tensioactivos no iónicos, Brij 96, polioxietileno oleil éteres, ésteres de ácidos grasos de poliglicerol, monolaurato de tetraglicerol (ML310), monooleato de tetraglicerol (MO310), monooleato de hexaglicerol (PO310), pentaoleato de hexaglicerol (PO500), monocaprato de decaglicerol (MCA750), monooleato de decaglicerol (MO750), sesquioleato de decaglicerol (SO750), decaoleato de decaglicerol (DAO750), solos o en combinación con co-tensioactivos. El co-tensioactivo, normalmente un alcohol de cadena corta, tal como etanol, 1-propanol y 1-butanol, sirve para aumentar la fluidez interfacial penetrando en la película del tensioactivo y, por consiguiente, creando una película desordenada debido al espacio vacío generado entre moléculas de tensioactivo. Sin embargo, las microemulsiones se pueden preparar sin el uso de co-tensioactivos y se conocen en la técnica sistemas de microemulsiones auto-emulsionantes libres de alcohol. La fase acuosa puede normalmente ser, pero no se limita a, agua, una disolución acuosa del fármaco, glicerol, PEG300, PEG400, poligliceroles, propilenglicoles y derivados de etilenglicol. La fase aceitosa puede incluir, pero no se limita a, materiales tales como Captex 300, Captex 355, Capmul MCM, ésteres de ácidos grasos, mono, di, y tri-glicéridos de cadena media (C8-C12), ésteres de ácidos grasos de glicerilo polioxietilados, alcoholes grasos, glicéridos poliglicolizados, glicéridos C8-C10 poliglicolizados saturados, aceites vegetales y aceite de silicona.

Las microemulsiones son particularmente de interés desde el punto de vista de la solubilización del fármaco y la potenciada absorción de fármacos. Se han propuesto microemulsiones basadas en lípidos (tanto o/w como w/o) para potenciar la biodisponibilidad oral de fármacos, que incluyen péptidos (Constantinides et al., *Pharmaceutical Research*, 1994, 11, 1385-1390; Ritschel, *Meth. Find. Exp. Clin. Pharmacol.*, 1993, 13, 205). Las microemulsiones proporcionan ventajas de solubilización del fármaco mejorada, protección del fármaco de la hidrólisis enzimática, posible potenciamiento de la absorción del fármaco debido a alteraciones inducidas por el tensioactivo en la fluidez y permeabilidad de la membrana, facilidad de preparación, facilidad de administración por vía oral con respecto a formas de dosificación sólidas, potencia clínica mejorada y toxicidad reducida (Constantinides et al., *Pharmaceutical Research*, 1994, 11, 1385; Ho et al., *J. Pharm. Sci.*, 1996, 85, 138-143). Frecuentemente, las microemulsiones se pueden formar espontáneamente cuando sus componentes se ponen juntos a temperatura ambiente. Esto puede ser particularmente ventajoso cuando se formulan fármacos termolábiles, péptidos o ARNbc. Las microemulsiones también han sido eficaces en la administración transdérmica de componentes activos en tanto aplicaciones cosméticas como farmacéuticas. Se espera que las composiciones en microemulsión y las formulaciones de la presente divulgan faciliten la elevada absorción sistémica de los ARNbc y ácidos nucleicos del tubo gastrointestinal, además de mejorar la captación celular local de los ARNbc y ácidos nucleicos.

Las microemulsiones de la presente divulgación también pueden contener componentes y aditivos adicionales tales como monoestearato de sorbitano (Grill 3), Labrasol y potenciadores de la penetración para mejorar las propiedades de la formulación y para potenciar la absorción de los ARNbc y ácidos nucleicos de la presente divulgación. Los potenciadores de la penetración usados en las microemulsiones de la presente divulgación se pueden clasificar como que pertenecen a una de las cinco amplias categorías--tensioactivos, ácidos grasos, sales biliares, agentes quelantes y no tensioactivos no quelantes (Lee et al., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, p. 92). Cada una de estas clases se ha tratado anteriormente.

Potenciadores de la penetración

La presente divulgación puede emplear diversos potenciadores de la penetración para afectar la eficaz administración de ácidos nucleicos, particularmente ARNbc, a la piel de animales. La mayoría de los fármacos están presentes en disolución en tanto formas ionizadas como no ionizadas. Sin embargo, normalmente solo los fármacos liposolubles o lipófilos cruzan fácilmente las membranas celulares. Se ha descubierto que incluso los fármacos no lipófilos pueden cruzar membranas celulares si la membrana que va a cruzarse se trata con un potenciador de la penetración. Además de ayudar en la difusión de fármacos no lipófilos a través de las membranas celulares, los potenciadores de la penetración también potencian la permeabilidad de fármacos lipófilos.

Los potenciadores de la penetración se pueden clasificar como pertenecientes a una de las cinco amplias categorías, es decir, tensioactivos, ácidos grasos, sales biliares, agentes quelantes y no tensioactivos no quelantes (Lee et al., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, p.92). Cada uno de las clases anteriormente mencionadas de potenciadores de la penetración se describe a continuación con mayor detalle.

5 Tensioactivos: A propósito de la presente divulgación, los tensioactivos (o "agentes tensioactivos") son entidades químicas que, cuando se disuelven en una disolución acuosa, reducen la tensión superficial de la disolución o la tensión interfacial entre la disolución acuosa y otro líquido, con el resultado de que se potencia la absorción de los ARNbc mediante la mucosa. Además de sales biliares y ácidos grasos, estos potenciadores de la penetración incluyen, por ejemplo, laurilsulfato de sodio, polioxietilen-9-lauril éter y polioxietilen-20-cetil éter) (Lee et al., *Critical*
10 *Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, p.92); y emulsiones perfluoroquímicas, tales como FC-43. Takahashi et al., *J. Pharm. Pharmacol.*, 1988, 40, 252).

Ácidos grasos: Diversos ácidos grasos y sus derivados que actúan de 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,
15 ácido caprílico, ácido araquidónico, 1-monocaprato de glicerol, 1-dodecilazacicloheptan-2-ona, acilcarnitinas, acilcolinas, ésteres de alquilo C₁₋₁₀ de los mismos (por ejemplo, metilo, isopropilo y t-butilo) y mono- y di-glicéridos de los mismos (es decir, oleato, laurato, caprato, miristato, palmitato, estearato, linoleato, etc.) (Lee et al., *Critical*
Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1991, p.92; Muranishi, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier*
Systems, 1990, 7, 1-33; El Hariri et al., *J. Pharm. Pharmacol.*, 1992, 44, 651-654).

20 Sales biliares: La función fisiológica de la bilis incluye facilitar la dispersión y absorción de lípidos y vitaminas liposolubles (Brunton, Capítulo 38 en: Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 9ª Ed., Hardman et al. Eds., McGraw-Hill, New York, 1996, pp. 934-935). Diversas sales biliares naturales, y sus derivados sintéticos, actúan de potenciadores de la penetración. Así el término "sales biliares" incluye cualquiera de los componentes que se producen naturalmente de la bilis, además de cualquiera de sus derivados sintéticos. Sales
25 biliares adecuadas incluyen, por ejemplo, ácido cólico (o su sal farmacéuticamente aceptable de sodio, colato de sodio), ácido dehidrocólico (dehidrocolato de sodio), ácido desoxicólico (desoxicolato de sodio), ácido glucólico (glucolato de sodio), ácido glicólico (glicocolato de sodio), ácido glicodesoxicólico (glicodesoxicolato de sodio), ácido taurocólico (taurocolato de sodio), ácido taurodesoxicólico (taurodesoxicolato de sodio), ácido quenodesoxicólico (quenodesoxicolato de sodio), ácido ursodesoxicólico (UDCA), tauro-24,25-dihidro-fusidato de sodio (STDHF),
30 glicodihidrofusidato de sodio y polioxietilen-9-lauril éter (POE) (Lee et al., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, página 92; Swinyard, Capítulo 39 en: Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª 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).

35 Agentes quelantes: Los agentes quelantes, como se usa a propósito de la presente divulgación, se pueden definir como compuestos que eliminan iones metálicos de la disolución formando complejos con los mismos, con el resultado de que se potencia la absorción de los ARNbc a través de la mucosa. Con respecto a su uso como potenciadores de la penetración en la presente divulgación, los agentes quelantes tienen la ventaja añadida de que también sirven de inhibidores de DNasa, ya que las ADN nucleasas más caracterizadas requieren un ión metálico
40 divalente para la catálisis y así son inhibidos por agentes quelantes (Jarrett, *J. Chromatogr.*, 1993, 618, 315-339). Agentes quelantes adecuados incluyen, pero no se limitan a, etilendiaminatetraacetato de disodio (EDTA), ácido cítrico, salicilatos (por ejemplo, salicilato de sodio, 5-metoxisalicilato y homovanilato), derivados de N-acilo de colágeno, lauril éter-9 y derivados de N-aminoacilo de beta-dicetonas (enaminas) (Lee et al., *Critical Reviews in*
Therapeutic Drug Carrier Systems, 1991, page 92; Muranishi, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*,
45 1990, 7, 1-33; Buur et al., *J. Control Rel.*, 1990, 14, 43-51).

No tensioactivos no quelantes: Como se usa en el presente documento, los compuestos potenciadores de la penetración no tensioactivos no quelantes se pueden definir como compuestos que demuestran actividad insignificativa como agentes quelantes o como tensioactivos, pero que sin embargo potencian la absorción de los ARNbc a través de la mucosa alimentaria (Muranishi, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1990, 7,
50 1-33). Esta clase de potenciadores de la penetración incluye, por ejemplo, ureas cíclicas insaturadas, derivados de 1-alquil- y 1-alquenilazaciclo-alcanonas (Lee et al., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, página 92); y agentes antiinflamatorios no esteroideos tales como diclofenaco sódico, indometacina y fenilbutazona (Yamashita et al., *J. Pharm. Pharmacol.*, 1987, 39, 621-626).

También se pueden añadir agentes que potencian la captación de los ARNbc al nivel celular a las composiciones farmacéuticas y otras composiciones de la presente divulgación. Por ejemplo, también se conocen lípidos catiónicos, tales como Lipofectin (Junichi et al., patente de EE.UU. Nº 5.705.188), derivados de glicerol catiónicos y moléculas policatiónicas, tales como polilisina (Lollo et al., solicitud PCT WO 97/30731), para potenciar la captación celular de ARNbc.

Se pueden utilizar otros agentes 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.

Vehículos

- 5 Ciertas composiciones de la presente divulgación también incorporan compuestos de vehículo en la formulación. Como se usa en el presente documento, "compuesto de vehículo" o "vehículo" se puede referir a un ácido nucleico, o análogo del mismo, que es inerte (es decir, no posee actividad biológica por sí mismo), pero es reconocido como un ácido nucleico por procesos *in vivo* que reducen la biodisponibilidad de un ácido nucleico que tiene actividad biológica, por ejemplo, degradando el ácido nucleico biológicamente activo o promoviendo su eliminación de la
- 10 circulación. La coadministración de un ácido nucleico y un compuesto de vehículo, normalmente con un exceso de la última sustancia, puede producir una reducción sustancial de la cantidad de ácido nucleico recuperada en el hígado, riñón u otros depósitos extracirculatorios, supuestamente debido a la competición entre el compuesto de vehículo y el ácido nucleico para un receptor común. Por ejemplo, la recuperación de un ARNbc parcialmente de fosforotioato en tejido hepático se puede reducir cuando se co-administra con ácido poliiinosínico, sulfato de dextrano, ácido policítico o diácido 4-acetamido-4'isotiociano-estilbeno-2,2'-sulfónico (Miyao et al., DsRNA Res. Dev., 1995, 5, 115-121; Takakura et al., DsRNA & Nucl. Acid Drug Dev., 1996, 6, 177-183).

Excipientes

- A diferencia de un compuesto de vehículo, un "vehículo farmacéutico" o "excipiente" es un disolvente farmacéuticamente aceptable, agente de suspensión o cualquier otro vehículo farmacológicamente inerte para
- 20 administrar uno o más ácidos nucleicos a un animal. El excipiente puede ser líquido o sólido y se selecciona, teniendo en cuenta el modo planeado de administración, de manera que se proporcione el volumen deseado, consistencia, etc., cuando se combine con un ácido nucleico y los otros componentes de una composición farmacéutica dada. Vehículos farmacéuticos típicos incluyen, pero no se limitan a, agentes de unión (por ejemplo, almidón de maíz pregelatinizado, polivinilpirrolidona o hidroxipropilmetilcelulosa, etc.); cargas (por ejemplo, lactosa y
- 25 otros azúcares, celulosa microcristalina, pectina, gelatina, sulfato de calcio, etilcelulosa, poliacrilatos o hidrogenofosfato de calcio, etc.); lubricantes (por ejemplo, estearato de magnesio, talco, sílice, dióxido de silicio coloidal, ácido esteárico, estearatos metálicos, aceites vegetales hidrogenados, almidón de maíz, polietilenglicoles, benzoato de sodio, acetato sódico, etc.); disgregantes (por ejemplo, almidón, glicolato sódico de almidón, etc.); y agentes humectantes (por ejemplo, laurilsulfato de sodio, etc.).
- 30 También se pueden usar excipientes orgánicos o inorgánicos farmacéuticamente aceptables adecuados para administración no parenteral que no reaccionan perjudicialmente con los ácidos nucleicos para formular las composiciones de la presente divulgación. Los vehículos farmacéuticamente aceptables adecuados incluyen, pero no se limitan a, agua, disoluciones salinas, alcoholes, polietilenglicoles, gelatina, lactosa, amilosa, estearato de magnesio, talco, ácido silícico, parafina viscosa, hidroximetilcelulosa, polivinilpirrolidona y similares.
- 35 Las formulaciones para administración tópica de ácidos nucleicos pueden incluir disoluciones acuosas estériles y no estériles, disoluciones no acuosas en disolventes comunes tales como alcoholes, o disoluciones de los ácidos nucleicos en bases de aceite líquidas o sólidas. Las disoluciones también pueden contener tampones, diluyentes y otros aditivos adecuados. Se pueden usar excipientes orgánicos o inorgánicos farmacéuticamente aceptables adecuados para administración no parenteral que no reaccionan perjudicialmente con ácidos nucleicos.
- 40 Los excipientes farmacéuticamente aceptables adecuados incluyen, pero no se limitan a, agua, disoluciones salinas, alcohol, polietilenglicoles, gelatina, lactosa, amilosa, estearato de magnesio, talco, ácido silícico, parafina viscosa, hidroximetilcelulosa, polivinilpirrolidona y similares.

Otros componentes

- Las composiciones de la presente divulgación pueden contener adicionalmente otros componentes auxiliares convencionalmente encontrados en composiciones farmacéuticas, a sus niveles de uso establecidos en la materia. Así, por ejemplo, las composiciones pueden contener materiales farmacéuticamente activos compatibles adicionales
- 45 tales como, por ejemplo, antipruríticos, astringentes, anestésicos locales o agentes antiinflamatorios, o pueden contener materiales adicionales útiles en la formulación física de diversas formas de dosificación de las composiciones de la presente divulgación, tales como colorantes, aromatizantes, conservantes, antioxidantes, opacificantes, espesantes y estabilizadores. Sin embargo, dichos materiales, cuando se añaden, no deben interferir excesivamente con las actividades biológicas de los componentes de las composiciones de la presente divulgación. Las formulaciones se pueden esterilizar y, si se desea, mezclar con agentes auxiliares, por ejemplo, lubricantes, conservantes, estabilizadores, agentes humectantes, emulsionantes, sales para influir en la presión osmótica,
- 50 tampones, colorantes, aromatizantes y/o sustancias aromáticas y similares que no interaccionan perjudicialmente con el (los) ácido(s) nucleico(s) de la formulación.

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

Las composiciones farmacéuticas desveladas en el presente documento incluyen (a) uno o más compuestos de ARNbc y (b) uno o más agentes biológicos de anti-citocina que funcionan por un mecanismo distinto de iARN. Los ejemplos de dichos agentes biológicos incluyen agentes biológicos que se dirigen a IL1 β (por ejemplo, anakinra), IL6 (tocilizumab) o TNF (etanercept, infliximab, adlimumab o certolizumab).

- 5 Las composiciones farmacéuticas desveladas en el presente documento también incluyen (a) uno o más compuestos de ARNbc y (b) uno o varios de otros agentes quimioterapéuticos que funcionan por un mecanismo distinto de iARN. Los ejemplos de dichos agentes quimioterapéuticos incluyen, pero no se limitan a, daunorubicina, daunomicina, dactinomicina, doxorubicina, epirubicina, idarubicina, esorubicina, bleomicina, mafosfamida, ifosfamida, citosina arabinósido, bis-cloroetilnitrosurea, busulfán, mitomicina C, actinomicina D, mitramicina, prednisona, hidroxiprogesterona, testosterona, tamoxifeno, dacarbazina, procarbazona, hexametilmelamina, pentametilmelamina, mitoxantrona, amsacrina, clorambucilo, metilciclohexilnitrosurea, mostazas nitrogenadas, melfalán, ciclofosfamida, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-azacitidina, hidroxiurea, desoxicoformicina, 4-hidroxiperoxiciclo-fosforamida, 5-fluorouracilo (5-FU), 5-fluorodesoxiuridina (5-FudR), metotrexato (MTX), colchicina, taxol, vincristina, vinblastina, etopósido (VP-16), trimetrexato, irinotecán, topotecán, gemcitabina, tenipósido, cisplatino y dietilestilbestrol (DES). Véase, generalmente, The Merck Manual of Diagnosis and Therapy, 15^a Ed. 1987, pp. 1206-1228, Berkow et al., eds., Rahway, N.J. Cuando se usa con los ARNbc desvelados en el presente documento, dichos agentes quimioterapéuticos se pueden usar individualmente (por ejemplo, 5-FU y oligonucleótido), secuencialmente (por ejemplo, 5-FU y oligonucleótido durante un periodo de tiempo seguido por MTX y oligonucleótido), o en combinación con uno o varios de otros de dichos agentes quimioterapéuticos (por ejemplo, 5-FU, MTX y oligonucleótido, o 5-FU, radioterapia y oligonucleótido). También se pueden combinar fármacos antiinflamatorios, que incluyen, pero no se limitan a, fármacos antiinflamatorios no esteroideos y corticosteroides, y fármacos antivirales, que incluyen, pero no se limitan a, ribavirina, vidarabina, aciclovir y ganciclovir, en las composiciones desveladas en el presente documento. Véase, generalmente, The Merck Manual of Diagnosis and Therapy, 15^a Ed., Berkow et al., eds., 1987, Rahway, N.J., páginas 2499-2506 y 46-49, respectivamente). También se desvelan en el presente documento otros agentes quimioterapéuticos distintos de iARN. Se pueden usar juntos o secuencialmente dos o más compuestos combinados.

Se pueden determinar la toxicidad y eficacia terapéutica de dichos compuestos mediante procedimientos farmacéuticos convencionales en cultivos celulares o animales experimentales, por ejemplo, para determinar la DL50 (la dosis letal para el 50 % de la población) y la DE50 (la dosis terapéuticamente eficaz en el 50 % de la población). La relación de dosis entre efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico y se puede expresar como la relación DL50/DE50. Se prefieren compuestos que presentan altos índices terapéuticos.

Los datos obtenidos de ensayos de cultivo celular y estudios en animales se pueden usar en la formulación de un intervalo de dosificación para su uso en seres humanos. La dosificación de las composiciones desveladas en el presente documento se encuentra generalmente dentro de un intervalo de concentraciones circulantes que incluyen la DE50 con poca o ninguna toxicidad. La dosificación puede variar dentro de este intervalo dependiendo de la forma de dosificación empleada y la vía de administración utilizada. Para cualquier compuesto usado en los métodos desvelados en el presente documento, la dosis terapéuticamente eficaz se puede estimar inicialmente a partir de ensayos de cultivo celular. Se puede formular una dosis en modelos animales para lograr un intervalo de concentración plasmática circulante del compuesto o, cuando convenga, del producto de polipéptido de una secuencia diana (por ejemplo, logrando una concentración disminuida del polipéptido) que incluye la CI₅₀ (es decir, la concentración del compuesto de prueba que logra una inhibición al 55 % de los síntomas) como se ha determinado en cultivo celular. Dicha información se puede usar para determinar con más exactitud dosis útiles en seres humanos. Los niveles en plasma pueden medirse, por ejemplo, por cromatografía líquida de alta resolución.

Además de su administración, como se trata anteriormente, los ARNbc desvelados en el presente documento se pueden administrar en combinación con otros agentes conocidos eficaces en el tratamiento de procesos patológicos mediados por la expresión de SAA. En cualquier caso, el médico que administra puede ajustar la cantidad y el momento exacto de la administración de ARNbc basándose en resultados observados usando medidas estándar de eficacia conocidas en la técnica o descritas en el presente documento.

Métodos de tratamiento de enfermedades provocadas por la expresión de un gen de SAA

50 La presente divulgación se refiere en particular al uso de un ARNbc que se dirige a SAA y composiciones que contienen al menos dicho ARNbc para el tratamiento de un trastorno o enfermedad mediado por SAA. Por ejemplo, un ARNbc que se dirige a un gen de SAA, por ejemplo, uno o ambos de SAA1 y SAA2, puede ser útil para el tratamiento de un trastorno asociado a inflamación, tal como artritis (por ejemplo, artritis reumatoide), o lesión de tejido, amiloidosis reactiva (secundaria) o amiloidosis sistémica, aterosclerosis o enfermedad de Alzheimer.

55 Un ARNbc que se dirige a un gen de SAA también se usa para el tratamiento de síntomas y trastornos, tales como enfermedades inflamatorias crónicas, infecciones crónicas y neoplasia. Dichos trastornos se asocian frecuentemente a amiloidosis. Los ejemplos de enfermedades inflamatorias crónicas incluyen artritis reumatoide, artritis psoriásica, artritis juvenil crónica, espondilitis anquilosante, síndrome de Behcet, síndrome de Reiter, enfermedad de Still del adulto, enfermedad inflamatoria del intestino (por ejemplo, enfermedad de Crohn) y fiebres periódicas hereditarias, tales como fiebre mediterránea familiar. Los ejemplos de infecciones crónicas asociadas a amiloidosis, y adecuados

para el tratamiento con ARNbc de SAA, incluyen tuberculosis, osteomielitis, bronquiectasia, lepra, pielonefritis, úlceras de decúbito, enfermedad de Whipple, acné conglobata, hipo/agammaglobulinemia con inmunodeficiencia común variable, fibrosis quística. Los ejemplos de neoplasia asociada a amiloidosis, y adecuados para el tratamiento con ARNbc de SAA, incluyen hepatoma, carcinoma renal, enfermedad de Castleman, enfermedad de Hodgkin, leucemia de células pilosas del adulto y enfermedad de Waldenström.

Un ARNbc que se dirige a un gen de SAA se puede usar para tratar trastornos clínicos tales como proteinuria/insuficiencia renal, diarrea/estreñimiento/malabsorción, gota, neuropatía/síndrome del túnel carpiano, hepatomegalia, linfadenopatía, cardíaca. Estos trastornos se presentan frecuentemente en pacientes con amiloidosis.

Un ARNbc que se dirige a un gen de SAA también se puede usar para tratar un trastorno proliferativo, tal como cáncer, tal como cáncer de colon. Una composición que contiene un ARNbc que se dirige a un gen de SAA también se usa para tratar un carcinoma de mama, ovario, cuello uterino, riñón, o una célula escamosa.

Una composición que contiene un ARNbc que se dirige a SAA, por ejemplo, uno o ambos de SAA1 o SAA2, también se puede usar para tratar otros tumores y cánceres, tales como cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de cabeza y cuello, cáncer cerebral, cáncer abdominal, cáncer de colon, cáncer colorrectal, cáncer de esófago, cáncer gastrointestinal, cáncer de lengua, neuroblastoma, osteosarcoma, cáncer de ovario, cáncer pancreático, cáncer de próstata, cáncer de cuello uterino (por ejemplo, carcinoma escamoso del cuello uterino), tumor linfoide, retinoblastoma, tumor de Wilms, mieloma múltiple y para el tratamiento de cáncer de piel, como melanoma, para el tratamiento de linfomas y leucemia. Las composiciones desveladas en el presente documento se pueden usar para tratar un tumor del cerebro o la columna vertebral.

Un ARNbc que se dirige a SAA se puede usar para tratar un trastorno proliferativo o trastorno diferenciativo. Los ejemplos de trastornos celulares proliferativos y/o diferenciativos incluyen cáncer, por ejemplo, carcinoma, sarcoma, trastornos metastásicos o trastornos neoplásicos hematopoyéticos, por ejemplo, leucemias. Un tumor metastásico puede surgir de una multitud de tipos de tumores primarios, que incluyen los de origen de próstata, colon, pulmón, mama e hígado. Como se usa en el presente documento, los términos "cáncer", "hiperproliferativo" y "neoplásico" se refieren a células que tienen la capacidad de crecimiento autónomo, es decir, un estado anormal de condición caracterizado por crecimiento celular rápidamente proliferante. Estos términos se indican para incluir todos los tipos de crecimientos cancerosos o procesos oncogénicos, tejidos metastásicos o células, tejidos u órganos transformados de forma maligna, independientemente del tipo o estadio histopatológico de la invasividad. Los trastornos proliferativos también incluyen trastornos neoplásicos hematopoyéticos, que incluye enfermedades que implican células hiperplásicas/neoplásicas de origen hematopoyético, por ejemplo, que surgen de linajes mieloides, linfoides o eritroides, o células precursoras de los mismos.

Debido a los efectos inhibidores sobre la expresión de SAA, una composición desvelada en el presente documento o una composición farmacéutica preparada a partir de la misma puede potenciar la calidad de vida.

La presente divulgación se refiere además al uso de un ARNbc o una composición farmacéutica del mismo, por ejemplo, para tratar una amiloidosis, en combinación con otros productos farmacéuticos y/u otros métodos terapéuticos, por ejemplo, con productos farmacéuticos conocidos y/o métodos terapéuticos conocidos, tales como, por ejemplo, los que se emplean actualmente para tratar estos trastornos. En un ejemplo, un ARNbc que se dirige a SAA se puede administrar en combinación con un agente anti-citocina tal como un agente anti-IL1 β (por ejemplo, anakinra), agente de IL6 (por ejemplo, tocilizumab), o agente de TNF α (por ejemplo, etanercept, infliximab, adlimumab o certolizumab). En otros ejemplos, un ARNbc que se dirige a SAA se puede administrar en combinación con rituxan (rituximab), eprodisato (Neurochem, Canadá). En aún otros ejemplos, un ARNbc que se dirige a SAA se puede administrar en combinación con esteroides o metotrexato, por ejemplo, para tratar la artritis inflamatoria crónica. En otros ejemplos, un ARNbc que se dirige a SAA se puede administrar en combinación con diuréticos, inhibidores de ECA, o ARBs, por ejemplo, para el tratamiento de función renal.

La presente divulgación se refiere además al uso de un ARNbc o una composición farmacéutica del mismo, por ejemplo, para tratar un cáncer, en combinación con otros productos farmacéuticos y/u otros métodos terapéuticos, por ejemplo, con productos farmacéuticos conocidos y/o métodos terapéuticos conocidos, tales como, por ejemplo, los que se emplean actualmente para tratar estos trastornos. En un ejemplo, la administración de un ARNbc que se dirige a SAA se puede administrar en combinación con un agente quimioterapéutico, tal como temozolomida, desoxicoformicina, cisplatino, ciclofosfamida, 5-fluorouracilo, adriamicina, daunorubicina, tamoxifeno, daunorubicina, daunomicina, dactinomicina, doxorubicina, epirubicina, idarubicina, esorubicina, bleomicina, mafosfamida, ifosfamida, citosina arabinósido, bis-cloroetilnitrosurea, busulfán, mitomicina C, actinomicina D, mitramicina, prednisona, hidroxiprogesterona, testosterona, tamoxifeno, dacarbazina, procarbazona, hexametilmelamina, pentametilmelamina, mitoxantrona, amsacrina, clorambucilo, metilciclohexilnitrosurea, mostazas clorambucilo, melfalán, ciclofosfamida, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-azacitidina, hidroxiaurea, desoxicoformicina, 4-hidroxiperoxiciclofosforamida, 5-fluorouracilo (5-FU), 5-fluorodesoxiuridina (5-FudR), metotrexato (MTX), colchicina, taxol, vincristina, vinblastina, etopósido (VP-16), trimetrexato, irinotecán, topotecán, gemcitabina, tenipósido, cisplatino y dietilestilbestrol (DES). Véase, generalmente, The Merck Manual of Diagnosis and Therapy, 15^a Ed. 1987, pp. 1206-1228, Berkow et al., eds., Rahway, N.J. Cuando se usa con los ARNbc desvelados en el presente

documento, dichos agentes quimioterapéuticos se pueden usar individualmente, secuencialmente (por ejemplo, ARNbc durante un periodo de tiempo, seguido por quimioterapia), o en combinación con uno o varios de otros de dichos agentes (por ejemplo, quimioterapia y ARNbc). Se pueden usar juntos o secuencialmente dos o más compuestos combinados.

- 5 El ARNbc y un agente terapéutico adicional se pueden administrar en la misma combinación, por ejemplo, por vía parenteral, o el agente terapéutico adicional se pueden administrar como parte de una composición separada o por otro método descrito en el presente documento.

10 El tratamiento con un ARNbc que se dirige a SAA también se puede realizar en combinación con radioterapia, tal como para el tratamiento de un cáncer, tal como cáncer de colon o un carcinoma. Un ARNbc desvelado en el presente documento se puede administrar antes o después de un procedimiento quirúrgico para tratar un cáncer (por ejemplo, para retirar un tumor, o una célula maligna o masa celular).

15 En el presente documento también se desvela un método de administración de un ARNbc que se dirige a SAA a un paciente que tiene una enfermedad o trastorno mediado por la expresión de SAA, tal como amiloidosis AA. La administración del ARNbc puede estabilizar y mejorar la función renal, por ejemplo, en un paciente con amiloidosis AA. Los pacientes se pueden administrar con una cantidad terapéutica de ARNbc, tal como 0,5 mg/kg, 1,0 mg/kg, 1,5 mg/kg, 2,0 mg/kg, o 2,5 mg/kg de ARNbc. El ARNbc se puede administrar por infusión intravenosa durante un periodo de tiempo, tal como durante un periodo de 5 minutos, 10 minutos, 15 minutos, 20 minutos o 25 minutos. La administración se repite, por ejemplo, regularmente, tal como bisemanalmente (es decir, cada dos semanas) durante un mes, dos meses, tres meses, cuatro meses o más. Después de una pauta de tratamiento inicial, los tratamientos se pueden administrar en una base menos frecuente. Por ejemplo, después de la administración bisemanal durante tres meses, la administración se puede repetir una vez al mes, durante seis meses o un año o más. La administración del ARNbc puede reducir los niveles en suero de SAA en el paciente al menos 20 %, 25 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 % o 90 %.

25 Antes de la administración de una dosis completa del ARNbc, los pacientes se pueden administrar con una dosis más pequeña, tal como una reacción de infusión a 5 %, y monitorizar para los efectos adversos, tales como una reacción alérgica o un cambio en la función hepática. Por ejemplo, en pacientes monitorizados para cambios en la función hepática, es aceptable un cambio de baja incidencia de LFT (prueba de la función hepática) (por ejemplo, una incidencia de LFT de 10-20 %) (por ejemplo, un aumento reversible de 3 veces en los niveles de ALT (alanina aminotransferasa) y/o AST (aspartato aminotransferasa)).

30 **Métodos de inhibición de la expresión de un gen de SAA**

En el presente documento también se desvela un método de inhibición de la expresión de un gen de SAA en un mamífero. El método incluye administrar una composición desvelada en el presente documento al mamífero de forma que se silencie la expresión del gen de SAA diana (por ejemplo, uno o ambos de SAA1 y SAA2).

35 Cuando el organismo que se va a tratar es un mamífero tal como un ser humano, la composición se puede administrar mediante cualquier medio conocido en la técnica que incluye, pero no se limita a, vías oral o parenteral, que incluyen administración intracraneal (por ejemplo, intraventricular, intraparénquima e intratecal), intravenosa, intramuscular, subcutánea, transdérmica, respiratoria (aerosol), nasal, rectal y tópica (incluyendo bucal y sublingual). Las composiciones se pueden administrar por infusión o inyección intravenosa.

40 A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que comúnmente es entendido por un experto habitual en la técnica a la que pertenece la presente divulgación. En caso de conflicto, controlará la presente memoria descriptiva, que incluye definiciones. Además, los materiales, métodos y ejemplos son solo ilustrativos y no pretenden ser limitantes.

EJEMPLOS

Ejemplo 1. Síntesis de ARNbc

45 **Fuente de reactivos**

Si la fuente de un reactivo no se da específicamente en el presente documento, dicho reactivo se puede obtener a partir de cualquier proveedor de reactivos para biología molecular a una calidad/pureza estándar para aplicación en biología molecular.

Síntesis de ARNip

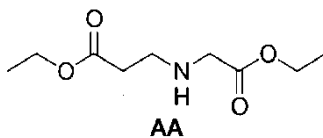
50 Se producen ARN monocatenarios por síntesis en fase sólida a una escala de 1 μ mol usando un sintetizador Expedite 8909 (Applied Biosystems, Applied Biosystems GmbH, Darmstadt, Alemania) y vidrio de poro controlado (CPG, 500Å, Proligo Biochemie GmbH, Hamburgo, Alemania) como soporte sólido. Se generan ARN y ARN que contienen nucleótidos de 2'-O-metilo por síntesis en fase sólida empleando los fosforamiditos y 2'-O-metilfosforamiditos correspondientes, respectivamente (Proligo Biochemie GmbH, Hamburgo, Alemania). Estos

elementos estructurales se incorporan en sitios seleccionados dentro de la secuencia de la cadena de oligorribonucleótidos usando química de nucleósido fosforamido convencional como se describe en Current protocols in nucleic acid chemistry, Beaucage, S.L. et al. (Edrs.), John Wiley & Sons, Inc., New York, NY, EE.UU. Se introducen enlaces fosforotioato por sustitución de la disolución de oxidante de yodo con una disolución del reactivo de Beaucage (Chruachem Ltd, Glasgow, RU) en acetonitrilo (1 %). Se obtienen reactivos secundarios adicionales de Mallinckrodt Baker (Griesheim, Alemania).

Se llevan a cabo desprotección y purificación de los oligorribonucleótidos en bruto por HPLC de intercambio aniónico según los procedimientos establecidos. Se determinan los rendimientos y las concentraciones por absorción de UV de una disolución del ARN respectivo a una longitud de onda de 260 nm usando un fotómetro espectral (DU 640B, Beckman Coulter GmbH, Unterschleißheim, Alemania). Se genera ARN bicatenario mezclando una disolución equimolar de hebras complementarias en tampón de hibridación (fosfato de sodio 20 mM, pH 6,8; cloruro sódico 100 mM), se calienta en un baño de agua a 85 - 90 °C durante 3 minutos y se enfría hasta temperatura ambiente durante un periodo de 3 - 4 horas. La disolución de ARN hibridado se almacena a -20 °C hasta uso.

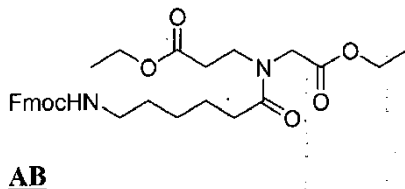
Para la síntesis de ARNip conjugados con 3'-colesterol (denominado en el presente documento -Col-3'), se usa un soporte sólido apropiadamente modificado para la síntesis de ARN. El soporte sólido modificado se prepara del siguiente modo:

Dietil-2-azabutano-1,4-dicarboxilato **AA**



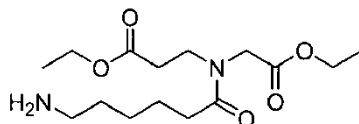
Se añade una disolución acuosa 4,7 M de hidróxido sódico (50 mL) en una disolución enfriada con hielo y con agitación de clorhidrato de glicinato de etilo (32,19 g, 0,23 moles) en agua (50 mL). Entonces se añade acrilato de etilo (23,1 g, 0,23 moles) y la mezcla se agita a temperatura ambiente hasta que se determina el fin de la reacción por CCF. Después de 19 h, la disolución se reparte con diclorometano (3 x 100 mL). Se seca la fase orgánica con sulfato de sodio anhidro, se filtra y se evapora. Se destila el residuo proporcionando AA (28,8 g, 61 %).

Éster etílico de ácido 3-{etoxicarbonilmetil-[6-(9H-fluoren-9-ilmetoxicarbonil-amino)-hexanoil]-amino}-propiónico **AB**



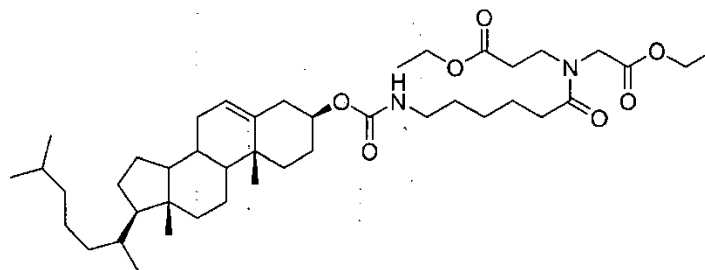
Se disuelve ácido Fmoc-6-amino-hexanoico (9,12 g, 25,83 mmoles) en diclorometano (50 mL) y se enfría con hielo. Se añade diisopropilcarbodiimida (3,25 g, 3,99 mL, 25,83 mmoles) a la disolución a 0 °C. Entonces se sigue mediante la adición de dietil-azabutano-1,4-dicarboxilato (5 g, 24,6 mmoles) y dimetilaminopiridina (0,305 g, 2,5 mmoles). La disolución se lleva a temperatura ambiente y se agita adicionalmente durante 6 h. Se determina el fin de la reacción por CCF. Se concentra a vacío la mezcla de reacción y se añade acetato de etilo para precipitar diisopropilurea. Se filtra la suspensión. El filtrado se lava con 5 % de ácido clorhídrico acuoso, 5 % de bicarbonato sódico y agua. Se seca la fase orgánica combinada sobre sulfato de sodio y se concentra dando el producto en bruto que se purifica por cromatografía en columna (50 % de EtOAc/hexanos) dando 11,87 g (88 %) de AB.

Éster etílico de ácido 3-[(6-amino-hexanoil)-etoxicarbonilmetil-amino]-propiónico **AC**

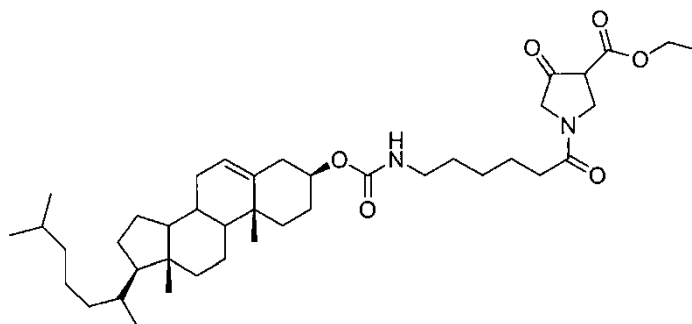


Se disuelve éster etílico de ácido 3-{etoxicarbonilmetil-[6-(9H-fluoren-9-ilmetoxicarbonil-amino)-hexanoil]-amino}-propiónico AB (11,5 g, 21,3 mmoles) en 20 % de piperidina en dimetilformamida a 0 °C. La disolución continúa con agitación durante 1 h. Se concentra a vacío la mezcla de reacción, se añade agua al residuo, y el producto se extrae con acetato de etilo. El producto en bruto se purifica por conversión en su sal de clorhidrato.

Éster etílico de ácido 3-((6-[17-(1,5-dimetil-hexil)-10,13-dimetil-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecahidro-1H-ciclopenta[a]fenantren-3-iloxicarbonilamino]-hexanoil)etoxicarbonilmetil-amino)-propiónico **AD**

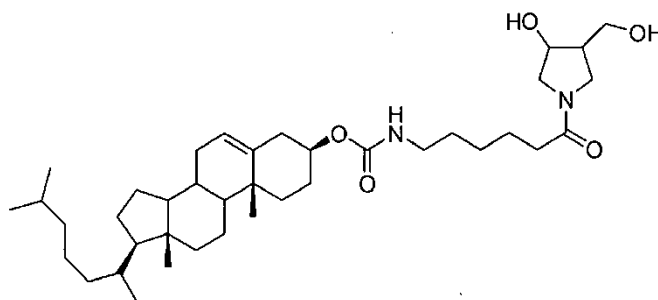
**AD**

- 5 Se recoge en diclorometano la sal de clorhidrato de éster etílico de ácido 3-[(6-amino-hexanoil)-etoxicarbonilmetil-amino]-propiónico AC (4,7 g, 14,8 mmoles). Se enfría la suspensión hasta 0 °C sobre hielo. A la suspensión se añade diisopropiletilamina (3,87 g, 5,2 mL, 30 mmoles). A la disolución resultante se añade cloroformiato de colesterol (6,675 g, 14,8 mmoles). Se agita la mezcla de reacción durante la noche. Se diluye la mezcla de reacción con diclorometano y se lava con 10 % de ácido clorhídrico. El producto se purifica por cromatografía ultrarrápida (10,3 g, 92 %).
- 10 Éster etílico de ácido 1-{6-[17-(1,5-dimetil-hexil)-10,13-dimetil-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecahidro-1H-ciclopenta[a]fenantren-3-iloxicarbonilamino]-hexanoil}-4-oxo-pirrolidin-3-carboxílico **AE**

**AE**

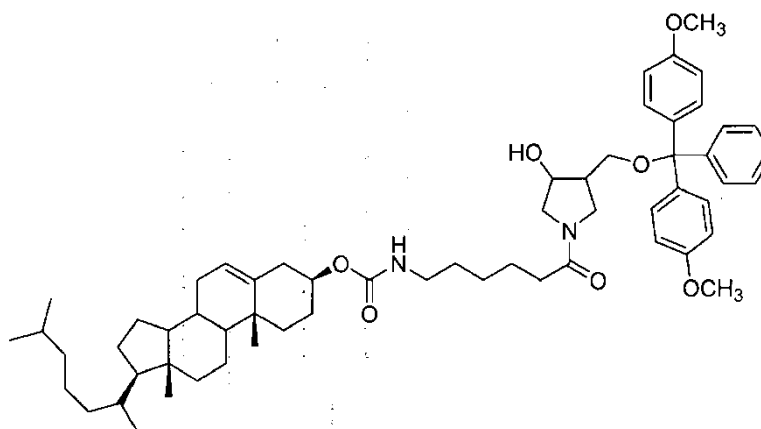
- 15 Se suspendió t-butoxido de potasio (1,1 g, 9,8 mmoles) en 30 mL de tolueno seco. La mezcla se enfría hasta 0 °C sobre hielo y se añaden lentamente con agitación en el plazo de 20 min 5 g (6,6 mmoles) del diéster AD. La temperatura se mantiene por debajo de 5 °C durante la adición. La agitación continúa durante 30 min a 0 °C y se añade 1 mL de ácido acético glacial, inmediatamente seguido por 4 g de NaH₂PO₄·H₂O en 40 mL de agua. La mezcla resultante se extrae dos veces con 100 mL de diclorometano cada una y los extractos orgánicos combinados se lavan dos veces con 10 mL de tampón fosfato cada vez, se secan y se evaporan a sequedad. El residuo se disuelve en 60 mL de tolueno, se enfría hasta 0 °C y se extrae con tres porciones de 50 mL de tampón carbonato frío a pH 9,5. Los extractos acuosos se ajustan hasta pH 3 con ácido fosfórico, y se extraen con cinco porciones de 40 mL de cloroformo que se combinan, se secan y se evaporan a sequedad. El residuo se purifica por cromatografía en columna usando 25 % de acetato de etilo/hexano proporcionando 1,9 g de b-cetoéster (39 %).

Éster 17-(1,5-dimetil-hexil)-10,13-dimetil-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecahidro-1H-ciclopenta[a]fenantren-3-ílico de ácido [6-(3-hidroxi-4-hidroximetil-pirrolidin-1-il)-6-oxo-hexil]-carbámico **AF**

**AF**

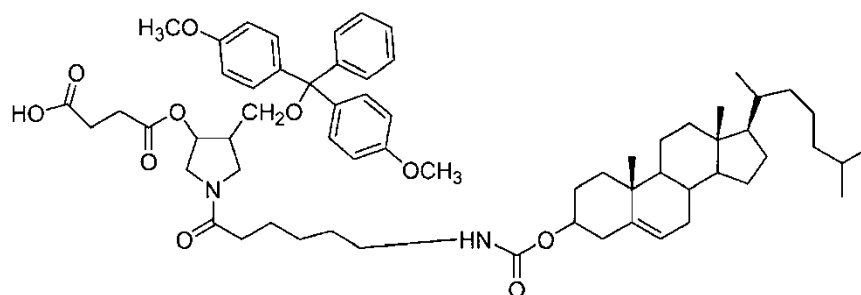
5 Se añade gota a gota metanol (2 mL) durante un periodo de 1 h a una mezcla a reflujo de b-cetoéster AE (1,5 g, 2,2 mmoles) y borohidruro de sodio (0,226 g, 6 mmoles) en tetrahidrofurano (10 mL). La agitación continúa a temperatura de reflujo durante 1 h. Después del enfriamiento hasta temperatura ambiente, se añade HCl 1 N (12,5 mL), la mezcla se extrae con acetato de etilo (3 x 40 mL). Se seca la fase de acetato de etilo combinada sobre sulfato de sodio anhidro y se concentra a vacío dando el producto que se purifica por cromatografía en columna (10 % de MeOH/CHCl₃) (89 %).

10 Éster 17-(1,5-dimetil-hexil)-10,13-dimetil-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecahidro-1H-ciclopenta[a]fenantren-3-ílico de ácido (6-{3-[bis-(4-metoxi-fenil)-fenil-metoximetil]-4-hidroxi-pirrolidin-1-il}-6-oxo-hexil)-carbámico **AG**

**AG**

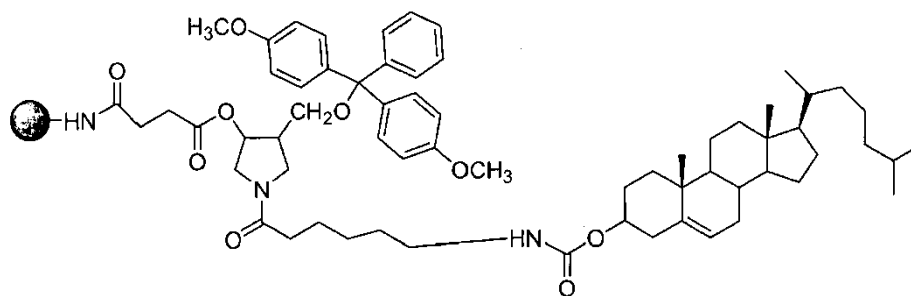
15 Se seca el diol AF (1,25 g, 1,994 mmoles) evaporando con piridina (2 x 5 mL) a vacío. Se añaden piridina anhidra (10 mL) y cloruro de 4,4'-dimetoxitritilo (0,724 g, 2,13 mmoles) con agitación. La reacción se lleva a cabo a temperatura ambiente durante la noche. La reacción se inactiva mediante la adición de metanol. La mezcla de reacción se concentra a vacío y se añade diclorometano (50 mL) al residuo. Se lava la fase orgánica con bicarbonato sódico acuoso 1 M. Se seca la fase orgánica sobre sulfato de sodio anhidro, se filtra y se concentra. Se retira la piridina residual evaporando con tolueno. El producto en bruto se purifica por cromatografía en columna (2 % de MeOH/cloroformo, R_f = 0,5 en 5 % de MeOH/CHCl₃) (1,75 g, 95 %).

20 Éster mono-(4-[bis-(4-metoxi-fenil)-fenil-metoximetil]-1-{6-[17-(1,5-dimetil-hexil)-10,13-dimetil-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecahidro-1H-ciclopenta[a]fenantren-3-íloxicarbonilamino]-hexanoil}-pirrolidin-3-ílico) de ácido succínico **AH**

**AH**

5 Se mezcla el compuesto AG (1,0 g, 1,05 mmoles) con anhídrido succínico (0,150 g, 1,5 mmoles) y DMAP (0,073 g, 0,6 mmoles) y se seca a vacío a 40 °C durante la noche. La mezcla se disuelve en dicloroetano anhidro (3 mL), se añade trietilamina (0,318 g, 0,440 mL, 3,15 mmoles) y la disolución se agita a temperatura ambiente bajo atmósfera de argón durante 16 h. Entonces se diluye con diclorometano (40 mL) y se lava con ácido cítrico acuoso helado (5 % en peso, 30 mL) y agua (2 X 20 mL). La fase orgánica se seca sobre sulfato de sodio anhidro y se concentra a sequedad. El residuo se usa como tal para la siguiente etapa.

CPG derivatizado con colesterol **AI**



AI

Se disuelve el succinato AH (0,254 g, 0,242 mmoles) en una mezcla de diclorometano/acetonitrilo (3:2, 3 mL). A esa disolución se añaden sucesivamente DMAP (0,0296 g, 0,242 mmoles) en acetonitrilo (1,25 mL), 2,2'-ditio-bis(5-nitropiridina) (0,075 g, 0,242 mmoles) en acetonitrilo/dicloroetano (3:1, 1,25 mL). A la disolución resultante se añade trifenilfosfina (0,064 g, 0,242 mmoles) en acetonitrilo (0,6 mL). La mezcla de reacción viró a color naranja brillante. Se agitó brevemente la disolución usando un agitador de acción de muñeca (5 min). Se añade alquilamina-CPG de cadena larga (LCAA-CPG) (1,5 g, 61 mM). La suspensión se agita durante 2 h. Se filtra CPG a través de un embudo sinterizado y se lava con acetonitrilo, diclorometano y éter sucesivamente. Se enmascaran los grupos amino sin reaccionar usando anhídrido acético/piridina. Se mide la carga lograda de CPG tomando una medición de UV (37 mM/g).

Se realiza la síntesis de ARNip que llevan un grupo bisdecilamida de ácido 5'-12-dodecanoico (denominado en el presente documento "5'-C32-") o un grupo de derivado de 5'-colesterilo (denominado en el presente documento "5'-Col-") como se describe en el documento de patente WO 2004/065601, excepto que, para el derivado de colesterilo, la etapa de oxidación se realiza usando el reactivo de Beaucage para introducir un enlace fosforotioato en el extremo 5' del oligómero de ácido nucleico.

Las secuencias de ácidos nucleicos se representan más adelante usando nomenclatura estándar, y específicamente las abreviaturas de la Tabla 1.

Tabla 1: Abreviaturas de monómeros de nucleótidos usados en la representación de secuencias de ácidos nucleicos. Se entenderá que estos monómeros, cuando están presentes en un oligonucleótido, están mutuamente unidos por enlaces 5'-3'-fosfodiéster.

Abreviatura	Nucleótido(s)
A	adenosina-5'-fosfato
C	citidina-5'-fosfato
G	guanosina-5'-fosfato
T, dT	2'-desoxi-timidina-5'-fosfato
U	uridina-5'-fosfato
N	cualquier nucleótido (G, A, C, o T)
a	2'-O-metiladenosina-5'-fosfato
c	2'-O-metilcitidina-5'-fosfato
g	2'-O-metilguanosina-5'-fosfato
u	2'-O-metiluridina-5'-fosfato
sT, sdT	2'-desoxi-timidina-5'-fosfato-fosforotioato

Ejemplo 2. Diseño de ARNip

Se llevó a cabo el diseño de ARNip para identificar ARNip que se dirigen a SAA1 y SAA2. El diseño usó el transcrito de SAA1 NM_000331.3 (humano), NM_009117.3 (ratón), y el trazado de tipo SAA de longitud casi completa

individual de mono cinomolgo, la secuencia de ADNc Mfa#S27795076 (*Macaca fascicularis*). Los transcritos de SAA2 usados en el diseño de los ARNip incluyeron NM_030754.2 (humano) y NM_011314.1 (ratón).

Se diseñaron dúplex de ARNip con 100 % de identidad con tanto los genes de SAA1 como de SAA2. Se diseñaron varios conjuntos reactivos de forma cruzada con humano y ratón, humano y mono cinomolgo y humano-mono cinomolgo.

Se crearon los 19-meros posibles a partir de cada secuencia. Se crearon subconjuntos de humano-ratón, humano-mono cinomolgo y humano-mono cinomolgo-ratón buscando 19-meros idénticos de cada especie usando la secuencia de comandos de Python polyFastaToNmer.py. Hubo 254 ARNip 19-meros codificantes humanos. De estos 254, hubo 21 con 100 % de identidad con los transcritos humanos y de ratón; 78 tuvieron 100 % de identidad en humano y mono cinomolgo, y dos tuvieron 100 % de identidad en las tres especies (humano, mono cinomolgo y ratón).

Se usó la especificidad predicha de cada diseño de ARNip como criterio para la selección final. Se usaron los ARNip de SAA en una amplia búsqueda contra los transcriptomas de ratón, humano y cinomolgo usando el algoritmo de FASTA. Entonces se usó una secuencia de comandos de Python para analizar los alineamientos y generar una puntuación basada en la posición y el número de apareamientos erróneos entre los ARNip y cualquier posible transcrito 'inespecífico'. Se pondera la puntuación para enfatizar las diferencias en la región 'semilla' de ARNip, en las posiciones 2-9 desde el extremo 5' de la molécula. Se asignaron ambas hebras de ARNip a una categoría de especificidad según las puntuaciones calculadas: una puntuación por encima de 3 cumple los requisitos para altamente específica, igual a 3 para específica y entre 2,2 y 2,8 para específica moderada.

Se diseñaron aproximadamente 500-700 ARNip de SAA 19-meros y se analizaron para reactividad cruzada de isoformas/especies de SAA y predicción inespecífica. Se seleccionaron 78 ARNbc para el análisis adicional. Se predijo que estos 78 ARNip se dirigían tanto a SAA1 como a SAA2 (denominados en lo sucesivo "SAA" o "SAA1/2"). Los 78 ARNip codificantes y no codificantes específicos de humano-mono cinomolgo se sintetizaron con modificaciones de 2'Ome internas y formaron dúplex.

Ejemplo 3. Cribado de la eficacia *in vitro* de suero amiloide A (SAA)

Se cribaron los 78 ARNip de SAA con modificaciones de luz Endo de 2'OM para la eficacia en un modelo *in vitro*. Se transfectaron de forma inversa SAA-ARNip a una concentración de 20 nM en células Hep3B usando LF-Max. 24 h después, se indujo SAA añadiendo citocinas IL-1 β e IL6 combinadas. 18 h después de la inducción, se analizó la actividad de ARNip de SAA midiendo el nivel de ARNm por ensayos de bDNA 2.0 y TaqMan. Se midieron los niveles de proteína usando ensayos de ELISA. Los resultados, mostrados en la Tabla 3, son de dos repeticiones biológicas, y dos técnicas.

Material y métodos:

Cultivo celular: Se mantuvieron células Hep3B (HB-8064™) a 37 °C, 5 % de CO₂ en medio esencial mínimo de Eagle (EMEM - GIBCO) con 10 % de FBS (Omega Scientific, Cat N° FB02) 1 % de antibióticos Antibiotics Cat N° 15240-062).

Para el cultivo de disoluciones madre, las células deben ser 90-100 % confluentes antes del fraccionamiento. Las células se lavan y se tripsinan con 3 mL de 0,25 % de tripsina-EDTA y se incuban a 37 °C, 5 % de CO₂. Se añaden 7 mL de DMEM-10 % de FBS, 1 % de antibióticos/antimicóticos y las células se resuspenden minuciosamente. Se añaden alícuotas de células apropiadas a un nuevo matraz que contiene 30 mL de DMEM-10 % de FBS-1 % de antibióticos/antimicóticos nuevo para obtener 90-100 % de confluencia el día deseado. Las células se resuspenden y se incuban a 37 °C, 5 % de CO₂.

Transfección inversa usando Lipofectamine RNAiMAX. Se almacenó Lipofectamine™ RNAiMAX N° 13778-150 (tamaño de 1,5 mL) a +4 °C, como sugirió el fabricante.

Se usó medio reducido en suero Opti-MEM® I (Cat. N° 31985-062) para diluir los dúplex de iARN y Lipofectamine™ RNAiMAX antes de la complejación.

Se usó BLOCK-IT™ Alexa Fluor® Red Fluorescent Oligo (Cat. N° 14750-100) para evaluar la eficiencia de la transfección.

Se usó el procedimiento de transfección inversa para transfectar ARNip en células Hep3B en un formato de 96 pocillos. En las transfecciones inversas, los complejos se prepararon dentro de los pocillos, después de que se añadiera la suspensión de células. Para cada pocillo a transfectar, se prepararon complejos de dúplex de iARN-Lipofectamine RNAiMAX del siguiente modo:

Se diluyeron 2 μ L de dúplex de iARN (a partir de disolución madre 20 μ M) en 198 μ L de Opti-MEM® en cada pocillo de la placa de dilución para tener una conc. final 20 nM para cribado de una dosis. Para las determinaciones de CI50, se realizaron diluciones adicionales mezclando suavemente el relleno previo y diluyendo 5 veces en serie

ES 2 740 129 T3

(40 uL del 1º relleno + 160 uL de OPT-MEM) para alcanzar un intervalo de conc. de ARN final de 20 nM - 50 fM. Se transfirieron 10 uL/pocillo de dilución de ARNip a la placa de cultivo.

5 Se mezcló suavemente Lipofectamine™ RNAiMAX, luego se añadieron 20 uL de Lipofectamine™ RNAiMAX a 10 mL de Opt-MEM (0,2 uL de Lipofectamine™/pocillo). Se añadieron 10 uL de la mezcla a cada pocillo en la placa de cultivo. La disolución se mezcló suavemente y se incubó durante 10-20 minutos a TA (20 uL de Lipoplex/pocillo).

Se fraccionaron las células, se concentraron y se diluyeron en medio de crecimiento completo sin antibióticos de manera que 80 uL contuvieran el número apropiado de células (2×10^4 /pocillo) para dar 30-50 % de confluencia 24 horas después de la siembra.

10 Se añadieron 80 uL de las células diluidas a cada pocillo con complejos de dúplex de iARN - Lipofectamine™ RNAiMAX. Esto dio un volumen final de 100 uL y una concentración de ARN final de 20 nM (para el ensayo de dosis única) y 20 nM - 50fM (ensayo de CI50). Las células se mezclaron suavemente balanceando la placa hacia adelante y hacia atrás. Las células se incubaron durante la noche a 37 °C en una estufa de incubación con CO₂.

15 Inducción de SAA humano en Hep-3B usando citocinas (IL-1β + IL-6). Se añadieron 500 uL de agua desionizada a un vial de IL-1β humana recombinante ((rIL-1β, Thermo Scientific), DE50 o 1 unidad de actividad = 3 pg/mL) para preparar una disolución madre de trabajo. Esta dilución produjo 20000000 pg/500 uL = 13333333 unidades totales en 500 uL, y 1 uL de disolución madre = 26666 unidades

20 Se añadieron 500 uL agua desionizada a un vial de IL-6 humana recombinante (RIL-61, Thermo Scientific, DE50 o 1 unidad de actividad = 52,5 pg/mL) para preparar una disolución madre de trabajo. Esta dilución produjo 20000000 pg/500 uL = 760456,3 unidades totales en 500 uL, y 1 uL de disolución madre = 1521 unidades.

20 Se prepararon medios de crecimiento con antibióticos en un volumen suficiente para su uso en las placas de ensayo, donde cada pocillo recibió 100 uL de los medios.

Para cada 4 mL de medio, se añadieron 1,2 uL (800 unidades/pocillo) de disolución madre de trabajo de IL-1β y 0,6 uL (23 unidades/pocillo) de disolución madre de trabajo de IL-6, y se mezcló bien la disolución.

Se retiró el medio de cada placa y se añadieron 100 uL de medio de inducción.

25 Se incubaron algunas placas durante 16-18 h a 37 °C, 5 % de CO₂, para su uso en los ensayos de ARNr y TaqMan, y se incubaron otras placas durante 44-46 h para su uso en los ensayos de ELISA.

30 Las FIGs. 1A y 1B muestran que SAA se puede detectar a tanto niveles de ARNm como de proteína. La combinación de IL-1β e IL-6 causó un aumento de 12-14 veces en los niveles de SAA de ARNm después de 16-18 horas, como se mide por ensayo de TaqMan, y causó un aumento de 8 veces en los niveles de SAA de proteína después de 44 horas, como se mide por ELISA.

35 Ensayo de ADNr de SAA humano usando QuantiGene 2.0 Reagent System (Panomics). Se usó el ensayo de ADNr QuantiGene 2.0 para medir los niveles de ARN de SAA. Todos los conjuntos de sondas de ADNr fueron de Panomics. Se diseñaron conjuntos de sondas de SAA específico humano para detectar tanto transcritos de SAA-1 como de SAA2. Se usó GAPDH humano como gen de mantenimiento de control, y se usó el kit QuantiGene (Panomics) para realizar el ensayo.

1º Día de ADNr. Se preparó una dilución de mezcla de lisis nueva (Panomics) redisolviendo cualquier precipitado incubando la mezcla a 37 °C seguido por arremolinamiento suave. Entonces se preparó una dilución 1:2 (1 volumen de mezcla de lisis más 2 volúmenes agua libre de nucleasa). Entonces se añadieron 10 uL/mL de proteinasa K (Panomics) a la dilución.

40 Se lisaron las células 18 h después de la inducción para liberar el ARN diana retirando primero el sobrenadante de las células, luego añadiendo 200 uL de mezcla de lisis diluida más proteinasa K. Las placas se taparon con cinta de aluminio y se incubaron 30-40 min a 55 °C.

45 Para capturar el ARN diana de las células cultivadas, se sacaron las placas del almacenamiento a 4 °C y se dispusieron sobre la mesa para calentarlas completamente hasta temperatura ambiente. Se sacó la bolsa de aluminio cerrada de la placa de captura y se prepararon 80 uL/pocillo de lisado celular para los pocillos de análisis de SAA, mientras que se prepararon 80 uL/pocillo de lisado diluido 1:20 (en mezcla de lisis diluida 1:2) para análisis de GAPDH.

50 Se preparó una mezcla de sondas de trabajo para el análisis de SAA y para el análisis de GAPDH en tubos separados (1,626 uL de H₂O libre de nucleasa + 887 uL de mezcla de lisis + 134 uL de bloqueo + 40 uL del conjunto de sondas 2.0 = 2,688 uL/placa). Se añadieron 20 uL/pocillo de la mezcla de sondas de trabajo, y las placas se sellaron muy fuertemente. Se incubaron las placas a 55 °C durante la noche para la hibridación.

2º día de ADNr. Se preparó 1X tampón de lavado añadiendo 1,5 mL del Componente 1 de tampón de lavado y 2,5 mL del Componente 2 de tampón de lavado, a 496 mL de agua libre de nucleasa.

ES 2 740 129 T3

- Se preparó reactivo de trabajo 2.0 Pre-Amplifier descongelando 2.0 Pre-Amplifier y centrifugando brevemente para recoger el contenido en el fondo del tubo. Se añadieron 11 μ L de 2.0 Pre-Amplifier a 11 mL de diluyente Amplifier/Label Probe y se invirtió la disolución para mezclarla. La disolución se mantuvo a temperatura ambiente hasta uso.
- 5 Se preparó reactivo de trabajo 2.0 Amplifier descongelando 2.0 Amplifier y luego centrifugando brevemente para recoger el contenido en el fondo del tubo. Se añadieron 11 μ L de 2.0 Amplifier a 11 mL de diluyente Amplifier/Label Probe y se invirtió la disolución para mezclarla. Este reactivo también se mantuvo a temperatura ambiente hasta que estuvo listo para su uso.
- 10 Se preparó reactivo de trabajo 2.0 Label Probe descongelando 2.0 Label Probe, luego centrifugando brevemente para recoger el contenido en el fondo del tubo. Se añadieron 11 μ L de 2.0 Label Probe a 11 mL de diluyente Amplifier/Label Probe y se invirtió la disolución para mezclarla. Esta disolución también se mantuvo a temperatura ambiente hasta que estuvo listo para su uso.
- Se sacó 2.0 Substrate del almacenamiento a 4 °C y se dejó que se calentara hasta temperatura ambiente antes de uso.
- 15 Se añaden 200 μ L/pocillo de 1x tampón de lavado a la placa de captura, y la placa de captura se invierte sobre un receptáculo apropiado y así se expulsa forzosamente el contenido. Se golpeó firmemente la placa invertida sobre una toalla de papel limpia para secar, y se repitió el lavado dos veces más usando 300 μ L/pocillo de 1x lavado. Se centrifugó la placa a 240xg durante 1 min a temperatura ambiente.
- 20 Para la hibridación de 2.0 Pre-Amplifier, se añadieron 100 μ L/pocillo del reactivo de trabajo Pre-Amplifier a la placa, y la placa se selló fuertemente. Entonces se incubó la placa a 55 °C durante 1 h. La placa se lavó tres veces después de la pre-amplificación.
- Para la hibridación de 2.0 Amplifier, añadir 100 μ L/pocillo de reactivo de trabajo Amplifier se añadieron 100 μ L/pocillo a la placa. La placa se selló fuertemente y entonces se incubó a 55 °C durante 1 h. La placa se lavó tres veces después de la amplificación.
- 25 Para la hibridación de Label Probe, se añadieron 100 μ L/pocillo del reactivo de trabajo Label Probe a la placa, y la placa se selló fuertemente. La placa se incubó a 50 °C durante 1 h. La placa se lavó tres veces después del marcado.
- Para la detección de señal, se añadieron 100 μ L de 2.0 Substrate a cada pocillo y la placa se leyó en el luminómetro después de 5 a 15 min.
- 30 Ensayo de expresión génica TaqMan de SAA humano (Applied Biosystems). Se usó el ensayo Taqman para medir ARN de SAA. Todas las sondas de Taqman usadas para los ensayos de Taqman se compraron de Applied Biosystems. Se usaron los cicladores ABI 7900 HT y 7000 para procesar y leer las placas de ensayo. No se debe realizar control de RT-PCR para comprobar ninguna amplificación inespecífica o contaminación por ADN del ARN usado para la etapa de transcripción inversa.
- 35 Se preparó la mezcla maestra combinando 10 μ L de mezcla maestra de expresión génica de PCR (Applied Biosystems, ABI), 6 μ L de agua libre de nucleasa, 1 μ L de sonda de SAA diseñada para detectar tanto SAA1 como SAA2 (Hs00761940_s1, Applied Biosystems) y 1 μ L de tanto sonda de control endógeno 18s como 2 μ L de RT cDNA/añadir después para una reacción total de 20 μ L.
- 40 Se tomaron en alícuotas 18 μ L de la mezcla maestra en cada pocillo y luego se añadieron 2 μ L de producto de RT cDNA y se mezclaron pipeteando arriba y abajo. La placa se selló con cinta AB Optic y se procesó con un instrumento de PCR en tiempo real. Las lecturas se tomaron con un instrumento de PCR en tiempo real ABI 7900 HT, después de lo cual se analizaron y evaluaron los datos.
- 45 Ensayo de kit de ELISA de SAA humano (Abazyme, LLC Cat Nº EL10015). Se usó un ensayo de ELISA de SAA humano para determinar la proteína de suero amiloide A (SAA) humano en sobrenadante de cultivo celular. Se dejó que los reactivos del kit alcanzaran la temperatura ambiente antes de uso. Se reconstituyó un patrón de SAA con 2,0 mL de Calibrator Diluent II (80 ng/mL), y se dejó que la disolución reposara durante al menos 15 minutos con agitación suave antes de hacer las diluciones.
- 50 Se usó la disolución madre para producir una serie de diluciones dobles en serie dentro del intervalo del ensayo (2,5 ng/mL a 80 ng/mL). El patrón de SAA sin diluir sirvió del patrón alto (80 ng/mL) y Calibrator Diluent sirvió de cero.
- Se usaron muestras de sobrenadante de células tratadas con ARNip y SAA inducidas un día después por IL1b+IL-6 y después de 46 después de la inducción, y los sobrenadantes se diluyeron 1:3.
- Se preparó 1x tampón de lavado (1:19 de agua destilada o desionizada). Se mezclaron juntos Sustrato A y Sustrato B en volúmenes iguales 15 minutos antes de uso (se necesitan 14 mL totales, 7 mL de cada uno /placa).

5 Para realizar el ensayo, se añadieron 100 µL de patrón o muestra al pocillo apropiado de una placa de microtitulación previamente recubierta con anticuerpo monoclonal específico de SAA. Se cubrió la placa y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. La placa se lavó cinco veces con 1x tampón de lavado (350 uL/pocillo). Entonces se añadieron a cada pocillo 100 µL de anticuerpo policlonal conjugado con HRP específico para SAA. La placa se cubrió y se incubó durante una hora a temperatura ambiente, y se repitió cinco veces el procedimiento de lavado. Se añadieron 100 µL de disolución de sustrato TMB (3,3',5',5'-tetrametil-bencidina) a cada pocillo. Entonces se cubrieron las placas y se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente. Presentan un cambio en el color una SAA y la reacción de enzima-sustrato.

10 Se terminó la reacción de enzima-sustrato añadiendo 100 µL de disolución de parada (ácido sulfúrico) a cada pocillo y mezclando bien. Se midió la densidad óptica (D.O.) a 450 ± 2 nm en el plazo de 30 minutos usando un lector de espectrofotómetro (una placa de microtitulación).

Se sintetizaron los SRN de dúplex de 2'-Ome de SAA en la Tabla 2; cada hebra incluyó un enlace de fosfato que conecta moléculas 3' dT adyacentes.

Símbolos usados en la Tabla 2

símbolo	definición
A	adenosina-3'-fosfato
C	citidina-3'-fosfato
G	guanosa-3'-fosfato
T	5-metiluridina-3'-fosfato
U	uridina-3'-fosfato
C	2'-O-metilcitidina-3'-fosfato
dT	2'-desoxitimidina-3'-fosfato
u	2'-O-metiluridina-3'-fosfato

*La Diana es la posición de la base de 5' en el transcrito de SAA1 humano NM_000331.3

Hebra: S es codificante; AS es no codificante

15

Tabla 2. Secuencias de ARNip de SAA

AD-ID Nº	Hebra	Diana*	Secuencia sin modificaciones (5'-3')	SEQ ID NO:	Secuencia con modificaciones (5'-3')	SEQ ID NO:
18368	S	385	CCAUGCUCGGGGGAACUAU	157	ccAuGcucGGGGGAACuAudTdT	1
	AS	403	AUAGUUCSCCCGAGCAUGG	158	AuAGUUCSCCCGAGcAUGGdTdT	2
18369	S	304	GGCUUUUGAUGGGGCUCCG	159	GGcuuuuGAuGGGGcucGGdTdT	3
	AS	322	CCGAGCCCCAUCAAAAGCC	160	CCGAGCCCCcAUcAAAAGCCdTdT	4
18370	S	285	UCUUUUCGUCCUUGGCGA	161	ucuuuucGuuccuuGGcGAdTdT	5
	AS	303	UCGCCAAGGAACGAAAAGA	162	UCGCcAAGGAACGAAAAGAdTdT	6
18371	S	352	AGAAGCCAAUUACAUCGGC	163	AGAAGccAAuuAcAucGGcdTdT	7
	AS	370	GCCGAUGUAAUUGGCUUCU	164	GCCGAUGuAAUUGGCUUCUdTdT	8
18372	S	366	UCGGCUCAGACAAUACUU	165	ucGGcucAGAcAAuAcuudTdT	9
	AS	384	AAGUAAUUGUCUGAGCCGA	166	AAGuAAUUGUCUGAGCCGAdTdT	10
18373	S	378	AAUACUCCAUGCUCGGGG	167	AAuAcuuccAuGcucGGGGdTdT	11
	AS	396	CCCCGAGCAUGGAAGUAAU	168	CCCCGAGcAUGGAAGuAAUdTdT	12
18374	S	551	CCCAAUCACUCCGACCU	169	cccAAucAcuuccGAccuGdTdT	13

ES 2 740 129 T3

AD-ID Nº	Hebra	Diana*	Secuencia sin modificaciones (5'-3')	SEQ ID NO:	Secuencia con modificaciones (5'-3')	SEQ ID NO:
	AS	569	AGGUCGGAAGUGAUUGGGTT	170	cAGGUCGGAAGUGAUUGGGdTdT	14
18375	S	277	CCGAAGCUUCUUUUCGUUC	171	ccGAAGcuucuuuuuGuucdTdT	15
	AS	295	GAACGAAAAGAAGCUUCGG	172	GAACGAAAAGAAGCUUCGGdTdT	16
18376	S	359	AAUUACAUCGGCUCAGACA	173	AAuuAcAucGGcucAGAcAdTdT	17
	AS	377	UGUCUGAGCCGAUGUAAUU	174	UGUCUGAGCCGAUGuAAUdTdT	18
18377	S	361	UUACAUCGGCUCAGACAAA	175	uuAcAucGGcucAGAcAAAdTdT	19
	AS	379	UUUGUCUGAGCCGAUGUAA	176	UUUGUCUGAGCCGAUGuAAdTdT	20
18378	S	383	UCCAUCGUCGGGGAAACU	177	uuccAuGcucGGGGAAAcuAdTdT	21
	AS	401	AGUUCCCCCGAGCAUGGAA	178	AGUUCCCCCGAGcAUGGAAdTdT	22
18379	S	386	CAUGCUCGGGGAAACUAUG	179	cAuGcucGGGGAAAcuAuGdTdT	23
	AS	404	CAUAGUUCCCCCGAGCAUG	180	cAuAGUUCCCCCGAGcAUGdTdT	24
18380	S	305	GCUUUUGAUGGGGCUCGGG	181	GcuuuuGAuGGGGcucGGdTdT	25
	AS	323	CCCGAGCCCCAUCAAAAGC	182	CCCGAGCCCcAUCAAAAGCdTdT	26
18381	S	334	AGCCUACUCUGACAUGAGA	183	AGccuAcucuGAcAuGAGAdTdT	27
	AS	352	UCUCAUGUCAGAGUAGGCU	184	UCUcAUGUcAGAGuAGGCUdTdT	28
18382	S	364	CAUCGGCUCAGACAAAUAC	185	cAucGGcucAGAcAAuAcdTdT	29
	AS	382	GUAUUUGUCUGAGCCGAUG	186	GuAUUUGUCUGAGCCGAUGdTdT	30
18383	S	547	AGACCCCAAUCACUCCGA	187	AGAccccAAucAcuuccGAdTdT	31
	AS	565	UCGGAAGUGAUUGGGGUCU	188	UCGGAAGUGAUUGGGGUCUdTdT	32
18384	S	579	CUGAGAAUACUGAGCUUC	189	cuGAGAAuAcuGAGcuucdTdT	33
	AS	597	GAAGCUCAGUAUUUCUCAG	190	GAAGCUcAGuAUUUCUcAGdTdT	34
18385	S	275	AGCCGAAGCUUCUUUUCGU	191	AGccGAAGcuucuuuuGudTdT	35
	AS	293	ACGAAAAGAAGCUUCGGCU	192	ACGAAAAGAAGCUUCGGCUdTdT	36
18386	S	286	CUUUUCGUUCCUUGGCGAG	193	cuuuucGuuccuuGGcGAGdTdT	37
	AS	304	CUCGCCAAGGAACGAAAAG	194	CUCGCcAAGGAACGAAAAGdTdT	38
18387	S	287	UUUUCGUUCCUUGGCGAGG	195	uuuuucGuuccuuGGcGAGGdTdT	39
	AS	305	CCUCGCCAAGGAACGAAAA	196	CCUCGCcAAGGAACGAAAAdTdT	40
18388	S	357	CCAUUACAUCGGCUCAGA	197	ccAAuuAcAucGGcucAGAdTdT	41
	AS	375	UCUGAGCCGAUGUAAUUGG	198	UCUGAGCCGAUGuAAUUGdTdT	42
18389	S	358	CAUUACAUCGGCUCAGAC	199	cAAuuAcAucGGcucAGAcdTdT	43
	AS	376	GUCUGAGCCGAUGUAAUUG	200	GUCUGAGCCGAUGuAAUUGdTdT	44
18390	S	299	GGCGAGGCUUUUGAUGGGG	201	GGcGAGGcuuuuGAuGGGdTdT	45
	AS	317	CCCCAUCAAAAGCCUCGCC	202	CCCcAUCAAAAGCCUCGCCdTdT	46
18391	S	316	GGCUCGGGACAUGUGGAGA	203	GGcucGGGAcAuGuGGAGAdTdT	47
	AS	334	UCUCCACAUGUCCCGAGCC	204	UCUCcAcAUGUCCCGAGCCdTdT	48
18392	S	345	ACAUGAGAGAAGCCAAUUA	205	AcAuGAGAGAAGccAAuuAdTdT	49

ES 2 740 129 T3

AD-ID N°	Hebra	Diana*	Secuencia sin modificaciones (5'-3')	SEQ ID NO:	Secuencia con modificaciones (5'-3')	SEQ ID NO:
	AS	363	UAAUUGGCUUCUCUCAUGU	206	uAAUUGGCUUCUCUCcAUGUdTdT	50
18393	S	346	CAUGAGAGAAGCCAAUUAC	207	cAuGAGAGAAGccAAuuAcdTdT	51
	AS	364	GUAAUUGGCUUCUCUCAUG	208	GuAAUUGGCUUCUCUCcAUGdTdT	52
18394	S	355	AGCCAAUUACAUCGGCUC	209	AgccAAuuAcAucGGcucAdTdT	53
	AS	373	UGAGCCGAUGUAAUUGGCU	210	UGAGCCGAUGuAAUUGGCUdTdT	54
18395	S	356	GCCAAUUACAUCGGCUCAG	211	GccAAuuAcAucGGcucAGdTdT	55
	AS	374	CUGAGCCGAUGUAAUUGGC	212	CUGAGCCGAUGuAAUUGGCdTdT	56
18396	S	367	CGGCUCAGACAAAUACUUC	213	cGGcucAGAcAAuAcuucdTdT	57
	AS	385	GAAGUAAUUGUCUGAGCCG	214	GAAGuAAUUGUCUGAGCCdTdT	58
18397	S	223	CAUGAAGCUUCUCACGGGC	215	cAuGAAGcuucucAcGGGdTdT	59
	AS	241	GCCCGUGAGAAGCUUCAUG	216	GCCCGUGAGAAGCUUcAUGdTdT	60
18398	S	485	GGCCAUGGUGCGGAGGACU	217	GGccAuGGuGcGGAGGAcudTdT	61
	AS	503	AGUCCUCCGCACCAUGGCC	218	AGUCCUCCGcAcCAUGGCCdTdT	62
18399	S	548	GACCCAAUCACUUCGAC	219	GaccccAAucAcuuccGAcdTdT	63
	AS	566	GUCGGAAGUGAUUGGGGUC	220	GUCGGAAGUGAUUGGGGUCdTdT	64
18400	S	550	CCCCAAUCACUUCGACCU	221	ccccAAucAcuuccGAccudTdT	65
	AS	568	AGGUCGGAAGUGAUUGGGG	222	AGGUCGGAAGUGAUUGGGGdTdT	66
18401	S	573	GCCUGCCUGAGAAUACUG	223	GccuGccuGAGAAuAcuGdTdT	67
	AS	591	CAGUAAUUCUCAGGCAGGC	224	cAGuAAUUCUCcAGGcAGGCdTdT	68
18402	S	276	GCCGAAGCUUCUUUCGUU	225	GccGAAGcuucuuucGuudTdT	69
	AS	294	AACGAAAAGAAGCUUCGGC	226	AACGAAAAGAAGCUUCGGCdTdT	70
18403	S	279	GAAGCUUCUUUCGUUCCU	227	GAAGcuucuuucGuuccdTdT	71
	AS	297	AGGAACGAAAAGAAGCUUC	228	AGGAACGAAAAGAAGCUUCdTdT	72
18404	S	280	AAGCUUCUUUCGUUCCUU	229	AAGcuucuuucGuuccdTdT	73
	AS	298	AAGGAACGAAAAGAAGCUU	230	AAGGAACGAAAAGAAGCUUdTdT	74
18405	S	291	CGUUCUUGGCGAGGCUUU	231	cGuuccuuGGcGAGGcuudTdT	75
	AS	309	AAAGCCUCGCCAAGGAACG	232	AAAGCCUCGCcAAGGAACdTdT	76
18406	S	292	GUUCCUUGGCGAGGCUUUU	233	GuuccuuGGcGAGGcuudTdT	77
	AS	310	AAAAGCCUCGCCAAGGAAC	234	AAAAGCCUCGCcAAGGAACdTdT	78
18407	S	296	CUUGGCGAGGCUUUUGAUG	235	cuuGGcGAGGcuuuGAuGdTdT	79
	AS	314	CAUCAAAAGCCUCGCCAAG	236	cAUcAAAAGCCUCGCcAAGdTdT	80
18408	S	298	UGGCGAGGCUUUUGAUGGG	237	uGGcGAGGcuuuGAuGGdTdT	81
	AS	316	CCCAUCAAAAGCCUCGCCA	238	CCcAUcAAAAGCCUCGCcAdTdT	82
18409	S	340	CUCUGACAUGAGAGAAGCC	239	cucuGAcAuGAGAGAAGccdTdT	83
	AS	358	GGCUUCUCUCAUGUCAGAG	240	GGCUUCUCUCcAUGUCAGdTdT	84
18410	S	235	CACGGGCCUGGUUUUCUGC	241	cAcGGGccuGGuuuuGcdTdT	85

ES 2 740 129 T3

AD-ID Nº	Hebra	Diana*	Secuencia sin modificaciones (5'-3')	SEQ ID NO:	Secuencia con modificaciones (5'-3')	SEQ ID NO:
	AS	253	GCAGAAAACCAGGCCCGUG	242	GcAGAAAACcAGGCCCGUGdTdT	86
18411	S	306	CUUUUGAUGGGGCUCGGGA	243	cuuuuGAuGGGGcucGGGAdTdT	87
	AS	324	UCCCGAGCCCCAUCAAAAG	244	UCCCGAGCCCCcAUcAAAAGdTdT	88
18412	S	297	UUGGCGAGGCUUUUGAUGG	245	uuGGcGAGGcuuuuGAuGGdTdT	89
	AS	315	CCAUCAAAAGCCUCGCCAA	246	CcAUcAAAAGCCUCGCcAAdTdT	90
18413	S	381	ACUCCAUGCUCGGGGGAA	247	AcuuccAuGcucGGGGAAdTdT	91
	AS	399	UCCCCCGAGCAUGGAAGU	248	UCCCCCGAGcAUGGAAGUdTdT	92
18414	S	246	UUUUCUGCUCCUUGGUCCU	249	uuuuuGcuccuuGGuccdTdT	93
	AS	264	AGGACCAAGGAGCAGAAAA	250	AGGACcAAGGAGcAGAAAAdTdT	94
18415	S	230	CUUCUCACGGGCCUGUUU	251	cuucucAcGGGccuGGuuuTdT	95
	AS	248	AAACCAGGCCCGUGAGAAG	252	AAAcAGGCCCGUGAGAAGdTdT	96
18416	S	360	AUUACAUCGGCUCAGACAA	253	AuuAcAucGGcucAGAcAAdTdT	97
	AS	378	UUGUCUGAGCCGAUGUAAU	254	UUGUCUGAGCCGAUGuAAUdTdT	98
18417	S	379	AUACUCCAUGCUCGGGGG	255	AuAcuuccAuGcucGGGGdTdT	99
	AS	397	CCCCGAGCAUGGAAGU	256	CCCCGAGcAUGGAAGuAUdTdT	100
18418	S	300	GCGAGGCUUUUGAUGGGGC	257	GcGAGGcuuuuGAuGGGGdTdT	101
	AS	318	GCCCCAUCAAAAGCCUCGC	258	GCCCCAUcAAAAGCCUCGcTdT	102
18419	S	317	GCUCGGGACAUGUGGAGAG	259	GcucGGGAcAuGuGGAGAdTdT	103
	AS	335	CUCUCCACAUGUCCCGAGC	260	CUCUCcAcAUGUCCCGAGcTdT	104
18420	S	324	ACAUGUGGAGAGCCUACUC	261	AcAuGuGGAGAGccuAcucdTdT	105
	AS	342	GAGUAGGCUCUCCACAUGU	262	GAGuAGGCUCUCcAcAUGUdTdT	106
18421	S	384	UCCAUGCUCGGGGGAACUA	263	uccAuGcucGGGGGAACuAdTdT	107
	AS	402	UAGUCCCCCGAGCAUGGA	264	uAGUCCCCCGAGcAUGGAdTdT	108
18422	S	555	AUCACUUCGGACCUGCUGG	265	AucAcuuccGAccuGcuGGdTdT	109
	AS	573	CCAGCAGGUCGGAAGUGAU	266	CcAGcAGGUCGGAAGUGAUdTdT	110
18423	S	322	GGACAUGUGGAGAGCCUAC	267	GGAcAuGuGGAGAGccuAcdTdT	111
	AS	340	GUAGGCUCUCCACAUGUCC	268	GuAGGCUCUCcAcAUGUCCdTdT	112
18424	S	325	CAUGUGGAGAGCCUACUCU	269	cAuGuGGAGAGccuAcucdTdT	113
	AS	343	AGAGUAGGCUCUCCACAUG	270	AGAGuAGGCUCUCcAcAUGdTdT	114
18425	S	330	GGAGAGCCUACUCUGACAU	271	GGAGAGccuAcucuGAcAuTdT	115
	AS	348	AUGUCAGAGUAGGCUCUCC	272	AUGUcAGAGuAGGCUCUCCdTdT	116
18426	S	331	GAGAGCCUACUCUGACAUG	273	GAGAGccuAcucuGAcAuGdTdT	117
	AS	349	CAUGUCAGAGUAGGCUCUC	274	cAUGUcAGAGuAGGCUCUCdTdT	118
18427	S	338	UACUCUGACAUGAGAGAAG	275	uAcucuGAcAuGAGAGAAGdTdT	119
	AS	356	CUUCUCUCAUGUCAGAGUA	276	CUUCUCUcAUGUcAGAGuAdTdT	120
18428	S	353	GAAGCCAAUUACAUCGGCU	277	GAAGccAAuuAcAucGGcudTdT	121

ES 2 740 129 T3

AD-ID Nº	Hebra	Diana*	Secuencia sin modificaciones (5'-3')	SEQ ID NO:	Secuencia con modificaciones (5'-3')	SEQ ID NO:
	AS	371	AGCCGAUGUAAUUGGCUUC	278	AGCCGAUGuAAUUGGCUUCdTdT	122
18429	S	369	GCUCAGACAAAUACUCCA	279	GcucAGAcAAuAcuuccAdTdT	123
	AS	387	UGGAAGUAAUUGUCUGAGC	280	UGGAAGuAAUUGUCUGAGCdTdT	124
18430	S	380	UACUCCAUGCUCGGGGGA	281	uAcuuccAuGcucGGGGAdTdT	125
	AS	398	UCCCCGAGCAUGGAAGUA	282	UCCCCGAGcAUGGAAGuAdTdT	126
18431	S	220	CACCAUGAAGCUUCACAG	283	cAccAuGAAGcuucucAcGdTdT	127
	AS	238	CGUGAGAAGCUUCAUGGUG	284	CGUGAGAAGCUUcAUGGUGdTdT	128
18432	S	410	GCCAAAAGGGGACCGGGG	285	GccAAAAGGGGAccuGGGdTdT	129
	AS	428	CCCcAGGUCCCCUUUUGGC	286	CCCcAGGUCCCCUUUUGGCdTdT	130
18433	S	224	AUGAAGCUUCACGGGCC	287	AuGAAGcuucucAcGGGcdTdT	131
	AS	242	GGCCCGUGAGAAGCUUCAU	288	GGCCCGUGAGAAGCUUcAUdTdT	132
18434	S	486	GCCAUUGGUGCGGAGGACUC	289	GccAuGGuGcGGAGGAcucdTdT	133
	AS	504	GAGUCCUCCGCACCAUGGC	290	GAGUCCUCCGcACcAUGGCdTdT	134
18435	S	487	CCAUGGUGCGGAGGACUCG	291	ccAuGGuGcGGAGGAcucdTdT	135
	AS	505	CGAGUCCUCCGCACCAUGG	292	CGAGUCCUCCGcACcAUGGdTdT	136
18436	S	237	CGGGCCUGGUUUUCUGCUC	293	cGGGccuGGuuuuuGcucdTdT	137
	AS	255	GAGCAGAAAACCAGGCCCG	294	GAGcAGAAAACcAGGCCCGdTdT	138
18437	S	268	UGUCAGCAGCCGAAGCUUC	295	uGucAGcAGccGAAGcuucdTdT	139
	AS	286	GAAGCUUCGGCUGCUGACA	296	GAAGCUUCGGCUGCUGAcAdTdT	140
18438	S	273	GCAGCCGAAGCUUCUUUUC	297	GcAGccGAAGcuuuuuuCdTdT	141
	AS	291	GAAAAGAAGCUUCGGCUGC	298	GAAAAGAAGCUUCGGCUGCdTdT	142
18439	S	282	GCUUCUUUCGUUCCUUGG	299	GcuuuuuuGcuuuuGGdTdT	143
	AS	300	CCAAGGAACGAAAAGAAGC	300	CcAAGGAACGAAAAGAAGCdTdT	144
18440	S	293	UUCUUGGCGAGGCUUUUG	301	uuuuuuGGcGAGGcuuuuGdTdT	145
	AS	311	CAAAAGCCUCGCCAAGGAA	302	cAAAAGCCUCGcCcAAGGAAdTdT	146
18441	S	294	UCCUUGGCGAGGCUUUUGA	303	uccuuGGcGAGGcuuuuGAdTdT	147
	AS	312	UCAAAAGCCUCGCCAAGGA	304	UcAAAAGCCUCGcCcAAGGAAdTdT	148
18442	S	583	GAAAUACUGAGCUUCCUCU	305	GAAAUAcuGAGcuuuccudTdT	149
	AS	601	AGAGGAAGCUCAGUAAUUC	306	AGAGGAAGCUcAGuAAUUCdTdT	150
18443	S	549	ACCCCAAUCACUCCGACC	307	AccccAAucAcuuccGAccdTdT	151
	AS	567	GGUCGGAAGUGAUUGGGGU	308	GGUCGGAAGUGAUUGGGGUdTdT	152
18444	S	393	GGGGGAACUAUGAUGCUGC	309	GGGGGAACuAuGAuGcuGcdTdT	153
	AS	411	GCAGCAUCAUAGUCCCCC	310	GcAGcAUcAuAGUCCCCCdTdT	154
18445	S	373	AGACAAAUACUCCAUGCU	311	AGAcAAuAcuuccAuGcdTdT	155
	AS	391	AGCAUGGAAGUAAUUGUCU	312	AGcAUGGAAGuAAUUGUCUdTdT	156

Tabla 3. Resultados del cribado de eficacia *in vitro* de ARNip de SAA

AD-ID Nº	Específico/reacciona de forma cruzada con ARNip de SAA	% de actividad de SAA con respecto a control no específico		
		ELISA	ADNr	TaqMan
18406	Humano	100	93	97
18440	Humano	100	92	96
18372	Humano	100	94	92
18402	Humano	100	92	94
18408	Humano	100	91	93
18386	Humano	100	89	95
18390	Humano	100	89	95
18403	Humano	100	88	96
18437	Humano	94	93	97
18376	Humano	100	95	87
18438	Humano	100	90	93
18396	Humano	100	85	97
18370	Humano	100	94	85
18416	Humano	97	92	90
18384	Humano	100	85	92
18409	Humano	98	83	89
18388	Humano	100	80	88
18387	Humano	96	79	90
18427	Humano	92	82	90
18377	Humano	100	68	90
18407	Humano	91	79	87
18385	Humano	100	51	97
18432	Humano	88	76	82
18375	Humano	100	67	80
18429	Humano	86	76	82
18439	Humano	80	69	80
18380	Humano	98	41	79
18381	Humano	85	72	66
18404	Humano	83	64	73
18371	Humano	65	96	29
18442	Humano	90	56	60
18389	Humano	75	86	39

ES 2 740 129 T3

AD-ID Nº	Específico/reacciona de forma cruzada con ARNip de SAA	% de actividad de SAA con respecto a control no específico		
18393	Humano	73	88	32
18401	Humano	80	67	58
18382	Humano	82	70	51
18395	Humano	63	60	57
18405	Humano	46	60	58
18369	Humano	85	43	51
18394	Humano	0	83	47
18392	Humano	100	32	0
18412	Humano	36	52	49
18435	Humano	41	45	45
18398	Humano	28	46	46
18428	Humano	4	27	57
18411	Humano	17	33	50
18441	Humano	52	32	9
18418	Humano	3	15	30
18431	Humano y cino	100	89	97
18400	Humano y cino	100	86	92
18420	Humano y cino	100	87	89
18397	Humano y cino	100	83	92
18374	Humano y cino	99	90	82
18415	Humano y cino	99	83	89
18436	Humano y cino	97	80	85
18425	Humano y cino	92	75	87
18399	Humano y cino	92	75	85
18391	Humano y cino	68	92	75
18414	Humano y cino	86	73	81
18443	Humano y cino	91	74	70
18419	Humano y cino	88	67	80
18383	Humano y cino	63	71	68
18410	Humano y cino	63	49	54
18426	Humano y cino	57	34	55
18422	Humano y cino	16	23	41
18424	Humano y cino	0	24	38
18433	Humano y cino	0	33	20

ES 2 740 129 T3

AD-ID N°	Específico/reacciona de forma cruzada con ARNip de SAA	% de actividad de SAA con respecto a control no específico		
18423	Humano y cino	0	0	0
18417	Humano y ratón	95	77	83
18379	Humano y ratón	99	54	89
18373	Humano y ratón	96	76	69
18368	Humano y ratón	88	79	54
18430	Humano y ratón	54	49	72
18413	Humano y ratón	28	51	53
18421	Humano y ratón	14	49	45
18378	Humano y ratón	0	50	20
18444	Humano, cino y ratón	92	73	76
18445	Humano, cino y ratón	93	68	74

Las FIGs. 2 y 3 ilustran los niveles de ARNm de SAA y de proteína en células Hep3B tras la administración del ARNip de SAA candidato como se ha descrito anteriormente. Trece de los ARNip probados mostraron >90 % de inhibición de niveles de ARNm, 30 ARNip mostraron >80 % de inhibición y 60 ARNip mostraron >50 % de inhibición. Más de 30 de los 78 ARNip candidatos redujeron los niveles de proteína >95 %.

Se seleccionaron treinta y dos de los 78 ARNip para la respuesta a dosis y la caracterización de citocinas de CMSP. La selección se basó en la actividad en el experimento de respuesta a dosis única y en la reactividad cruzada a través de especies para ensayar dúplex con actividad de solo humano, actividad de humano/cino, actividad de humano/ratón y actividad de humano/ratón/cino. Las curvas de respuesta a dosis para ARNip seleccionados se muestran en las FIGs. 4A-4G.

Resultados de la 1ª ronda de CI50 de ARNip de SAA en un modelo *in vitro*.

Para identificar el ARNip de SAA más potente, se cribaron las CI50 de 32 ARNip de SAA en un modelo *in vitro* a concentraciones que variaban desde 20 nM hasta 50 fM (diluciones sucesivas quintuples). Se transfectaron de forma inversa los ARNip de SAA en Hep3B usando LF-Max. 24 h después, se indujo la expresión génica de SAA añadiendo citocinas 1L-1 β e IL6 combinadas. 18 h después de la inducción, se analizó la actividad de ARNip de SAA midiendo los niveles de SAA de ARNm con respecto a un control no específico (BLOCK-IT) usando bDNA 2.0. Los resultados de la primera ronda de cribado se muestran en la Tabla 4 a continuación.

Tabla 4. Resultados de la primera ronda de ARNip de SAA en un modelo *in vitro*

ID N°	Específico de ARNip de SAA/ reacciona de forma cruzada	CI50 (nM) ADNr
18402	Humano	0,0003
18384	Humano	0,0035
18403	Humano	0,0052
18406	Humano	0,0058
18386	Humano	0,0064
18376	Humano	0,0301
18396	Humano	0,0304
18372	Humano	0,0547

ES 2 740 129 T3

ID Nº	Específico de ARNip de SAA/ reacciona de forma cruzada	CI50 (nM)
18437	Humano	0,0687
18438	Humano	0,0828
18408	Humano	0,0925
18390	Humano	0,1490
18370	Humano	0,1697
18416	Humano	0,2548
18440	Humano	0,7700
18409	Humano	0,8412
18400	Humano y cino	0,0004
18431	Humano y cino	0,0151
18397	Humano y cino	0,1558
18420	Humano y cino	0,1612
18399	Humano y cino	0,2097
18415	Humano y cino	0,4249
18374	Humano y cino	0,5581
18425	Humano y cino	1,3838
18414	Humano y cino	1,7319
18436	Humano y cino	4,2058
18379	Humano y ratón	0,0466
18373	Humano y ratón	0,2614
18417	Humano y ratón	0,6534

Resultados de la 2ª ronda de CI50 de ARNip de SAA en un modelo *in vitro*.

5 Para identificar potentes ARNip de SAA, se cribaron las CI50 de 32 ARNip de SAA en un modelo *in vitro* a concentraciones que variaban desde 20 nM hasta 50 fM (diluciones sucesivas quíntuples). Se transfectó de forma inversa ARNip de SAA en Hep3B usando LF-Max. 24 h después, se indujo SAA añadiendo citocinas IL-1 β e IL6 combinadas. 18 h después de la inducción, se analizó la actividad de ARNip de SAA midiendo el nivel de ARNm de SAA con respecto a un control no específico (AD-1955) usando bDNA 2.0. Los resultados de la segunda ronda de cribado se muestran a continuación en la Tabla 5. Se seleccionaron los ARNip sombreados en la Tabla 5 para análisis adicional en ensayos de estabilidad de suero, en estudios de eficacia *in vivo* en ratones y para efectos inespecíficos. La selección se basó en la mejor CI50 en cada clase de reactividades cruzadas; humano/cino fue más pesado ya que era más probable que produjera una molécula inicial, ya que las moléculas en esta clase tenían mayor CI50 y permitían la prueba preclínica en NHP.

10

Tabla 5. Resultados de la segunda ronda de cribado de ARNip de SAA en un modelo *in vitro*

ID N°	Específico de ARNip de SAA/ reacciona de forma cruzada	CI50 (nM) ADNr 2ª ronda	CI50 (nM) TaqMan	CI50 (nM) ELISA
18386	Humano	0,0001	0,0003	0,0001
18402	Humano	0,0005	0,001	0,0001
18406	Humano	0,0019	0,0035	0,0007
18384	Humano	0,0017	0,005	0,0017
18403	Humano	0,0159	0,1737	0,0296
18431	Humano y cino	0,0016	0,003	0,0001
18415	Humano y cino	0,0126	0,009	0,0018
18420	Humano y cino	0,0097	0,0121	0,0082
18397	Humano y cino	0,2216	0,0377	0,0176
18400	Humano y cino	0,5644	0,0687	0,237
18374	Humano y cino	0,4711	0,113	0,336
18399	Humano y cino	0,8078	0,3986	0,606
18443	Humano y cino	3,4945	0,9039	2,227
18379	Humano y ratón	0,0463	0,0116	0,068
18373	Humano y ratón	0,2572	0,0555	0,078
18417	Humano y ratón	0,3150	0,1694	0,441
18445	Humano, cino y ratón	0,2138	0,031	0,1499
18444	Humano, cino y ratón	1,2722	3,1406	1,545

Ejemplo 4: Modelo de ratón *in vivo* para probar ARNip de SAA

5 Se estableció un modelo de ratón *in vivo* para probar ARNip de SAA. Se inyectaron ratones (n=5) por vía intraperitoneal (i.p.) con lipopolisacárido (LPS) a una concentración de 50 ug en el día 0. Se tomó sangre de los ratones en el día -3 y día 1 tras la inyección de LPS y se midieron los niveles de DO relativa de SAA de ratón.

La Figura 5 muestra que los niveles de SAA aumentaron en todos los ratones probados 24 horas después de la inyección de LPS en comparación con los niveles de SAA pre-inyección de LPS. Se logró regulación por incremento de SAA similar con 10 ug de LPS inyectado i.p. (datos no mostrados).

10 Para probar si el ARNip de SAA puede regular por disminución los niveles de SAA *in vivo*, los ratones se administraron con ARNip i.v. 6 horas después de la inyección de LPS (10 ug i.p.). Los ARNip probados fueron 18445 formulado en LNP01 (10 mg/kg), 18379 formulado en LNP01 (10 mg/kg) y 18445 formulado en SNALP (2 mg/kg). Los controles incluyeron PBS y ARNip de control de 1955 formulado en LNP01 (10 mg/kg). Se tomó sangre de los ratones 24 horas después de la administración de ARNip y se midieron los niveles de SAA usando ensayo de ELISA.

15 La formulación de SNALP fue del siguiente modo: DLinDMA/DPPC/Colesterol/PEG-cDMA (57,1/7,1/34,4/1,4) con lípido:ARNip de ~7:1.

La formulación de LNP01 fue del siguiente modo: ND98/Colesterol/PEG-Ceramida C16 con una relación molar 42:48:10.

20 La Figura 6 muestra que LNP01-18445 y SNALP-18445 regularon significativamente por disminución los niveles de SAA en comparación con los controles.

Como se describe en la Tabla 2, las secuencias de cada hebra de 18445 son del siguiente modo:

AD-ID N°	Hebra	Diana*	Secuencia sin modificaciones (5'-3')	SEQ ID NO:	Secuencia con modificaciones (5'-3')	SEQ ID NO:
18445	S	373	AGACAAAUACUCCAUGCU	311	AGAcAAAUAcuuccAuGcudTdT	155
	AS	391	AGCAUGGAAGUAUUUGUCU	312	AGcAUGGAAGuAUUUGUCUdT	156

Se incluyen ARNbc alternativos en la presente divulgación, por ejemplo, que comprenden al menos 15 nucleótidos de las siguientes hebras codificantes o no codificantes:

Hebra	Secuencia (5'-3')	SEQ ID NO:
S	AGACAAAUACUCCAUGCUNN	313
AS	AGCAUGGAAGUAUUUGUCUNN	314
S	AGAcAAAUAcuuccAuGcu	315
AS	AGcAUGGAAGuAUUUGUCU	316
S	AGAcAAAUAcuuccAuGcudTsdT	317
AS	AGcAUGGAAGuAUUUGUCUdTsdT	318

5 **Ejemplo 5. Modelos animales para probar ARNip de SAA**

Los modelos endógenos de ratón no son adecuados para probar el silenciamiento de SAA humano. Por tanto, se puede probar ARNip de SAA en ratones que expresan SAA1 o SAA2 humano de un plásmido y/o de adenovirus.

Se manipuló un adenovirus que expresa SAA1h con un promotor y potenciador temprano inmediato del CMV para conducir la expresión de SAA1h (Hosai et al., JLR 1999). Se tomaron previamente muestras de sangre de los ratones y luego se administraron con $4-12 \times 10^9$ ufp/ratón. Entonces se tomaron muestras de los ratones en los días 4, 8, 11, 15 y 22 tras la administración de virus en el día 0. La Figura 7 muestra que la expresión de SAA1h puede durar durante aproximadamente 2 semanas después de una única inyección de virus.

También se usó inyección hidrodinámica para expresar los genes de SAA humano en ratones (Nguyen et al., J. Surg. Res., 148:1, julio de 2008, p. 60-66; y Herweijer et al., J. Gene Med., 3:3, 2001, p. 280-291). Se diseñó una construcción para la expresión de SAA1h específica de hepatocitos en ratones (Figura 8). Los ratones (n=3) se inyectaron mediante la vena de la cola con 50 ug del plásmido de construcción en aproximadamente 2 mL de solución salina en aproximadamente 10 segundos. Se muestra en la Figura 9 la expresión de SAA1h en ratones tras la inyección hidrodinámica.

También se pueden probar ARNip en ratones que expresan SAA1 o SAA2 humano de un transgén. Los ratones transgénicos pueden expresar el gen de SAA humano constitutivamente y durante un periodo de tiempo más largo. Se muestra en la Figura 10 una construcción que se diseñó para la expresión transgénica de SAA1h (Postic y Magnuson, Genesis, 2000 Feb.; 26(2):149-150).

Se pueden probar ARNip en modelos de primate no humano (NHP) usando expresión endógena de SAA. Se validan reactivos para detectar niveles de ARNm y proteína de SAA de NHP, y luego se determinan niveles de SAA circulante en estado de reposo y de enfermedad antes de administrar el ARNip candidato.

Ejemplo 6. Inhibición de la expresión de SAA en seres humanos

Se trata un sujeto humano con un ARNbc dirigido a un gen de SAA para inhibir la expresión del gen de SAA durante un periodo de tiempo prolongado siguiendo una dosis única para tratar una afección.

Se selecciona o identifica un sujeto en necesidad de tratamiento. El sujeto pueden tener amiloidosis AA, artritis reumatoide, una neoplasia, artritis psoriásica, artritis juvenil crónica, espondilitis anquilosante, síndrome de Behcet, síndrome de Reiter, enfermedad de Still del adulto, enfermedad inflamatoria del intestino, fiebres periódicas hereditarias, tuberculosis, osteomielitis, bronquiectasia, lepra, pielonefritis, úlceras de decúbito, enfermedad de Whipple, acné conglobata, hipo/agammaglobulinemia con inmunodeficiencia común variable, fibrosis quística, hepatoma, carcinoma renal, enfermedad de Castleman, enfermedad de Hodgkin, leucemia de células pilosas del adulto, enfermedad de Waldenström, una neoplasia, infecciones crónicas, una enfermedad inflamatoria crónica, artritis crónica, septicemia crónica, un síndrome de fiebre periódica, fiebre mediterránea familiar o enfermedad de Crohn.

La identificación del sujeto puede ocurrir en un ámbito clínico, o en cualquier parte, por ejemplo, en la casa del sujeto mediante el uso propio del sujeto de un kit de auto-comprobación.

A tiempo cero, se administra por vía subcutánea al sujeto una primera dosis adecuada de un ARNip anti-SAA. El ARNbc se formula como se describe en el presente documento. Después de un periodo de tiempo tras la primera

dosis, por ejemplo, 7 días, 14 días y 21 días, se evalúa la afección del sujeto, por ejemplo, midiendo la temperatura o uno o más biomarcadores de inflamación. Esta medición puede ir acompañada por una medición de la expresión de SAA en dicho sujeto, y/o los productos del satisfactorio direccionamiento de ARNip de ARNm de SAA. También se pueden medir otros criterios relevantes. Se ajustan el número y la concentración de dosis según las necesidades del sujeto.

Después del tratamiento, se reducen la temperatura y/o el (los) biomarcador(es) de inflamación del sujeto con respecto a los niveles que existen antes del tratamiento, o con respecto a los niveles medidos en un sujeto similarmente afectado, pero sin tratar.

En el presente documento también se describen los siguientes puntos:

- 10 1. Un ácido ribonucleico bicatenario (ARNbc), en donde dicho ARNbc comprende una hebra codificante y una hebra no codificante que comprende una región de complementariedad que es complementaria a al menos una parte de un ARNm que codifica suero amiloide A (SAA), y en donde dicha región de complementariedad es inferior a 30 nucleótidos de longitud.
- 15 2. El ARNbc del punto 1, en donde el ARNbc comprende una hebra codificante que comprende al menos 15 nucleótidos contiguos de una secuencia de hebra codificante seleccionada de la Tabla 2.
3. El ARNbc de los puntos 1-2, en donde el ARNbc comprende una hebra no codificante que comprende al menos 15 nucleótidos contiguos de una secuencia no codificante seleccionada de la Tabla 2.
- 20 4. El ARNbc de los puntos 1-3, en donde la hebra codificante comprende 15 o más nucleótidos contiguos de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 311, SEQ ID NO: 155, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 127, SEQ ID NO: 95, SEQ ID NO: 105, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 193, SEQ ID NO: 283, SEQ ID NO: 251, SEQ ID NO: 261, SEQ ID NO: 215 o SEQ ID NO: 179.
- 25 5. El ARNbc de los puntos 1-4, en donde la hebra no codificante comprende 15 o más nucleótidos contiguos de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 312, SEQ ID NO: 156, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 128, SEQ ID NO: 96, SEQ ID NO: 106, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 194, SEQ ID NO: 284, SEQ ID NO: 252, SEQ ID NO: 262, SEQ ID NO: 216 o SEQ ID NO: 180.
- 30 6. El ARNbc de los puntos 1-5, en donde la hebra codificante consiste en la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 311, SEQ ID NO: 155, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 127, SEQ ID NO: 95, SEQ ID NO: 105, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 193, SEQ ID NO: 283, SEQ ID NO: 251, SEQ ID NO: 261, SEQ ID NO: 215 o SEQ ID NO: 179 y la hebra no codificante consiste en SEQ ID NO: 312, SEQ ID NO: 156, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 128, SEQ ID NO: 96, SEQ ID NO: 106, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 194, SEQ ID NO: 284, SEQ ID NO: 252, SEQ ID NO: 262, SEQ ID NO: 216 o SEQ ID NO: 180.
- 35 7. El ARNbc de los puntos 1-6, en donde el ARNbc es 18445, 18397, 18379, 18420, 18415, 18431 o 18326.
8. El ARNbc de los puntos 1-7, en donde el ARNbc se dirige a SEQ ID NO: 311, SEQ ID NO: 193, SEQ ID NO: 283, SEQ ID NO: 251, SEQ ID NO: 261, SEQ ID NO: 215 o SEQ ID NO: 179.
9. El ARNbc de los puntos 1-8, en donde el ARNbc consiste en 18445.
10. El ARNbc de los puntos 1-9, donde el ARNm codifica SAA1.
11. El ARNbc de los puntos 1-10, en donde el ARNm codifica SAA2.
- 40 12. El ARNbc de los puntos 1-11, en donde la región de complementariedad de la segunda secuencia también es complementaria a al menos una parte de un ARNm que codifica SAA2.
13. El ARNbc de los puntos 1-12, en donde la región de complementariedad de la segunda secuencia también es complementaria a al menos una parte de un ARNm que codifica SAA1.
14. El ARNbc de los puntos 1-13, en donde dicho ARNbc comprende al menos un nucleótido modificado.
- 45 15. El ARNbc de los puntos 1-14, en donde al menos uno de dichos nucleótidos modificados se elige del grupo de: un nucleótido modificado con 2'-O-metilo, un nucleótido que comprende un grupo 5'-fosforotioato y un nucleótido terminal unido a un derivado de colesterilo o grupo bisdecilamida de ácido dodecanoico.
- 50 16. El ARNbc de los puntos 1-15, en donde dicho nucleótido modificado se elige del grupo de: un nucleótido modificado con 2'-desoxi-2'-flúor, un nucleótido modificado con 2'-desoxi, un nucleótido bloqueado, un nucleótido abásico, nucleótido modificado con 2'-amino, nucleótido modificado con 2'-alquilo, nucleótido de morfolino, un fosforamidato y un nucleótido que comprende una base no natural.

17. El ARNbc de los puntos 1-16, en donde la región de complementariedad tiene al menos 15 nucleótidos de longitud.
18. El ARNbc de los puntos 1-17, en donde la región de complementariedad tiene entre 19 y 21 nucleótidos de longitud.
- 5 19. El ARNbc de los puntos 1-18, en donde el ARNbc comprende una hebra codificante que consiste en una secuencia de hebra codificante seleccionada de la Tabla 2 y una hebra no codificante que consiste en una secuencia no codificante seleccionada de la Tabla 2.
20. El ARNbc de los puntos 1-19, en donde el ARNbc está conjugado con un ligando.
21. El ARNbc de los puntos 1-20, en donde el ARNbc se formula en una formulación de lípidos.
- 10 22. El ARNbc de los puntos 1-21, en donde el ARNbc se formula en una formulación de LNP, una formulación de LNP01, un formulación de LÍPIDO A-SNALP o una formulación de SNALP.
23. El ARNbc de los puntos 1-22, en donde la administración del ARNbc a una célula da como resultado aproximadamente 97 %, 95 %, 92 %, 89 % o 74 % de inhibición de la expresión de ARNm de SAA como se mide por un ensayo de PCR en tiempo real.
- 15 24. El ARNbc de los puntos 1-23, en donde la administración del ARNbc a una célula da como resultado aproximadamente 89 %, 87 %, 83 %, 68 % o 54 % de inhibición de la expresión de ARNm de SAA como se mide por un ensayo de ADN ramificado.
25. El ARNbc de los puntos 1-24, en donde la administración del ARNbc a una célula da como resultado aproximadamente 100 %, 99 % o 93 % de inhibición de la expresión de proteínas de SAA como se mide por un ensayo de ELISA.
- 20 26. El ARNbc de los puntos 1-25, en donde el ARNbc tiene una CI50 inferior a 10 pM.
27. El ARNbc de los puntos 1-26, en donde la administración del ARNbc reduce la expresión de proteínas de SAA aproximadamente 80 % en ratones en comparación con un control de ARNip.
28. El ARNbc de los puntos 1-27, en donde el ARNbc comprende un nucleótido protuberante.
- 25 29. El ARNbc de los puntos 1-28, en donde el ARNbc comprende un nucleótido protuberante dTdT.
30. El ARNbc de los puntos 1-29, en donde el ARNbc comprende dos nucleótidos protuberantes dTdT en el extremo 3' de la hebra codificante y la hebra no codificante.
31. El ARNbc de los puntos 1-30, en donde la hebra codificante tiene 21 nucleótidos de longitud.
32. El ARNbc de los puntos 1-31, en donde la hebra no codificante tiene 21 nucleótidos de longitud.
- 30 33. El ARNbc de los puntos 1-32, en donde el ARNbc comprende uno o más 2'-O-metilcitidina-5'-fosfatos y/o uno o más 2'-O-metiluridina-5'-fosfatos.
34. Una célula que contiene el ARNbc de los puntos 1-33.
35. Una composición farmacéutica para inhibir la expresión de un gen de SAA que comprende el ARNbc de los puntos 1-33.
- 35 36. Un método de inhibición de la expresión de SAA en una célula, comprendiendo el método:
- (a) introducir en la célula el ARNbc de los puntos 1-33; y
- (b) mantener la célula producida en la etapa (a) durante un tiempo suficiente para obtener la degradación del transcrito de ARNm de un gen de SAA, inhibiendo así la expresión del gen de SAA en la célula.
- 40 37. Un método de tratamiento de un trastorno asociado a la expresión de SAA que comprende administrar a un ser humano en necesidad de tal tratamiento una cantidad terapéuticamente eficaz del ARNbc de los puntos 1-33.
38. El método del punto 37, en donde el ser humano tiene amiloidosis AA.
39. El método de los puntos 37-38, en donde el ser humano tiene artritis reumatoide.
- 45 40. El método de los puntos 37-39, en donde el ser humano tiene una neoplasia.

- 5 41. El método del punto 37-40, en donde el ser humano tiene artritis psoriásica, artritis juvenil crónica, espondilitis anquilosante, síndrome de Behcet, síndrome de Reiter, enfermedad de Still del adulto, enfermedad inflamatoria del intestino, fiebres periódicas hereditarias, tuberculosis, osteomielitis, bronquiectasia, lepra, pielonefritis, úlceras de decúbito, enfermedad de Whipple, acné conglobata, hipo/agammaglobulinemia con inmunodeficiencia común variable, fibrosis quística, hepatoma, carcinoma renal, enfermedad de Castleman, enfermedad de Hodgkin, leucemia de células pilosas del adulto, enfermedad de Waldenström, una neoplasia, infecciones crónicas, una enfermedad inflamatoria crónica, artritis crónica, septicemia crónica, un síndrome de fiebre periódica, fiebre mediterránea familiar o enfermedad de Crohn.
- 10 42. Un vector que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica al menos una hebra de un ARNbc, en donde una de las hebras de dicho ARNbc es complementaria a al menos una parte de un ARNm que codifica SAA y en donde dicho ARNbc tiene menos de 30 pares de bases de longitud.
43. El vector del punto 42, en donde la región de complementariedad tiene al menos 15 nucleótidos de longitud.
- 15 44. El vector de los puntos 42-43, en donde la región de complementariedad tiene 19 a 21 nucleótidos de longitud.
45. Una célula que comprende los vectores del punto 42-44.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 20 <110> Alnylam Pharmaceuticals, Inc. DE FOUGEROLLES, ANTONIN NOVOBRANTSEVA, TATIANA HINKLE, GREGORY
- <120> COMPOSICIONES FORMULADAS EN LÍPIDOS Y MÉTODOS DE INHIBICIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL GEN DE SUERO AMILOIDE A
- 25 <130> T1536 EP/1
- <150>US 61/100.195
- <151> 25-09-2008
- 30 <160> 318
- <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
- 35 <211> 21
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 40 <223> Descripción de molécula combinada de ADN/ARN: Oligonucleótido sintético
- <220>
- <223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

ES 2 740 129 T3

<400> 1
ccaugcucgg ggaacuaut t 21

<210> 2
5 <211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
10 <223> Descripción de molécula combinada de ADN/ARN: Oligonucleótido sintético

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

15 <400> 2
auaguucccc cgagcaugt t 21

<210> 3
<211> 21
20 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de molécula combinada de ADN/ARN: Oligonucleótido sintético

25 <220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 3
30 ggcuuuugau ggggcucggt t 21

<210> 4
<211> 21
<212> ADN
35 <213> Secuencia artificial

<220>

ES 2 740 129 T3

<223> Descripción de molécula combinada de ADN/ARN: Oligonucleótido sintético

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

5

<400> 4

ccgagcccca ucaaaagcct t 21

<210> 5

10

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

15

<223> Descripción de molécula combinada de ADN/ARN: Oligonucleótido sintético

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

20

<400> 5

ucuuuucguu ccuuggcgat t 21

<210> 6

<211> 21

25

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de molécula combinada de ADN/ARN: Oligonucleótido sintético

30

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 6

35

ucgccaagga acgaaaagat t 21

<210> 7

ES 2 740 129 T3

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

5 <220>

<223> Descripción de molécula combinada de ADN/ARN: Oligonucleótido sintético

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

10

<400> 7

agaagccaau uacaucggct t 21

<210> 8

15 <211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> Descripción de molécula combinada de ADN/ARN: Oligonucleótido sintético

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

25 <400> 8

gccgauguaa uuggcuucut t 21

<210> 9

<211> 21

30 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de molécula combinada de ADN/ARN: Oligonucleótido sintético

35

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

ES 2 740 129 T3

<400> 9
ucggcucaga caaaacuut t 21

<210> 10
5 <211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
10 <223> Descripción de molécula combinada de ADN/ARN: Oligonucleótido sintético

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

15 <400> 10
aaguauuugu cugagccgat t 21

<210> 11
<211> 21
20 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de molécula combinada de ADN/ARN: Oligonucleótido sintético

25 <220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 11
30 aauacuucca ugcucgggt t 21

<210> 12
<211> 21
<212> ADN
35 <213> Secuencia artificial

<220>

ES 2 740 129 T3

<223> Descripción de molécula combinada de ADN/ARN: Oligonucleótido sintético

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

5

<400> 12

ccccgagcau ggaaguauut t 21

<210> 13

10

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

15

<223> Descripción de molécula combinada de ADN/ARN: Oligonucleótido sintético

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

20

<400> 13

cccaaucacu uccgaccugt t 21

<210> 14

<211> 21

25

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de molécula combinada de ADN/ARN: Oligonucleótido sintético

30

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 14

35

caggucggaa gugauuggt t 21

<210> 15

ES 2 740 129 T3

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

5

<220>

<223> Descripción de molécula combinada de ADN/ARN: Oligonucleótido sintético

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

10

<400> 15

ccgaagcuuc uuuucguuct t 21

<210> 16

15

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

20

<223> Descripción de molécula combinada de ADN/ARN: Oligonucleótido sintético

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

25

<400> 16

gaacgaaaag aagcuucggt t 21

<210> 17

<211> 21

30

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de molécula combinada de ADN/ARN: Oligonucleótido sintético

35

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

ES 2 740 129 T3

<400> 17
aauuacaucg gcucagacat t 21

<210> 18
5 <211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
10 <223> Descripción de molécula combinada de ADN/ARN: Oligonucleótido sintético

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

15 <400> 18
ugucugagcc gauguaauut t 21

<210> 19
<211> 21
20 <212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Descripción de molécula combinada de ADN/ARN: Oligonucleótido sintético

25 <220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 19
30 uuacaucggc ucagacaaat t 21

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

35 <220>
<223> Descripción de molécula combinada de ADN/ARN: Oligonucleótido sintético

ES 2 740 129 T3

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 20

5 uuugucugag ccgaugaat t 21

<210> 21

<211> 21

<212> ADN

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de molécula combinada de ADN/ARN: Oligonucleótido sintético

15 <220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 21

20 uucaugcuc ggggaacut t 21

<210> 22

<211> 21

<212> ADN

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de molécula combinada de ADN/ARN: Oligonucleótido sintético

<220>

30 <223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 22

aguucccccg agcaugaat t 21

35 <210> 23

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de molécula combinada de ADN/ARN: Oligonucleótido sintético

5

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 23

10 caugcucggg ggaacuaugt t 21

<210> 24

<211> 21

<212> ADN

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de molécula combinada de ADN/ARN: Oligonucleótido sintético

20

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 24

25 cauaguuccc ccgagcaugt t 21

<210> 25

<211> 21

<212> ADN

30 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de molécula combinada de ADN/ARN: Oligonucleótido sintético

<220>

35 <223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 25

ES 2 740 129 T3

gcuuuugaug gggcucgggt t 21

<210> 26

<211> 21

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Descripción de molécula combinada de ADN/ARN: Oligonucleótido sintético

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 26

15 cccgagcccc aucaaaagct t 21

<210> 27

<211> 21

<212> ADN

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de molécula combinada de ADN/ARN: Oligonucleótido sintético

25 <220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 27

30 agccuacucu gacaugagat t 21

<210> 28

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

35

<220>

<223> Descripción de molécula combinada de ADN/ARN: Oligonucleótido sintético

ES 2 740 129 T3

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 28

5 ucucauguca gaguagggcut t 21

<210> 29

<211> 21

<212> ADN

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de molécula combinada de ADN/ARN: Oligonucleótido sintético

15 <220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 29

20 caucggcuca gacaaauact t 21

<210> 30

<211> 21

<212> ADN

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de molécula combinada de ADN/ARN: Oligonucleótido sintético

<220>

30 <223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 30

guauuugucu gagccgaugt t 21

35 <210> 31

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de molécula combinada de ADN/ARN: Oligonucleótido sintético

5

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 31

10 agacccaau cacuuccgat t 21

<210> 32

<211> 21

<212> ADN

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de molécula combinada de ADN/ARN: Oligonucleótido sintético

20

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 32

25 ucggaaguga uugggucut t 21

<210> 33

<211> 21

<212> ADN

30 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de molécula combinada de ADN/ARN: Oligonucleótido sintético

<220>

35 <223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 33

ES 2 740 129 T3

cugagaaaua cugagcuuct t 21

<210> 34

<211> 21

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Descripción de molécula combinada de ADN/ARN: Oligonucleótido sintético

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 34

15 gaagcucagu auuucucagt t 21

<210> 35

<211> 21

<212> ADN

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de molécula combinada de ADN/ARN: Oligonucleótido sintético

<220>

25 <223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 35

30 agccgaagcu uuuuucgut t 21

<210> 36

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

35

<220>

<223> Descripción de molécula combinada de ADN/ARN: Oligonucleótido sintético

ES 2 740 129 T3

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 36

5 acgaaaagaa gcuucggcut t 21

<210> 37

<211> 21

<212> ADN

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de molécula combinada de ADN/ARN: Oligonucleótido sintético

15 <220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 37

20 cuuuucguuc cuuggcgagt t 21

<210> 38

<211> 21

<212> ADN

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de molécula combinada de ADN/ARN: Oligonucleótido sintético

<220>

30 <223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 38

cucgccaagg aacgaaaagt t 21

35 <210> 39

<211> 21

<212> ADN

ES 2 740 129 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de molécula combinada de ADN/ARN: Oligonucleótido sintético

5

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 39

10 uuuucguucc uggcgaggt t 21

<210> 40

<211> 21

<212> ADN

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de molécula combinada de ADN/ARN: Oligonucleótido sintético

20

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 40

25 ccucgccaag gaacgaaaat t 21

<210> 41

<211> 21

<212> ADN

30 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de molécula combinada de ADN/ARN: Oligonucleótido sintético

<220>

35 <223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 41

ES 2 740 129 T3

ccaauuacau cggcucagat t 21

<210> 42

<211> 21

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Descripción de molécula combinada de ADN/ARN: Oligonucleótido sintético

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 42

15 ucugagccga uguaaauuggt t 21

<210> 43

<211> 21

<212> ADN

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de molécula combinada de ADN/ARN: Oligonucleótido sintético

25 <220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 43

30 caauuacauc ggcucagact t 21

<210> 44

<211> 21

<212> ADN

35 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de molécula combinada de ADN/ARN: Oligonucleótido sintético

ES 2 740 129 T3

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 44

5 gucugagccg auguaauugt t 21

<210> 45

<211> 21

<212> ADN

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de molécula combinada de ADN/ARN: Oligonucleótido sintético

15 <220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 45

20 ggcgaggcuu uugaugggt t 21

<210> 46

<211> 21

<212> ADN

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de molécula combinada de ADN/ARN: Oligonucleótido sintético

<220>

30 <223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 46

ccccaucaaa agccucgcct t 21

35 <210> 47

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de molécula combinada de ADN/ARN: Oligonucleótido sintético

5

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 47

10 ggcucgggac auguggagat t 21

<210> 48

<211> 21

<212> ADN

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de molécula combinada de ADN/ARN: Oligonucleótido sintético

20

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 48

25 ucuccacaug ucccgagcct t 21

<210> 49

<211> 21

<212> ADN

30 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de molécula combinada de ADN/ARN: Oligonucleótido sintético

<220>

35 <223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 49

ES 2 740 129 T3

acaugagaga agccaauuat t 21

<210> 50
<211> 21
5 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de molécula combinada de ADN/ARN: Oligonucleótido sintético

10 <220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 50
15 uaaugggcuu cucucaugut t 21

<210> 51
<211> 21
<212> ADN
20 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de molécula combinada de ADN/ARN: Oligonucleótido sintético

25 <220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 51
30 caugagagaa gcccauuact t 21

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

35 <220>
<223> Descripción de molécula combinada de ADN/ARN: Oligonucleótido sintético

ES 2 740 129 T3

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 52

5 guaaauuggcu ucucucaugt t 21

<210> 53

<211> 21

<212> ADN

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de molécula combinada de ADN/ARN: Oligonucleótido sintético

15 <220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 53

20 agccaauuac aucggcucat t 21

<210> 54

<211> 21

<212> ADN

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de molécula combinada de ADN/ARN: Oligonucleótido sintético

<220>

30 <223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 54

ugagccgaug uaauuggcut t 21

35 <210> 55

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de molécula combinada de ADN/ARN: Oligonucleótido sintético

5

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 55

10 gccaauuaca ucggcucagt t 21

<210> 56

<211> 21

<212> ADN

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de molécula combinada de ADN/ARN: Oligonucleótido sintético

20

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 56

25 cugagccgau guaauggct t 21

<210> 57

<211> 21

<212> ADN

30 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de molécula combinada de ADN/ARN: Oligonucleótido sintético

<220>

35 <223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 57

ES 2 740 129 T3

cggcucagac aaauacuuct t 21

<210> 58

<211> 21

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Descripción de molécula combinada de ADN/ARN: Oligonucleótido sintético

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 58

15 gaaguauuug ucugagccgt t 21

<210> 59

<211> 21

<212> ADN

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de molécula combinada de ADN/ARN: Oligonucleótido sintético

<220>

25 <223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 59

30 caugaagcuu cucacgggct t 21

<210> 60

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

35

<220>

<223> Descripción de molécula combinada de ADN/ARN: Oligonucleótido sintético

ES 2 740 129 T3

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 60

5 gcccgugaga agcuucaugt t 21

<210> 61

<211> 21

<212> ADN

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de molécula combinada de ADN/ARN: Oligonucleótido sintético

15 <220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 61

20 ggccauggug cggaggacut t 21

<210> 62

<211> 21

<212> ADN

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de molécula combinada de ADN/ARN: Oligonucleótido sintético

<220>

30 <223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 62

aguccuccgc accauggcct t 21

35 <210> 63

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de molécula combinada de ADN/ARN: Oligonucleótido sintético

5

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 63

10 gaccccaauc acuuccgact t 21

<210> 64

<211> 21

<212> ADN

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de molécula combinada de ADN/ARN: Oligonucleótido sintético

20

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 64

25 gucggaagug auugggguct t 21

<210> 65

<211> 21

<212> ADN

30 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de molécula combinada de ADN/ARN: Oligonucleótido sintético

<220>

35 <223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 65

ES 2 740 129 T3

ccccaaucac uuccgacut t 21

<210> 66

<211> 21

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Descripción de molécula combinada de ADN/ARN: Oligonucleótido sintético

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 66

15 aggucggaag ugauugggt t 21

<210> 67

<211> 21

<212> ADN

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de molécula combinada de ADN/ARN: Oligonucleótido sintético

25 <220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 67

30 gccugccuga gaaauacugt t 21

<210> 68

<211> 21

<212> ADN

35 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de molécula combinada de ADN/ARN: Oligonucleótido sintético

ES 2 740 129 T3

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 68

5 caguauuuucu caggcaggct t 21

<210> 69

<211> 21

<212> ADN

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de molécula combinada de ADN/ARN: Oligonucleótido sintético

15 <220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 69

20 gccgaagcuu cuuuucguut t 21

<210> 70

<211> 21

<212> ADN

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de molécula combinada de ADN/ARN: Oligonucleótido sintético

<220>

30 <223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 70

aacgaaaaga agcuucggct t 21

35 <210> 71

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de molécula combinada de ADN/ARN: Oligonucleótido sintético

5

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 71

10 gaagcuucuu uucguuccut t 21

<210> 72

<211> 21

<212> ADN

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de molécula combinada de ADN/ARN: Oligonucleótido sintético

20

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 72

25 aggaacgaaa agaagcuuct t 21

<210> 73

<211> 21

<212> ADN

30 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de molécula combinada de ADN/ARN: Oligonucleótido sintético

<220>

35 <223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 73

ES 2 740 129 T3

aagcuucuuu ucguuccuut t 21

<210> 74

<211> 21

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Descripción de molécula combinada de ADN/ARN: Oligonucleótido sintético

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 74

15 aaggaacgaa aagaagcuut t 21

<210> 75

<211> 21

<212> ADN

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de molécula combinada de ADN/ARN: Oligonucleótido sintético

25 <220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 75

30 cguuccuugg cgaggcuut t 21

<210> 76

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

35

<220>

<223> Descripción de molécula combinada de ADN/ARN: Oligonucleótido sintético

ES 2 740 129 T3

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 76

5 aaagccucgc caaggaacgt t 21

<210> 77

<211> 21

<212> ADN

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de molécula combinada de ADN/ARN: Oligonucleótido sintético

15 <220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 77

20 guuccuuggc gaggcuuuut t 21

<210> 78

<211> 21

<212> ADN

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de molécula combinada de ADN/ARN: Oligonucleótido sintético

<220>

30 <223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 78

aaaagccucg ccaaggaact t 21

35 <210> 79

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de molécula combinada de ADN/ARN: Oligonucleótido sintético

5

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 79

10 cuuggcgagg cuuuugaug t 21

<210> 80

<211> 21

<212> ADN

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de molécula combinada de ADN/ARN: Oligonucleótido sintético

20

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 80

25 caucaaaaagc cugccaagt t 21

<210> 81

<211> 21

<212> ADN

30 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de molécula combinada de ADN/ARN: Oligonucleótido sintético

<220>

35 <223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 81

ES 2 740 129 T3

uggcgaggcu uuugauggt t 21

<210> 82
<211> 21
5 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
10 <223> Descripción de molécula combinada de ADN/ARN: Oligonucleótido sintético

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 82
15 cccaucaaaa gccucgcat t 21

<210> 83
<211> 21
<212> ADN
20 <213> Secuencia artificial
<220>
<223> Descripción de molécula combinada de ADN/ARN: Oligonucleótido sintético

<220>
25 <223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 83
cucugacaug agagaagcct t 21

30 <210> 84
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> Descripción de molécula combinada de ADN/ARN: Oligonucleótido sintético

ES 2 740 129 T3

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 84

5 ggcuucucuc augucagagt t 21

<210> 85

<211> 21

<212> ADN

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de molécula combinada de ADN/ARN: Oligonucleótido sintético

15 <220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 85

20 cacgggccug guuuucugct t 21

<210> 86

<211> 21

<212> ADN

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de molécula combinada de ADN/ARN: Oligonucleótido sintético

<220>

30 <223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 86

gcagaaaacc aggcccugt t 21

35 <210> 87

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de molécula combinada de ADN/ARN: Oligonucleótido sintético

5

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 87

10 cuuuugaugg ggcucgggat t 21

<210> 88

<211> 21

<212> ADN

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de molécula combinada de ADN/ARN: Oligonucleótido sintético

20

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 88

25 ucccgagccc caucaaaagt t 21

<210> 89

<211> 21

<212> ADN

30 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de molécula combinada de ADN/ARN: Oligonucleótido sintético

<220>

35 <223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 89

ES 2 740 129 T3

uuggcgaggc uuuugauggt t 21

<210> 90

<211> 21

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Descripción de molécula combinada de ADN/ARN: Oligonucleótido sintético

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 90

15 ccaucaaaaag ccucgccaat t 21

<210> 91

<211> 21

<212> ADN

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de molécula combinada de ADN/ARN: Oligonucleótido sintético

25 <220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 91

30 acuuccaugc ucgggggaat t 21

<210> 92

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

35

<220>

<223> Descripción de molécula combinada de ADN/ARN: Oligonucleótido sintético

ES 2 740 129 T3

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 92

5 ucccccgag cauggaagut t 21

<210> 93

<211> 21

<212> ADN

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de molécula combinada de ADN/ARN: Oligonucleótido sintético

15 <220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 93

20 uuuucugcuc cuuggucut t 21

<210> 94

<211> 21

<212> ADN

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de molécula combinada de ADN/ARN: Oligonucleótido sintético

<220>

30 <223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 94

aggaccaagg agcagaaaat t 21

35 <210> 95

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de molécula combinada de ADN/ARN: Oligonucleótido sintético

5

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 95

10 cuucucacgg gccugguuut t 21

<210> 96

<211> 21

<212> ADN

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de molécula combinada de ADN/ARN: Oligonucleótido sintético

20

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 96

25 aaaccaggcc cgugagaagt t 21

<210> 97

<211> 21

<212> ADN

30 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de molécula combinada de ADN/ARN: Oligonucleótido sintético

<220>

35 <223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 97

ES 2 740 129 T3

auuacaucgg cucagacaat t 21

<210> 98

<211> 21

5

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de molécula combinada de ADN/ARN: Oligonucleótido sintético

10

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 98

15

uugucugagc cgaugaaat t 21

<210> 99

<211> 21

<212> ADN

20

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de molécula combinada de ADN/ARN: Oligonucleótido sintético

25

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 99

30

auacuuccau gcucgggggt t 21

<210> 100

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

35

<220>

<223> Descripción de molécula combinada de ADN/ARN: Oligonucleótido sintético

ES 2 740 129 T3

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 100

5 cccccgagca uggaaguaut t 21

<210> 101

<211> 21

<212> ADN

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de molécula combinada de ADN/ARN: Oligonucleótido sintético

15 <220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 101

20 gcgaggcuuu ugaugggct t 21

<210> 102

<211> 21

<212> ADN

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de molécula combinada de ADN/ARN: Oligonucleótido sintético

<220>

30 <223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 102

gccccauca aagccucgct t 21

35 <210> 103

<211> 21

<212> ADN

ES 2 740 129 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de molécula combinada de ADN/ARN: Oligonucleótido sintético

5

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 103

10 gcucgggaca uguggagagt t 21

<210> 104

<211> 21

<212> ADN

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de molécula combinada de ADN/ARN: Oligonucleótido sintético

20

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 104

25 cucuccacau gucccgagct t 21

<210> 105

<211> 21

<212> ADN

30 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de molécula combinada de ADN/ARN: Oligonucleótido sintético

<220>

35 <223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 105

ES 2 740 129 T3

acauguggag agccuacuct t 21

<210> 106

<211> 21

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Descripción de molécula combinada de ADN/ARN: Oligonucleótido sintético

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 106

15 gaguaggcuc uccacaugut t 21

<210> 107

<211> 21

<212> ADN

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de molécula combinada de ADN/ARN: Oligonucleótido sintético

25 <220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 107

30 uccaugcucg gggaacuat t 21

<210> 108

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

35

<220>

<223> Descripción de molécula combinada de ADN/ARN: Oligonucleótido sintético

ES 2 740 129 T3

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 108

5 uaguuccccc gagcauggat t 21

<210> 109

<211> 21

<212> ADN

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de molécula combinada de ADN/ARN: Oligonucleótido sintético

15 <220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 109

20 aucacuuccg accugcuggt t 21

<210> 110

<211> 21

<212> ADN

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de molécula combinada de ADN/ARN: Oligonucleótido sintético

<220>

30 <223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 110

ccagcagguc ggaagugaut t 21

35 <210> 111

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de molécula combinada de ADN/ARN: Oligonucleótido sintético

5

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 111

10 ggacaugugg agagccuact t 21

<210> 112

<211> 21

<212> ADN

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de molécula combinada de ADN/ARN: Oligonucleótido sintético

20

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 112

25 guaggcucuc cacaugucct t 21

<210> 113

<211> 21

<212> ADN

30 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de molécula combinada de ADN/ARN: Oligonucleótido sintético

35

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 113

ES 2 740 129 T3

caugggaga gccuacucut t 21

<210> 114

<211> 21

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Descripción de molécula combinada de ADN/ARN: Oligonucleótido sintético

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 114

15 agaguaggcu cuccacaugt t 21

<210> 115

<211> 21

<212> ADN

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de molécula combinada de ADN/ARN: Oligonucleótido sintético

25 <220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 115

30 ggagagccua cucugacaut t 21

<210> 116

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

35

<220>

<223> Descripción de molécula combinada de ADN/ARN: Oligonucleótido sintético

ES 2 740 129 T3

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 116

5 augucagagu aggcucucct t 21

<210> 117

<211> 21

<212> ADN

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de molécula combinada de ADN/ARN: Oligonucleótido sintético

15 <220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 117

20 gagagccuac ucugacaugt t 21

<210> 118

<211> 21

<212> ADN

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de molécula combinada de ADN/ARN: Oligonucleótido sintético

<220>

30 <223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 118

caugucagag uaggcucuct t 21

35 <210> 119

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de molécula combinada de ADN/ARN: Oligonucleótido sintético

5

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 119

10 uacucugaca ugagagaagt t 21

<210> 120

<211> 21

<212> ADN

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de molécula combinada de ADN/ARN: Oligonucleótido sintético

20

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 120

25 cuucucucau gucagaguat t 21

<210> 121

<211> 21

<212> ADN

30 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de molécula combinada de ADN/ARN: Oligonucleótido sintético

<220>

35 <223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 121

ES 2 740 129 T3

gaagccaauu acaucggcut t 21

<210> 122

<211> 21

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Descripción de molécula combinada de ADN/ARN: Oligonucleótido sintético

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 122

15 agccgaugua auuggcuuct t 21

<210> 123

<211> 21

<212> ADN

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de molécula combinada de ADN/ARN: Oligonucleótido sintético

25 <220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 123

30 gcucagacaa auacuucatt t 21

<210> 124

<211> 21

<212> ADN

35 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de molécula combinada de ADN/ARN: Oligonucleótido sintético

ES 2 740 129 T3

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 124

5 uggaaguauu ugucugagct t 21

<210> 125

<211> 21

<212> ADN

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de molécula combinada de ADN/ARN: Oligonucleótido sintético

15 <220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 125

20 uacuuccaug cucgggggat t 21

<210> 126

<211> 21

<212> ADN

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de molécula combinada de ADN/ARN: Oligonucleótido sintético

<220>

30 <223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 126

uccccgagc auggaaguat t 21

35 <210> 127

<211> 21

<212> ADN

ES 2 740 129 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de molécula combinada de ADN/ARN: Oligonucleótido sintético

5

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 127

10 caccaugaag cuucucacgt t 21

<210> 128

<211> 21

<212> ADN

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de molécula combinada de ADN/ARN: Oligonucleótido sintético

20 <220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 128

25 cgugagaagc uucauggugt t 21

<210> 129

<211> 21

<212> ADN

30 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de molécula combinada de ADN/ARN: Oligonucleótido sintético

<220>

35 <223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 129

ES 2 740 129 T3

gccaaaaggg gaccugggt t 21

<210> 130

<211> 21

5

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de molécula combinada de ADN/ARN: Oligonucleótido sintético

10

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 130

15

cccaggucc ccuuuggct t 21

<210> 131

<211> 21

<212> ADN

20

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de molécula combinada de ADN/ARN: Oligonucleótido sintético

25

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 131

30

augaagcuuc ucacggcct t 21

<210> 132

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

35

<220>

<223> Descripción de molécula combinada de ADN/ARN: Oligonucleótido sintético

ES 2 740 129 T3

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 132

5 ggcccgugag aagcucaut t 21

<210> 133

<211> 21

<212> ADN

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de molécula combinada de ADN/ARN: Oligonucleótido sintético

15 <220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 133

20 gccauggugc ggaggacuct t 21

<210> 134

<211> 21

<212> ADN

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de molécula combinada de ADN/ARN: Oligonucleótido sintético

<220>

30 <223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 134

gaguccuccg caccauggct t 21

35 <210> 135

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de molécula combinada de ADN/ARN: Oligonucleótido sintético

5

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 135

10 ccauggugcg gaggacucgt t 21

<210> 136

<211> 21

<212> ADN

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de molécula combinada de ADN/ARN: Oligonucleótido sintético

20 <220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 136

25 cgaguccucc gcaccaugt t 21

<210> 137

<211> 21

<212> ADN

30 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de molécula combinada de ADN/ARN: Oligonucleótido sintético

<220>

35 <223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 137

ES 2 740 129 T3

cgggccuggu uuucugcuct t 21

<210> 138
<211> 21
5 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de molécula combinada de ADN/ARN: Oligonucleótido sintético

10 <220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 138
15 gagcagaaaa ccaggcccg t 21

<210> 139
<211> 21
<212> ADN
20 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de molécula combinada de ADN/ARN: Oligonucleótido sintético

25 <220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 139
30 ugucagcagc cgaagcuuct t 21

<210> 140
<211> 21
<212> ADN
35 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de molécula combinada de ADN/ARN: Oligonucleótido sintético

ES 2 740 129 T3

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 140

5 gaagcuucgg cugcugacat t 21

<210> 141

<211> 21

<212> ADN

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de molécula combinada de ADN/ARN: Oligonucleótido sintético

15 <220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 141

20 gcagccgaag cuucuuuuct t 21

<210> 142

<211> 21

<212> ADN

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de molécula combinada de ADN/ARN: Oligonucleótido sintético

<220>

30 <223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 142

gaaaagaagc uucggcugct t 21

35 <210> 143

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de molécula combinada de ADN/ARN: Oligonucleótido sintético

5

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 143

10 gcuucuuuuc guuccuuggt t 21

<210> 144

<211> 21

<212> ADN

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de molécula combinada de ADN/ARN: Oligonucleótido sintético

20

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 144

25 ccaaggaacg aaaagaagct t 21

<210> 145

<211> 21

<212> ADN

30 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de molécula combinada de ADN/ARN: Oligonucleótido sintético

<220>

35 <223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 145

ES 2 740 129 T3

uuccuuggcg aggcuuuugt t 21

<210> 146

<211> 21

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Descripción de molécula combinada de ADN/ARN: Oligonucleótido sintético

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 146

15 caaaagccuc gccaaaggaat t 21

<210> 147

<211> 21

<212> ADN

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de molécula combinada de ADN/ARN: Oligonucleótido sintético

<220>

25 <223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 147

30 uccuuggcga ggcuuuugat t 21

<210> 148

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

35

<220>

<223> Descripción de molécula combinada de ADN/ARN: Oligonucleótido sintético

ES 2 740 129 T3

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 148

5 ucaaaagccu cgccaaggat t 21

<210> 149

<211> 21

<212> ADN

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de molécula combinada de ADN/ARN: Oligonucleótido sintético

15 <220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 149

20 gaaauacuga gcuuccucut t 21

<210> 150

<211> 21

<212> ADN

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de molécula combinada de ADN/ARN: Oligonucleótido sintético

<220>

30 <223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 150

agaggaagcu caguauuuct t 21

35 <210> 151

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de molécula combinada de ADN/ARN: Oligonucleótido sintético

5

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 151

10 accccaauca cuuccgacct t 21

<210> 152

<211> 21

<212> ADN

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de molécula combinada de ADN/ARN: Oligonucleótido sintético

20

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 152

25 ggucggaagu gauuggggut t 21

<210> 153

<211> 21

<212> ADN

30 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de molécula combinada de ADN/ARN: Oligonucleótido sintético

<220>

35 <223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 153

ES 2 740 129 T3

gggggaacua ugaugcugct t 21

<210> 154

<211> 21

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Descripción de molécula combinada de ADN/ARN: Oligonucleótido sintético

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 154

15 gcagcaucau aguucccct t 21

<210> 155

<211> 21

<212> ADN

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de molécula combinada de ADN/ARN: Oligonucleótido sintético

<220>

25 <223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 155

30 agacaaauac uccaugcut t 21

<210> 156

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

35

<220>

<223> Descripción de molécula combinada de ADN/ARN: Oligonucleótido sintético

ES 2 740 129 T3

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 156

5 agcauggaag uauuugucut t 21

<210> 157

<211> 19

<212> ARN

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

15 <400> 157

ccaugcucgg gggaacuau 19

<210> 158

<211> 19

20 <212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

25

<400> 158

auaguucccc cgagcaugg 19

<210> 159

30 <211> 19

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>

35 <223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 159

ES 2 740 129 T3

ggcuuuugau ggggcucgg 19

<210> 160
<211> 19
5 <212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético
10

<400> 160
ccgagcccca ucaaaagcc 19

<210> 161
15 <211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
20 <223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético
<400> 161
ucuuuuucguu ccuuggcga 19

<210> 162
25 <211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
30 <223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 162
ucgccaagga acgaaaaga 19

35 <210> 163
<211> 19
<212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

5

<400> 163

agaagccaau uacaucggc 19

<210> 164

10

<211> 19

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>

15

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 164

gccgauguaa uuggcuucu 19

20

<210> 165

<211> 19

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 165

ucggcucaga caaaucuu 19

30

<210> 166

<211> 19

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

35

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

ES 2 740 129 T3

<400> 166
aaguauuugu cugagccga 19

5 <210> 167
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 167
aaacuucca ugcucgggg 19

15 <210> 168
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 168
ccccgagcau ggaaguauu 19

25 <210> 169
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 169
35 cccaucacu uccgaccug 19

<210> 170

ES 2 740 129 T3

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

5

<220>

<223> Descripción de molécula combinada de ADN/ARN: Oligonucleótido sintético

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

10

<400> 170

aggucggaag ugauugggtt 20

<210> 171

15

<211> 19

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>

20

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 171

ccgaagcuuc uuuucguuc 19

25

<210> 172

<211> 19

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

30

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 172

gaacgaaaag aagcuucgg 19

35

<210> 173

<211> 19

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 173

aauuacaucg gcucagaca 19

10 <210> 174

<211> 19

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 174

ugucugagcc gauguaau 19

20

<210> 175

<211> 19

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 175

30 uuacaucggc ucagacaaa 19

<210> 176

<211> 19

<212> ARN

35 <213> Secuencia artificial

<220>

ES 2 740 129 T3

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 176

uuugucugag ccgauguaa 19

5

<210> 177

<211> 19

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 177

15 uuccaugcuc gggggaacu 19

<210> 178

<211> 19

<212> ARN

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 178

25 aguucccccg agcauggaa 19

<210> 179

<211> 19

<212> ARN

30 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

35 <400> 179

caugcucggg ggaacuaug 19

<210> 180

<211> 19

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

5

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 180

10 cauaguuccc ccgagcaug 19

<210> 181

<211> 19

<212> ARN

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

20 <400> 181

gcuuuugaug gggcucggg 19

<210> 182

<211> 19

25 <212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

30

<400> 182

cccgagcccc aucaaaagc 19

<210> 183

35 <211> 19

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

ES 2 740 129 T3

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 183

5 agccuacucu gacaugaga 19

<210> 184

<211> 19

<212> ARN

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

15 <400> 184

ucucauguca gaguaggcu 19

<210> 185

<211> 19

20 <212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

25

<400> 185

caucggcuca gacaaauac 19

<210> 186

30 <211> 19

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>

35 <223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 186

ES 2 740 129 T3

guauuugucu gagccgaug 19

<210> 187
<211> 19
5 <212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético
10

<400> 187
agacccaau cacuuccga 19

<210> 188
15 <211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
20 <223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 188
ucggaaguga uugggucu 19

25 <210> 189
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 189
35 cugagaaaua cugagcuuc 19

<210> 190
<211> 19

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 190

gaagcucagu auuucucag 19

10 <210> 191

<211> 19

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 191

agccgaagcu uuuuuuucu 19

20

<210> 192

<211> 19

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 192

30 acgaaaagaa gcuucggcu 19

<210> 193

<211> 19

<212> ARN

35 <213> Secuencia artificial

<220>

ES 2 740 129 T3

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 193

uuuuucguuc cuuggcgag 19

5

<210> 194

<211> 19

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 194

15 cucgccaagg aacgaaaag 19

<210> 195

<211> 19

<212> ARN

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

25 <400> 195

uuuucguucc uuggcgagg 19

<210> 196

<211> 19

30 <212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

35

<400> 196

ccucgccaag gaacgaaaa 19

<210> 197

<211> 19

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

5

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 197

10 ccaauuacau cggcucaga 19

<210> 198

<211> 19

<212> ARN

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 198

20 ucugagccga uguaaauugg 19

<210> 199

<211> 19

25 <212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

30

<400> 199

caauuacauc ggcucagac 19

<210> 200

35 <211> 19

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

ES 2 740 129 T3

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 200

5 gucugagccg auguaauug 19

<210> 201

<211> 19

<212> ARN

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

15 <400> 201

ggcgaggcuu uugaugggg 19

<210> 202

<211> 19

20 <212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

25

<400> 202

ccccaucaaa agccucgcc 19

<210> 203

30 <211> 19

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>

35 <223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 203

ES 2 740 129 T3

ggcucgggac auguggaga 19

<210> 204
<211> 19
5 <212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético
10

<400> 204
ucuccacaug ucccgagcc 19

<210> 205
15 <211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
20 <223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 205
acaugagaga agccaauua 19

25 <210> 206
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 206
uaauuggcuu cucucaugu 19
35

<210> 207
<211> 19

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 207

caugagagaa gccaaauac 19

10 <210> 208

<211> 19

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 208

guaauuggcu ucucucaug 19

20 <210> 209

<211> 19

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

25 <220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 209

agccaauuac aucggcuca 19

30 <210> 210

<211> 19

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

35 <220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

ES 2 740 129 T3

<400> 210
ugagccgaug uaauuggcu 19

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

10 <220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 211
gccaauuaca ucggcucag 19

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

20 <220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 212
cugagccgau guaauggc 19

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

30 <220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 213
35 cggcucagac aaauacuuc 19

<210> 214

ES 2 740 129 T3

<211> 19

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

5

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 214

gaaguauuug ucugagccg 19

10

<210> 215

<211> 19

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 215

20

caugaagcuu cucacgggc 19

<210> 216

<211> 19

<212> ARN

25

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

30

<400> 216

gcccgugaga agcuucaug 19

<210> 217

<211> 19

35

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

ES 2 740 129 T3

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 217

5 ggccauggug cggaggacu 19

<210> 218

<211> 19

<212> ARN

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

15 <400> 218

aguccuccgc accauggcc 19

<210> 219

<211> 19

20 <212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

25

<400> 219

gaccccaauc acuuccgac 19

<210> 220

30 <211> 19

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>

35 <223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 220

ES 2 740 129 T3

gucggaagug auugggguc 19

<210> 221
<211> 19
5 <212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético
10

<400> 221
ccccaaucac uuccgaccu 19

<210> 222
15 <211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
20 <223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 222
aggucggaag ugauugggg 19

25 <210> 223
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 223
gccugccuga gaaauacug 19
35

<210> 224
<211> 19

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 224

caguauuucu caggcaggc 19

10 <210> 225

<211> 19

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 225

gccgaagcuu cuuuucguu 19

20

<210> 226

<211> 19

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 226

30 aacgaaaaga agcuucggc 19

<210> 227

<211> 19

<212> ARN

35 <213> Secuencia artificial

<220>

ES 2 740 129 T3

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 227

gaagcuucuu uucguuccu 19

5

<210> 228

<211> 19

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 228

15 aggaacgaaa agaagcuuc 19

<210> 229

<211> 19

<212> ARN

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 229

25 aagcuucuuu ucguuccuu 19

<210> 230

<211> 19

<212> ARN

30 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

35 <400> 230

aaggaacgaa aagaagcuu 19

<210> 231
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético
 <400> 231
 10 cguuccuugg cgaggcuuu 19
 <210> 232
 <211> 19
 <212> ARN
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético
 20 <400> 232
 aaagccucgc caaggaacg 19
 <210> 233
 <211> 19
 25 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético
 30 <400> 233
 guuccuuggc gaggcuuuu 19
 <210> 234
 35 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

ES 2 740 129 T3

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 234

5 aaaagccucg ccaaggaac 19

<210> 235

<211> 19

<212> ARN

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

15 <400> 235

cuuggcgagg cuuuugaug 19

<210> 236

<211> 19

20 <212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

25

<400> 236

caucaaaaagc cugccaag 19

<210> 237

30 <211> 19

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>

35 <223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 237

ES 2 740 129 T3

uggcgaggcu uuugauggg 19

<210> 238
<211> 19
5 <212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético
10

<400> 238
cccaucaaaa gccucgcca 19

<210> 239
15 <211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
20 <223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 239
cucugacaug agagaagcc 19

25 <210> 240
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 240
ggcuucucuc augucagag 19
35

<210> 241
<211> 19

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 241

cacgggccug guuuucugc 19

10 <210> 242

<211> 19

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 242

gcagaaaacc aggcccgug 19

20

<210> 243

<211> 19

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 243

30 cuuuugaugg ggcucggga 19

<210> 244

<211> 19

<212> ARN

35 <213> Secuencia artificial

<220>

ES 2 740 129 T3

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 244

ucccgagccc caucaaaag 19

5

<210> 245

<211> 19

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 245

15 uuggcgaggc uuuugaugg 19

<210> 246

<211> 19

<212> ARN

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

25 <400> 246

ccaucaaaag ccucgcaa 19

<210> 247

<211> 19

30 <212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

35

<400> 247

acuuccaugc ucgggggaa 19

<210> 248
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético
 <400> 248
 10 uucccccgag cauggaagu 19
 <210> 249
 <211> 19
 <212> ARN
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético
 20 <400> 249
 uuuucugcuc cuugguccu 19
 <210> 250
 <211> 19
 25 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético
 30 <400> 250
 aggaccaagg agcagaaaa 19
 <210> 251
 35 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

ES 2 740 129 T3

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 251

5 cuucucacgg gccugguuu 19

<210> 252

<211> 19

<212> ARN

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

15 <400> 252

aaaccaggcc cgugagaag 19

<210> 253

<211> 19

20 <212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

25

<400> 253

auuacaucgg cucagaaa 19

<210> 254

30 <211> 19

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>

35 <223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 254

ES 2 740 129 T3

uugucugagc cgauguaau 19

<210> 255
<211> 19
5 <212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético
10

<400> 255
auacuuccau gcucggggg 19

<210> 256
15 <211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
20 <223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 256
cccccgagca uggaaguau 19

25 <210> 257
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 257
gcgaggcuuu ugauggggc 19
35

<210> 258
<211> 19

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 258

gccccauca aagccucgc 19

10 <210> 259

<211> 19

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 259

gcucgggaca uguggagag 19

20

<210> 260

<211> 19

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 260

30 cucuccacau gucccgagc 19

<210> 261

<211> 19

<212> ARN

35 <213> Secuencia artificial

<220>

ES 2 740 129 T3

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 261

acauguggag agccuacuc 19

5

<210> 262

<211> 19

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 262

15 gaguaggcuc uccacaugu 19

<210> 263

<211> 19

<212> ARN

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

25 <400> 263

uccaugcucg ggggaacua 19

<210> 264

<211> 19

30 <212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

35

<400> 264

uaguuccccc gagcaugga 19

<210> 265

<211> 19

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

5

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 265

10 aucacuuccg accugcugg 19

<210> 266

<211> 19

<212> ARN

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 266

20 ccagcagguc ggaagugau 19

<210> 267

<211> 19

25 <212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

30

<400> 267

ggacaugugg agagccuac 19

<210> 268

35 <211> 19

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

ES 2 740 129 T3

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 268

5 guaggcucuc cacaugucc 19

<210> 269

<211> 19

<212> ARN

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

15 <400> 269

cauguggaga gccuacucu 19

<210> 270

<211> 19

20 <212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

25

<400> 270

agaguaggcu cuccacaug 19

<210> 271

30 <211> 19

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>

35 <223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 271

ES 2 740 129 T3

ggagagccua cucugacau 19

<210> 272
<211> 19
5 <212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético
10

<400> 272
augucagagu aggcucucc 19

<210> 273
15 <211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
20 <223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 273
gagagccuac ucugacaug 19

25 <210> 274
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 274
caugucagag uaggcucuc 19
35

<210> 275
<211> 19

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 275

uacucugaca ugagagaag 19

10 <210> 276

<211> 19

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 276

cuucucucu gucagagua 19

20

<210> 277

<211> 19

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 277

30 gaagccaauu acaucggcu 19

<210> 278

<211> 19

<212> ARN

35 <213> Secuencia artificial

<220>

ES 2 740 129 T3

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 278

agccgaugua auuggcuuc 19

5

<210> 279

<211> 19

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 279

15 gcucagacaa auacuucca 19

<210> 280

<211> 19

<212> ARN

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

25 <400> 280

uggaaguauu ugucugagc 19

<210> 281

<211> 19

30 <212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

35

<400> 281

uacuuccaug cucggggga 19

<210> 282

<211> 19

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

5

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 282

10 ucccccgagc auggaagua 19

<210> 283

<211> 19

<212> ARN

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

20 <400> 283

caccaugaag cuucucacg 19

<210> 284

<211> 19

25 <212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

30

<400> 284

cgugagaagc uucauggug 19

<210> 285

35 <211> 19

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

ES 2 740 129 T3

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 285

5 gccaaaaggg gaccuggg 19

<210> 286

<211> 19

<212> ARN

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

15 <400> 286

cccaggucc ccuuuggc 19

<210> 287

<211> 19

<212> ARN

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

25 <400> 287

augaagcuuc ucacgggcc 19

<210> 288

<211> 19

30 <212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

35

<400> 288

ggcccugag aagcucau 19

<210> 289

<211> 19

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

5

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 289

10 gccauggugc ggaggacuc 19

<210> 290

<211> 19

<212> ARN

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 290

20 gaguccuccg caccauggc 19

<210> 291

<211> 19

25 <212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

30

<400> 291

ccauggugcg gaggacucg 19

<210> 292

35 <211> 19

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

ES 2 740 129 T3

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 292

5 cgaguccucc gcaccaugg 19

<210> 293

<211> 19

<212> ARN

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

15 <400> 293

cgggccuggu uuucugcuc 19

<210> 294

<211> 19

20 <212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

25 <400> 294

gagcagaaaa ccaggcccg 19

<210> 295

30 <211> 19

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>

35 <223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 295

ES 2 740 129 T3

ugucagcagc cgaagcuuc 19

<210> 296
<211> 19
5 <212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético
10

<400> 296
gaagcuucgg cugcugaca 19

<210> 297
15 <211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
20 <223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 297
gcagccgaag cuucuuuuc 19

25 <210> 298
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 298
gaaaagaagc uucggcugc 19
35

<210> 299
<211> 19

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 299

gcuucuuuuc guuccuugg 19

10 <210> 300

<211> 19

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 300

ccaaggaacg aaaagaagc 19

20

<210> 301

<211> 19

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 301

30 uuccuuggcg aggcuuuug 19

<210> 302

<211> 19

<212> ARN

35 <213> Secuencia artificial

<220>

ES 2 740 129 T3

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 302

caaaagccuc gccaggaa 19

5

<210> 303

<211> 19

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 303

15 uccuuggcga ggcuuuuga 19

<210> 304

<211> 19

<212> ARN

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

25 <400> 304

ucaaaagccu cgccaagga 19

<210> 305

<211> 19

30 <212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

35

<400> 305

gaaauacuga gcuuccucu 19

<210> 306

<211> 19

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

5

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 306

10 agaggaagcu caguauuuc 19

<210> 307

<211> 19

<212> ARN

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

20 <400> 307

accccauca cuuccgacc 19

<210> 308

<211> 19

25 <212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

30

<400> 308

ggucggaagu gauugggu 19

<210> 309

35 <211> 19

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

ES 2 740 129 T3

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 309

5 gggggaacua ugaugcugc 19

<210> 310

<211> 19

<212> ARN

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

15 <400> 310

gcagcaucau aguuccccc 19

<210> 311

<211> 19

20 <212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

25

<400> 311

agacaaauac uucaugcu 19

<210> 312

30 <211> 19

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>

35 <223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 312

agcauggaag uauuugucu 19

<210> 313

<211> 21

5 <212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Descripción de molécula combinada de ADN/ARN: Oligonucleótido sintético

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<220>

15 <221> base_modificada

<222> (20)..(21)

<223> a, c, u, t, g, desconocido u otro

<400> 313

20 agacaaauac uuccaugcun n 21

<210> 314

<211> 21

<212> ARN

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de molécula combinada de ADN/ARN: Oligonucleótido sintético

30 <220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<220>

<221> base_modificada

35 <222> (20)..(21)

<223> a, c, u, t, g, desconocido u otro

ES 2 740 129 T3

<400> 314

agcauggaag uauuugucun n 21

<210> 315

5

<211> 19

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>

10

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 315

agacaaauac uuccaugcu 19

15

<210> 316

<211> 19

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 316

agcauggaag uauuugucu 19

25

<210> 317

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

30

<220>

<223> Descripción de molécula combinada de ADN/ARN: Oligonucleótido sintético

<220>

35

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 317

ES 2 740 129 T3

agacaaaauac uuccaugcut t 21

<210> 318

<211> 21

5

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de molécula combinada de ADN/ARN: Oligonucleótido sintético

10

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 318

15

agcauggaag uauuugucut t 21

REIVINDICACIONES

1. Un ácido ribonucleico bicatenario (ARNbc), en donde dicho ARNbc comprende una hebra codificante y una hebra no codificante que comprende una región de complementariedad que es complementaria a al menos una parte de un ARNm que codifica suero amiloide A (SAA), en donde
- 5 (i) el ARNbc consiste en SEQ ID NOs: 225 y 226 o consiste en GccGAAGcuucuuuuuGuudTdT (SEQ ID NO: 69) y AACGAAAAGAAGCUUCGGCdTdT (SEQ ID NO: 70),
- (ii) el ARNbc consiste en SEQ ID NOs: 233 y 234 o consiste en GuuccuuGGcGAGGcuuuudTdT (SEQ ID NO: 77) y AAAAGCCUCGCcAAGGAACdTdT (SEQ ID NO: 78),
- 10 (iii) el ARNbc consiste en SEQ ID NOs: 189 y 190 o consiste en cuGAGAAAUAcuGAGcuucdTdT (SEQ ID NO: 33) y GAAGCUcAGuAUUUCUcAGdTdT (SEQ ID NO: 34),
- (iv) el ARNbc consiste en SEQ ID NOs: 227 y 228 o consiste en GAAGcuucuuuuuGuuccudTdT (SEQ ID NO: 71) y AGGAACGAAAAGAAGCUUCdTdT (SEQ ID NO: 72),
- (v) el ARNbc consiste en SEQ ID NOs: 221 y 222 o consiste en ccccAAucAcuuccGAccudTdT (SEQ ID NO: 65) y AGGUCGGAAGUGAUUGGGdTdT (SEQ ID NO: 66),
- 15 (vi) el ARNbc consiste en SEQ ID NOs: 169 y 170 o consiste en cccAAucAcuuccGAccuGdTdT (SEQ ID NO: 13) y cAGGUCGGAAGUGAUUGGGdTdT (SEQ ID NO: 14),
- (vii) el ARNbc consiste en SEQ ID NOs: 167 y 168 o consiste en AAuAcuuccAuGcucGGGGdTdT (SEQ ID NO: 11) y CCCCAGcAUGGAAGuAUUdTdT (SEQ ID NO: 12), o
- 20 (viii) el ARNbc consiste en AuAcuuccAuGcucGGGGdTdT (SEQ ID NO: 99) y CCCCAGcAUGGAAGuAUdTdT (SEQ ID NO: 100),
- en donde c es 2'-O-metilcitidina-3'-fosfato, dT es 2'-desoxitimidina-3'-fosfato, y u es 2'-O-metiluridina-3'-fosfato.
2. El ARNbc de la reivindicación 1, donde el ARNm codifica SAA1 o SAA2.
3. El ARNbc de la reivindicación 1 o 2, en donde dicho ARNbc comprende al menos un nucleótido modificado.
4. El ARNbc de las reivindicaciones 1-3, en donde el ARNbc está conjugado con un ligando.
- 25 5. El ARNbc de las reivindicaciones 1-4, en donde el ARNbc se formula en una formulación de lípidos.
6. El ARNbc de las reivindicaciones 1-5, en donde el ARNbc se formula en una formulación de LNP, una formulación de LNP01, una formulación de LÍPIDO A-SNALP o una formulación de SNALP.
7. Una célula no humana, no embrionaria y/o aislada que contiene el ARNbc de las reivindicaciones 1-6.
- 30 8. Una composición farmacéutica para inhibir la expresión de un gen de SAA que comprende el ARNbc de las reivindicaciones 1-6.
9. Un método de inhibición de la expresión de SAA en una célula, comprendiendo el método:
- (a) introducir en la célula el ARNbc de las reivindicaciones 1-6; y
- (b) mantener la célula producida en la etapa (a) durante un tiempo suficiente para obtener la degradación del transcrito de ARNm de un gen de SAA, inhibiendo así la expresión del gen de SAA en la célula,
- 35 en donde se excluye cualquier método de tratamiento del cuerpo humano o animal por terapia.
10. Un ARNbc de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 para su uso en el tratamiento de un trastorno asociado a la expresión de SAA en un ser humano.
11. El ARNbc para su uso según la reivindicación 10, en donde el ser humano tiene amiloidosis AA, artritis reumatoide, una neoplasia, artritis psoriásica, artritis juvenil crónica, espondilitis anquilosante, síndrome de Behcet, síndrome de Reiter, enfermedad de Still del adulto, enfermedad inflamatoria del intestino, fiebres periódicas hereditarias, tuberculosis, osteomielitis, bronquiectasia, lepra, pielonefritis, úlceras de decúbito, enfermedad de Whipple, acné conglobata, hipo/agammaglobulinemia con inmunodeficiencia común variable, fibrosis quística, hepatoma, carcinoma renal, enfermedad de Castleman, enfermedad de Hodgkin, leucemia de células pilosas del adulto, enfermedad de Waldenström, infecciones crónicas, una enfermedad inflamatoria crónica, artritis crónica, septicemia crónica, un síndrome de fiebre periódica, fiebre mediterránea familiar o enfermedad de Crohn.
- 40
- 45

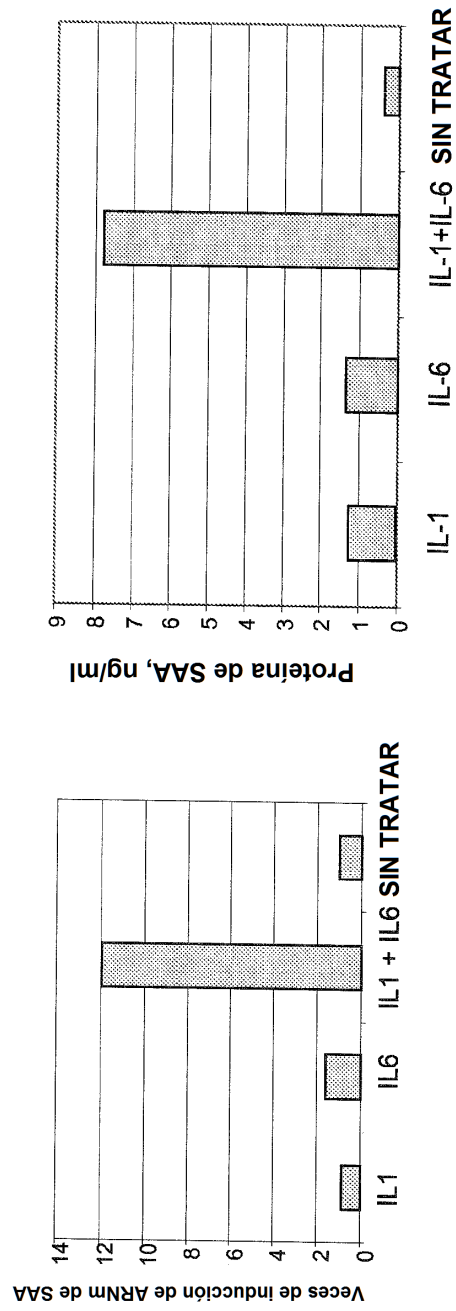


FIG. 1A

FIG. 1B

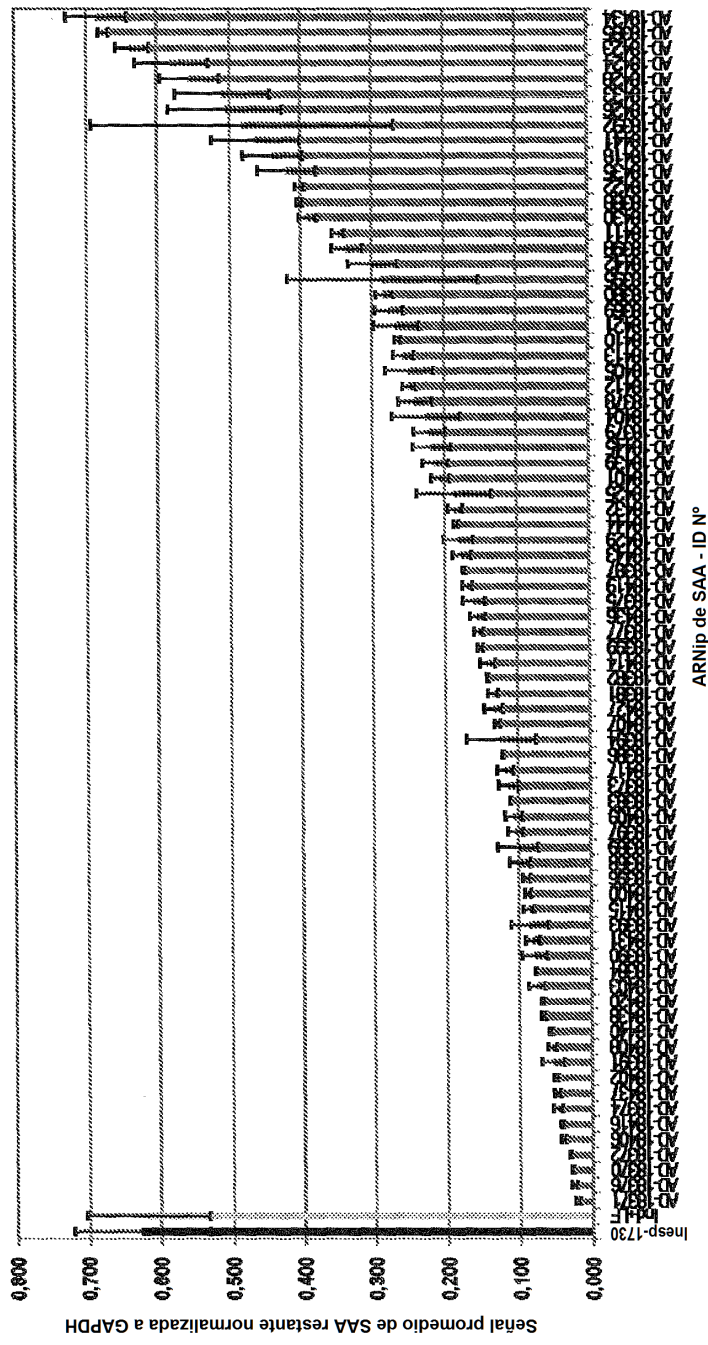


FIG. 2

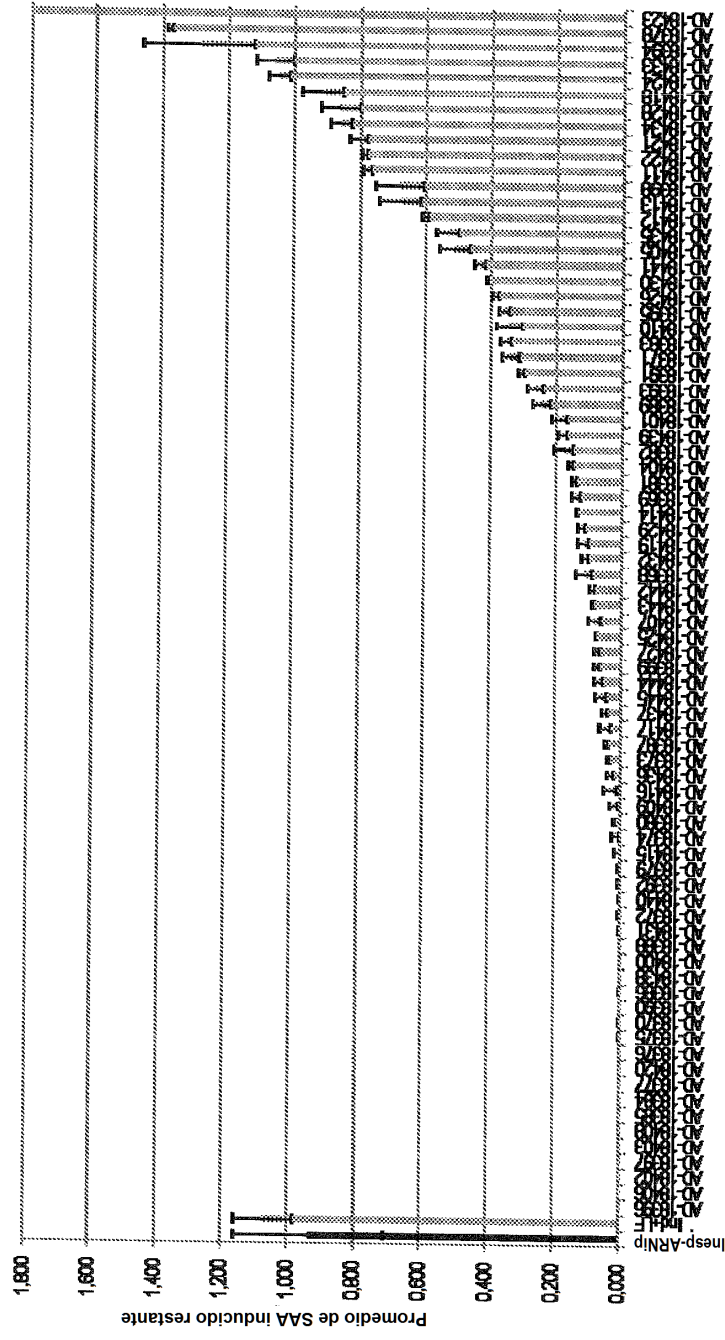


FIG. 3

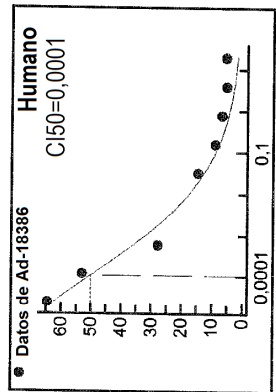
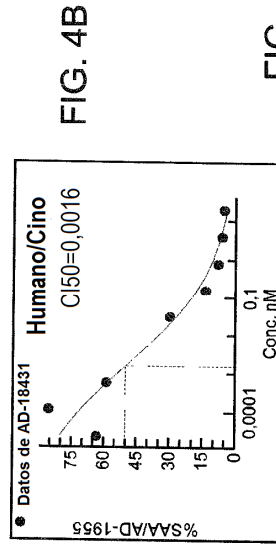


FIG. 4A

FIG. 4B

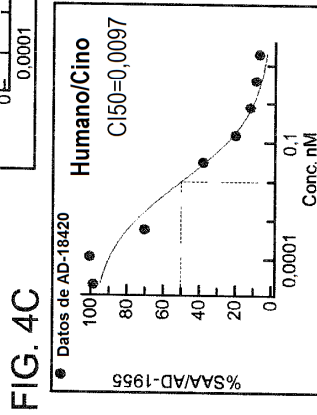


FIG. 4E

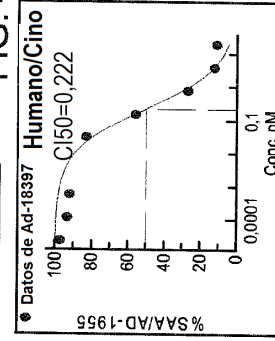
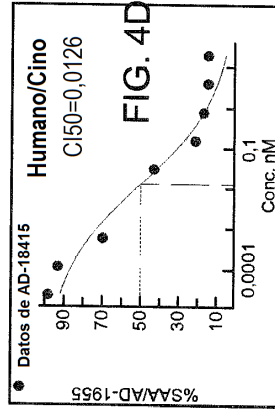


FIG. 4C

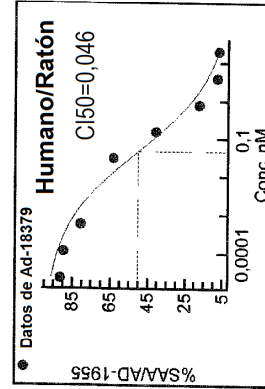


FIG. 4F

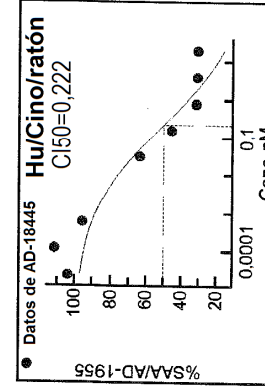


FIG. 4G

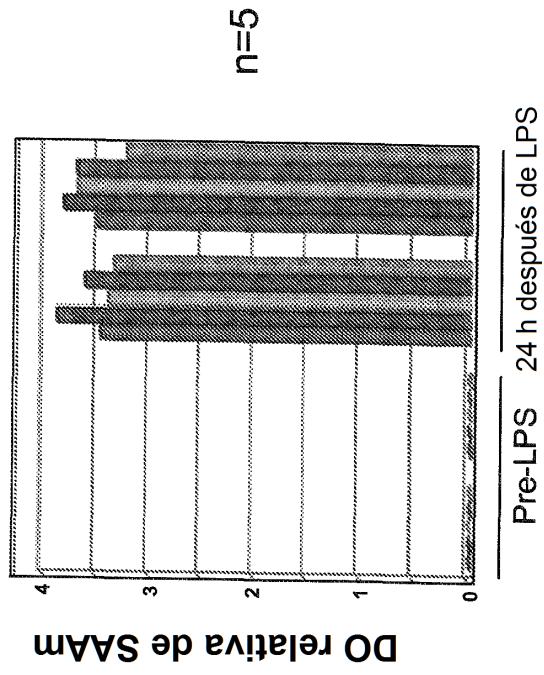


FIG. 5

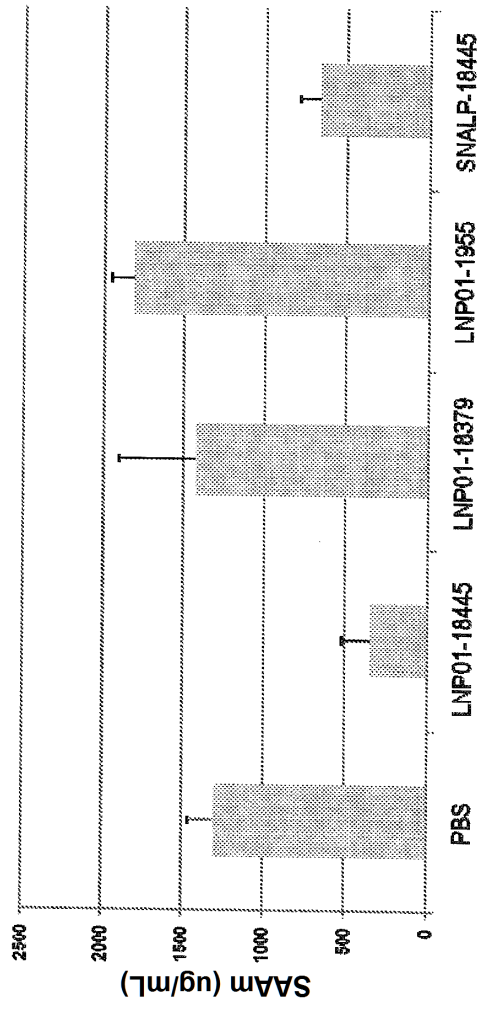


FIG. 6

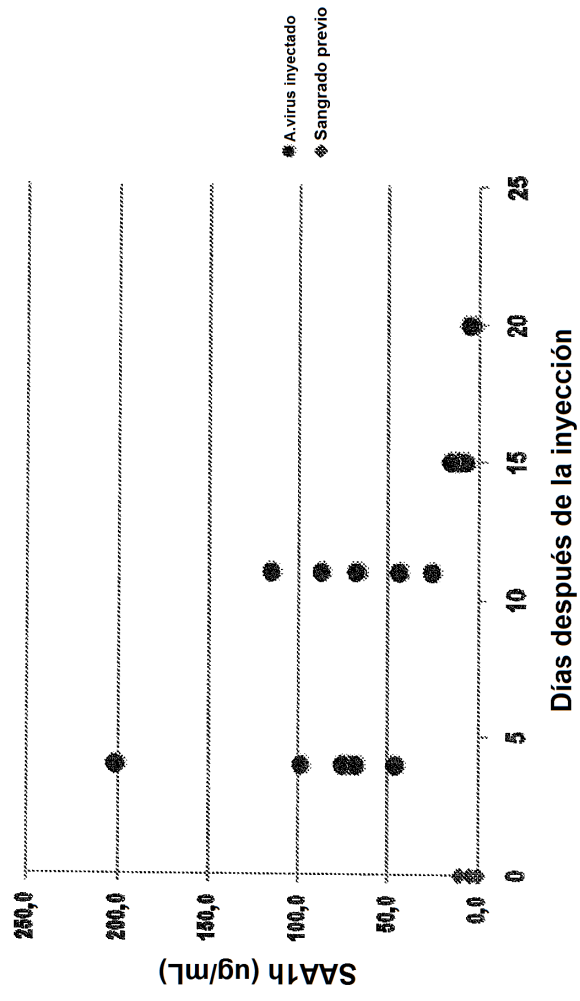


FIG. 7

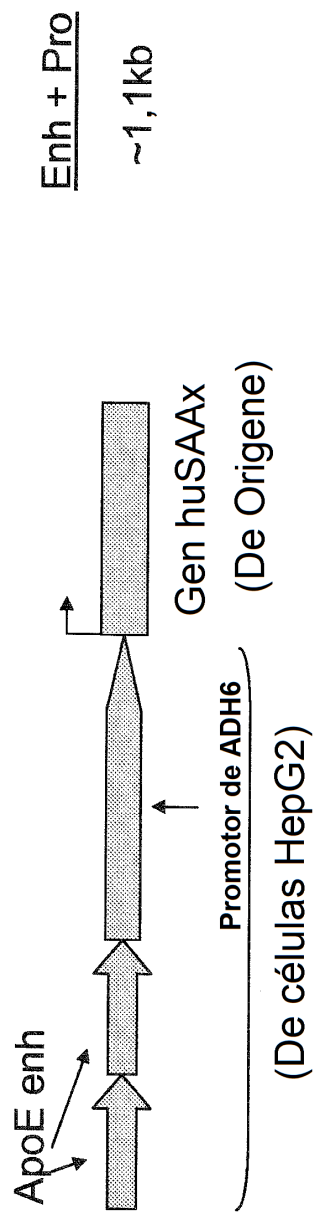
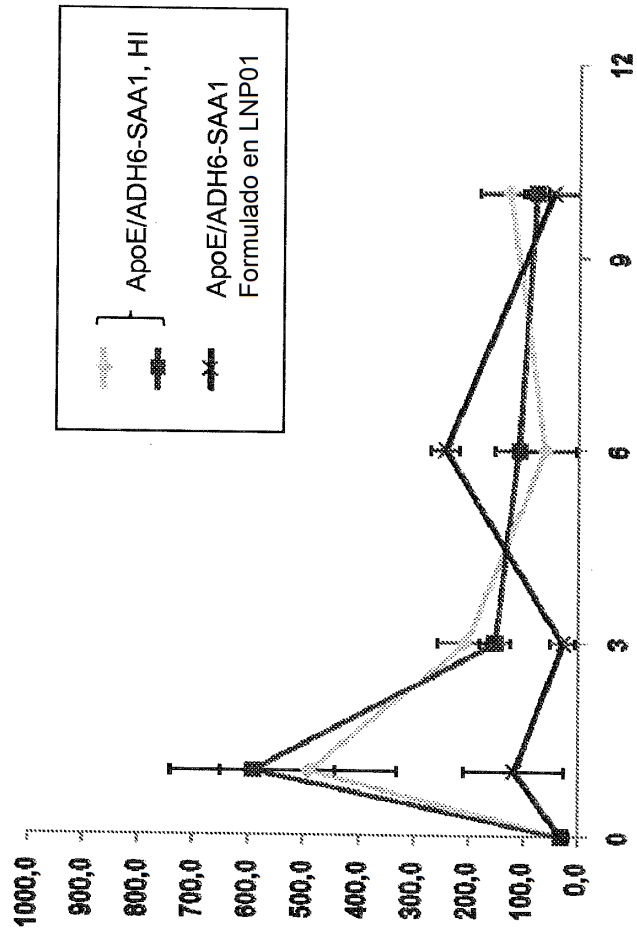


FIG. 8



50 ug de plásmido administrados por animal; n=3

FIG. 9

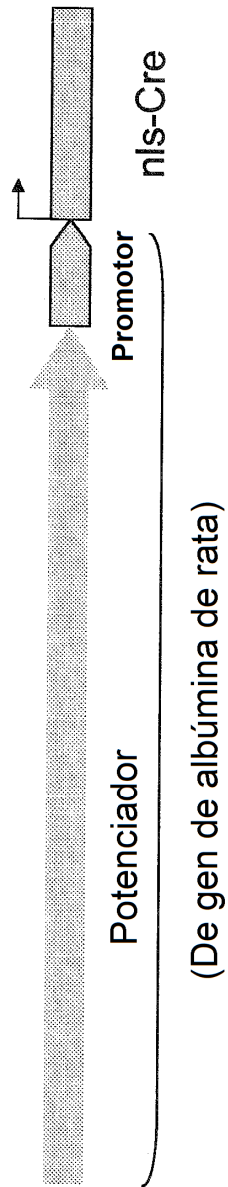


FIG. 10