

REIVINDICACIONES

1. Un ácido ribonucleico bicatenario (dsARN) para
5 inhibir la expresión de ALAS1, en donde dicho dsARN comprende
una cadena con sentido y una cadena antisentido, donde la
cadena antisentido comprende una región de complementariedad
con un transcripto de ARN de ALAS1 (por ejemplo, SEQ ID
NO:1), cuya cadena antisentido comprende al menos 20
10 nucleótidos contiguos de la secuencia antisentido de
UAAGAUGAGACACUCUUUCUGGU (SEQ ID NO: 4153) o
UAAGAUGAGACACUCTUUCUGGU (SEQ ID NO: 4154).

2. El dsARN de acuerdo con la reivindicación 1, en donde
15 dicho dsARN comprende al menos un nucleótido modificado.

3. El dsARN de acuerdo con cualquiera de las
reivindicaciones precedentes, que tiene una región de dúplex
que tiene 17-23 pares de nucleótidos de longitud.

20

4. El dsARN de acuerdo con cualquiera de las
reivindicaciones precedentes, en donde al menos una cadena
comprende una saliente 3' de al menos 2 nucleótidos.

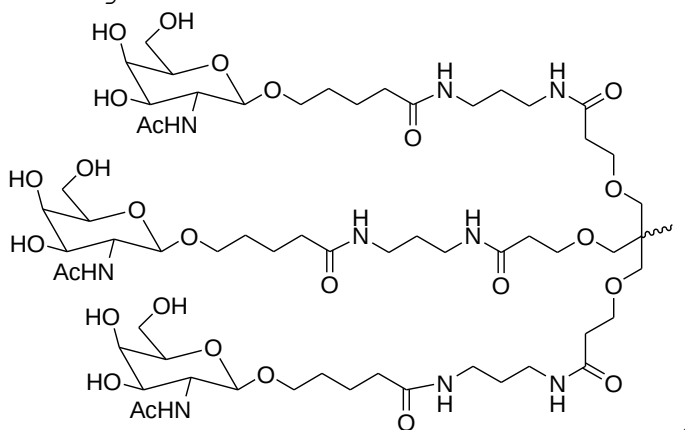
25 5. El dsARN de acuerdo con cualquiera de las
reivindicaciones precedentes, en donde cada cadena tiene no
más de 26 nucleótidos de longitud.

6. El dsARN de acuerdo con la reivindicación 2, en donde al menos un nucleótido modificado se selecciona de un 2'-O-metilo, 2'-fluoro o nucleótido modificado, y opcionalmente uno o varios grupos 5'-fosforotioato, o cualquiera de sus combinaciones.

7. El dsARN de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que también comprende un ligando.

8. El dsARN de acuerdo con la reivindicación 7, en donde el ligando comprende un carbohidrato o un ligando de GalNAc.

9. El dsARN de acuerdo con la reivindicación 8, en donde el ligando es



10. El dsARN de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7-9, en donde el ligando se une por medio de un ligador ramificado bivalente o trivalente.

ED50 de dosis simple de menos de aproximadamente 10 mg/kg o menos de aproximadamente 5 mg/kg.

15. El dsARN de acuerdo con cualquiera de las
5 reivindicaciones precedentes, en donde la cadena con sentido comprende o consiste en la secuencia de CAGAAAGAGUGUCUCAUCUUA (SEQ ID NO: 4155).

16. El dsARN de acuerdo con la reivindicación 1, en
10 donde:

(i) la cadena antisentido comprende la secuencia antisentido de (SEQ ID NO: 4153), en donde la secuencia antisentido comprende todos los nucleótidos modificados de (SEQ ID NO: 4717),

15 (ii) la cadena antisentido consiste en la secuencia antisentido de (SEQ ID NO: 4153), en donde la secuencia antisentido comprende todos los nucleótidos modificados de (SEQ ID NO: 4717),

(iii) la cadena con sentido comprende la secuencia con
20 sentido de (SEQ ID NO: 4155), en donde la secuencia con sentido comprende todos los nucleótidos modificados de (SEQ ID NO: 4716),

(iv) la cadena con sentido consiste en la secuencia con
sentido de (SEQ ID NO: 4155), en donde la secuencia con
25 sentido comprende todos los nucleótidos modificados de (SEQ ID NO: 4716),

(v) la cadena con sentido comprende la secuencia con sentido de (SEQ ID NO: 4716) y la cadena antisentido comprende la secuencia antisentido de (SEQ ID NO: 4717), en donde la secuencia con sentido y la secuencia antisentido
5 comprenden todos los nucleótidos modificados de (SEQ ID NO: 4716) y (SEQ ID NO: 4717), o

(vi) la cadena con sentido consiste en la secuencia con sentido de (SEQ ID NO: 4716) y la cadena antisentido consiste en la secuencia antisentido de (SEQ ID NO: 4717), en donde
10 la secuencia con sentido y la secuencia antisentido comprenden todos los nucleótidos modificados de (SEQ ID NO: 4716) y (SEQ ID NO: 4717).

17. El dsARN de acuerdo con la reivindicación 1, en
15 donde:

(i) la cadena antisentido comprende la secuencia antisentido de (SEQ ID NO: 4707) y/o la cadena con sentido comprende la secuencia con sentido de (SEQ ID NO: 4706), en donde la secuencia antisentido y/o la secuencia con sentido
20 comprenden todos los nucleótidos modificados de (SEQ ID NO: 4706) y (SEQ ID NO: 4707), o

(ii) la cadena antisentido consiste en la secuencia antisentido de (SEQ ID NO: 4707), y/o la cadena con sentido consiste en la secuencia con sentido de (SEQ ID NO: 4706),
25 en donde la secuencia antisentido y/o la secuencia con sentido comprenden todos los nucleótidos modificados de (SEQ ID NO: 4706) y (SEQ ID NO: 4707).

18. El dsARN de acuerdo con la reivindicación 1, en donde:

(i) la cadena antisentido comprende la secuencia antisentido de (SEQ ID NO: 5161) y/o la cadena con sentido comprende la secuencia con sentido de (SEQ ID NO: 5160), en donde la secuencia antisentido y/o la secuencia con sentido comprenden todos los nucleótidos modificados de (SEQ ID NO: 5161) y (SEQ ID NO: 5160), o

(ii) la cadena antisentido consiste en la secuencia antisentido de (SEQ ID NO: 5161), y/o la cadena con sentido consiste en la secuencia con sentido de (SEQ ID NO: 5160), en donde la secuencia antisentido y/o la secuencia con sentido comprenden todos los nucleótidos modificados de (SEQ ID NO: 5161) y (SEQ ID NO: 5160).

19. El dsARN de acuerdo con la reivindicación 1, en donde:

(i) la cadena antisentido comprende la secuencia antisentido de (SEQ ID NO: 4169) y/o la cadena con sentido comprende la secuencia con sentido de (SEQ ID NO: 4168), en donde la secuencia antisentido y/o la secuencia con sentido comprenden todos los nucleótidos modificados de (SEQ ID NO: 4169) (SEQ ID NO: 4168), o

(ii) la cadena antisentido consiste en la secuencia antisentido de (SEQ ID NO: 4169), y/o la cadena con sentido consiste en la secuencia con sentido de (SEQ ID NO: 4168),

en donde la secuencia antisentido y/o la secuencia con sentido comprenden todos los nucleótidos modificados de (SEQ ID NO: 4169) (SEQ ID NO: 4168).

5 20. Una célula que comprende el ARNs de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20.

 21. Una composición farmacéutica para inhibir la expresión de un gen ALAS1, que comprende el dsARN de acuerdo
10 con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20.

 22. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 21, en donde el dsARN se encuentra en una solución salina no tamponada o solución acuosa.

15

 23. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 21 ó 22, en donde dicha composición es apropiada para administración subcutánea.

20 24. Un método de inhibición de la expresión de ALAS1 en una célula *in vitro* que comprende:

 (a) introducir en la célula el dsARN de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19 y
 (b) mantener la célula de la etapa (a) durante un
25 tiempo suficiente para obtener una degradación del transcripto de mRNA de un gen ALAS1, inhibiendo así la expresión del gen ALAS1 en la célula, opcionalmente en

donde en donde la expresión de ALAS1 se inhibe en al menos el 20% o al menos el 30%.

REIVINDICACIONES 30-47 ELIMINADAS

5

25. Un método de ensayo del nivel de mRNA de ALAS1 extracelular circulante en un sujeto, en donde el método se realiza *in vitro* y comprende las etapas de:

detectar (*por ejemplo*, medir) el nivel de mRNA de ALAS1
10 en una muestra de fluido biológico (*por ejemplo*, una muestra de sangre, una muestra de plasma, una muestra de suero, o una muestra de orina) del sujeto, donde dicha muestra de fluido biológico comprende el mRNA de ALAS1,

ensayando así el nivel de mRNA de ALAS1 extracelular
15 circulante en el sujeto.

26. Un método de ensayo del nivel de mRNA de ALAS1 extracelular circulante en un sujeto, en donde el método se realiza *in vitro* y comprende las etapas de:

20 (i) proporcionar un ARN (*por ejemplo*, ARN extracelular) de una muestra de fluido biológico (*por ejemplo*, una muestra de sangre, una muestra de plasma, una muestra de suero, o una muestra de orina) del sujeto, donde dicha muestra de fluido biológico comprende el mRNA de ALAS1;

25 (ii) obtener un cADN de ALAS1 del mRNA de ALAS1;

(iii) poner en contacto el cADN de ALAS1 con un ácido nucleico complementario (*por ejemplo*, sonda y/o cebador) con

el cADN de ALAS1 o una de sus partes, produciendo así una mezcla de reacción; y

(iv) detectar (por ejemplo, medir) el nivel de cADN de ALAS1 en la mezcla de reacción, en donde el nivel de cADN de ALAS1 es indicativo del nivel de mRNA de ALAS1,

ensayando así el nivel de mRNA de ALAS1 extracelular circulante en el sujeto, opcionalmente en donde

(a) el método comprende PCR, qPCR o 5'-RACE,

(b) el ácido nucleico es una sonda o un cebador y/o

(c) el ácido nucleico comprende un resto detectable y el nivel de mRNA de ALAS1 se determina por detección de la cantidad del resto detectable.

27. El método de acuerdo con la reivindicación 26, en donde la eficacia de un tratamiento de porfiria se evalúa en base a una composición del nivel de mRNA de ALAS1 extracelular circulante en el sujeto con un valor de referencia.

28. El método de acuerdo con la reivindicación 26, en donde una reducción en el nivel de mRNA de ALAS1 extracelular circulante en el sujeto en respuesta al tratamiento de porfiria, respecto al valor de referencia, indica que el tratamiento de porfiria es eficaz.

25

29. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 26 a 28, que también comprende la

adquisición de la muestra de fluido biológico de un sujeto, opcionalmente en donde la muestra de fluido biológico se separa del tejido y en donde la muestra de fluido biológico contiene exosomas.

5

30. Una composición que comprende el ARNAd de acuerdo con la reivindicación 16 y agua para inyección.

31. La composición de acuerdo con la reivindicación 30,
10 que comprende aproximadamente 200 mg/mL del ARNAd de acuerdo con la reivindicación 16.

32. La composición de acuerdo con la reivindicación 30 ó 31, en donde la composición tiene un pH de 6,0-7,5, por
15 ejemplo, de aproximadamente 7,0.

33. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 30 a 32, en donde la composición se formula para inyección subcutánea.

20

REIVINDICACIONES 57-59 ELIMINADAS