COMPOSICIONES DE ARNi DE SERPINA1 Y SUS MÉTODOS DE USO

Solicitudes relacionadas

Esta solicitud invoca el beneficio de prioridad de la Solicitud Provisional de Patente de los EEUU N°: 62/425.907 (N° Caso del Abogado ALN-260PRO1), presentada el 23 de noviembre, 2016; Solicitud Provisional de Patente de los EEUU N°: 62/548.589 (N° Caso del Abogado ALN-260PRO2), presentada el 22 de agosto, 2017; Solicitud Provisional de Patente de los EEUU N°: 62/549.099 (N° Caso del Abogado ALN-273PRO1), presentada el 23 de agosto, 2017; y Solicitud Provisional de Patente de los EEUU N°: 62/561.514 (N° Caso del Abogado ALN-260PRO3), presentada el 21 de septiembre, 2017. El contenido completo de cada una de las solicitudes citadas se incorpora en la presente a modo de referencia.

Esta solicitud está relacionada con la Solicitud Provisional de Patente de los EEUU N°: 61/826.125, presentada el 22 de mayo, 2013, Solicitud Provisional de Patente de los EEUU N°: 61/898.695, presentada el 1 de noviembre, 2013; Solicitud Provisional de Patente de los EEUU N°: 61/979.727, presentada el 15 de abril, 2014; Solicitud Provisional de Patente de los EEUU N°: 61/989.028, presentada el 6 de mayo, 2014; Solicitud de Patente de los EEUU N°: 14/284.745, ahora presentada como Patente de los EEUU N°: 9.574.192, presentada el 21 de febrero, 2017; Solicitud de Patente de los EEUU N°: 15/399.820, presentada el 6 de enero, 2017; y la Solicitud de Patente Internacional N°: PCT/US2014/039109, presentada el 22 de mayo, 2014. El contenido completo de cada una de las solicitudes citadas se incorpora en la presente a modo de referencia.

Listado de secuencias

La presente solicitud contiene un Listado de secuencias presentado en formato ASCII por vía electrónica y se incorpora por completo en la presente a modo de referencia. Dicha copia en ASCII fue creada el 16 de noviembre, 2016, se denomina 121301-07820_SL.txt y su tamaño es de 129.236 bytes.

Antecedentes de la invención

La Serpina1 codifica la alfa-1-antitripsina que predominantemente forma complejos e inhibe la actividad de la elastasa de neutrófilos producidos por hepatocitos, monocitos mononucleares, macrófagos alveolares, enterocitos y células mieloides. Los sujetos que presentan variaciones en una o ambas copias del gen de Serpina1 pueden sufrir de deficiencia de alfa-1-antitripsina y tienen riesgo de desarrollar enfisema pulmonar y/o una enfermedad hepática crónica debido a una actividad elastasa mayor que la normal en los pulmones y el hígado.

En los sujetos afectados, la deficiencia de la alfa-1-antitripsina es una deficiencia de la alfa-1-antitripsina funcional, de tipo salvaje. En algunos casos, un sujeto que presenta una variación en una o ambas copias del gen de Serpina1 es portador de un alelo nulo. En otros casos, un sujeto que presenta una variación en una o ambas copias del gen Serpina1 es portador de un alelo deficiente.

Por ejemplo, un sujeto que tiene un alelo deficiente de Serpina1, tal como el alelo PIZ, posiblemente produce proteínas mal plegadas que no pueden ser transportadas apropiadamente desde el sitio de síntesis hasta el sitio de acción dentro del cuerpo. Estos sujetos típicamente tienen riesgo de desarrollar una enfermedad de pulmón y/o hepática. Los sujetos que tienen un alelo nulo de Serpina1, tal como el PINULL (Granite Falls), típicamente sólo

tienen riesgo de desarrollar una enfermedad de pulmón.

La enfermedad hepática que resulta de una deficiencia de la alfa-1 antitripsina es el resultado de formas variantes de la alfa-1-antitripsina producidas en las células hepáticas, que no se pliegan bien y que, por ende, no son transportadas fácilmente fuera de las células. Esto conduce a la acumulación de la proteína mal plegada en las células hepáticas y pueda causar una o más enfermedades o trastornos del hígado que incluyen, pero en un sentido no taxativo, una enfermedad hepática crónica, inflamación del hígado, cirrosis, fibrosis hepática y/o carcinoma hepatocelular.

Actualmente son muy limitadas las opciones de tratamiento de los pacientes con una enfermedad hepática debida a la deficiencia de alfa-1-antitripsina, que incluyen vacunas contra hepatitis, cuidados suplementarios y omisión de agentes nocivos (por ejemplo, alcohol y NSAID). Aunque existen terapias de reemplazo de alfa-1-antitripsina disponibles, dichos tratamientos no tienen efecto sobre la enfermedad hepática en estos sujetos y, si bien un transplante hepático puede ser eficaz, es un procedimiento difícil, costoso y de riesgo y no es fácil obtener un órgano hepático.

Por lo tanto, persiste la necesidad en el arte de tratamientos efectivos para las enfermedades asociadas a la Serpina1, tal como una enfermedad hepática crónica, inflamación hepática, cirrosis, fibrosis hepática y/o carcinoma hepatocelular.

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

Según se describirá con mayor detalle más adelante, en la presente se divulgan composiciones que comprenden agentes, por ejemplo, agentes de ARNi, por ejemplo, agentes de ARNi de hebra doble, direccionados a la

Serpina1. También se divulgan métodos que emplean las composiciones de la invención para inhibir la expresión de Serpina1 y para tratar las enfermedades asociadas con Serpina1, por ejemplo, la enfermedad hepática crónica, una inflamación hepática, cirrosis, fibrosis hepática y/o carcinoma hepatocelular.

La presente invención se basa, por lo menos en parte, en el descubrimiento de nucleótidos o motivos químicos efectivos para agentes de ARNhd dirigidos a Serpina1 que son ventajosos para la inhibición de la expresión del gen blanco, al mismo tiempo que presenta efectos de silenciamiento fuera del gen blanco reducidos, así como composiciones que comprenden dichos agentes adecuados para usos terapéuticos. Más específicamente, se ha descubierto, entre otros, que los agentes de ARNhd dirigidos a Serpina1, donde la hebra antisentido comprende por lo menos una modificación térmicamente desestabilizante del dúplex dentro de la región de siembra (es decir, en las posiciones 2-9 del extremo 5' de la hebra antisentido, contando desde el extremo 5') y/o el agente de ARNhd tiene una temperatura de fusión en el rango entre aproximadamente 40 °C y aproximadamente 80 °C puede ser más eficaz para mediar la interferencia de ARN que un agente de ARNhd parental sin la modificación desestabilizante.

Por lo tanto, en un aspecto, la presente invención provee un agente de ARN de hebra doble (ARNhd) que inhibe la expresión de una secuencia genética blanco de un inhibidor de serina peptidasa, clado A, miembro 1 (Serpina1), que comprende una hebra sentido y una hebra antisentido, en donde la hebra antisentido tiene una complementariedad suficiente con la secuencia blanco como para mediar la interferencia de ARN, en donde dicha hebra antisentido comprende por lo menos una modificación térmicamente

desestabilizante en las primeras 9 posiciones de nucleótido de la región 5' o un precursor de la misma, en donde dicha hebra sentido comprende un ligando del receptor de la asialoglicoproteína (ASGPR) y en donde cada una de las hebras sentido y antisentido son de manera independiente de entre 14 y 40 nucleótidos de longitud.

En otro aspecto, la presente invención provee un agente de ARN de hebra doble (ARNhd) que inhibe la expresión de un inhibidor del gen de serina peptidasa, clado A, miembro 1 (Serpina1), que comprende una hebra sentido y una hebra antisentido que forman una región de hebra doble, en donde la hebra sentido comprende por lo menos 15 nucleótidos contiguos que difieren en no más de 3 nucleótidos de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID N°: 1, y la hebra antisentido comprende por lo menos 15 nucleótidos contiguos que difieren en no más de 3 nucleótidos de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID N°: 15, en donde dicha hebra antisentido comprende por lo menos una modificación térmicamente desestabilizante de la región de hebra doble en las primeras 9 posiciones de nucleótido de la región 5' o un precursor de la misma, en donde dicha hebra sentido comprende un ligando del receptor de la asialoglicoproteína (ASGPR), y en donde cada una de la hebra sentido y la hebra antisentido son de manera independiente de entre 14 y 40 nucleótidos de longitud.

En aún otro aspecto, la presente invención provee un agente de ARN de hebra doble (ARNhd) que inhibe la expresión de un inhibidor de un gen serina peptidasa, clado A, miembro 1 (Serpina1), que comprende una hebra sentido y una hebra antisentido que forma una región de hebra doble, dicha hebra antisentido que comprende una región de complementariedad con un ARNm

que codifica Serpina1, en donde la región de complementariedad comprende por lo menos 15 nucleótidos contiguos que difieren en no más de 3 nucleótidos de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID N°: 15, en donde dicha hebra antisentido comprende por lo menos una modificación térmicamente desestabilizante en las primeras 9 posiciones de nucleótido de la región 5' o un precursor de la misma, en donde dicha hebra sentido comprende un ligando del receptor de la asialoglicoproteína (ASGPR), en donde cada una de la hebra sentido y la hebra antisentido son de manera independiente de entre 14 y 40 nucleótidos de longitud.

En una forma de realización, el agente de ARNhd comprende por lo menos cuatro nucleótidos que comprenden una modificación 2'-fluoro.

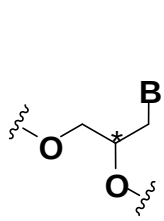
En una forma de realización, el agente de ARNhd presenta las siguientes características: a) la modificación térmicamente desestabilizante se ubica en las posiciones 4-8 de la región 5' de la hebra antisentido; b) y cada una de las hebras sentido y antisentido comprenden de manera independiente por lo menos dos nucleótidos que comprenden una modificación 2'-fluoro; y c) un ligando del ASGPR unido a cualquiera de los extremos de la hebra sentido.

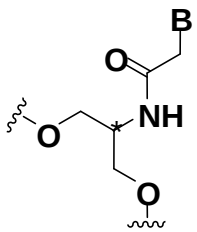
En otra forma de realización, la hebra antisentido presenta por lo menos dos de las siguientes características: a) la modificación térmicamente desestabilizante se ubica en las posiciones 4 a 8 de la hebra antisentido; b) por lo menos dos nucleótidos comprenden una modificación 2'-fluoro; c) enlaces internucleótidos de fosforotioato entre las posiciones de nucleótido 1 y 2 (contando desde el extremo 5'); d) una longitud de 18 a 35 nucleótidos.

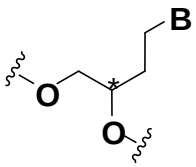
En una forma de realización, la hebra sentido presenta por lo menos una de las siguientes características:

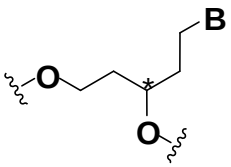
a) el ligando del ASGPR unido a cualquiera de los extremos de la hebra sentido; b) por lo menos dos nucleótidos comprenden una modificación 2'-fluoro; c) la hebra sentido y la hebra antisentido forman una región de hebra doble que abarca por lo menos 19 posiciones de nucleótido y en donde la modificación térmicamente desestabilizante está ubicada en dicha región de hebra doble.

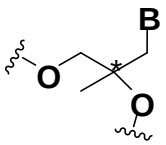
En una forma de realización, la modificación térmicamente desestabilizante se selecciona del grupo que consiste en

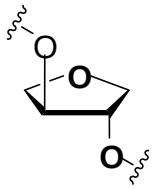


,


,




,


, y


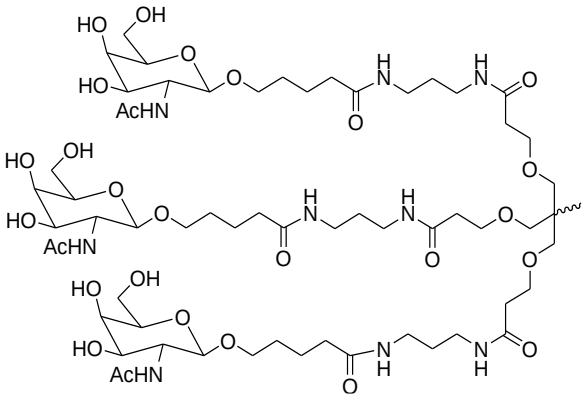
,

en donde B es una nucleobase.

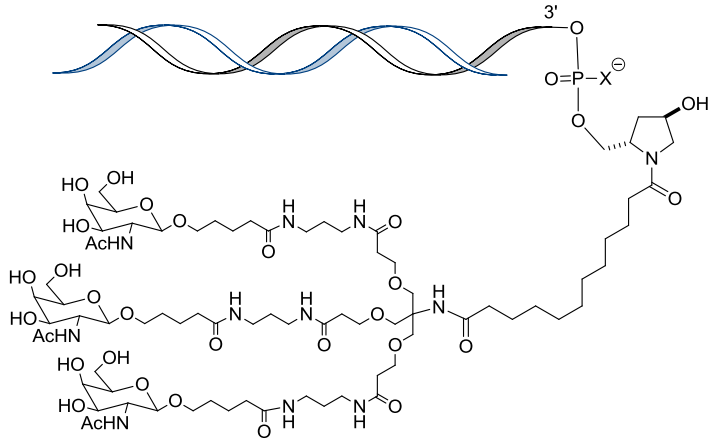
En una forma de realización, la modificación desestabilizante se ubica en la posición 7 de la hebra antisentido.

En una forma de realización, el ligando del ASGPR está compuesto por uno o más derivados de GalNAc que están unidos por medio de un conector bivalente o trivalente ramificado.

En una forma de realización, el ligando del ASGPR es



En una forma de realización, el agente de ARNhd está conjugado con el ligando representado en el siguiente esquema:



en donde X es O o S;

En un aspecto, la presente invención provee un agente de ARN de hebra doble (ARNhd) que inhibe la expresión de una secuencia genética blanco de un inhibidor de serina peptidasa, clado A, miembro 1 (Serpina1), que comprende una hebra sentido y una hebra antisentido, en donde la hebra antisentido tiene una complementariedad suficiente con una secuencia blanco como para mediar la interferencia de ARN, en donde la hebra antisentido comprende por lo menos una modificación térmicamente desestabilizante en las primeras 9 posiciones de nucleótido de la región 5', en donde cada una de la hebra sentido y la hebra antisentido son de manera independiente de entre

14 y 40 nucleótidos de longitud, y en donde el ARNhd tiene una temperatura de fusión de entre aproximadamente 40 °C y aproximadamente 80 °C.

En otro aspecto, la presente invención provee un agente de ARN de hebra doble (ARNhd) que inhibe la expresión de una secuencia genética blanco de un inhibidor de serina peptidasa, clado A, miembro 1 (Serpina1), que comprende una hebra sentido y una hebra antisentido, en donde la hebra sentido comprende por lo menos 15 nucleótidos contiguos que difieren en no más de 3 nucleótidos de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID N°: 1, y la hebra antisentido comprende por lo menos 15 nucleótidos contiguos que difieren en no más de 3 nucleótidos de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID N°: 15, en donde la hebra antisentido comprende por lo menos una modificación térmicamente desestabilizante en las primeras 9 posiciones de nucleótido de la región 5', en donde cada una de la hebra sentido y la hebra antisentido son de manera independiente de entre 14 y 40 nucleótidos de longitud, y en donde el ARNhd tiene una temperatura de fusión de entre aproximadamente 40 °C y aproximadamente 80 °C.

En aún otro aspecto, la presente invención provee un agente de ARN de hebra doble (ARNhd) que inhibe la expresión de una secuencia genética blanco de un inhibidor de serina peptidasa, clado A, miembro 1 (Serpina1), que comprende una hebra sentido y una hebra antisentido, dicha hebra antisentido comprende una región de complementariedad con un ARNm que codifica Serpina1, en donde la región de complementariedad comprende por lo menos 15 nucleótidos contiguos que difieren en no más de 3 nucleótidos de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID N°: 15, en donde la hebra antisentido comprende por lo menos una modificación térmicamente desestabilizante en

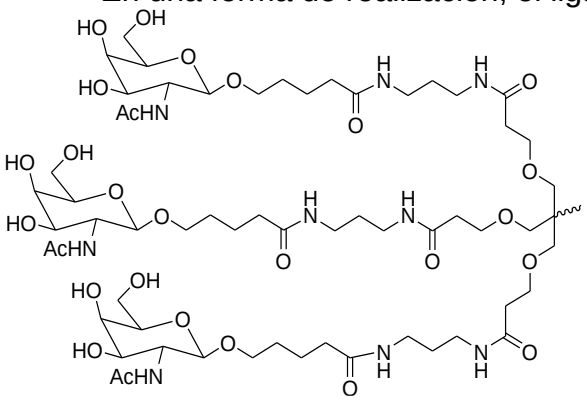
las primeras 9 posiciones de nucleótido de la región 5', en donde cada una de la hebra sentido y la hebra antisentido son de manera independiente de entre 14 y 40 nucleótidos de longitud, y en donde el ARNhd tiene una temperatura de fusión de entre aproximadamente 40 °C y aproximadamente 80 °C.

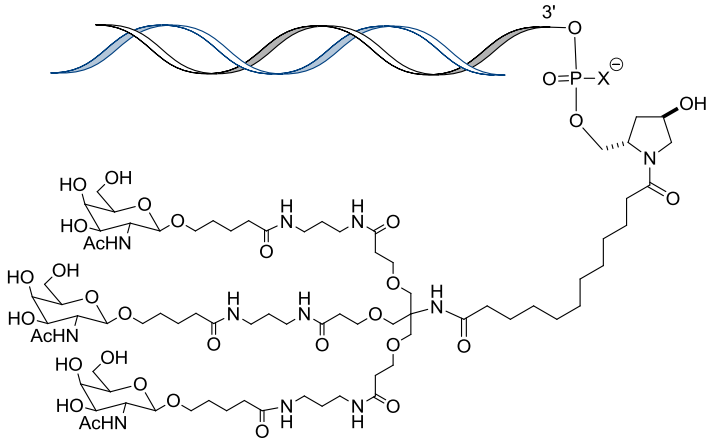
En una forma de realización, el agente de ARNhd tiene una temperatura de fusión de entre aproximadamente 55 °C y aproximadamente 67 °C. En otra forma de realización, el agente de ARNhd tiene una temperatura de fusión de entre aproximadamente 60 °C y aproximadamente 67 °C.

En una forma de realización, el agente de ARNhd comprende además un ligando del receptor de la asialoglicoproteína (ASGPR).

En una forma de realización, el ligando del ASGPR está compuesto por uno o más derivados de GalNAc que están unidos por medio de un conector bivalente o trivalente ramificado.

En una forma de realización, el ligando del ASGPR es


HO
OH
O
HO
AcHN
O
H
N
O
O
O



en donde X es O o S;

En una forma de realización, el agente de ARNhd presenta además por lo menos una de las siguientes características: (i) la hebra antisentido comprende 2, 3, 4, 5 ó 6 nucleótidos que comprenden modificaciones 2'-fluoro (ii) la hebra antisentido comprende 1, 2, 3 ó 4 enlaces internucleótidos de fosforotioato; (iii) la hebra sentido está conjugada con un ligando; (iv) la hebra sentido comprende 2, 3, 4 ó 5 nucleótidos que comprenden una modificación 2'-fluoro; (v) la hebra sentido comprende 1, 2, 3 ó 4 enlaces internucleótidos de fosforotioato; (vi) el ARNhd comprende por lo menos cuatro nucleótidos que comprenden una modificación 2'-fluoro; (vii) el ARNhd comprende una región de hebra doble de 12-40 pares de nucleótidos de longitud; y (viii) un extremo romo en el extremo 5' de la hebra antisentido.

En algunas formas de realización, cada hebra del agente de ARNhd puede comprender 15-30 nucleótidos, 19-30 nucleótidos; o la hebra sentido puede comprender 21 nucleótidos, y la hebra antisentido puede comprender 23 nucleótidos.

En una forma de realización, la hebra antisentido comprende una región de complementariedad que comprende por lo menos 15 nucleótidos contiguos

que difieren en no más de 3 nucleótidos de los nucleótidos 1440-1480 de la SEQ ID N°: 1; o de los nucleótidos 1441-1479 de la SEQ ID N°: 1; o de los nucleótidos 1442-1478 de la SEQ ID N°: 1; o de los nucleótidos 1443-1477 de la SEQ ID N°: 1; o de los nucleótidos 1444-1476 de la SEQ ID N°: 1; o de los nucleótidos 1445-1475 de la SEQ ID N°: 1; o de los nucleótidos 1446-1474 de la SEQ ID N°: 1; o de los nucleótidos 1447-1473 de la SEQ ID N°: 1; o de los nucleótidos 1448-1473 de la SEQ ID N°: 1; o de los nucleótidos 1448-1472 de la SEQ ID N°: 1; o de los nucleótidos 1448-1471 de la SEQ ID N°: 1; o de los nucleótidos 1448-1470 de la SEQ ID N°: 1; o de los nucleótidos 1447-1469 de la SEQ ID N°: 1; o de los nucleótidos 1446-1478 de la SEQ ID N°: 1; o de los nucleótidos 1449-1471 de la SEQ ID N°: 1; o de los nucleótidos 1450-1472 de la SEQ ID N°: 1; o de los nucleótidos 1440-1475 de la SEQ ID N°: 1; o de los nucleótidos 1445-1480 de la SEQ ID N°: 1; o de los nucleótidos 1445-1475 de la SEQ ID N°: 1.

En una forma de realización, la región de complementariedad comprende por lo menos 15 nucleótidos contiguos que difieren en no más de 3 nucleótidos de la secuencia de nucleótidos 5’ – UUUUGUUCAAUCAUUAAGAAGAC – 3’ (SEQ ID N°: 419).

En una forma de realización, la hebra sentido comprende la secuencia de nucleótidos 5’ – CUUCUUAAUGAUUGAACAAAA – 3’ (SEQ ID N°: 417) y la hebra antisentido comprende la secuencia de nucleótidos 5’ – UUUUGUUCAAUCAUUAAGAAGAC – 3’ (SEQ ID N°: 419).

En una forma de realización, la hebra sentido comprende la secuencia de nucleótidos 5’ - csusucuuAfaUfGfAfuugaacaaaa – 3’ (SEQ ID N°: 33) y la hebra antisentido comprende la secuencia de nucleótidos 5’ –

usUfsuugu(Tgn)caaucaUfuAfagaagsasc – 3’ (SEQ ID N°: 34), en donde a, g, c y u son A, G, C y U 2'-O-metilo (2'-OMe), respectivamente; Af, Gf, Cf y Uf son A, G, C y U 2'-fluoro, respectivamente; s es un enlace fosforotioato; y (Tgn) es un isómero S de ácido timidina-glicol nucleico (GNA).

En un aspecto, la presente invención provee una molécula de ARN de hebra doble (ARNhd) que inhibe la expresión de un gen de un inhibidor de serina peptidasa, clado A, miembro 1 (Serpina1), que comprende una hebra sentido y una hebra antisentido que forman una región de hebra doble, en donde la hebra sentido comprende la secuencia de nucleótidos 5’ - csusucuuAfaUfGfAfuugaacaaaaL96 – 3’ (SEQ ID N°: 35) y la hebra antisentido comprende la secuencia de nucleótidos 5’ – usUfsuugu(Tgn)caaucaUfuAfagaagsasc – 3’ (SEQ ID N°: 34), en donde a, g, c y u son A, G, C y U 2'-O-metilo (2'-OMe), respectivamente; Af, Gf, Cf y Uf son A, G, C y U 2'-fluoro, respectivamente; s es un enlace fosforotioato; (Tgn) es un isómero S de ácido timidina-glicol nucleico (GNA); y L96 es N-[tris(GalNAc-alquil)-amidodecanoíl)]-4-hidroxiprolinol.

En un aspecto la invención provee un agente de ARNhd que inhibe la expresión de un gen de un inhibidor de serina peptidasa, clado a, miembro 1 (Serpina1), que comprende una hebra sentido y una hebra antisentido, donde cada hebra tiene entre 14 y 40 nucleótidos, en donde la hebra antisentido tiene una complementariedad suficiente con una secuencia de Serpina1 blanco, por ejemplo, los nucleótidos 1440-1480 de la SEQ ID N°: 1, para mediar la interferencia de ARN y en donde la hebra antisentido comprende por lo menos una modificación térmicamente desestabilizante del dúplex en la región de siembra (es decir, en las posiciones 2-9 del extremo 5’ de la hebra antisentido,

contando desde el extremo 5'), y el ARNhd presenta además por lo menos una (por ejemplo, una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho o las nueve) de las siguientes características: (i) una temperatura de fusión (T_m) de entre aproximadamente 40 °C y aproximadamente 80 °C; (ii) la secuencia antisentido comprende 2, 3, 4, 5 ó 6 modificaciones 2'-fluoro; (iii) la secuencia antisentido comprende 1, 2, 3 ó 4 enlaces internucleótidos de fosforotioato; (iv) la hebra sentido está conjugada con un ligando; (v) la hebra sentido comprende 2, 3, 4 ó 5 modificaciones 2'-fluoro; (vi) la hebra sentido comprende 1, 2, 3 ó 4 enlaces internucleótidos de fosforotioato; (vii) el ARNhd comprende por lo menos cuatro modificaciones 2'-fluoro; (viii) el ARNhd comprende una región dúplex de 12-40 pares de nucleótidos de longitud; y (ix) un extremo romo en el extremo 5' de la hebra antisentido.

En algunas formas de realización, la invención provee un agente de ARNhd que inhibe la expresión de un gen de un inhibidor de serina peptidasa, clado a, miembro 1 (Serpina1), que comprende una hebra sentido y una hebra antisentido, donde cada hebra tiene entre 14 y 40 nucleótidos, en donde la hebra antisentido tiene una complementariedad suficiente con una secuencia de Serpina1 blanco, por ejemplo, los nucleótidos 1440-1480 de la SEQ ID N°: 1, para mediar la interferencia de ARN y en donde la hebra antisentido comprende por lo menos una modificación térmicamente desestabilizante del dúplex en la región de siembra (es decir, en las posiciones 2-9 del extremo 5' de la hebra antisentido, contando desde el extremo 5'), y el ARNhd presenta además por lo menos una (por ejemplo, una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho o las nueve) de las siguientes características: (i) una temperatura de fusión (T_m) de entre aproximadamente 40 °C y aproximadamente 80 °C; (ii)

la secuencia antisentido comprende 6, 7, 8, 9, 10, 11 ó 12 modificaciones 2'-OMe; (iii) la secuencia antisentido comprende 1, 2, 3 ó 4 enlaces internucleótidos de fosforotioato; (iv) la hebra sentido está conjugada con un ligando; (v) la hebra sentido comprende 6, 7, 8, 9, 10, 11 ó 12 modificaciones 2'-OMe; (vi) la hebra sentido comprende 1, 2, 3 ó 4 enlaces internucleótidos de fosforotioato; (vii) el ARNhd comprende por lo menos 1, 2, 3, 4 ó 5 modificaciones 2'-desoxi; (viii) el ARNhd comprende una región dúplex de 12-40 pares de nucleótidos de longitud; y (ix) un extremo romo en el extremo 5' de la hebra antisentido.

En algunas formas de realización, el ARNhd tiene una temperatura de fusión cuyos extremos comprenden entre el extremo inferior del rango de aproximadamente 40 °C, 45 °C, 50 °C, 55 °C, 60 °C o 65 °C, y el extremo superior del rango entre aproximadamente 70 °C, 75 °C u 80 °C. En algunas formas de realización, el ARNhd tiene una temperatura de fusión en el rango entre aproximadamente 55 °C y aproximadamente 70 °C. En algunas formas de realización, el ARNhd tiene una temperatura de fusión en el rango entre aproximadamente 57 °C y aproximadamente 67 °C. En algunas formas de realización particulares, el ARNhd tiene una temperatura de fusión en el rango entre aproximadamente 60 °C y aproximadamente 67 °C. En algunas formas de realización adicionales, el ARNhd tiene una temperatura de fusión en el rango entre aproximadamente 62 °C y aproximadamente 66 °C.

También se ha descubierto que los agentes de ARNhd que tienen una temperatura de fusión de por lo menos 60 °C son más efectivos *in vivo* e *in vitro*. Por consiguiente, en algunas formas de realización, el ARNhd tiene una temperatura de fusión de por lo menos 60 °C.

En algunas formas de realización, el agente de ARNhd comprende una hebra sentido y una hebra antisentido, donde cada hebra tiene entre 14 y 40 nucleótidos, en donde la hebra antisentido tiene una complementariedad suficiente con una secuencia de Serpina1 blanco, por ejemplo, los nucleótidos 1440-1480 de la SEQ ID N°: 1, para mediar la interferencia de ARN y en donde la hebra antisentido comprende por lo menos una modificación térmicamente desestabilizante del dúplex en la región de siembra (es decir, en las posiciones 2-9 del extremo 5' de la hebra antisentido, contando desde el extremo 5'), el ARNhd tiene una temperatura de fusión (T_m) de entre aproximadamente 40 °C y aproximadamente 80 °C, y el ARNhd opcionalmente presenta además por lo menos una (por ejemplo, una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete o las ocho) de las siguientes características: (i) la secuencia antisentido comprende 2, 3, 4, 5 ó 6 modificaciones 2'-fluoro; (ii) la secuencia antisentido comprende 1, 2, 3 ó 4 enlaces internucleótidos de fosforotioato; (iii) la hebra sentido está conjugada con un ligando; (iv) la hebra sentido comprende 2, 3, 4 ó 5 modificaciones 2'-fluoro; (v) la hebra sentido comprende 1, 2, 3 ó 4 enlaces internucleótidos de fosforotioato; (vi) el ARNhd comprende por lo menos cuatro modificaciones 2'-fluoro; (vii) el ARNhd comprende una región dúplex de 12-40 pares de nucleótidos de longitud; y (viii) un extremo romo en el extremo 5' de la hebra antisentido.

En algunas formas de realización, el agente de ARNhd tiene una región dúplex de 12-40 pares de nucleótidos de longitud, en donde la hebra antisentido comprende por lo menos una modificación térmicamente desestabilizante del dúplex en la región de siembra (es decir, en las posiciones 2-9 del extremo 5' de la hebra antisentido, contando desde el extremo 5'), y el

ARNhd tiene una T_m de entre aproximadamente 40 °C y aproximadamente 80 °C, y en donde el ARNhd opcionalmente presenta además por lo menos una (por ejemplo, una, dos, tres, cuatro, cinco, seis o las siete) de las siguientes características: (i) la secuencia antisentido comprende 2, 3, 4, 5 ó 6 modificaciones 2'-fluoro; (ii) la secuencia antisentido comprende 1, 2, 3 ó 4 enlaces internucleótidos de fosforotioato; (iii) la hebra sentido está conjugada con un ligando; (iv) la hebra sentido comprende 2, 3, 4 ó 5 modificaciones 2'-fluoro; (v) la hebra sentido comprende 1, 2, 3 ó 4 enlaces internucleótidos de fosforotioato; (vi) el ARNhd comprende por lo menos cuatro modificaciones 2'-fluoro; y vii) un extremo romo en el extremo 5' de la hebra antisentido.

En algunas formas de realización, el agente de ARNhd tiene una región dúplex de 19, 21, 22 ó 23 pares de bases de nucleótidos de longitud, en donde la hebra antisentido contiene por lo menos una modificación térmicamente desestabilizante del dúplex ubicada en la región de siembra de la hebra antisentido (es decir, en las posiciones 2-9 del extremo 5' de la hebra antisentido), y en donde el ARNhd tiene una temperatura de fusión de entre aproximadamente 40 °C y aproximadamente 80 °C.

En algunas formas de realización, el agente de ARNhd tiene una región dúplex de 19, 21, 22 ó 23 pares de bases de nucleótidos de longitud, en donde la hebra antisentido contiene por lo menos una modificación térmicamente desestabilizante del dúplex ubicada en la región de siembra de la hebra antisentido (es decir, en las posiciones 2-9 del extremo 5' de la hebra antisentido), y en donde el ARNhd tiene una temperatura de fusión de entre aproximadamente 40 °C y aproximadamente 80 °C (por ejemplo, 40 °C, 50 °C, 60 °C, 70 °C u 80 °C).

En algunas formas de realización particulares, la modificación térmicamente desestabilizante del dúplex se encuentra en la posición 5, 6, 7 ú 8 de la hebra antisentido, contando desde el extremo 5’ de la hebra antisentido.

En algunas formas de realización particulares, la modificación térmicamente desestabilizante del dúplex se encuentra en la posición 6 de la hebra antisentido, contando desde el extremo 5’ de la hebra antisentido.

En algunas formas de realización particulares, la modificación térmicamente desestabilizante del dúplex se encuentra en la posición 7 de la hebra antisentido, contando desde el extremo 5’ de la hebra antisentido.

En algunas formas de realización, el agente de ARNhd comprende una hebra sentido y una hebra antisentido, donde cada hebra tiene entre 14 y 40 nucleótidos, en donde la hebra antisentido tiene una complementariedad suficiente con una secuencia de Serpina1 blanco, por ejemplo, los nucleótidos 1440-1480 de la SEQ ID N°: 1, para mediar la interferencia de ARN y en donde la hebra antisentido comprende por lo menos una modificación térmicamente desestabilizante del dúplex en la región de siembra (es decir, en las posiciones 2-9 del extremo 5’ de la hebra antisentido, contando desde el extremo 5’), en donde el ARNhd tiene una temperatura de fusión de entre aproximadamente 40 °C y aproximadamente 80 °C, y la hebra antisentido comprende además una o ambas de las siguientes características:

(i) 2, 3, 4, 5 ó 6 modificaciones 2’-fluoro; y

(ii) 1, 2, 3 ó 4 enlaces internucleótidos de fosforotioato; y

la hebra sentido comprende una, dos o tres de las siguientes características:

(i) un ligando conjugado con la hebra sentido;

(ii) 2, 3, 4 ó 5 modificaciones 2’-fluoro; y

(iii) 1, 2, 3 ó 4 enlaces internucleótidos de fosforotioato.

En algunas formas de realización, el agente de ARNhd comprende una hebra sentido y una hebra antisentido, donde cada hebra tiene entre 14 y 40 nucleótidos, en donde la hebra antisentido tiene una complementariedad suficiente con la secuencia de Serpina1 blanco, por ejemplo, los nucleótidos 1440-1480 de la SEQ ID N°: 1, para mediar la interferencia de ARN y en donde la hebra antisentido comprende por lo menos una modificación térmicamente desestabilizante del dúplex en las primeras 9 posiciones de nucleótido contando desde el extremo 5’, y un ligando está conjugado con la hebra sentido, y en donde el ARNhd tiene una temperatura de fusión de entre aproximadamente 40 °C y aproximadamente 80 °C.

En algunas formas de realización, el agente de ARNhd comprende una hebra sentido y una hebra antisentido, donde cada hebra tiene entre 14 y 40 nucleótidos, en donde la hebra antisentido tiene una complementariedad suficiente con una secuencia de Serpina1 blanco, por ejemplo, los nucleótidos 1440-1480 de la SEQ ID N°: 1, para mediar la interferencia de ARN y en donde la hebra antisentido comprende por lo menos una modificación térmicamente desestabilizante del dúplex en las primeras 9 posiciones de nucleótido contando desde el extremo 5’, un ligando está conjugado con la hebra sentido, y el ARNhd comprende por lo menos cuatro modificaciones 2’-fluoro.

En algunas formas de realización, el agente de ARNhd comprende una hebra sentido y una hebra antisentido, donde cada hebra tiene entre 14 y 40 nucleótidos, en donde la hebra antisentido tiene una complementariedad suficiente con una secuencia de Serpina1 blanco, por ejemplo, los nucleótidos

1440-1480 de la SEQ ID N°: 1, para mediar la interferencia de ARN, en donde el ARNhd comprende por lo menos cuatro 2'-fluoro, en donde dicha hebra antisentido comprende por lo menos una modificación térmicamente desestabilizante del dúplex en las primeras 9 posiciones de nucleótido, contando desde el extremo 5', dicha hebra sentido comprende un ligando, y en donde el ARNhd tiene una temperatura de fusión de entre aproximadamente 40 °C y aproximadamente 80 °C. En algunas otras formas de realización de esto, el ligando es un ligando del ASGPR.

En algunas formas de realización, el agente de ARNhd comprende una hebra sentido y una hebra antisentido, donde cada hebra tiene entre 14 y 40 nucleótidos, en donde la hebra antisentido tiene una complementariedad suficiente con una secuencia de Serpina1 blanco, por ejemplo, los nucleótidos 1440-1480 de la SEQ ID N°: 1, para mediar la interferencia de ARN, en donde dicha hebra antisentido comprende por lo menos una modificación térmicamente desestabilizante del dúplex ubicado en la posición 4-8, contando desde el extremo 5', en donde dicha hebra sentido comprende un ligando, en donde cada una de las hebras sentido y antisentido comprenden por lo menos dos modificaciones 2'-fluoro, y en donde el ARNhd tiene una temperatura de fusión de entre aproximadamente 40 °C y aproximadamente 80 °C. En algunas otras formas de realización de esto, el ligando es un ligando del ASGPR.

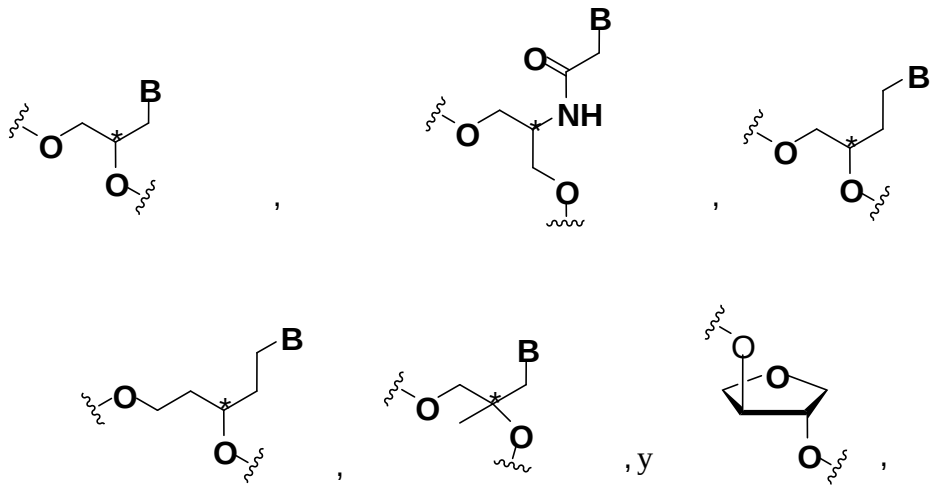
En algunas formas de realización, el agente de ARNhd comprende una hebra sentido y una hebra antisentido, donde cada hebra tiene entre 14 y 40 nucleótidos, en donde la hebra antisentido tiene una complementariedad suficiente con una secuencia de Serpina1 blanco, por ejemplo, los nucleótidos 1440-1480 de la SEQ ID N°: 1, para mediar la interferencia de ARN, en donde

el ARNhd comprende por lo menos cuatro 2’-fluoro, en donde dicha hebra antisentido comprende por lo menos una modificación térmicamente desestabilizante del dúplex en las primeras 9 posiciones de nucleótido, contando desde el extremo 5’, y en donde dicha hebra sentido comprende un ligando, en donde el ARNhd tiene una temperatura de fusión de entre aproximadamente 40 °C y aproximadamente 80 °C, y en donde la secuencia antisentido comprende además por lo menos dos de las siguientes características: (i) la modificación térmicamente desestabilizante del dúplex se ubica en la posición 4 a 8 de la hebra antisentido; (ii) por lo menos dos modificaciones 2’-fluoro; (iii) enlaces internucleótidos de fosforotioato entre las posiciones de nucleótido 1 y 2 (contando desde el extremo 5’); y la hebra antisentido tiene una longitud de 18 a 35 nucleótidos. En algunas otras formas de realización, el ligando es un ligando del ASGPR.

En algunas formas de realización, el agente de ARNhd comprende una hebra sentido y una hebra antisentido, donde cada hebra tiene entre 14 y 40 nucleótidos, en donde la hebra antisentido tiene una complementariedad suficiente con una secuencia de Serpina1 blanco, por ejemplo, los nucleótidos 1440-1480 de la SEQ ID N°: 1, para mediar la interferencia de ARN, en donde el ARNhd comprende por lo menos cuatro 2’-fluoro, en donde dicha hebra antisentido comprende por lo menos una modificación térmicamente desestabilizante del dúplex en las primeras 9 posiciones de nucleótido, contando desde el extremo 5’, y en donde dicha hebra sentido comprende un ligando, en donde el ARNhd tiene una temperatura de fusión de entre aproximadamente 40 °C y aproximadamente 80 °C, y la hebra sentido presenta por lo menos una de las siguientes características: (i) el ligando está unido a

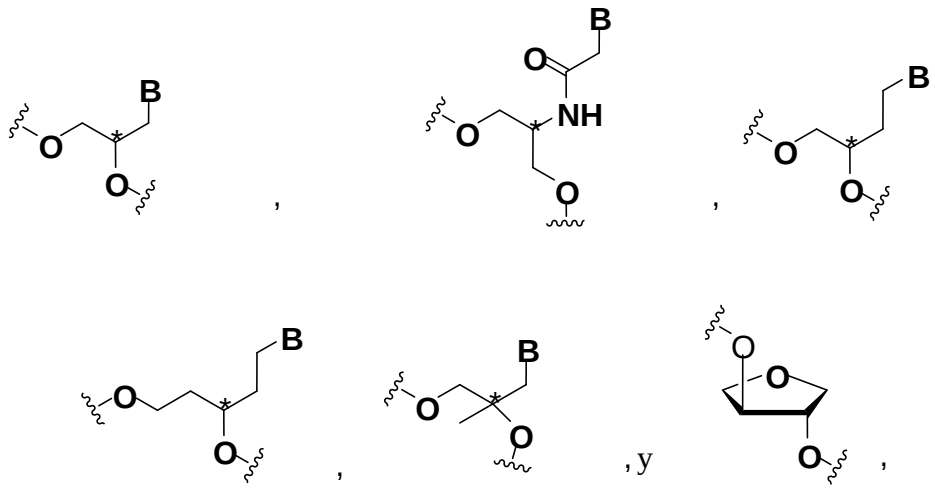
cualquiera de los extremos de la hebra sentido; (ii) la hebra sentido comprende por lo menos dos modificaciones 2'-fluoro; y (iii) la hebra sentido y la hebra antisentido tienen una complementariedad suficiente como para formar una región de hebra doble que abarca por lo menos 19 posiciones de nucleótido y en donde la modificación térmicamente desestabilizante del dúplex está ubicada en dicha región de hebra doble.

En algunas formas de realización, el agente de ARNhd comprende una hebra sentido y una hebra antisentido, donde cada hebra tiene entre 14 y 40 nucleótidos, en donde la hebra antisentido tiene una complementariedad suficiente con una secuencia de Serpina1 blanco, por ejemplo, los nucleótidos 1440-1480 de la SEQ ID N°: 1, para mediar la interferencia de ARN, en donde el ARNhd comprende por lo menos cuatro 2'-fluoro, en donde dicha hebra antisentido comprende por lo menos una modificación térmicamente desestabilizante del dúplex en las primeras 9 posiciones de nucleótido, contando desde el extremo 5', y en donde dicha hebra sentido comprende un ligando, en donde el ARNhd tiene una temperatura de fusión de entre aproximadamente 40 °C y aproximadamente 80 °C, y en donde la modificación térmicamente desestabilizante del dúplex se selecciona del grupo que consiste en:



en donde B es una nucleobase modificada o no modificada y el asterisco sobre cada estructura indica ya sea *R*, *S* o *racémico.*

En algunas formas de realización, el agente de ARNhd comprende una hebra sentido y una hebra antisentido, donde cada hebra tiene entre 14 y 40 nucleótidos, en donde la hebra antisentido tiene una complementariedad suficiente con una secuencia de Serpina1 blanco, por ejemplo, los nucleótidos 1440-1480 de la SEQ ID N°: 1, para mediar la interferencia de ARN, en donde dicha hebra antisentido comprende por lo menos una modificación térmicamente desestabilizante del dúplex ubicado en las posiciones 4-8, contando desde el extremo 5', en donde dicha hebra sentido comprende un ligando, y en donde cada una de las hebras sentido y antisentido comprenden por lo menos dos modificaciones 2'-fluoro, en donde el ARNhd tiene una temperatura de fusión de entre aproximadamente 40 °C y aproximadamente 80 °C, y en donde la modificación térmicamente desestabilizante del dúplex se selecciona del grupo que consiste en:

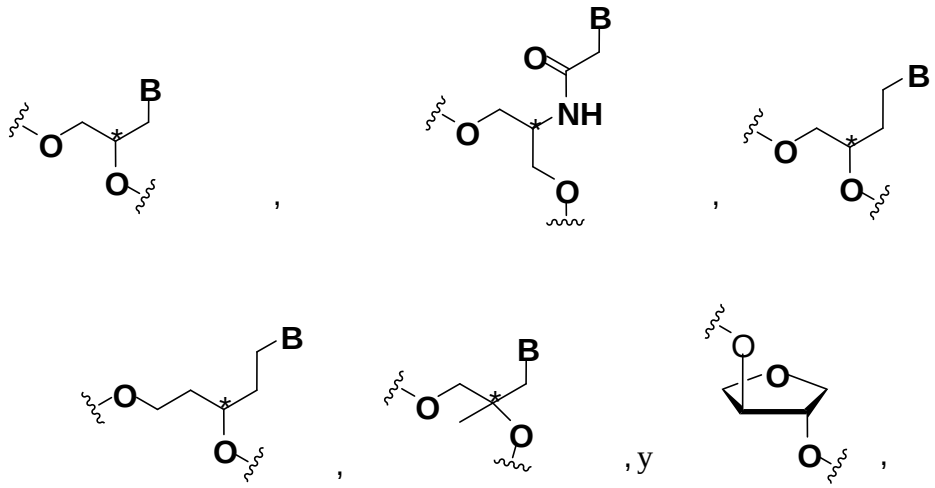


en donde B es una nucleobase modificada o no modificada y el asterisco sobre cada estructura indica ya sea *R*, *S* o *racémico.*

En algunas formas de realización, el agente de ARNhd comprende una hebra sentido y una hebra antisentido, donde cada hebra tiene entre 14 y 40 nucleótidos, en donde la hebra antisentido tiene una complementariedad suficiente con una secuencia de Serpina1 blanco, por ejemplo, los nucleótidos 1440-1480 de la SEQ ID N°: 1, para mediar la interferencia de ARN, en donde el ARNhd comprende por lo menos cuatro 2'-fluoro, en donde dicha hebra antisentido comprende por lo menos una modificación térmicamente desestabilizante del dúplex ubicado en la posición 7, contando desde el extremo 5' de la hebra antisentido, en donde dicha hebra sentido comprende un ligando, y en donde el ARNhd tiene una temperatura de fusión de entre aproximadamente 40 °C y aproximadamente 80 °C.

En algunas formas de realización, el agente de ARNhd comprende una hebra sentido y una hebra antisentido, donde cada hebra tiene entre 14 y 40 nucleótidos, en donde la hebra antisentido tiene una complementariedad suficiente con una secuencia de Serpina1 blanco, por ejemplo, los nucleótidos

1440-1480 de la SEQ ID N°: 1, para mediar la interferencia de ARN, en donde dicha hebra antisentido comprende por lo menos una modificación térmicamente desestabilizante del dúplex ubicado en la posición 7, contando desde el extremo 5', en donde dicha hebra sentido comprende un ligando, y en donde cada una de las hebras sentido y antisentido comprenden por lo menos dos modificaciones 2'-fluoro, en donde el ARNhd tiene una temperatura de fusión de entre aproximadamente 40 °C y aproximadamente 80 °C, y en donde la modificación térmicamente desestabilizante del dúplex se selecciona del grupo que consiste en:

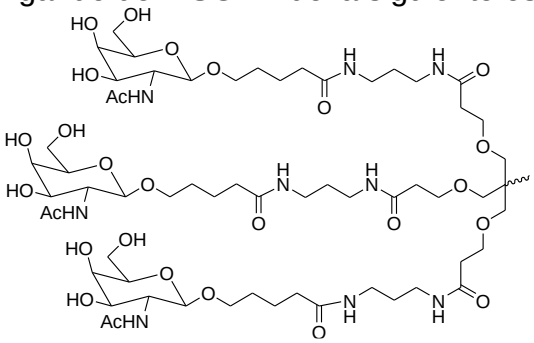


en donde B es una nucleobase modificada o no modificada y el asterisco sobre cada estructura indica ya sea *R*, *S* o *racémico.*

En algunas formas de realización, el agente de ARNhd comprende una hebra sentido y una hebra antisentido, donde cada hebra tiene entre 14 y 40 nucleótidos, en donde la hebra antisentido tiene una complementariedad suficiente con una secuencia de Serpina1 blanco, por ejemplo, los nucleótidos 1440-1480 de la SEQ ID N°: 1, para mediar la interferencia de ARN, en donde el ARNhd comprende por lo menos cuatro 2'-fluoro, en donde dicha hebra

antisentido comprende por lo menos una modificación térmicamente desestabilizante del dúplex en las primeras 9 posiciones de nucleótido, contando desde el extremo 5', en donde dicha hebra sentido comprende un ligando, en donde el ARNhd tiene una temperatura de fusión de entre aproximadamente 40 °C y aproximadamente 80 °C, y en donde el ligando comprende uno o más derivados de GalNAc unidos por medio de un conector ramificado bivalente o trivalente.

En algunas formas de realización, el agente de ARNhd comprende una hebra sentido y una hebra antisentido, donde cada hebra tiene entre 14 y 40 nucleótidos, en donde la hebra antisentido tiene una complementariedad suficiente con una secuencia de Serpina1 blanco, por ejemplo, los nucleótidos 1440-1480 de la SEQ ID N°: 1, para mediar la interferencia de ARN, en donde el ARNhd comprende por lo menos cuatro 2'-fluoro, en donde dicha hebra antisentido comprende por lo menos una modificación térmicamente desestabilizante del dúplex en las primeras 9 posiciones de nucleótido, contando desde el extremo 5', y en donde dicha hebra sentido comprende un ligando, en donde el ARNhd tiene una temperatura de fusión de entre aproximadamente 40 °C y aproximadamente 80 °C, y en donde el ligando es un ligando del ASGPR de la siguiente estructura:


HO
OH
O
HO
AcHN
O
H
N
O
O
O

de manera independiente, de 19, 20, 21, 22, 23, 24 ó 25 nucleótidos de longitud; la hebra antisentido contiene por lo menos un nucleótido térmicamente desestabilizante, donde dicho por lo menos un nucleótido térmicamente desestabilizante se encuentra en la región de siembra de la hebra antisentido (es decir, en las posiciones 2-9 del extremo 5’ de la hebra antisentido); en donde la hebra sentido está conjugada con un ligando, comprende 3 ó 4 modificaciones 2’-fluoro, y comprende 0, 1 ó 2 enlaces internucleótidos de fosforotioato; en donde la hebra antisentido comprende 3, 4, 5 ó 6 modificaciones 2’-fluoro, comprende 2, 3 ó 4 enlaces internucleótidos de fosforotioato; en donde el ARNhd tiene una temperatura de fusión de entre aproximadamente 40 °C y aproximadamente 80 °C; y en donde el ARNhd opcionalmente presenta además por lo menos una (por ejemplo, una, dos o las tres) de las siguientes características: (i) el ARNhd comprende una región dúplex de 12-25 pares de nucleótidos de longitud; (ii) el ARNhd comprende un extremo romo en el extremo 5’ de la hebra antisentido; y (iii) el ARNhd presenta una sobreextensión de por lo menos dos nucleótidos en el extremo 3’ de la hebra antisentido.

En algunas formas de realización, las hebras sentido y antisentido son, de manera independiente, de 19, 20, 21, 22, 23, 24 ó 25 nucleótidos de longitud; la hebra antisentido contiene por lo menos un nucleótido térmicamente desestabilizante, donde dicho por lo menos un nucleótido térmicamente desestabilizante se encuentra en la región de siembra de la hebra antisentido (es decir, en las posiciones 2-9 del extremo 5’ de la hebra antisentido); en donde la hebra sentido está conjugada con un ligando, comprende modificaciones 2’-fluoro en las posiciones 7, 10 y 11 o en las

posiciones 7, 9, 10 y 11 (contando desde el extremo 5’ de la hebra sentido) y, opcionalmente, comprende enlaces internucleótidos de fosforotioato entre las posiciones de nucleótido 1 y 2, y entre las posiciones de nucleótido 2 y 3; en donde la hebra antisentido comprende 3, 4, 5 ó 6 modificaciones 2’-fluoro, comprende 2, 3 ó 4 enlaces internucleótidos de fosforotioato; en donde el ARNhd tiene una temperatura de fusión de entre aproximadamente 40 °C y aproximadamente 80 °C; y en donde el ARNhd opcionalmente presenta además por lo menos una (por ejemplo, una, dos o las tres) de las siguientes características: (i) el ARNhd comprende una región dúplex de 12-25 pares de nucleótidos de longitud; (ii) el ARNhd comprende un extremo romo en el extremo 5’ de la hebra antisentido; y (iii) el ARNhd tiene una sobreextensión de por lo menos dos nucleótidos en el extremo 3’ de la hebra antisentido.

En algunas formas de realización, las hebras sentido y antisentido son, de manera independiente, de 19, 20, 21, 22, 23, 24 ó 25 nucleótidos de longitud; la hebra antisentido contiene por lo menos un nucleótido térmicamente desestabilizante, donde dicho por lo menos un nucleótido térmicamente desestabilizante se encuentra en la región de siembra de la hebra antisentido (es decir, en las posiciones 2-9 del extremo 5’ de la hebra antisentido); en donde la hebra sentido está conjugada con un ligando, comprende 3 ó 4 modificaciones 2’-fluoro y comprende 0 ó 2 enlaces internucleótidos de fosforotioato; en donde la hebra antisentido comprende modificaciones 2’-fluoro en las posiciones 2, 6, 8, 9, 14 ó 16, o en las posiciones 2, 6, 14 ó 16, o en las posiciones 2, 14 y 16; y la secuencia antisentido comprende enlaces internucleótidos de fosforotioato entre las posiciones de nucleótido 21 y 22, y entre las posiciones de nucleótido 22 y 23;

en donde el ARNhd tiene una temperatura de fusión de entre aproximadamente 40 °C y aproximadamente 80 °C; y en donde el ARNhd opcionalmente presenta además por lo menos una (por ejemplo, una, dos o las tres) de las siguientes características: (i) el ARNhd comprende una región dúplex de 12-25 pares de nucleótidos de longitud; (ii) el ARNhd comprende un extremo romo en el extremo 5’ de la hebra antisentido; y (iii) el ARNhd tiene una sobreextensión de por lo menos dos nucleótidos en el extremo 3’ de la hebra antisentido.

En algunas formas de realización, las hebras sentido y antisentido son, de manera independiente, de 19, 20, 21, 22, 23, 24 ó 25 nucleótidos de longitud; la hebra antisentido contiene por lo menos un nucleótido térmicamente desestabilizante, donde dicho por lo menos un nucleótido térmicamente desestabilizante se encuentra en la región de siembra de la hebra antisentido (es decir, en las posiciones 2-9 del extremo 5’ de la hebra antisentido); en donde la hebra sentido está conjugada con un ligando, comprende 3 ó 4 modificaciones 2’-fluoro y comprende 0 ó 2 enlaces internucleótidos de fosforotioato; en donde la hebra antisentido comprende modificaciones 2’-fluoro en las posiciones 2, 6, 8, 9, 14 ó 16, o en las posiciones 2, 6, 14 ó 16, o en las posiciones 2, 14 y 16; y la secuencia antisentido comprende enlaces internucleótidos de fosforotioato entre las posiciones de nucleótido 21 y 22, entre las posiciones de nucleótido 22 y 23, entre las posiciones de nucleótido 1 y 2, entre las posiciones de nucleótido 2 y 3; en donde el ARNhd tiene una temperatura de fusión de entre aproximadamente 40 °C y aproximadamente 80 °C; y en donde el ARNhd opcionalmente presenta además por lo menos una (por ejemplo, una, dos o las tres) de las siguientes características: (i) el ARNhd comprende una región

dúplex de 12-25 pares de nucleótidos de longitud; (ii) el ARNhd comprende un extremo romo en el extremo 5’ de la hebra antisentido; y (iii) el ARNhd tiene una sobreextensión de por lo menos dos nucleótidos en el extremo 3’ de la hebra antisentido.

En algunas formas de realización, las hebras sentido y antisentido son, de manera independiente, de 19, 20, 21, 22, 23, 24 ó 25 nucleótidos de longitud; la hebra antisentido contiene por lo menos un nucleótido térmicamente desestabilizante, donde dicho por lo menos un nucleótido térmicamente desestabilizante se encuentra en la región de siembra de la hebra antisentido (es decir, en las posiciones 2-9 del extremo 5’ de la hebra antisentido); en donde la hebra sentido está conjugada con un ligando, comprende modificaciones 2’-fluoro en las posiciones 7, 10 y 11 o en las posiciones 7, 9, 10 y 11 (contando desde el extremo 5’ de la hebra sentido) y, opcionalmente, comprende enlaces internucleótidos de fosforotioato entre las posiciones de nucleótido 1 y 2, y entre las posiciones de nucleótido 2 y 3; en donde la hebra antisentido comprende modificaciones 2’-fluoro en las posiciones 2, 6, 8, 9, 14 ó 16, o en las posiciones 2, 6, 14 ó 16, o en las posiciones 2, 14 y 16; y la secuencia antisentido comprende enlaces internucleótidos de fosforotioato entre las posiciones de nucleótido 21 y 22, y entre las posiciones de nucleótido 22 y 23; en donde el ARNhd tiene una temperatura de fusión de entre aproximadamente 40 °C y aproximadamente 80 °C; y en donde el ARNhd opcionalmente presenta además por lo menos una (por ejemplo, una, dos o las tres) de las siguientes características: (i) el ARNhd comprende una región dúplex de 12-25 pares de nucleótidos de longitud; (ii) el ARNhd comprende un extremo romo en el extremo 5’ de la hebra antisentido; y

(iii) el ARNhd tiene una sobreextensión de por lo menos dos nucleótidos en el extremo 3’ de la hebra antisentido.

En algunas formas de realización, las hebras sentido y antisentido son, de manera independiente, de 19, 20, 21, 22, 23, 24 ó 25 nucleótidos de longitud, en donde la hebra antisentido contiene por lo menos un nucleótido térmicamente desestabilizante, y donde dicho por lo menos un nucleótido térmicamente desestabilizante se encuentra en la región de siembra de la hebra antisentido (es decir, en las posiciones 2-9 del extremo 5’ de la hebra antisentido), en donde el ARNhd tiene una temperatura de fusión de entre aproximadamente 40 °C y aproximadamente 80 °C, y en donde el ARNhd opcionalmente presenta además por lo menos una (por ejemplo, una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete o las ocho) de las siguientes características: (i) la secuencia antisentido comprende 2, 3, 4, 5 ó 6 modificaciones 2’-fluoro; (ii) la secuencia antisentido comprende 1, 2, 3 ó 4 enlaces internucleótidos de fosforotioato; (iii) la hebra sentido está conjugada con un ligando; (iv) la hebra sentido comprende 2, 3, 4 ó 5 modificaciones 2’-fluoro; (v) la hebra sentido comprende 1, 2, 3 ó 4 enlaces internucleótidos de fosforotioato; (vi) el ARNhd comprende por lo menos cuatro modificaciones 2’-fluoro; (vii) el ARNhd comprende una región dúplex de 18, 19, 21, 22, 23, 24 ó 24 pares de nucleótidos de longitud; y (viii) el ARNhd comprende un extremo romo en el extremo 5’ de la hebra sentido. En algunas formas de realización particulares, la hebra sentido es de 19, 20 ó 21 ó 22 nucleótidos de longitud y la hebra antisentido es de 20, 21 ó 22 nucleótidos de longitud.

En algunas formas de realización, las hebras sentido y antisentido son, de manera independiente, de 19, 20, 21, 22, 23, 24 ó 25 nucleótidos de

longitud; la hebra antisentido contiene por lo menos un nucleótido térmicamente desestabilizante, donde dicho por lo menos un nucleótido térmicamente desestabilizante se encuentra en la región de siembra de la hebra antisentido (es decir, en las posiciones 2-9 del extremo 5’ de la hebra antisentido); en donde la hebra sentido está conjugada con un ligando, comprende modificaciones 2’-fluoro en las posiciones 7, 10 y 11 o en las posiciones 7, 9, 10 y 11 (contando desde el extremo 5’ de la hebra sentido) y, opcionalmente, comprende enlaces internucleótidos de fosforotioato entre las posiciones de nucleótido 1 y 2, y entre las posiciones de nucleótido 2 y 3; en donde la hebra antisentido comprende modificaciones 2’-fluoro en las posiciones 2, 6, 8, 9, 14 ó 16, o en las posiciones 2, 6, 14 ó 16, o en las posiciones 2, 14 y 16; y la secuencia antisentido comprende enlaces internucleótidos de fosforotioato entre las posiciones de nucleótido 21 y 22, entre las posiciones de nucleótido 22 y 23, entre las posiciones de nucleótido 1 y 2, entre las posiciones de nucleótido 2 y 3; en donde el ARNhd tiene una temperatura de fusión de entre aproximadamente 40 °C y aproximadamente 80 °C; y en donde el ARNhd opcionalmente presenta además por lo menos una (por ejemplo, una, dos o las tres) de las siguientes características: (i) el ARNhd comprende una región dúplex de 12-25 pares de nucleótidos de longitud; (ii) el ARNhd comprende un extremo romo en el extremo 5’ de la hebra antisentido; y (iii) el ARNhd tiene una sobreextensión de por lo menos dos nucleótidos en el extremo 3’ de la hebra antisentido.

En algunas formas de realización, un extremo del ARNhd es un extremo romo y el otro extremo tiene una sobreextensión, en donde la hebra antisentido contiene por lo menos un nucleótido térmicamente desestabilizante, y donde

dicho por lo menos un nucleótido térmicamente desestabilizante se encuentra en la región de siembra de la hebra antisentido (es decir, en las posiciones 2-9 del extremo 5’ de la hebra antisentido), en donde el ARNhd tiene una temperatura de fusión de entre aproximadamente 40 °C y aproximadamente 80 °C, y en donde el ARNhd opcionalmente presenta además por lo menos una (por ejemplo, una, dos, tres, cuatro, cinco, seis o las siete) de las siguientes características: (i) la secuencia antisentido comprende 2, 3, 4, 5 ó 6 modificaciones 2’-fluoro; (ii) la secuencia antisentido comprende 1, 2, 3 ó 4 enlaces internucleótidos de fosforotioato; (iii) la hebra sentido está conjugada con un ligando; (iv) la hebra sentido comprende 2, 3, 4 ó 5 modificaciones 2’-fluoro; (v) la hebra sentido comprende 1, 2, 3 ó 4 enlaces internucleótidos de fosforotioato; (vi) el ARNhd comprende por lo menos cuatro modificaciones 2’-fluoro; (vii) y el ARNhd comprende una región dúplex de 12-40 pares de nucleótidos de longitud. En algunas formas de realización, la sobreextensión se encuentra en el extremo 3’ de la hebra antisentido y el extremo romo se encuentra en el extremo 5’ de la hebra antisentido. En algunas formas de realización particulares, la sobreextensión es de 2, 3 ó 4 nucleótidos de longitud.

En algunas formas de realización, el agente de ARNhd tiene una región dúplex de 19, 21, 22 ó 23 pares de bases de nucleótidos de longitud, en donde un extremo del ARNhd es un extremo romo y el otro extremo tiene una sobreextensión, en donde la hebra antisentido contiene por lo menos una modificación térmicamente desestabilizante del dúplex ubicada en la región de siembra de la hebra antisentido (es decir, en las posiciones 2-9 del extremo 5’ de la hebra antisentido), en donde el ARNhd tiene una temperatura de fusión

de entre aproximadamente 40 °C y aproximadamente 80 °C, y en donde el ARNhd opcionalmente presenta además por lo menos una (por ejemplo, una, dos, tres, cinco o las seis) de las siguientes características: (i) la secuencia antisentido comprende 2, 3, 4, 5 ó 6 modificaciones 2'-fluoro; (ii) la secuencia antisentido comprende 1, 2, 3 ó 4 enlaces internucleótidos de fosforotioato; (iii) la hebra sentido está conjugada con un ligando; (iv) la hebra sentido comprende 2, 3, 4 ó 5 modificaciones 2'-fluoro; (v) la hebra sentido comprende 1, 2, 3 ó 4 enlaces internucleótidos de fosforotioato; y (vi) el ARNhd comprende por lo menos cuatro modificaciones 2'-fluoro, y opcionalmente la sobreextensión de 2 nucleótidos se encuentra en el extremo 3' de la hebra antisentido y el extremo romo se encuentra en el extremo 5' de la hebra antisentido. En algunas formas de realización, la sobreextensión se encuentra en el extremo 3' de la hebra antisentido y el extremo romo se encuentra en el extremo 5' de la hebra antisentido.

En algunas formas de realización, el agente de ARNhd de la invención también puede tener dos extremos romos, en ambos extremos del dúplex de ARNhd.

En algunas formas de realización, el ARNhd tiene un extremo romo en ambos extremos del dúplex, en donde la hebra antisentido contiene por lo menos un nucleótido térmicamente desestabilizante, y donde dicho por lo menos un nucleótido térmicamente desestabilizante se encuentra en la región de siembra de la hebra antisentido (es decir, en las posiciones 2-9 del extremo 5' de la hebra antisentido), en donde el ARNhd tiene una temperatura de fusión de entre aproximadamente 40 °C y aproximadamente 80 °C, y en donde el ARNhd opcionalmente presenta además por lo menos una (por ejemplo, una,

dos, tres, cuatro, cinco, seis o las siete) de las siguientes características: (i) la secuencia antisentido comprende 2, 3, 4, 5 ó 6 modificaciones 2'-fluoro; (ii) la secuencia antisentido comprende 1, 2, 3 ó 4 enlaces internucleótidos de fosforotioato; (iii) la hebra sentido está conjugada con un ligando; (iv) la hebra sentido comprende 2, 3, 4 ó 5 modificaciones 2'-fluoro; (v) la hebra sentido comprende 1, 2, 3 ó 4 enlaces internucleótidos de fosforotioato; (vi) el ARNhd comprende por lo menos cuatro modificaciones 2'-fluoro; y (vii) el ARNhd comprende una región dúplex de 12-40 pares de nucleótidos de longitud.

En algunas formas de realización, el agente de ARNhd tiene una región dúplex de 19, 21, 22 ó 23 pares de bases de nucleótidos de longitud y tiene un extremo romo en ambos extremos del dúplex, en donde un extremo del ARNhd es un extremo romo y el otro extremo tiene una sobreextensión, en donde la hebra antisentido contiene por lo menos una modificación térmicamente desestabilizante del dúplex ubicada en la región de siembra de la hebra antisentido (es decir, en las posiciones 2-9 del extremo 5' de la hebra antisentido), en donde el ARNhd tiene una temperatura de fusión de entre aproximadamente 40 °C y aproximadamente 80 °C, y en donde el ARNhd opcionalmente presenta además por lo menos una (por ejemplo, una, dos, tres, cinco o las seis) de las siguientes características: (i) la secuencia antisentido comprende 2, 3, 4, 5 ó 6 modificaciones 2'-fluoro; (ii) la secuencia antisentido comprende 1, 2, 3 ó 4 enlaces internucleótidos de fosforotioato; (iii) la hebra sentido está conjugada con un ligando; (iv) la hebra sentido comprende 2, 3, 4 ó 5 modificaciones 2'-fluoro; (v) la hebra sentido comprende 1, 2, 3 ó 4 enlaces internucleótidos de fosforotioato; y (vi) el ARNhd comprende por lo menos cuatro modificaciones 2'-fluoro.

En algunas formas de realización, el agente de ARNhd de la invención comprende una hebra sentido de 21 nucleótidos (nt) y una hebra antisentido de 23 nucleótidos (nt), en donde la hebra antisentido contiene por lo menos un nucleótido térmicamente desestabilizante, donde dicho por lo menos un nucleótido térmicamente desestabilizante está presente en la región de siembra de la hebra antisentido (es decir, en las posiciones 2-9 del extremo 5' de la hebra antisentido), en donde un extremo del ARNhd es romo, en tanto el otro extremo comprende una sobreextensión de 2 nt, en donde el ARNhd tiene una temperatura de fusión de entre aproximadamente 40 °C y aproximadamente 80 °C, y en donde el ARNhd opcionalmente presenta además por lo menos una (por ejemplo, una, dos, tres, cuatro, cinco, seis o las siete) de las siguientes características: (i) la secuencia antisentido comprende 2, 3, 4, 5 ó 6 modificaciones 2'-fluoro; (ii) la secuencia antisentido comprende 1, 2, 3 ó 4 enlaces internucleótidos de fosforotioato; (iii) la hebra sentido está conjugada con un ligando; (iv) la hebra sentido comprende 2, 3, 4 ó 5 modificaciones 2'-fluoro; (v) la hebra sentido comprende 1, 2, 3 ó 4 enlaces internucleótidos de fosforotioato; (vi) el ARNhd comprende por lo menos cuatro modificaciones 2'-fluoro; y (vii) el ARNhd comprende un extremo romo en el extremo 5' de la hebra antisentido. Preferiblemente, la sobreextensión de 2 nt se encuentra en el extremo 3' de la hebra antisentido.

En algunas formas de realización, el agente de ARNhd de la invención que comprende una hebra sentido y una hebra antisentido, en donde: la hebra sentido es de 25-30 residuos de nucleótidos de longitud, en donde, comenzando desde el nucleótido 5' terminal (posición 1), las posiciones 1 a 23 de dicha hebra sentido comprenden por lo menos 8 ribonucleótidos; la hebra

antisentido es de 36-66 residuos de nucleótidos de longitud y, comenzando desde el nucleótido 3’ terminal, por lo menos 8 ribonucleótidos en las posiciones apareadas con las posiciones 1-23 de la hebra sentido forman un dúplex; en donde por lo menos el nucleótido 3 ‘ terminal de la hebra antisentido no está apareado con la hebra sentido, y hasta 6 nucleótidos 3’ terminales consecutivos no están apareados con la hebra sentido, formando de esa manera una sobreextensión 3’ de hebra simple de 1-6 nucleótidos; en donde el extremo 5’ terminal de la hebra antisentido comprende 10-30 nucleótidos consecutivos que no están apareados con la hebra sentido, formando de esa manera una sobreextensión 5' de 10-30 nucleótidos de hebra simple; en donde por lo menos los nucleótidos 5' terminal y 3' terminal de la hebra sentido están apareados por sus bases con los nucleótidos de la hebra antisentido cuando las hebras sentido y antisentido se alinean para una complementariedad máxima, formando de esa manera una región sustancialmente dúplex entre las hebras sentido y antisentido; y la hebra antisentido es suficientemente complementaria de un ARN blanco a lo largo de por lo menos 19 ribonucleótidos de la extensión de la hebra antisentido para reducir la expresión del gen de Serpina1 blanco cuando dicho ácido nucleico de hebra doble se introduce en una célula de mamífero; y en donde la hebra antisentido contiene por lo menos un nucleótido térmicamente desestabilizante, donde por lo menos un nucleótido térmicamente desestabilizante se encuentra en la región de siembra de la hebra antisentido (es decir en las posiciones 2-9 del extremo 5’ de la hebra antisentido), y en donde el ARNhd tiene una temperatura de fusión de entre aproximadamente 40 °C y aproximadamente 80 °C. Por ejemplo, el nucleótido térmicamente desestabilizante está presente entre las posiciones

opuestas o complementarias de las posiciones 14-17 del extremo 5’ de la hebra sentido, y en donde el ARNhd opcionalmente presenta además por lo menos una (por ejemplo, una, dos, tres, cuatro, cinco, seis o las siete) de las siguientes características: (i) la secuencia antisentido comprende 2, 3, 4, 5 ó 6 modificaciones 2’-fluoro; (ii) la secuencia antisentido comprende 1, 2, 3 ó 4 enlaces internucleótidos de fosforotioato; (iii) la hebra sentido está conjugada con un ligando; (iv) la hebra sentido comprende 2, 3, 4 ó 5 modificaciones 2’-fluoro; (v) la hebra sentido comprende 1, 2, 3 ó 4 enlaces internucleótidos de fosforotioato; y (vi) el ARNhd comprende por lo menos cuatro modificaciones 2’-fluoro; y (vii) el ARNhd comprende una región dúplex de 12-30 pares de nucleótidos de longitud.

En algunas formas de realización, el agente de ARNhd de la invención comprende una hebra sentido y una hebra antisentido, en donde dicho agente de ARNhd comprende una hebra sentido que tiene una longitud que es por lo menos de 25 y como máximo de 29 nucleótidos y una hebra antisentido que tiene una longitud que es como máximo de 30 nucleótidos, donde la hebra sentido comprende un nucleótido modificado que es susceptible a degradación enzimática en la posición 11 desde el extremo 5’, en donde el extremo 3’ de dicha hebra sentido y el extremo 5’ de dicha hebra antisentido forman un extremo romo y dicha hebra antisentido es 1-4 nucleótidos más larga por su extremo 3’ que la hebra sentido, en donde la región dúplex que es de por lo menos 25 nucleótidos de longitud, y dicha hebra antisentido es suficientemente complementaria de un ARNm de Serpina1 blanco a lo largo de por lo menos 19 nt de dicha longitud de la hebra antisentido para reducir la expresión del gen blanco cuando dicho agente de ARNhd se introduce en una célula de

mamífero, y en donde el clivaje Dicer de dicho ARNhd resulta preferencialmente en un ARNip que comprende dicho extremo 3’ de dicha hebra antisentido, reduciendo de esa manera la expresión del gen blanco en el mamífero, en donde la hebra antisentido contiene por lo menos un nucleótido térmicamente desestabilizante, donde dicho por lo menos un nucleótido térmicamente desestabilizante se encuentra en la región de siembra de la hebra antisentido (es decir, en las posiciones 2-9 del extremo 5’ de la hebra antisentido), en donde el ARNhd tiene una temperatura de fusión de entre aproximadamente 40 °C y aproximadamente 80 °C, y en donde el ARNhd opcionalmente presenta además por lo menos una (por ejemplo, una, dos, tres, cuatro, cinco, seis o las siete) de las siguientes características: (i) la secuencia antisentido comprende 2, 3, 4, 5 ó 6 modificaciones 2’-fluoro; (ii) la secuencia antisentido comprende 1, 2, 3 ó 4 enlaces internucleótidos de fosforotioato; (iii) la hebra sentido está conjugada con un ligando; (iv) la hebra sentido comprende 2, 3, 4 ó 5 modificaciones 2’-fluoro; (v) la hebra sentido comprende 1, 2, 3 ó 4 enlaces internucleótidos de fosforotioato; y (vi) el ARNhd comprende por lo menos cuatro modificaciones 2’-fluoro; y (vii) el ARNhd tiene una región dúplex de 12-29 pares de nucleótidos de longitud.

En algunas formas de realización, la hebra antisentido comprende enlaces internucleótidos de fosforotioato entre las posiciones de nucleótido 21 y 22, y entre las posiciones de nucleótido 22 y 23, en donde la hebra antisentido contiene por lo menos una modificación térmicamente desestabilizante del dúplex ubicada en la región de siembra de la hebra antisentido (es decir, en las posiciones 2-9 del extremo 5’ de la hebra antisentido), en donde el ARNhd tiene una temperatura de fusión de entre aproximadamente 40 °C y

aproximadamente 80 °C, y en donde el ARNhd opcionalmente presenta además por lo menos una (por ejemplo, una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete o las ocho) de las siguientes características: (i) la secuencia antisentido comprende 2, 3, 4, 5 ó 6 modificaciones 2'-fluoro; (ii) la secuencia antisentido comprende 3 ó 4 enlaces internucleótidos de fosforotioato; (iii) la hebra sentido está conjugada con un ligando; (iv) la hebra sentido comprende 2, 3, 4 ó 5 modificaciones 2'-fluoro; (v) la hebra sentido comprende 1, 2, 3 ó 4 enlaces internucleótidos de fosforotioato; (vi) el ARNhd comprende por lo menos cuatro modificaciones 2'-fluoro; (vii) el ARNhd comprende una región dúplex de 12-40 pares de nucleótidos de longitud; y (viii) el ARNhd tiene un extremo romo en el extremo 5' de la hebra antisentido.

En algunas formas de realización, la hebra antisentido comprende enlaces internucleótidos de fosforotioato entre las posiciones de nucleótido 1 y 2, entre las posiciones de nucleótido 2 y 3, entre las posiciones de nucleótido 21 y 22, y entre las posiciones de nucleótido 22 y 23, en donde la hebra antisentido contiene por lo menos una modificación térmicamente desestabilizante del dúplex ubicada en la región de siembra de la hebra antisentido (es decir, en las posiciones 2-9 del extremo 5' de la hebra antisentido), en donde el ARNhd tiene una temperatura de fusión de entre aproximadamente 40 °C y aproximadamente 80 °C, y en donde el ARNhd opcionalmente presenta además por lo menos una (por ejemplo, una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete o las ocho) de las siguientes características: (i) la secuencia antisentido comprende 2, 3, 4, 5 ó 6 modificaciones 2'-fluoro; (ii) la hebra sentido está conjugada con un ligando; (iii) la hebra sentido comprende 2, 3, 4 ó 5 modificaciones 2'-fluoro; (iv) la hebra sentido comprende 1, 2, 3 ó 4

enlaces internucleótidos de fosforotioato; (v) el ARNhd comprende por lo menos cuatro modificaciones 2'-fluoro; (vi) el ARNhd comprende una región dúplex de 12-40 pares de nucleótidos de longitud; (vii) el ARNhd comprende una región dúplex de 12-40 pares de nucleótidos de longitud; y (viii) el ARNhd tiene un extremo romo en el extremo 5' de la hebra antisentido.

En algunas formas de realización, la hebra sentido comprende enlaces internucleótidos de fosforotioato entre las posiciones de nucleótido 1 y 2, y entre las posiciones de nucleótido 2 y 3, en donde la hebra antisentido contiene por lo menos una modificación térmicamente desestabilizante del dúplex ubicada en la región de siembra de la hebra antisentido (es decir, en las posiciones 2-9 del extremo 5' de la hebra antisentido), en donde el ARNhd tiene una temperatura de fusión de entre aproximadamente 40 °C y aproximadamente 80 °C, y en donde el ARNhd opcionalmente presenta además por lo menos una (por ejemplo, una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete o las ocho) de las siguientes características: (i) la secuencia antisentido comprende 2, 3, 4, 5 ó 6 modificaciones 2'-fluoro; (ii) la secuencia antisentido comprende 1, 2, 3 ó 4 enlaces internucleótidos de fosforotioato; (iii) la hebra sentido está conjugada con un ligando; (iv) la hebra sentido comprende 2, 3, 4 ó 5 modificaciones 2'-fluoro; (v) la hebra sentido comprende 3 ó 4 enlaces internucleótidos de fosforotioato; (vi) el ARNhd comprende por lo menos cuatro modificaciones 2'-fluoro; (vii) el ARNhd comprende una región dúplex de 12-40 pares de nucleótidos de longitud; y (viii) el ARNhd tiene un extremo romo en el extremo 5' de la hebra antisentido.

En algunas formas de realización, la hebra sentido comprende enlaces internucleótidos de fosforotioato entre las posiciones de nucleótido 1 y 2, y

entre las posiciones de nucleótido 2 y 3, la hebra antisentido comprende enlaces internucleótidos de fosforotioato entre las posiciones de nucleótido 1 y 2, entre las posiciones de nucleótido 2 y 3, entre las posiciones de nucleótido 21 y 22, y entre las posiciones de nucleótido 22 y 23, en donde la hebra antisentido contiene por lo menos una modificación térmicamente desestabilizante del dúplex ubicada en la región de siembra de la hebra antisentido (es decir, en las posiciones 2-9 del extremo 5' de la hebra antisentido), en donde el ARNhd tiene una temperatura de fusión de entre aproximadamente 40 °C y aproximadamente 80 °C, y en donde el ARNhd opcionalmente presenta además por lo menos una (por ejemplo, una, dos, tres, cuatro, cinco, seis o las siete) de las siguientes características: (i) la secuencia antisentido comprende 2, 3, 4, 5 ó 6 modificaciones 2'-fluoro; (ii) la hebra sentido está conjugada con un ligando; (iii) la hebra sentido comprende 2, 3, 4 ó 5 modificaciones 2'-fluoro; (iv) la hebra sentido comprende 3 ó 4 enlaces internucleótidos de fosforotioato; (v) el ARNhd comprende por lo menos cuatro modificaciones 2'-fluoro; (vi) el ARNhd comprende una región dúplex de 12-40 pares de nucleótidos de longitud; y (vii) el ARNhd tiene un extremo romo en el extremo 5' de la hebra antisentido.

En un aspecto, la invención provee un agente de ARNhd capaz de inhibir la expresión de una secuencia de Serpina1 blanco, por ejemplo, los nucleótidos 1440-1480 de la SEQ ID N°: 1, que comprende una hebra sentido y una hebra antisentido, donde cada hebra tiene entre 14 y 40 nucleótidos, en donde la hebra antisentido tiene una complementariedad suficiente con la secuencia de Serpina1 blanco, por ejemplo, los nucleótidos 1440-1480 de la SEQ ID N°: 1, para mediar la interferencia de ARN y en donde la hebra

antisentido comprende por lo menos una modificación térmicamente desestabilizante del dúplex en la región de siembra (es decir, en las posiciones 2-9 del extremo 5’ de la hebra antisentido, contando desde el extremo 5’), y el ARNhd presenta además por lo menos una (por ejemplo, una, dos, tres, cuatro, cinco, seis siete o las ocho) de las siguientes características:

(i) la secuencia antisentido comprende 2, 3, 4, 5 ó 6 modificaciones 2’-fluoro;

(ii) la secuencia antisentido comprende 1, 2, 3 ó 4 enlaces internucleótidos de fosforotioato;

(iii) la hebra sentido está conjugada con un ligando;

(iv) la hebra sentido comprende 2, 3, 4 ó 5 modificaciones 2’-fluoro;

(v) la hebra sentido comprende 1, 2, 3 ó 4 enlaces internucleótidos de fosforotioato;

(vi) el ARNhd comprende por lo menos cuatro modificaciones 2’-fluoro;

(vii) el ARNhd comprende una región dúplex de 12-40 pares de nucleótidos de longitud; y

(viii) un extremo romo en el extremo 5’ de la hebra antisentido.

En algunas formas de realización particulares, la modificación térmicamente desestabilizante del dúplex se encuentra en la posición 7 de la hebra antisentido, contando desde el extremo 5’ de la hebra antisentido.

En algunas formas de realización, el agente de ARNhd comprende una hebra sentido y una hebra antisentido, donde cada hebra tiene entre 14 y 40 nucleótidos, en donde la hebra antisentido tiene una complementariedad suficiente con la secuencia blanco para mediar la interferencia de ARN y en

donde la hebra antisentido comprende por lo menos una modificación térmicamente desestabilizante del dúplex en la región de siembra (es decir, en las posiciones 2-9 del extremo 5’ de la hebra antisentido, contando desde el extremo 5’), y la hebra antisentido comprende además una o ambas de las siguientes características:

(i) 2, 3, 4, 5 ó 6 modificaciones 2’-fluoro; y

(ii) 1, 2, 3 ó 4 enlaces internucleótidos de fosforotioato; y

la hebra sentido comprende una, dos o tres de las siguientes características:

(i) un ligando conjugado con la hebra sentido;

(ii) 2, 3, 4 ó 5 modificaciones 2’-fluoro; y

(iii) 1, 2, 3 ó 4 enlaces internucleótidos de fosforotioato.

En algunas formas de realización, el agente de ARNhd comprende una hebra sentido y una hebra antisentido, donde cada hebra tiene entre 14 y 40 nucleótidos, en donde la hebra antisentido tiene una complementariedad suficiente con la secuencia de Serpina1 blanco, por ejemplo, los nucleótidos 1440-1480 de la SEQ ID N°: 1, para mediar la interferencia de ARN y en donde la hebra antisentido comprende por lo menos una modificación térmicamente desestabilizante del dúplex en las primeras 9 posiciones de nucleótido contando desde el extremo 5’ y un ligando está conjugado con la hebra sentido.

En algunas formas de realización, el agente de ARNhd comprende una hebra sentido y una hebra antisentido, donde cada hebra tiene entre 14 y 40 nucleótidos, en donde la hebra antisentido tiene una complementariedad suficiente con la secuencia de Serpina1 blanco, por ejemplo, los nucleótidos 1440-1480 de la SEQ ID N°: 1, para mediar la interferencia de ARN y en donde

la hebra antisentido comprende por lo menos una modificación térmicamente desestabilizante del dúplex en las primeras 9 posiciones de nucleótido contando desde el extremo 5', un ligando está conjugado con la hebra sentido, y el ARNhd comprende por lo menos cuatro modificaciones 2'-fluoro.

En algunas formas de realización, el agente de ARNhd comprende una hebra sentido y una hebra antisentido, donde cada hebra tiene entre 14 y 40 nucleótidos, en donde la hebra antisentido tiene una complementariedad suficiente con la secuencia de Serpina1 blanco, por ejemplo, los nucleótidos 1440-1480 de la SEQ ID N°: 1, para mediar la interferencia de ARN, en donde el ARNhd comprende por lo menos cuatro 2'-fluoro, en donde dicha hebra antisentido comprende por lo menos una modificación térmicamente desestabilizante del dúplex en las primeras 9 posiciones de nucleótido, contando desde el extremo 5' y en donde dicha hebra sentido comprende un ligando. En algunas otras formas de realización de esto, el ligando es un ligando del ASGPR.

En algunas formas de realización, el agente de ARNhd comprende una hebra sentido y una hebra antisentido, donde cada hebra tiene entre 14 y 40 nucleótidos, en donde la hebra antisentido tiene una complementariedad suficiente con la secuencia de Serpina1 blanco, por ejemplo, los nucleótidos 1440-1480 de la SEQ ID N°: 1, para mediar la interferencia de ARN, en donde dicha hebra antisentido comprende por lo menos una modificación térmicamente desestabilizante del dúplex ubicado en la posición 4-8, contando desde el extremo 5', en donde dicha hebra sentido comprende un ligando, y en donde cada una de las hebras sentido y antisentido comprenden por lo menos dos modificaciones 2'-fluoro. En algunas otras formas de realización de esto, el

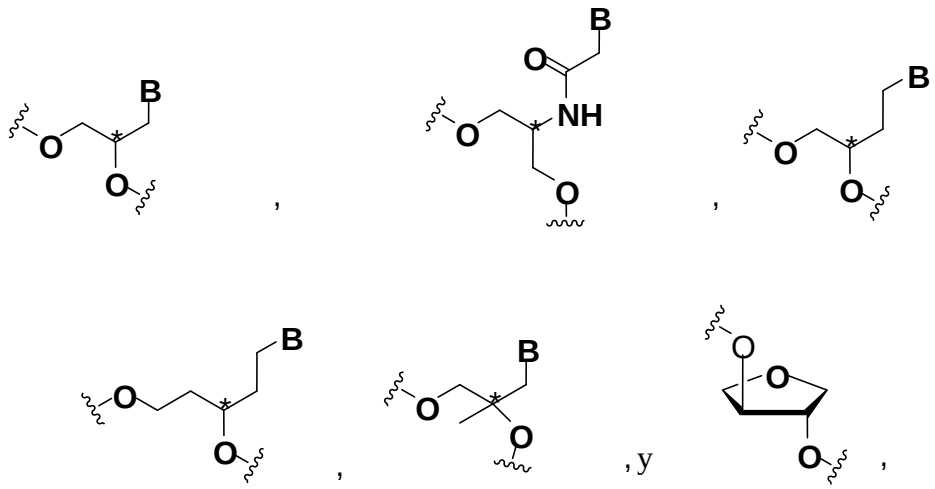
ligando es un ligando del ASGPR.

En algunas formas de realización, el agente de ARNhd comprende una hebra sentido y una hebra antisentido, donde cada hebra tiene entre 14 y 40 nucleótidos, en donde la hebra antisentido tiene una complementariedad suficiente con la secuencia de Serpina1 blanco, por ejemplo, los nucleótidos 1440-1480 de la SEQ ID N°: 1, para mediar la interferencia de ARN, en donde el ARNhd comprende por lo menos cuatro 2'-fluoro, en donde dicha hebra antisentido comprende por lo menos una modificación térmicamente desestabilizante del dúplex en las primeras 9 posiciones de nucleótido, contando desde el extremo 5', y en donde dicha hebra sentido comprende un ligando, y en donde la secuencia antisentido comprende además por lo menos dos de las siguientes características: (i) la modificación térmicamente desestabilizante del dúplex se ubica en las posiciones 4 a 8 de la hebra antisentido; (ii) por lo menos dos modificaciones 2'-fluoro; (iii) enlaces internucleótidos de fosforotioato entre las posiciones de nucleótido 1 y 2 (contando desde el extremo 5'); y la hebra antisentido tiene una longitud de 18 a 35 nucleótidos. En algunas otras formas de realización, el ligando es un ligando del ASGPR.

En algunas formas de realización, el agente de ARNhd comprende una hebra sentido y una hebra antisentido, donde cada hebra tiene entre 14 y 40 nucleótidos, en donde la hebra antisentido tiene una complementariedad suficiente con la secuencia de Serpina1 blanco, por ejemplo, los nucleótidos 1440-1480 de la SEQ ID N°: 1, para mediar la interferencia de ARN, en donde el ARNhd comprende por lo menos cuatro 2'-fluoro, en donde dicha hebra antisentido comprende por lo menos una modificación térmicamente

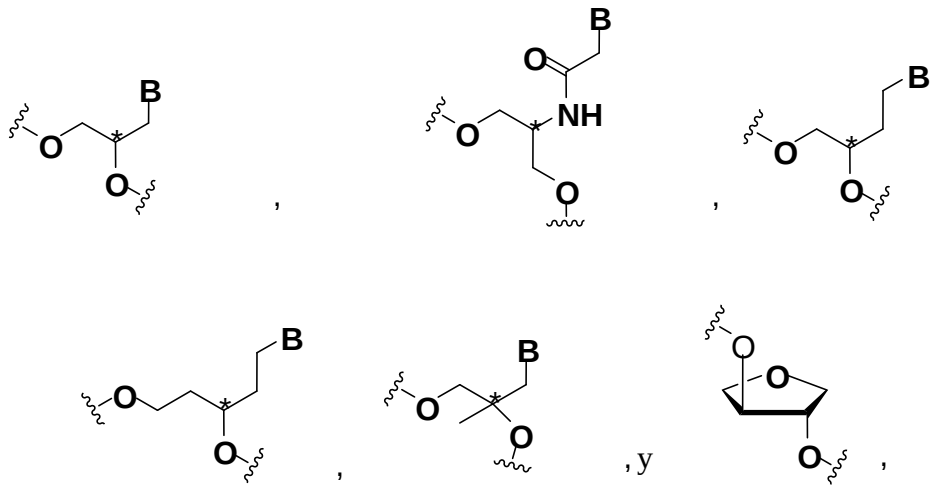
desestabilizante del dúplex en las primeras 9 posiciones de nucleótido, contando desde el extremo 5', y en donde dicha hebra sentido comprende un ligando, y la hebra sentido presenta por lo menos una de las siguientes características: (i) el ligando está unido a cualquiera de los extremos de la hebra sentido; (ii) la hebra sentido comprende por lo menos dos modificaciones 2'-fluoro; y (iii) la hebra sentido y la hebra antisentido tienen una complementariedad suficiente como para formar una región de hebra doble que abarca por lo menos 19 posiciones de nucleótido y en donde la modificación térmicamente desestabilizante del dúplex está ubicada en dicha región de hebra doble.

En algunas formas de realización, el agente de ARNhd comprende una hebra sentido y una hebra antisentido, donde cada hebra tiene entre 14 y 40 nucleótidos, en donde la hebra antisentido tiene una complementariedad suficiente con la secuencia de Serpina1 blanco, por ejemplo, los nucleótidos 1440-1480 de la SEQ ID N°: 1, para mediar la interferencia de ARN, en donde el ARNhd comprende por lo menos cuatro 2'-fluoro, en donde dicha hebra antisentido comprende por lo menos una modificación térmicamente desestabilizante del dúplex en las primeras 9 posiciones de nucleótido, contando desde el extremo 5', y en donde dicha hebra sentido comprende un ligando, y en donde la modificación térmicamente desestabilizante del dúplex se selecciona del grupo que consiste en:



en donde B es una nucleobase modificada o no modificada y el asterisco sobre cada estructura indica ya sea *R*, *S* o *racémico.*

En algunas formas de realización, el agente de ARNhd comprende una hebra sentido y una hebra antisentido, donde cada hebra tiene entre 14 y 40 nucleótidos, en donde la hebra antisentido tiene una complementariedad suficiente con la secuencia de Serpina1 blanco, por ejemplo, los nucleótidos 1440-1480 de la SEQ ID N°: 1, para mediar la interferencia de ARN, en donde dicha hebra antisentido comprende por lo menos una modificación térmicamente desestabilizante del dúplex ubicado en la posición 4-8, contando desde el extremo 5', en donde dicha hebra sentido comprende un ligando, y en donde cada una de las hebras sentido y antisentido comprenden por lo menos dos modificaciones 2'-fluoro, y en donde la modificación térmicamente desestabilizante del dúplex se selecciona del grupo que consiste en:

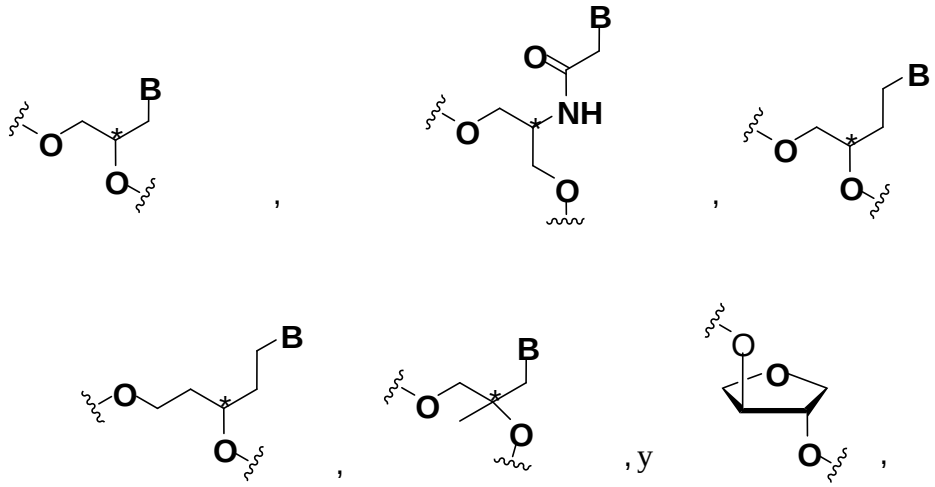


en donde B es una nucleobase modificada o no modificada y el asterisco sobre cada estructura indica ya sea *R*, *S* o *racémico.*

En algunas formas de realización, el agente de ARNhd comprende una hebra sentido y una hebra antisentido, donde cada hebra tiene entre 14 y 40 nucleótidos, en donde la hebra antisentido tiene una complementariedad suficiente con la secuencia de Serpina1 blanco, por ejemplo, los nucleótidos 1440-1480 de la SEQ ID N°: 1, para mediar la interferencia de ARN, en donde el ARNhd comprende por lo menos cuatro 2'-fluoro, en donde dicha hebra antisentido comprende por lo menos una modificación térmicamente desestabilizante del dúplex ubicado en la posición 7, contando desde el extremo 5' de la hebra antisentido, y en donde dicha hebra sentido comprende un ligando.

En algunas formas de realización, el agente de ARNhd comprende una hebra sentido y una hebra antisentido, donde cada hebra tiene entre 14 y 40 nucleótidos, en donde la hebra antisentido tiene una complementariedad suficiente con la secuencia de Serpina1 blanco, por ejemplo, los nucleótidos 1440-1480 de la SEQ ID N°: 1, para mediar la interferencia de ARN, en donde

dicha hebra antisentido comprende por lo menos una modificación térmicamente desestabilizante del dúplex ubicado en la posición 7, contando desde el extremo 5', en donde dicha hebra sentido comprende un ligando, y en donde cada una de las hebras sentido y antisentido comprenden por lo menos dos modificaciones 2'-fluoro, y en donde la modificación térmicamente desestabilizante del dúplex se selecciona del grupo que consiste en:

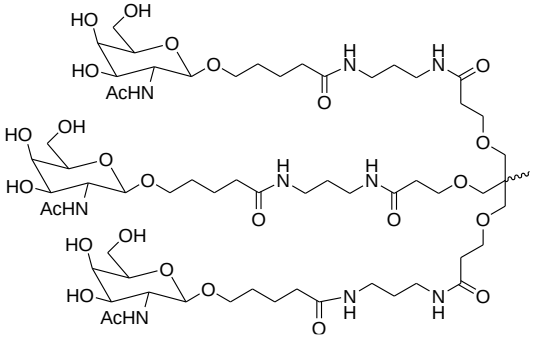


en donde B es una nucleobase modificada o no modificada y el asterisco sobre cada estructura indica ya sea *R*, *S* o *racémico.*

En algunas formas de realización, el agente de ARNhd comprende una hebra sentido y una hebra antisentido, donde cada hebra tiene entre 14 y 40 nucleótidos, en donde la hebra antisentido tiene una complementariedad suficiente con una secuencia de Serpina1 blanco, por ejemplo, los nucleótidos 1440-1480 de la SEQ ID N°: 1, para mediar la interferencia de ARN, en donde el ARNhd comprende por lo menos cuatro 2'-fluoro, en donde dicha hebra antisentido comprende por lo menos una modificación térmicamente desestabilizante del dúplex en las primeras 9 posiciones de nucleótido, contando desde el extremo 5', y en donde dicha hebra sentido comprende un

ligando, en donde el ligando comprende uno o más derivados de GalNAc unidos por medio de un conector ramificado bivalente o trivalente.

En algunas formas de realización, el agente de ARNhd comprende una hebra sentido y una hebra antisentido, donde cada hebra tiene entre 14 y 40 nucleótidos, en donde la hebra antisentido tiene una complementariedad suficiente con una secuencia de Serpina1 blanco, por ejemplo, los nucleótidos 1440-1480 de la SEQ ID N°: 1, para mediar la interferencia de ARN, en donde el ARNhd comprende por lo menos cuatro 2'-fluoro, en donde dicha hebra antisentido comprende por lo menos una modificación térmicamente desestabilizante del dúplex en las primeras 9 posiciones de nucleótido, contando desde el extremo 5', y en donde dicha hebra sentido comprende un ligando, en donde el ligando es un ligando del ASGPR de la siguiente estructura:


HO
OH
O
HO
AcHN
O
H
N
O
O
O

comprende 3 ó 4 modificaciones 2’-fluoro, y comprende 0, 1 ó 2 enlaces internucleótidos de fosforotioato; en donde la hebra antisentido comprende 3, 4, 5 ó 6 modificaciones 2’-fluoro, comprende 2, 3 ó 4 enlaces internucleótidos de fosforotioato; y en donde el ARNhd opcionalmente presenta además por lo menos una (por ejemplo, una, dos o las tres) de las siguientes características: (i) el ARNhd comprende una región dúplex de 12-25 pares de nucleótidos de longitud; (ii) el ARNhd comprende un extremo romo en el extremo 5’ de la hebra antisentido; y (iii) el ARNhd tiene una sobreextensión de por lo menos dos nucleótidos en el extremo 3’ de la hebra antisentido.

En algunas formas de realización, las hebras sentido y antisentido son, de manera independiente, de 19, 20, 21, 22, 23, 24 ó 25 nucleótidos de longitud; la hebra antisentido contiene por lo menos un nucleótido térmicamente desestabilizante, donde dicho por lo menos un nucleótido térmicamente desestabilizante se encuentra en la región de siembra de la hebra antisentido (es decir, en las posiciones 2-9 del extremo 5’ de la hebra antisentido); en donde la hebra sentido está conjugada con un ligando, comprende modificaciones 2’-fluoro en las posiciones 7, 10 y 11 o en las posiciones 7, 9, 10 y 11 (contando desde el extremo 5’ de la hebra sentido) y, opcionalmente, comprende enlaces internucleótidos de fosforotioato entre las posiciones de nucleótido 1 y 2, y entre las posiciones de nucleótido 2 y 3; en donde la hebra antisentido comprende 3, 4, 5 ó 6 modificaciones 2’-fluoro, comprende 2, 3 ó 4 enlaces internucleótidos de fosforotioato; y en donde el ARNhd opcionalmente presenta además por lo menos una (por ejemplo, una, dos o las tres) de las siguientes características: (i) el ARNhd comprende una región dúplex de 12-25 pares de nucleótidos de longitud; (ii) el ARNhd

comprende un extremo romo en el extremo 5’ de la hebra antisentido; y (iii) el ARNhd tiene una sobreextensión de por lo menos dos nucleótidos en el extremo 3’ de la hebra antisentido.

En algunas formas de realización, las hebras sentido y antisentido son, de manera independiente, de 19, 20, 21, 22, 23, 24 ó 25 nucleótidos de longitud; la hebra antisentido contiene por lo menos un nucleótido térmicamente desestabilizante, donde dicho por lo menos un nucleótido térmicamente desestabilizante se encuentra en la región de siembra de la hebra antisentido (es decir, en las posiciones 2-9 del extremo 5’ de la hebra antisentido); en donde la hebra sentido está conjugada con un ligando, comprende 3 ó 4 modificaciones 2’-fluoro y comprende 0 ó 2 enlaces internucleótidos de fosforotioato; en donde la hebra antisentido comprende modificaciones 2’-fluoro en las posiciones 2, 6, 8, 9, 14 ó 16, o en las posiciones 2, 6, 14 ó 16, o en las posiciones 2, 14 y 16; y la secuencia antisentido comprende enlaces internucleótidos de fosforotioato entre las posiciones de nucleótido 21 y 22, y entre las posiciones de nucleótido 22 y 23; y en donde el ARNhd opcionalmente presenta además por lo menos una (por ejemplo, una, dos o las tres) de las siguientes características: (i) el ARNhd comprende una región dúplex de 12-25 pares de nucleótidos de longitud; (ii) el ARNhd comprende un extremo romo en el extremo 5’ de la hebra antisentido; y (iii) el ARNhd tiene una sobreextensión de por lo menos dos nucleótidos en el extremo 3’ de la hebra antisentido.

En algunas formas de realización, las hebras sentido y antisentido son, de manera independiente, de 19, 20, 21, 22, 23, 24 ó 25 nucleótidos de longitud; la hebra antisentido contiene por lo menos un nucleótido

térmicamente desestabilizante, donde dicho por lo menos un nucleótido térmicamente desestabilizante se encuentra en la región de siembra de la hebra antisentido (es decir, en las posiciones 2-9 del extremo 5’ de la hebra antisentido); en donde la hebra sentido está conjugada con un ligando, comprende 3 ó 4 modificaciones 2’-fluoro y comprende 0 ó 2 enlaces internucleótidos de fosforotioato; en donde la hebra antisentido comprende modificaciones 2’-fluoro en las posiciones 2, 6, 8, 9, 14 ó 16, o en las posiciones 2, 6, 14 ó 16, o en las posiciones 2, 14 y 16; y la secuencia antisentido comprende enlaces internucleótidos de fosforotioato entre las posiciones de nucleótido 21 y 22, entre las posiciones de nucleótido 22 y 23, entre las posiciones de nucleótido 1 y 2, entre las posiciones de nucleótido 2 y 3; y en donde el ARNhd opcionalmente presenta además por lo menos una (por ejemplo, una, dos o las tres) de las siguientes características: (i) el ARNhd comprende una región dúplex de 12-25 pares de nucleótidos de longitud; (ii) el ARNhd comprende un extremo romo en el extremo 5’ de la hebra antisentido; y (iii) el ARNhd tiene una sobreextensión de por lo menos dos nucleótidos en el extremo 3’ de la hebra antisentido.

En algunas formas de realización, las hebras sentido y antisentido son, de manera independiente, de 19, 20, 21, 22, 23, 24 ó 25 nucleótidos de longitud; la hebra antisentido contiene por lo menos un nucleótido térmicamente desestabilizante, donde dicho por lo menos un nucleótido térmicamente desestabilizante se encuentra en la región de siembra de la hebra antisentido (es decir, en las posiciones 2-9 del extremo 5’ de la hebra antisentido); en donde la hebra sentido está conjugada con un ligando, comprende modificaciones 2’-fluoro en las posiciones 7, 10 y 11 o en las

posiciones 7, 9, 10 y 11 (contando desde el extremo 5’ de la hebra sentido) y, opcionalmente, comprende enlaces internucleótidos de fosforotioato entre las posiciones de nucleótido 1 y 2, y entre las posiciones de nucleótido 2 y 3; en donde la hebra antisentido comprende modificaciones 2’-fluoro en las posiciones 2, 6, 8, 9, 14 ó 16, o en las posiciones 2, 6, 14 ó 16, o en las posiciones 2, 14 y 16; y la secuencia antisentido comprende enlaces internucleótidos de fosforotioato entre las posiciones de nucleótido 21 y 22, y entre las posiciones de nucleótido 22 y 23; y en donde el ARNhd opcionalmente presenta además por lo menos una (por ejemplo, una, dos o las tres) de las siguientes características: (i) el ARNhd comprende una región dúplex de 12-25 pares de nucleótidos de longitud; (ii) el ARNhd comprende un extremo romo en el extremo 5’ de la hebra antisentido; y (iii) el ARNhd tiene una sobreextensión de por lo menos dos nucleótidos en el extremo 3’ de la hebra antisentido.

En algunas formas de realización, las hebras sentido y antisentido son, de manera independiente, de 19, 20, 21, 22, 23, 24 ó 25 nucleótidos de longitud; la hebra antisentido contiene por lo menos un nucleótido térmicamente desestabilizante, donde dicho por lo menos un nucleótido térmicamente desestabilizante se encuentra en la región de siembra de la hebra antisentido (es decir, en las posiciones 2-9 del extremo 5’ de la hebra antisentido); en donde la hebra sentido está conjugada con un ligando, comprende modificaciones 2’-fluoro en las posiciones 7, 10 y 11 o en las posiciones 7, 9, 10 y 11 (contando desde el extremo 5’ de la hebra sentido) y, opcionalmente, comprende enlaces internucleótidos de fosforotioato entre las posiciones de nucleótido 1 y 2, y entre las posiciones de nucleótido 2 y 3; en

donde la hebra antisentido comprende modificaciones 2'-fluoro en las posiciones 2, 6, 8, 9, 14 ó 16, o en las posiciones 2, 6, 14 ó 16, o en las posiciones 2, 14 y 16; y la secuencia antisentido comprende enlaces internucleótidos de fosforotioato entre las posiciones de nucleótido 21 y 22, entre las posiciones de nucleótido 22 y 23, entre las posiciones de nucleótido 1 y 2, entre las posiciones de nucleótido 2 y 3; y en donde el ARNhd opcionalmente presenta además por lo menos una (por ejemplo, una, dos o las tres) de las siguientes características: (i) el ARNhd comprende una región dúplex de 12-25 pares de nucleótidos de longitud; (ii) el ARNhd comprende un extremo romo en el extremo 5' de la hebra antisentido; y (iii) el ARNhd tiene una sobreextensión de por lo menos dos nucleótidos en el extremo 3' de la hebra antisentido.

En una forma de realización particular, los agentes de ARNhd de la presente invención comprenden:

(a) una hebra sentido que tiene:

(i) una longitud de 21 nucleótidos;

(ii) un ligando del ASGPR unido al extremo 3', en donde dicho ligando del ASGPR comprende tres derivados de GalNAc unidos por medio de un conector ramificado trivalente; y

(iii) modificaciones 2'-F en las posiciones 7, 10 y 11 (contando desde el extremo 5');

y

(b) una hebra antisentido que tiene:

(i) una longitud de 23 nucleótidos;

(ii) modificaciones 2'-F en las posiciones 2, 6 a 8, 9, 14 y 16

(contando desde el extremo 5’);

(iii) enlaces internucleótidos de fosforotioato entre las posiciones de nucleótido 21 y 22, y entre las posiciones de nucleótido 22 y 23 (contando desde el extremo 5’); y

(iv) una modificación térmicamente desestabilizante del dúplex en la posición 7 (contando desde el extremo 5’);

en donde los agentes de ARNhd tienen una sobreextensión de dos nucleótidos en el extremo 3’ de la hebra antisentido y un extremo romo en el extremo 5’ de la hebra antisentido.

En otra forma de realización particular, los agentes de ARNhd de la presente invención comprenden:

(a) una hebra sentido que tiene:

(i) una longitud de 21 nucleótidos;

(ii) un ligando del ASGPR unido al extremo 3’, en donde dicho ligando del ASGPR comprende tres derivados de GalNAc unidos por medio de un conector ramificado trivalente;

(iii) modificaciones 2’-F en las posiciones 7, 9, 10 y 11 (contando desde el extremo 5’); y

(iv) enlaces internucleótidos de fosforotioato entre las posiciones de nucleótido 1 y 2, y entre las posiciones de nucleótido 2 y 3 (contando desde el extremo 5’);

y

(b) una hebra antisentido que tiene:

(i) una longitud de 23 nucleótidos;

(ii) modificaciones 2’-F en las posiciones 2, 6, 14 y 16 (contando

desde el extremo 5’);

(iii) enlaces internucleótidos de fosforotioato entre las posiciones de nucleótido 1 y 2, entre las posiciones de nucleótido 2 y 3, entre las posiciones de nucleótido 21 y 22, y entre las posiciones de nucleótido 22 y 23 (contando desde el extremo 5’); y

(iv) una modificación térmicamente desestabilizante del dúplex en la posición 7 (contando desde el extremo 5’);

en donde los agentes de ARNhd tienen una sobreextensión de dos nucleótidos en el extremo 3’ de la hebra antisentido y un extremo romo en el extremo 5’ de la hebra antisentido.

En otra forma de realización particular, los agentes de ARNhd de la presente invención comprenden:

(a) una hebra sentido que tiene:

(i) una longitud de 21 nucleótidos;

(ii) un ligando del ASGPR unido al extremo 3’, en donde dicho ligando del ASGPR comprende tres derivados de GalNAc unidos por medio de un conector ramificado trivalente;

(iii) modificaciones 2’-F en las posiciones 7, 9, 10 y 11 (contando desde el extremo 5’); y

(iv) enlaces internucleótidos de fosforotioato entre las posiciones de nucleótido 1 y 2, y entre las posiciones de nucleótido 2 y 3 (contando desde el extremo 5’);

y

(b) una hebra antisentido que tiene:

(i) una longitud de 23 nucleótidos;

(ii) modificaciones 2’-F en las posiciones 2, 14 y 16 (contando desde el extremo 5’);

(iii) enlaces internucleótidos de fosforotioato entre las posiciones de nucleótido 1 y 2, entre las posiciones de nucleótido 2 y 3, entre las posiciones de nucleótido 21 y 22, y entre las posiciones de nucleótido 22 y 23 (contando desde el extremo 5’); y

(iv) una modificación térmicamente desestabilizante del dúplex en la posición 6 ó 7 (contando desde el extremo 5’);

en donde los agentes de ARNhd tienen una sobreextensión de dos nucleótidos en el extremo 3’ de la hebra antisentido y un extremo romo en el extremo 5’ de la hebra antisentido.

En otra forma de realización particular, los agentes de ARNhd de la presente invención comprenden:

(a) una hebra sentido que tiene:

(i) una longitud de 21 nucleótidos;

(ii) un ligando del ASGPR unido al extremo 3’, en donde dicho ligando del ASGPR comprende tres derivados de GalNAc unidos por medio de un conector ramificado trivalente;

(iii) modificaciones 2’-F en las posiciones 7, 9, 10 y 11 (contando desde el extremo 5’); y

(iv) enlaces internucleótidos de fosforotioato entre las posiciones de nucleótido 1 y 2, y entre las posiciones de nucleótido 2 y 3 (contando desde el extremo 5’);

y

(b) una hebra antisentido que tiene:

(i) una longitud de 23 nucleótidos;

(ii) modificaciones 2’-F en las posiciones 2, 6, 8, 9, 14 y 16 (contando desde el extremo 5’);

(iii) enlaces internucleótidos de fosforotioato entre las posiciones de nucleótido 1 y 2, entre las posiciones de nucleótido 2 y 3, entre las posiciones de nucleótido 21 y 22, y entre las posiciones de nucleótido 22 y 23 (contando desde el extremo 5’); y

(iv) una modificación térmicamente desestabilizante del dúplex en la posición 7 (contando desde el extremo 5’);

en donde los agentes de ARNhd tienen una sobreextensión de dos nucleótidos en el extremo 3’ de la hebra antisentido y un extremo romo en el extremo 5’ de la hebra antisentido.

En otra forma de realización particular, los agentes de ARNhd de la presente invención comprenden:

(a) una hebra sentido que tiene:

(i) una longitud de 21 nucleótidos;

(ii) un ligando del ASGPR unido al extremo 3’, en donde dicho ligando del ASGPR comprende tres derivados de GalNAc unidos por medio de un conector ramificado trivalente;

(iii) modificaciones 2’-F en las posiciones 7, 9, 10 y 11 (contando desde el extremo 5’); y

(iv) enlaces internucleótidos de fosforotioato entre las posiciones de nucleótido 1 y 2, y entre las posiciones de nucleótido 2 y 3 (contando desde el extremo 5’);

y

(b) una hebra antisentido que tiene:

(i) una longitud de 23 nucleótidos;

(ii) modificaciones 2’-F en las posiciones 2, 14 y 16 (contando desde el extremo 5’);

(iii) enlaces internucleótidos de fosforotioato entre las posiciones de nucleótido 1 y 2, entre las posiciones de nucleótido 2 y 3, entre las posiciones de nucleótido 21 y 22, y entre las posiciones de nucleótido 22 y 23 (contando desde el extremo 5’); y

(iv) una modificación térmicamente desestabilizante del dúplex en la posición 7 (contando desde el extremo 5’);

en donde los agentes de ARNhd tienen una sobreextensión de dos nucleótidos en el extremo 3’ de la hebra antisentido y un extremo romo en el extremo 5’ de la hebra antisentido.

En otra forma de realización particular, los agentes de ARNhd de la presente invención que comprende una hebra antisentido que tiene:

(i) modificaciones 2’-F en las posiciones 2, 14 y 16 (contando desde el extremo 5’); y

(2) una modificación térmicamente desestabilizante del dúplex en la posición 6 ó 7 (contando desde el extremo 5’).

En otra forma de realización particular, los agentes de ARNhd de la presente invención comprenden:

(a) una hebra sentido que tiene:

(i) un ligando del ASGPR, en donde dicho ligando del ASGPR;

(ii) enlaces internucleótidos de fosforotioato entre las posiciones de nucleótido 1 y 2, y entre las posiciones de nucleótido 2 y 3 (contando desde el

extremo 5’);

y

(b) una hebra antisentido que tiene:

(i) modificaciones 2’-F en las posiciones 2, 14 y 16 (contando desde el extremo 5’);

(ii) una modificación térmicamente desestabilizante del dúplex en la posición 6 ó 7 (contando desde el extremo 5’);

En otra forma de realización particular, los agentes de ARNhd de la presente invención comprenden:

(a) una hebra sentido que tiene:

(i) un ligando del ASGPR unido al extremo 3’, en donde dicho ligando del ASGPR comprende tres derivados de GalNAc unidos por medio de un conector ramificado trivalente;

(ii) enlaces internucleótidos de fosforotioato entre las posiciones de nucleótido 1 y 2, y entre las posiciones de nucleótido 2 y 3 (contando desde el extremo 5’);

y

(b) una hebra antisentido que tiene:

(ii) modificaciones 2’-F en las posiciones 2, 14 y 16 (contando desde el extremo 5’);

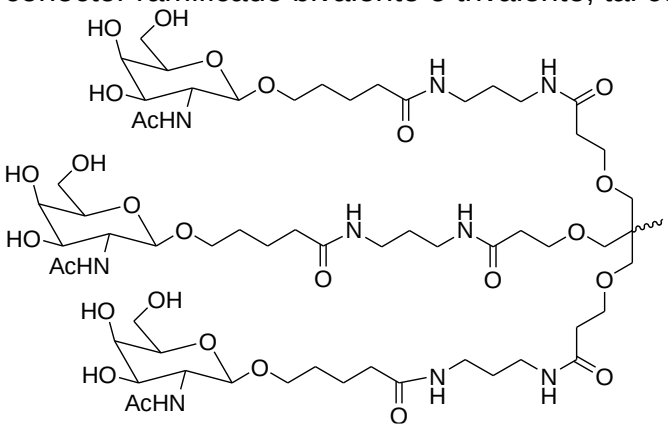
(iii) enlaces internucleótidos de fosforotioato entre las posiciones de nucleótido 1 y 2, entre las posiciones de nucleótido 2 y 3, entre las posiciones de nucleótido 21 y 22, y entre las posiciones de nucleótido 22 y 23 (contando desde el extremo 5’); y

(iv) una modificación térmicamente desestabilizante del dúplex en la

posición 6 ó 7 (contando desde el extremo 5');

en donde los agentes de ARNhd tienen una sobreextensión de dos nucleótidos en el extremo 3' de la hebra antisentido y un extremo romo en el extremo 5' de la hebra antisentido.

En algunas formas de realización, el agente de ARNhd comprende además por lo menos un ligando del ASGPR. Por ejemplo, el ligando del ASGPR comprende uno o más derivados de GalNAc unidos por medio de un conector ramificado bivalente o trivalente, tal como:


HO
OH
O
HO
AcHN
O
H
N
O
O
O

SEQ ID N°: 1; o los nucleótidos 1448-1470 de la SEQ ID N°: 1; o los nucleótidos 1447-1469 de la SEQ ID N°: 1; o los nucleótidos 1446-1478 de la SEQ ID N°: 1; o los nucleótidos 1449-1471 de la SEQ ID N°: 1; o los nucleótidos 1450-1472 de la SEQ ID N°: 1; o los nucleótidos 1440-1475 de la SEQ ID N°: 1; o los nucleótidos 1445-1480 de la SEQ ID N°: 1; o los nucleótidos 1445-1475 de la SEQ ID N°: 1.

La presente invención también provee vectores, células y composiciones farmacéuticas que comprenden los agentes de ARNhd de la invención.

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden ser soluciones no amortiguadoras del pH, por ejemplo, salina o agua; o una solución amortiguadora, por ejemplo, una solución amortiguadora que comprende acetato, citrato, prolamina, carbonato o fosfato o cualquier combinación de los mismos, o solución amortiguadora de salina con fosfato (PBS).

En un aspecto, en la presente invención se provee un método para inhibir la expresión de Serpina1 en una célula. El método incluye poner la célula en contacto con cualquiera de los agentes de ARNhd mencionados o composiciones farmacéuticas de la invención, inhibiendo de esa manera la expresión del gen de Serpina1 en la célula.

En una forma de realización, la célula se encuentra en un sujeto, tal como un sujeto humano.

En una forma de realización, la expresión de Serpina1 es inhibida en por lo menos aproximadamente un 30%, aproximadamente un 40%, aproximadamente un 50%, aproximadamente un 60%, aproximadamente un 70%, aproximadamente un 80%, aproximadamente un 90%, aproximadamente un 95%, aproximadamente un 98% o aproximadamente un 100%.

En un aspecto, la presente invención provee un método de tratamiento de un sujeto que sufre de una enfermedad asociada con Serpina1. El método incluye administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de cualquiera de los agentes de ARNhd mencionados o composiciones farmacéuticas, para así tratar a dicho sujeto.

En una forma de realización, el sujeto es un ser humano.

En una forma de realización, la enfermedad asociada con Serpina1 es un trastorno hepático.

En una forma de realización, el trastorno hepático se selecciona del grupo que consiste en una enfermedad hepática crónica, inflamación del hígado, cirrosis, fibrosis hepática y/o carcinoma hepatocelular.

En otro aspecto, la presente invención provee un método para inhibir el desarrollo de un carcinoma hepatocelular en un sujeto que presenta una variante de la deficiencia de Serpina1. El método incluye administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de cualquiera de los agentes de ARNhd mencionados o composiciones farmacéuticas de la invención, para así inhibir el desarrollo de un carcinoma hepatocelular en el sujeto.

En aún otro aspecto, la presente invención provee un método para reducir la acumulación de Serpina1 mal plegada en el hígado de un sujeto que presenta una variante de la deficiencia de Serpina1. El método incluye administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de cualquiera de los agentes de ARNhd mencionados o composiciones farmacéuticas de la invención, reduciendo de esa manera la acumulación de Serpina1 más plegada en el hígado del sujeto.

El agente de ARNhd se puede administrar al sujeto a una dosis de entre

aproximadamente 0,01 mg/kg y aproximadamente 10 mg/kg o entre aproximadamente 0,5 mg/kg y aproximadamente 50 mg/kg; o una dosis de entre aproximadamente 10 mg/kg y aproximadamente 30 mg/kg.

El agente de ARNhd se puede administrar al sujeto por vía subcutánea; o intravenosa.

El agente de ARNhd se puede administrar al sujeto en dos o más dosis.

La presente invención se ilustra además en la siguiente descripción detallada y en las figuras.

Descripción breve de las figuras

En la Figura 1A se muestran esquemáticamente las secuencias de nucleótidos modificadas de las hebras sentido y antisentido de AD-61444; AD-75994; y AD-75995. La Figura 1A divulga las SEQ ID N°: 36-37, 36, 38, 36 y 39, respectivamente, por orden de aparición.

La Figura 1B es un gráfico que muestra el efecto de la administración *in vivo* de los agentes de ARNhd indicados sobre el nivel de expresión de AAT (Serpina). El nivel de expresión de AAT indicado es relativo al nivel de expresión de AAT de presangrado.

En la Figura 1C se muestran esquemáticamente las secuencias de nucleótidos modificadas de las hebras sentido y antisentido de AD-61444; AD-77404; y AD-77412.La Figura 1C divulga las SEQ ID N°: 36-37, 36, -37, 36 y 39, respectivamente, por orden de aparición.

La Figura 1D es un gráfico que muestra el efecto de la administración *in vivo* de los agentes de ARNhd indicados sobre el nivel de expresión de AAT (Serpina).

La Figura 2A es un gráfico que muestra el efecto fuera del blanco de AD-

61444 en células Hep3B transfectadas con 10 nM del agente de ARNhd 16 horas después del tratamiento.

La Figura 2B es un gráfico que muestra el efecto fuera del blanco de AD-77412 en células Hep3B transfectadas con 10 nM del agente de ARNhd 16 horas después del tratamiento.

La Figura 3A es un gráfico que muestra la eficacia y durabilidad del silenciamiento de AAT en primates no humanos (NHP) cuando recibieron una sola dosis de 0,3 mg/kg de los agentes indicados. El nivel de expresión de AAT indicado es relativo al nivel de expresión de AAT de presangrado determinado los días -7 y -1 previos a la administración de la dosis.

La Figura 3B es un gráfico que muestra la durabilidad del silenciamiento de AAT en primates no humanos cuando recibieron una sola dosis de 1 mg/kg de los agentes indicados. El nivel de expresión de AAT indicado es relativo al nivel de expresión de AAT de presangrado determinado los días -7 y -1 previos a la administración de la dosis.

La Figura 3C es un gráfico que muestra la durabilidad del silenciamiento de AAT en primates no humanos cuando recibieron una sola dosis de 3 mg/kg de los agentes indicados. El nivel de expresión de AAT indicado es relativo al nivel de expresión de AAT de presangrado determinado los días -7 y -1 previos a la administración de la dosis.

La Figura 3D es un gráfico que muestra la durabilidad del silenciamiento de AAT en primates no humanos cuando recibieron una sola dosis de 10 mg/kg de los agentes indicados. El nivel de expresión de AAT indicado es relativo al nivel de expresión de AAT de presangrado determinado los días -7 y -1 previos a la administración de la dosis.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

La presente invención provee composiciones que comprenden agentes, por ejemplo, agentes de ARNi, por ejemplo, agentes de ARNi de hebra doble, direccionados a Serpina1. También se divulgan métodos que emplean las composiciones de la invención para inhibir la expresión de Serpina1 y para tratar enfermedades asociadas a Serpina1, tales como trastornos hepáticos, por ejemplo, una enfermedad hepática crónica, una inflamación hepática, cirrosis, una fibrosis hepática y/o carcinoma hepatocelular.

La presente invención se basa, por lo menos en parte, en el descubrimiento de nucleótidos o motivos químicos efectivos para agentes de ARNhd dirigidos a Serpina1 que son ventajosos para la inhibición de la expresión del gen blanco, al mismo tiempo que presenta efectos de silenciamiento fuera del gen blanco reducidos, así como composiciones que comprenden dichos agentes adecuados para usos terapéuticos. Más específicamente, se ha descubierto, entre otros, que los agentes de ARNhd dirigidos a Serpina1, donde la hebra antisentido comprende por lo menos una modificación térmicamente desestabilizante del dúplex dentro de la región de siembra (es decir, en las posiciones 2-9 del extremo 5’ de la hebra antisentido, contando desde el extremo 5’) y/o el agente de ARNhd tiene una temperatura de fusión en el rango entre aproximadamente 40 °C y aproximadamente 80 °C puede ser más eficaz para mediar la interferencia de ARN que un agente de ARNhd parental sin la modificación desestabilizante.

I. Definiciones

Para que se pueda comprender más fácilmente la presente invención, primero se definirán algunos términos. Además, se debe destacar que siempre

que se menciona un valor o un rango de valores de un parámetro, los valores y los rangos intermedios de los valores mencionados también forman parte de esta invención.

El artículo "un" y "una" se usan en la presente para hacer referencia a uno o a más de uno (es decir, a por lo menos uno) del objeto gramatical del artículo. A modo de ejemplo, “un elemento” significa un elemento o más de un elemento, por ejemplo, una pluralidad de elementos.

El término "que incluyen/incluyendo" se emplea en la presente para hacer referencia y para usar indistintamente con la frase "que incluyen, pero en un sentido no taxativo".

El término "o" se emplea en la presente para hacer referencia y para usar indistintamente con el término "y/o" a menos que el contexto claramente indique de otra manera.

Según se usa en la presente, "Serpina1" se refiere al gen o proteína del miembro 1 del clado A del inhibidor de la serpina peptidasa. La Serpina1 también se conoce como alfa-1-antitripsina, □-1-antitripsina, AAT, inhibidor de proteasa1, PI, PI1, antielastasa y antitripsina.

El término Serpina1 incluye la Serpina1 humana, cuyas secuencias de aminoácidos y de nucleótidos se pueden consultar, por ejemplo, en GenBank con los N° de Acceso GI: 189163524 (SEQ ID N°: 1), GI: 189163525 (SEQ ID N°: 2), GI: 189163526 (SEQ ID N°: 3), GI: 189163527 (SEQ ID N°: 4), GI: 189163529 (SEQ ID N°: 5), GI: 189163531 (SEQ ID N°: 6), GI: 189163533 (SEQ ID N°: 7), GI: 189163535 (SEQ ID N°: 8), GI: 189163537 (SEQ ID N°: 9), GI: 189163539 (SEQ ID N°: 10) y/o GI: 189163541 (SEQ ID N°: 11); la Serpina1 rhesus, cuyas secuencias de aminoácidos y nucleótidos se

encuentran, por ejemplo, en GenBank con los N° de Acceso GI: 402766667 (SEQ ID N°: 12), GI: 297298519 (SEQ ID N°: 13) y/o GI: 297298520 (SEQ ID N°: 14); la Serpina1 de ratón, cuyas secuencias de aminoácidos y nucleótidos se encuentran, por ejemplo, en GenBank con los N° de Acceso GI: 357588423 y/o GI: 357588426; y de rata, cuya secuencia de aminoácidos y nucleótidos se encuentra, por ejemplo, en GenBank con el N° de Acceso GI: 77020249.Los ejemplos adicionales de las secuencias de ARNm de Serpina1 están fácilmente disponibles usando, por ejemplo, GenBank y OMIM.

Se han identificado más de 120 alelos de Serpina1 y se considera que los alelos "M" son alelos de tipo salvaje o "normales" (por ejemplo, “PIM1-ALA213” (también conocido como PI, M1A), “PIM1-VAL213” (también conocido como PI, MIV), “PIM2”, “PIM3” y PIM4”). Se pueden consultar variantes adicionales, por ejemplo, en la base de datos A(1)ATVar (véase, por ejemplo, Zaimidou, S., *et al.,* (2009) *Hum Mutat.,* 230(3): 308-13 y www.goldenhelix.org/A1ATVar).

Según se usa en la presente, el término “alelo de deficiencia de Serpina1” se refiere a una variante de alelo que produce proteínas que no se pliegan apropiadamente y se pueden agregar intracelularmente y por lo cual no son transportadas apropiadamente desde el sitio de síntesis en el hígado hasta el sitio de acción dentro del cuerpo.

Los ejemplos de alelos de deficiencia de Serpina1 incluyen, el “alelo Z”, el “alelo S”, el “alelo PIM (Malton)” y el “alelo PIM (Procida)”.

Según se usa en la presente, los términos “alelo Z”, “PIZ” y "Z-AAT" se refieren a variantes de alelos de Serpina1 en las cuales el aminoácido en la posición 342 de la proteína ha cambiado de glutamina por una lisina porque el

codón relevante ha cambiado de GAG a AAG. Un sujeto homocigota para un alelo Z se conoce como "PIZZ." Las mutaciones Z-AAT representan un 95% de los pacientes con deficiencia de Serpina1 y se estima que están presentes en 100.000 norteamericanos y en aproximadamente 3 millones de individuos en todo el mundo. El alelo Z alcanza frecuencias polimórficas en caucásicos y es raro o no existe en individuos asiáticos y de color. El fenotipo homocigota ZZ está asociado con un alto riesgo de ambos enfisema y enfermedad hepática. La proteína Z-AAT no se pliega correctamente en el retículo endoplasmático, lo cual conduce a polímeros de bucle-lámina que se agregan y reducen la secreción, generación de la respuesta de la proteína no plegada, apoptosis, respuesta de sobrecarga del retículo endoplasmático, autofagia, estrés mitocondrial y función alterada de hepatocitos.

Según se usa en la presente, los términos “PIM(Malton)” y "M(Malton)-AAT" se refieren a una variante de alelo de Serpina1 en la cual se ha suprimido uno de los residuos adyacentes de fenilalanina en la posición 51 ó 52 de la proteína madura. La supresión de dicho un aminoácido acorta una hebra de la lamina beta, B6, lo cual impide el procesamiento y la secreción normales en el hígado que están asociados con inclusiones en hepatocitos y secreción deteriorada de la proteína desde el hígado.

Según se usa en la presente, el término “PIS” se refiere a una variante de alelo de Serpina1 en la cual el ácido glutámico en la posición 264 está sustituido por valina. Si bien la mayor parte de esta variante de proteína es degradada intracelularmente, existe un frecuencia elevada del alelo PIS en la población caucásica y, por consiguiente, son frecuentes los heterocigotas compuestos con un alelo Z o alelo nulo.

Según se usa en la presente, una “secuencia blanco” se refiere a una porción contigua de la secuencia de nucleótidos de una molécula de ARNm formada durante la transcripción de un gen Serpina1, incluyendo un ARNm que es producto del procesamiento de ARN de un producto de transcripción primario.

Según se usa en la presente, el término “hebra que comprende una secuencia” se refiere a un oligonucleótido que comprende una hebra de nucleótidos descrita por la secuencia de referencia usando la nomenclatura estándar de nucleótidos.

"G”, "C”, "A" y "U" generalmente representan, cada uno, un nucleótido que contiene guanina, citosina, adenina y uracilo como base, respectivamente. “T” y “dT” se usan indistintamente en la presente y hacen referencia a un desoxirribonucleótido en donde la nucleobase es timina, por ejemplo, desoxirribotimina, 2’-desoxitimidina o timidina. Sin embargo, se comprenderá que el término “ribonucleótido” o “nucleótido” o “desoxirribonucleótido” también puede hacer referencia a un nucleótido modificado, tal como se detalla adicionalmente más adelante, o un grupo de reemplazo sustituto. El especialista sabe que la guanina, citosina, adenina y uracilo se pueden reemplazar por otras porciones sin alterar sustancialmente las propiedades de apareamiento de bases de un oligonucleótido que comprende un nucleótido que contiene dicha porción de reemplazo. Por ejemplo, en un sentido no taxativo, un nucleótido que comprende inosina como base puede aparearse por sus bases con nucleótidos que contienen adenina, citosina o uracilo. Por ende, se pueden reemplazar los nucleótidos que contienen uracilo, guanina o adenina en las secuencias de nucleótidos de la invención por un nucleótido que

contiene, por ejemplo, inosina. Las secuencias que comprenden dichos grupos de reemplazo son formas de realización de la invención.

Los “polinucleótidos”, también denominados “oligonucleótidos” se forman mediante la unión covalente de nucleósidos adyacentes entre sí, para formar un oligonucleótido polimérico lineal. En el contexto de la estructura del polinucleótido, los grupos fosfatos se conocen comúnmente por formar los enlaces internucleosídicos del polinucleótido. Los polinucleótidos pueden ser ya sea ARN o ADN y son, por ejemplo de menos de aproximadamente 100, 200, 300 o aproximadamente 400 nucleótidos de longitud.

Los términos “ARNi”, “agente de ARNi”, “agente de ARNi”, “agente de interferencia de ARN”, usados indistintamente en la presente, se refieren a un agente que contiene, ARN tal como se define dicho término en la presente, y que interviene en el clivaje dirigido de un ARN transcripto por medio de una vía de un complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC). El ARNi dirige la degradación de ARNm específica de la secuencia por un proceso conocido como interferencia de ARN (ARNi). El ARNi modula, por ejemplo, inhibe, la expresión de Serpina1 en una célula, por ejemplo, una célula en un sujeto, tal como un sujeto mamífero.

Según se usa en la presente, la frase “mediar el ARNi” se refiere a la capacidad para silenciar, de una manera específica de la secuencia, un ARN blanco. Sin considerar ninguna teoría, se cree que el silenciamiento emplea la maquinaria o el proceso de ARNi y un ARN guía, por ejemplo, un agente de ARNip de 21 a 23 nucleótidos.

En una forma de realización, un agente de ARNi de la invención incluye un ARN de hebra simple que interactúa con una secuencia de ARN blanco, por

ejemplo, una secuencia de ARNm blanco de Serpina1, para dirigir el clivaje del ARN blanco. Sin considerar la teoría, se cree que los ARN de hebra doble largos introducidos en las células son degradados en ARNpi por una endonucleasa de Tipo III conocida como Dicer (Sharp *et al.,* (2001) *Genes Dev.,* 15: 485). Dicer, una enzima tipo ribonucleasa III, procesa el ARNhd en ARNi cortos de 19-23 pares de bases con dos sobreextensiones de bases 3' (Bernstein, *et al*., (2001) *Nature* 409: 363). Los ARNip se incorporan luego en un complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC) donde una o más helicasas desenrolla el dúplex de ARNip, permitiendo que la hebra antisentido complementaria guíe el reconocimiento al blanco (Nykanen, *et al*., (2001) *Cell* 107: 309). Al unirse al ARNm blanco apropiado, una o más endonucleasas en el RISC clivan al blanco para así inducir el silenciamiento (Elbashir, *et al*., (2001) *Genes Dev.,* 15: 188). 15:188). Por consiguiente, en un aspecto la invención se relaciona con un ARN de hebra simple (ARNhs) generado en la célula y que promueve la formación de un complejo RISC para efectuar el silenciamiento del gen blanco, es decir, un gen de Serpina1. Por lo tanto, el término “ARNip” también se usa en la presente para hacer referencia a un ARNi descrito previamente.

En otra forma de realización, el agente de ARNi puede ser un agente de ARNi de hebra simple que se introduce en una célula u organismo para inhibir un ARNm blanco. Los agentes de ARNi de hebra simple (ARNihs) se unen a la endonucleasa RISC, Argonauta 2, que luego cliva al ARNm blanco. Los ARNsi de hebra simple generalmente comprenden 15-30 nucleótidos y están modificados químicamente. El diseño y las pruebas con los agentes de ARNi de hebra simple se describen en la Patente de los EEUU N°: 8.101.348 y en

Lima *et al.*, (2012) *Cell* 150: 883-894, cuyos contenidos se incorporan por completo en la presente a modo de referencia. Se puede emplear cualquiera de las secuencias de nucleótidos antisentido descritas en la presente como un ARNsi de hebra simple como se describe en la presente o modificados químicamente mediante los métodos descritos en Lima *et al.*, (2012) *Cell* 150: 883-894.

En otra forma de realización, un "ARNi" para su uso en las composiciones y los métodos de la invención es un ARN de hebra doble y en la presente se denomina "agente de ARNi de hebra doble", "molécula de ARN de hebra doble (ARNhd)", "agente de ARNhd" o "ARNhd". El término "ARNhd", se refiere a un complejo de moléculas de ácido ribonucleico, que tiene una estructura de dupla que comprende dos hebras de ácido nucleico antiparalelas y sustancialmente complementarias, conocidas por tener orientaciones "en el sentido del marco de lectura" y "antisentido" con respecto a un ARN blanco, es decir, un gen Serpina1. En algunas formas de realización de la invención, un ARN de hebra doble (ARNhd) desencadena la degradación de un ARN blanco, por ejemplo, un ARNm, por medio de un mecanismo de silenciamiento de genes de postranscripción conocido en la presente como interferencia de ARN o ARNi.

En general, la mayoría de los nucleótidos de cada hebra de un agente de ARNhd son ribonucleótidos, pero como se describe con detalle en la presente, cada una o ambas hebras también pueden incluir uno o más no ribonucleótidos, por ejemplo, un desoxirribonucleótido y/o un nucleótido modificado. Adicionalmente, según se usa en esta descripción, un "agente de ARNi" puede incluir ribonucleótidos con modificaciones químicas; un agente de

ARNi puede incluir modificaciones sustanciales en múltiples nucleótidos. Según se usa en la presente, el término “nucleótido modificado” se refiere a un nucleótido que puede comprender, de manera independiente, una unidad de azúcares que ha sido modificada, un enlace entre nucleótidos que ha sido modificado y/o una nucleobase modificada. Por consiguiente, el término nucleótido modificado abarca sustituciones, adiciones o la eliminación, por ejemplo, de un grupo funcional o átomo, de enlaces entre nucleósidos, unidades de azúcares o nucleobases. Las modificaciones adecuadas para su uso en los agentes de la invención incluyen todos los tipos de modificaciones divulgados en la presente o conocidos en el arte. Cualquiera de dichas modificaciones, tal como se usan en una molécula tipo ARNpi, están comprendidas por el “agente de ARNi” a los efectos de esta descripción y las reivindicaciones.

La región del dúplex puede ser de cualquier longitud que permita una degradación específica de un ARN blanco deseado a través de una vía RISC, y puede variar en un rango de entre aproximadamente 9 y 36 pares de bases de longitud, por ejemplo, de aproximadamente 15-30 pares de bases de longitud, por ejemplo, de aproximadamente 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 ó 36 pares de bases de longitud, tal como aproximadamente 15-30, 15-29, 15-28, 15-27, 15-26, 15-25, 15-24, 15-23, 15-22, 15-21, 15-20, 15-19, 15-18, 15-17, 18-30, 18-29, 18-28, 18-27, 18-26, 18-25, 18-24, 18-23, 18-22, 18-21, 18-20, 19-30, 19-29, 19-28, 19-27, 19-26, 19-25, 19-24, 19-23, 19-22, 19-21, 19-20, 20-30, 20-29, 20-28, 20-27, 20-26, 20-25, 20-24,20-23, 20-22, 20-21, 21-30, 21-29, 21-28, 21-27, 21-26, 21-25, 21-24, 21-23 ó 21-22 pares de bases de longitud. Los rangos y las

longitudes intermedios de los rangos y las longitudes indicadas previamente también se contemplan como parte de esta invención.

Las dos hebras que forman la estructura en dupla pueden ser porciones diferentes de una molécula de ARN más grande o pueden ser moléculas de ARN separadas. Cuando las dos hebras forman parte de una molécula más grande, y por ende están conectadas por una hebra ininterrumpida de nucleótidos entre el extremo 3' de una hebra y el extremo 5' de la otra hebra respectiva que forma la estructura en dúplex, la hebra de ARN conectora se conoce como "bucle en horquilla". Un bucle en horquilla puede comprender al menos un nucleótido no apareado. En algunas formas de realización, el bucle en horquilla puede comprender al menos 2, al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7, al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 20, al menos 23 o más nucleótidos no apareados.

Cuando las dos hebras sustancialmente complementarias de un ARNhd están compuestas por moléculas de ARN separadas, dichas moléculas pueden estar, aunque no necesariamente, conectadas de manera covalente. Cuando las dos hebras están conectadas de manera covalente pero por un medio distinto de una hebra ininterrumpida de nucleótidos entre el extremo 3' de una hebra y el extremo 5' de la otra hebra respectiva que forma la estructura en dupla, la estructura de conexión se conoce como un "conector". Las hebras de ARN pueden contener la misma cantidad, o una cantidad diferente, de nucleótidos. La cantidad máxima de pares de bases es la cantidad de nucleótidos en la hebra más corta del ARNhd menos cualquier sobreextensión presente en el dúplex. Además de la estructura en dúplex, un ARNi puede comprender una o más sobreextensiones de nucleótidos.

En una forma de realización, un agente de ARNi de la invención comprende un ARNhd, cada una de cuyas hebras comprende 19-23 nucleótidos, que interactúa con una secuencia de ARN blanco, por ejemplo, una secuencia de ARNm blanco de Serpina1, para dirigir el clivaje del ARN blanco. Sin vinculación con la teoría, los ARN de hebra doble largos introducidos en las células son degradados en ARNip por una endonucleasa de Tipo III conocida como Dicer (Sharp *et al.,* (2001) *Genes Dev.,* 15: 485). Dicer, una enzima tipo ribonucleasa III, procesa el ARNhd en ARNi cortos de 19-23 pares de bases con dos sobreextensiones de bases 3' (Bernstein, *et al*., (2001) *Nature* 409: 363). Los ARNip se incorporan luego en un complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC) donde una o más helicasas desenrollan el dúplex de ARNip, permitiendo que la hebra antisentido complementaria guíe el reconocimiento al blanco (Nykanen, *et al*., (2001) *Cell* 107: 309). Al unirse al ARNm blanco apropiado, una o más endonucleasas en el RISC clivan al blanco para así inducir el silenciamiento (Elbashir, *et al*., (2001) *Genes Dev.,* 15: 188). 15:188).

Según se usa en la presente, el término “sobreextensión de nucleótidos” se refiere a por lo menos un nucleótido no apareado que sobresale de la estructura del dúplex de un ARNi, por ejemplo, un ARNhd. Por ejemplo, cuando un extremo 3’ de una hebra de un ARNhd se extiende más allá del extremo 5’ de la otra hebra, o viceversa, hay una sobreextensión de nucleótidos. Un ARNhd puede comprender una sobreextensión de por lo menos un nucleótido; como alternativa la sobreextensión puede comprender por lo menos dos nucleótidos, por lo menos tres nucleótidos, por lo menos cuatro nucleótidos, por lo menos cinco nucleótidos o más. Una sobreextensión

de nucleótidos puede comprender o consistir en un análogo de nucleótido/nucleósido, incluyendo un desoxinucleótido/nucleósido. Las sobreextensiones pueden ser en la hebra sentido, en la hebra antisentido o en cualquier combinación de las mismas. Aún más, los nucleótidos de una sobreextensión se pueden encontrar en el extremo 5', en el extremo 3' o en ambos extremos de una hebra sentido o antisentido de un ARNhd.

En una forma de realización, la hebra antisentido de un ARNhd tiene una sobreextensión de 1-10 nucleótidos, por ejemplo, de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10 nucleótidos, por el extremo 3' y/o por el extremo 5'. En una forma de realización, la hebra sentido de un ARNhd tiene una sobreextensión de 1-10 nucleótidos, por ejemplo, de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10 nucleótidos, por el extremo 3' y/o por el extremo 5'. En otra forma de realización, se reemplaza uno o más de los nucleótidos en la sobreextensión por un nucleósido con tiofosfato.

En determinadas formas de realización, la sobreextensión en la hebra sentido o en la hebra antisentido o en ambas, puede incluir longitudes extendidas más largas de 10 nucleótidos, por ejemplo, de 10-30 nucleótidos, de 10-25 nucleótidos, de 10-20 nucleótidos o de 10-15 nucleótidos de longitud. En determinadas formas de realización, la sobreextensión extendida se encuentra en la hebra sentido del dúplex. En determinadas formas de realización, hay una sobreextensión extendida por el extremo 3' de la hebra sentido del dúplex. En determinadas formas de realización, hay una sobreextensión extendida por el extremo 5' de la hebra sentido del dúplex. En determinadas formas de realización, la sobreextensión extendida se encuentra en la hebra antisentido del dúplex. En determinadas formas de realización, hay una sobreextensión

extendida en el extremo 3’ de la hebra antisentido del dúplex. En determinadas formas de realización, hay una sobreextensión extendida en el extremo 5’ de la hebra antisentido del dúplex. En otra forma de realización, se reemplaza uno o más de los nucleótidos en la sobreextensión extendida por un nucleósido con tiofosfato.

Los términos “romo” o “de extremos romos”, según se usan en la presente con referencia a un ARNhd significa que no hay nucleótidos no apareados o nucleótidos análogos en un extremo terminal dado de un ARNhd, es decir, no hay una sobreextensión de nucleótidos. Uno o ambos extremos de un ARNhd pueden ser romos. Cuando ambos extremos de un ARNhd son romos, se dice que el ARNhd es de extremos romos. Para mayor claridad, un ARNhd “de extremos romos” es un ARNhd con ambos extremos romos, es decir, no hay una sobreextensión de nucleótidos en ningún extremo de la molécula. Más a menudo dicha molécula será de hebra doble en toda su longitud.

El término “hebra antisentido” o "hebra guía" se refiere a la hebra de un ARNi, por ejemplo, un ARNhd, que incluye una región que es sustancialmente complementaria a una secuencia blanco, por ejemplo, un ARNm de Serpina1.

Según se usa en la presente, el término “región de complementariedad” se refiere a la región sobre la hebra antisentido que es sustancialmente complementaria de una secuencia, por ejemplo una secuencia blanco, por ejemplo, una secuencia de nucleótidos de Serpina1, definida en la presente. Cuando la región de complementariedad no es completamente complementaria de la secuencia blanco, las faltas de coincidencia pueden estar en las regiones internas o terminales de la molécula. En general, las faltas de coincidencia

más toleradas están en las regiones terminales, por ejemplo, dentro de los 5, 4, 3 ó 2 nucleótidos del extremo terminal 5’ y/o 3’ del ARNi.

El término “hebra sentido”, o "hebra pasajero", según se usa en la presente, se refiere a la hebra de un ARNi que incluye una región que es sustancialmente complementaria de una región de la hebra antisentido según la definición de dicho término en la presente.

Según se usa en la presente, el término “región de clivaje” hace referencia a una región localizada inmediatamente adyacente al sitio de clivaje. El sitio de clivaje es el sitio en el blanco en donde se produce el clivaje. En algunas formas de realización, la región de clivaje comprende tres bases en cualquier extremo e inmediatamente adyacente al sitio de clivaje. En algunas formas de realización, la región de clivaje comprende dos bases en cualquier extremo e inmediatamente adyacente al sitio de clivaje. En algunas formas de realización, el sitio de clivaje se encuentra específicamente en el sitio donde se unen los nucleótidos 10 y 11 de la hebra antisentido, y la región de clivaje comprende los nucleótidos 11, 12 y 13.

Según se usa en la presente, y a menos que se indique de otra manera, el término “complementaria”, cuando se usa para describir una primera secuencia de nucleótidos con relación a una segunda secuencia de nucleótidos, se refiere a la capacidad de un oligonucleótido o polinucleótido que comprende a la primera secuencia de nucleótidos de hibridizarse y formar una estructura en dúplex bajo determinadas condiciones con un oligonucleótido o polinucleótido que comprende a la segunda secuencia de nucleótidos, como comprenderá el especialista. Dichas condiciones pueden ser, por ejemplo, ser condiciones severas, en donde dichas condiciones severas puede incluir: NaCl

400 mM, PIPES 40 mM pH 6,4, EDTA 1 mM, a 50 ºC o 70 ºC por entre 12 y 16 horas seguido de lavado. Se pueden aplicar otras condiciones, tales como las condiciones fisiológicamente relevantes que se pueden encontrar dentro de un organismo. Por ejemplo, una secuencia complementaria es suficiente para permitir la función relevante del ácido nucleico, por ejemplo, el ARNi. El especialista podrá determinar el conjunto de condiciones más apropiadas para la prueba de complementariedad de dos secuencias de acuerdo con la aplicación final de los nucleótidos hibridizados.

Las secuencias pueden ser “completamente complementarias” entre sí cuando hay apareamiento de bases de los nucleótidos de la primera secuencia de nucleótidos con los nucleótidos de la segunda secuencia de nucleótidos sobre toda la extensión de la primera y segunda secuencias de nucleótidos. Sin embargo, cuando en la presente se indica que la primera secuencia es “sustancialmente complementaria” con respecto a una segunda secuencia, las dos secuencias pueden ser completamente complementarias, o pueden formar una o más, pero generalmente no más de 4, 3 ó 2 pares de bases no coincidentes tras la hibridación, reteniendo al mismo tiempo la capacidad para hibridizarse bajo las condiciones más relevantes para su aplicación final. Sin embargo, cuando se diseñan dos oligonucleótidos para formar, luego de la hibridación, una o más sobreextensiones de hebra simple, dichas sobreextensiones no serán consideradas como faltas de coincidencia con respecto a la determinación de complementariedad. Por ejemplo, un ARNhd 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 del oligonucleótido más corto, aún puede denominarse como “completamente complementario” a los fines que se describen en la presente.

Las secuencias “complementarias”, según se usan en la presente, también pueden incluir o pueden estar formadas completamente pares de bases que no son Watson-Crick y/o pares de bases formados a partir de nucleótidos no naturales y modificados, en tanto se cumpla con los requisitos anteriores con respecto a su capacidad para hibridizarse. Dichos pares de bases que no son Watson-Crick incluyen, pero en un sentido no taxativo, Bamboleo G:U o apareamiento de bases de Hoogstein.

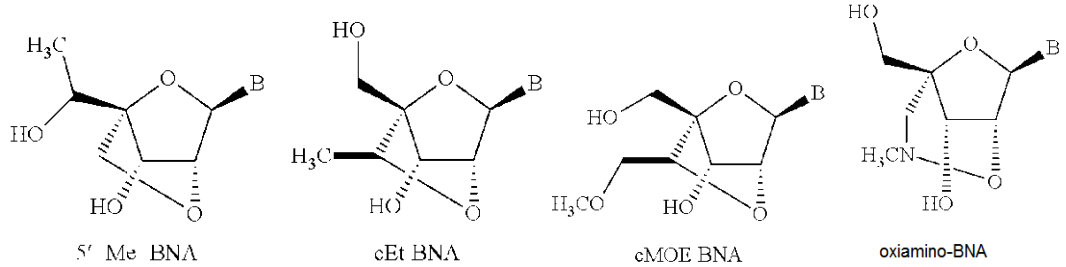
Los términos “complementario”, “completamente complementario” y “sustancialmente complementario” se pueden usar en la presente con respecto a la coincidencia de bases entre la hebra sentido y la hebra antisentido de un ARNhd, o entre la hebra antisentido de un ARNhd y una secuencia blanco, como se comprenderá a partir del contexto de su uso.

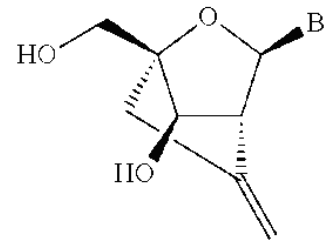
Según se usa en la presente, un polinucleótido que es “sustancialmente complementario a por lo menos una parte” de un ARN mensajero (ARNm) se refiere a un polinucleótido que es sustancialmente complementario de una porción contigua del ARNm de interés (por ejemplo, un ARNm que codifica Serpina1) que incluye una UTR 5’, un marco de lectura abierto (ORF) o una UTR 3’. Por ejemplo, un polinucleótido es complementario de por lo menos una parte de un ARNm Serpina1 si la secuencia es sustancialmente complementaria de una porción no interrumpida de un ARNm que codifica Serpina1.

En algunas formas de realización, un agente de ARNhd de la invención es “suficientemente complementario” de un ARN de Serpina1 blanco, por

ejemplo, un ARN blanco, de modo tal que el agente de ARNhd silenciará la producción de la proteína codificada por el ARNm blanco. En otra forma de realización, el agente de ARNhd de la invención es “exactamente complementario” o completamente complementario de un ARN blanco, por ejemplo, el ARN blanco y el agente de ARNhd dúplex se alinean, por ejemplo, para formar un híbrido conformado exclusivamente por pares de bases de Watson-Crick en la región de complementariedad exacta. Un ARN blanco “suficientemente complementario” puede incluir una región interna (por ejemplo, de por lo menos 10 nucleótidos) que es exactamente complementaria de un ARN blanco. Aún más, en algunas formas de realización, el agente de ARNhd de la invención distingue específicamente una diferencia de un solo nucleótido. En este caso, el agente de ARNhd solamente media al ARNi si hay una complementariedad exacta en la región (por ejemplo, dentro de los 7 nucleótidos) de la diferencia de un solo nucleótido.

El término ‘BNA’ se refiere a un ácido nucleico con puente, y a menudo se denomina ARN restringido o inaccesible. El BNA puede contener una estructura de puente de 5, 6 miembros, o aún de 7-miembros, con un empaquetamiento de azúcar C_3’-endo “fijo”. El puente se incorpora típicamente en la posición 2’-, 4’ de la ribosa para obtener un nucleótido 2’, 4’-BNA (por ejemplo, LNA o ENA). Los ejemplos de nucleótidos BNA incluyen los siguientes nucleósidos:

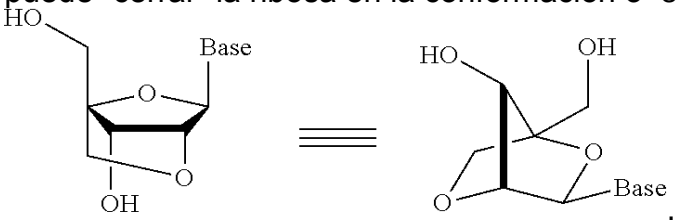




vinil-carbo-BNA

.

El término ‘LNA’ se refiere a un ácido nucleico cerrado, y a menudo se denomina ARN restringido o inaccesible. LNA es un nucleótido de ARN modificado. La unidad ribosa de un nucleótido LNA se modifica con un puente adicional (por ejemplo, un puente de metileno o un puente de etileno) que une el 2' hidroxilo al carbono 4' del mismo azúcar ribosa. Por ejemplo, el puente puede “cerrar” la ribosa en la conformación 3'-endo (North):



.

El término ‘ENA’ se refiere a un ácido nucleico con puente de etileno, y a menudo se denomina ARN restringido o inaccesible.

El término “inhibición”, según se usa en la presente, se emplea indistintamente con “reducción”, “silenciamiento”, “subregulación”, “supresión” y otros términos similares, e incluye cualquier nivel de inhibición.

La frase “inhibición de la expresión de Serpina1”, según se usa en la presente, incluye la inhibición de la expresión de cualquier gen de Serpina1 (tal como, por ejemplo, un gen Serpina1 de ratón, un gen Serpina1 de rata, un gen Serpina1 de mono o un gen Serpina1 humano) así como variantes (por ejemplo, variantes naturales), o mutantes de un gen Serpina1. Por lo tanto, el gen de Serpina1 puede ser un gen de Serpina1 de tipo salvaje, una variante de

un gen de Serpina1, un gen de Serpina1 mutante o un gen de Serpina1 transgénico en el contexto de una célula, un grupo de células o un organismo manipulado genéticamente.

La “inhibición de la expresión de un gen de Serpina1” incluye cualquier nivel de la inhibición de un gen de Serpina1, por ejemplo, al menos una supresión parcial de la expresión de un gen Serpina1, tal como una inhibición de al menos aproximadamente 5%, al menos aproximadamente 10%, al menos aproximadamente 15%, al menos aproximadamente 20%, al menos aproximadamente 25%, al menos aproximadamente 30%, al menos aproximadamente 35%,al menos aproximadamente 40%, al menos aproximadamente 45%, al menos aproximadamente 50%, al menos aproximadamente 55%, al menos aproximadamente 60%, al menos aproximadamente 65%, al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 75%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 85%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 91%, al menos aproximadamente 92%, al menos aproximadamente 93%, al menos aproximadamente 94%, al menos aproximadamente 95%, al menos aproximadamente 96%, al menos aproximadamente 97%, al menos aproximadamente 98% o al menos aproximadamente 99%.

La expresión de un gen de Serpina1 se puede evaluar en base al nivel de cualquier variable asociada con la expresión del gen de Serpina1, por ejemplo, el nivel de ARNm de Serpina1, el nivel de proteína Serpina1 o los niveles de AAT en suero. La inhibición se puede evaluar por una disminución en el nivel absoluto o relativo de una o más de estas variables en comparación

con un nivel control. El nivel control puede ser cualquier tipo de nivel control que se utilice en el arte, por ejemplo, un nivel basal de predosis, o un nivel determinado de un sujeto, célula o muestra similar no tratado o tratado con un control (tal como, por ejemplo, un control de solución amortiguadora solamente o un control con un agente inactivo).

La expresión “poner una célula en contacto con un agente de ARNi de hebra doble”, según se usa en la presente, incluye el contacto de una célula utilizando cualquier medio posible. El contacto de una célula con un agente de ARNi de hebra doble incluye poner una célula en contacto con el agente de ARNi *in vitro* o poner una célula en contacto con el agente de ARNi *in vivo*. El contacto puede ser directo o indirecto. Así, por ejemplo, la persona que ejecuta el método puede poner el agente de ARNi en contacto físico con la célula o, como alternativa, el agente de ARNi puede situarse en una posición que permitirá o hará que subsiguientemente tomará contacto con la célula.

El contacto con una célula *in vitro* puede efectuarse, por ejemplo, por incubación de la célula con el agente de ARNi. El contacto con una célula *in vivo* puede efectuarse, por ejemplo, por inyección del agente de ARNi en o cerca del tejido donde se encuentra la célula o por inyección del agente de ARNi en otro área, en el torrente sanguíneo o en el espacio subcutáneo, de manera tal que el agente llegará posteriormente al tejido donde se encuentra la célula para el contacto. Por ejemplo, el agente de ARNi puede contener y/o puede estar acoplado a un ligando, tal como un ligando GalNAc3, que dirigirá al agente de ARNi al sitio de interés, por ejemplo, el hígado. También es posible combinar los métodos de contacto *in vitro* e *in vivo*. Con relación a los métodos de la invención, la célula también se puede poner en contacto con un agente de

ARNi *in vitro* y posteriormente puede ser trasplantada en un sujeto.

Un "paciente" o un "sujeto", según se usa en la presente, incluye a un ser humano o un animal no humano, preferiblemente un mamífero, por ejemplo, un mono. Con mayor preferencia, el sujeto o paciente es un ser humano.

Una "enfermedad asociada a Serpina1", según se usa en la presente, incluye cualquier enfermedad, trastorno o condición asociada con el gen o la proteína Serpina1. Dicha enfermedad puede ser causada, por ejemplo, por el mal plegamiento de una proteína Serpina1, por acumulación intracelular de una proteína Serpina1 (por ejemplo, una proteína Serpina1 mal plegada), por una producción excesiva de la proteína Serpina1, por variantes del gen de Serpina1, por mutaciones del gen de Serpina1, por un clivaje anormal de la proteína Serpina1, por interacciones anormales entre Serpina1 y otras proteínas u otras sustancias endógenas o exógenas. Una enfermedad asociada a Serpina1 puede ser una enfermedad hepática y/o una enfermedad de pulmón.

Una "enfermedad hepática", según se usa en la presente, incluye una enfermedad, un trastorno o una condición que afecta al hígado y/o a su función. Un trastorno hepático puede ser el resultado de la acumulación de la proteína Serpina1 en el hígado y/o en las células hepáticas. Los ejemplos de trastorno hepáticos incluyen aquellos trastornos hepáticos que resultan de infecciones virales, infecciones por parásitos, predisposición genética, enfermedades autoinmunes, exposición a radiación, exposición a compuestos hepatotóxicos, lesiones mecánicas, diversas toxinas ambientales, alcohol, acetaminofeno, una combinación de alcohol y acetaminofeno, anestésicos por inhalación, niacina,

sustancias quimioterapéuticas, antibióticos, analgésicos, antieméticos y el suplemento de hierbas kava, y combinaciones de los mismos.

Por ejemplo, un trastorno hepático asociado con una deficiencia de Serpina1 aparece más a menudo en sujetos con una o más copias de determinados alelos (por ejemplo, los alelos PIZ, PiM (Malton) y/o PIS). Sin considerar la teoría, se considera que los alelos asociados con un mayor riesgo de desarrollar una enfermedad hepática antitripsina alfa-1 codifican formas de Serpina1 mal plegadas y no son secretadas apropiadamente de los hepatocitos. Las respuestas celulares a estas proteínas mal plegadas pueden incluir la respuesta de proteína desplegada (UPR), degradación asociada al retículo endoplasmático (ERAD), apoptosis, respuesta de sobrecarga de ER, autofagia, estrés mitocondrial y función alterada de hepatocitos. Las lesiones de los hepatocitos pueden conducir a síntomas tales como, pero en un sentido no taxativo, inflamación, colestasis, fibrosis, cirrosis, ictericia obstructiva prolongada, incremento de transaminasas, hipertensión portal y/o carcinoma hepatocelular. Sin considerar la teoría, el transcurso clínico altamente variable de esta enfermedad sugiere la presencia de modificadores o "segundos aciertos" que contribuyen en el desarrollo de los síntomas o del progreso de la severidad.

Por ejemplo, los sujetos con un alelo PIZ puede ser más sensible a las infecciones por hepatitis C o abuso de alcohol y tienen mayor probabilidad de desarrollar un trastorno hepático si se los expone a tales factores. Adicionalmente los sujetos con fibrosis quística (CF) que son portadores de un alelo PIZ tienen mayor riesgo de desarrollar una enfermedad hepática severa con hipertensión portal. La deficiencia de Serpina1 también puede causar o

contribuir en el desarrollo del comienzo temprano de enfisema, paniculitis necrotizante, bronquiectasia y/o ictericia neonatal prolongada. Algunos pacientes que padecen o con riesgo de padecer una deficiencia de alfa-1-antitripsina se identifican con el examen que se efectúa cuando tienen miembros de familia afectados por una deficiencia de alfa-1-antitripsina.

Los ejemplos de trastornos hepáticos incluyen, pero en un sentido no taxativo, inflamación del hígado, enfermedad hepática crónica, cirrosis, fibrosis hepática, carcinoma hepatocelular, necrosis hepática, esteatosis, colestasis y/o reducción y/o pérdida de la función de los hepatocitos.

La “cirrosis” es una condición patológica asociado con el daño hepático crónico que incluye una fibrosis extensa y nódulos regenerativos en el hígado.

La "fibrosis" es la proliferación de fibroblastos y la formación de tejido cicatricial en el hígado.

La frase "función hepática" se refiere a una o más de las muchas funciones fisiológicas del hígado. Dichas funciones incluyen, pero en un sentido no taxativo, regulación de los niveles de azúcar en sangre, regulación endócrina, sistemas enzimáticos, interconversión de metabolitos (por ejemplo, cuerpos cetónicos, esteroles y esteroides y aminoácidos); elaboración de proteínas sanguíneas tal como fibrinógeno, albúmina de suero y colinesterasa, función eritropoyética, detoxificación, formación de bilis y almacenamiento de vitaminas. Se conocen varias pruebas para examinar la función hepática en el arte, incluyendo, por ejemplo, mediciones de alanina amino transferasa (ALT), fosfatasa alcalina, bilirrubina, protrombina y albúmina.

Una "cantidad terapéuticamente eficaz”, según se usa en la presente, pretende incluir la cantidad de un agente de ARNi que, cuando es administrada

a un paciente para tratar una enfermedad asociada a Serpina1, es suficiente para el tratamiento de la enfermedad (por ejemplo, por disminución, alivio o mantenimiento de la enfermedad existente o de uno o más síntomas de la enfermedad). La "cantidad terapéuticamente eficaz" puede variar dependiendo del agente de ARNi, de la manera en que se administra el agente, la enfermedad y su severidad y los antecedentes, edad, peso, historia familiar, constitución genética, etapa de los procesos patológicos mediado por expresión de Serpina1, los tipos de tratamientos precedentes o concomitantes, si hubiera alguno, y otras características individuales del paciente a tratar.

Una “cantidad profilácticamente eficaz”, según se usa en la presente, tiene como intención incluir la cantidad de un agente de ARNi que, cuando se administra a un sujeto que aún no ha experimentado o presentado síntomas de una enfermedad asociada a Serpina1, pero el cual puede estar predispuesto a la enfermedad, es suficiente para prevenir o mejorar la enfermedad o uno o más síntomas de la enfermedad. El alivio de la enfermedad incluye demorar el curso de la enfermedad o reducir la severidad de una enfermedad desarrollada posteriormente. La "cantidad profilácticamente efectiva" puede variar dependiendo del ARNi, de la manera en que se administra el agente, del grado de riesgo de enfermedad y los antecedentes, edad, peso, historia familiar, constitución genética, los tipos de tratamientos precedentes o concomitantes, si hubiera alguno, y otras características individuales del paciente a tratar.

Una "cantidad terapéuticamente eficaz" o “cantidad profilácticamente eficaz” también incluye una cantidad de un agente de ARNi que produce algo del efecto local o sistémico deseado con una relación beneficio/riesgo razonable que se puede aplicar a cualquier tratamiento. Los agentes de ARNi

empleados en los métodos de la presente invención pueden ser administradas en una cantidad suficiente como para producir una relación de beneficio/riesgo razonable aplicable a dicho tratamiento..

El término “muestra”, según se usa en la presente, incluye una colección de fluidos, células o tejidos similares aislados de un sujeto, así como fluidos, células o tejidos presentes en un sujeto. Los ejemplos de fluidos biológicos incluyen sangre, suero y fluidos serosos, plasma, orina, líquido cerebroespinal, fluidos oculares, saliva y semejantes. Las muestras de tejido pueden incluir muestras de tejidos, de órganos o de regiones localizadas. Por ejemplo, las muestras pueden derivar de órganos particulares, de partes de órganos o de fluidos o de células de dichos órganos. En determinadas formas de realización, se pueden obtener muestras del hígado (por ejemplo, del hígado completo o de determinados segmentos del hígado o de determinados tipos de células del hígado, tales como, por ejemplo, hepatocitos). En las formas de realización preferidas, una “muestra que se obtuvo de un sujeto” se refiere a sangre o plasma extraídos del sujeto. En otras formas de realización, una “muestra derivada de un sujeto” hace referencia a tejido hepático (o subcomponentes del mismo) derivado del sujeto.

II. ARNi de la invención

En la presente se describen agentes de ARNi de hebra doble mejorados que inhiben la expresión de un gen de Serpina1 en una célula, tal como una célula en un sujeto, por ejemplo, un mamífero, tal como un ser humano, que sufre de una enfermedad asociada a Serpina1, por ejemplo, una enfermedad hepática, tal como una enfermedad hepática crónica, una inflamación hepática, cirrosis, fibrosis hepática y/o carcinoma hepatocelular.

Por lo tanto, la invención provee agentes de ARNi de hebra doble con modificaciones químicas que pueden inhibir la expresión de un gen blanco (es decir, un gen de Serpina1) *in vivo*.

En determinados aspectos de la invención, están modificados sustancialmente todos los nucleótidos de un ARNi de la invención. En otras formas de realización de la invención, están modificados todos los nucleótidos de un ARNi de la invención. Los ARNi de la invención en donde "sustancialmente todos los nucleótidos están modificados", están mayormente modificados pero no completamente modificados y pueden incluir no más de 5, 4, 3, 2 ó 1 nucleótidos no modificados.

El agente de ARNi comprende una hebra sentido y una hebra antisentido. Cada hebra del agente de ARNi puede variar entre 12 y 30 nucleótidos de longitud. Por ejemplo, cada hebra puede tener entre 14 y 30 nucleótidos de longitud, entre 17 y 30 nucleótidos de longitud, entre 25 y 30 nucleótidos de longitud, entre 27 y 30 nucleótidos de longitud, entre 17 y 23 nucleótidos de longitud, entre 17 y 21 nucleótidos de longitud, entre 17 y 19 nucleótidos de longitud, entre 19 y 25 nucleótidos de longitud, entre 19 y 23 nucleótidos de longitud, entre 19 y 21 nucleótidos de longitud, entre 21 y 25 nucleótidos de longitud, o entre 21 y 23 nucleótidos de longitud.

La hebra sentido y la hebra antisentido típicamente forman un ARN dúplex de hebra doble ("ARNhd"), también referido en la presente como un "agente de ARNi". La región dúplex de un agente de ARNi puede tener entre 12 y 30 pares de nucleótidos de longitud. Por ejemplo, la región dúplex puede tener entre 14 y 30 pares de nucleótidos de longitud, entre 17 y 30 pares de nucleótidos de longitud, entre 27 y 30 pares de nucleótidos de longitud, entre

17 y 23 pares de nucleótidos de longitud, entre 17 y 21 pares de nucleótidos de longitud, entre 17 y 19 pares de nucleótidos de longitud, entre 19 y 25 pares de nucleótidos de longitud, entre 19 y 23 pares de nucleótidos de longitud, entre 19 y 21 pares de nucleótidos de longitud, entre 21 y 25 pares de nucleótidos de longitud o entre 21 y 23 pares de nucleótidos de longitud. En otro ejemplo, la región dúplex se selecciona entre 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26 y 27 nucleótidos de longitud.

En una forma de realización, el agente de ARNi puede contener una o más regiones sobreextendidas y/o grupos protectores en el extremo 3', o extremo 5' o ambos extremos de una o ambas hebras. La sobreextensión puede tener entre 1 y 6 nucleótidos de longitud, por ejemplo entre 2 y 6 nucleótidos de longitud, entre 1 y 5 nucleótidos de longitud, entre 2 y 5 nucleótidos de longitud, entre 1 y 4 nucleótidos de longitud, entre 2 y 4 nucleótidos de longitud, entre 1 y 3 nucleótidos de longitud, entre 2 y 3 nucleótidos de longitud o entre 1 y 2 nucleótidos de longitud. Las sobreextensiones pueden ser el resultado de que una hebra sea más larga que la otra, o el resultado de dos hebras de la misma longitud que estén escalonadas. La sobreextensión puede formar una no coincidencia con el ARNm blanco o puede ser complementaria con las secuencias del gen que es blanco o puede ser otra secuencia. La primera y segunda hebras también pueden estar unidas, por ejemplo, por bases adicionales para formar una horquilla, o por otros conectores no bases.

En una forma de realización, los nucleótidos en la región sobreextendida del agente de ARNi pueden ser de manera independiente cada uno un nucleótido modificado o no modificado que incluye, a título enunciativo no

taxativo 2'-azúcar modificado, tal como, 2-F, 2'-O-metilo, timidina (T), 2`-O-metoxietil-5-metiluridina (Teo), 2`-O-metoxietiladenosina (Aeo), 2`-O-metoxietil-5-metilcitidina (m5Ceo), y cualquier combinación de los mismos. Por ejemplo, TT puede ser una secuencia sobreextendida para cada extremo en cualquier hebra. La sobreextensión puede formar una no coincidencia con el ARNm blanco o puede ser complementaria con las secuencias del gen que es blanco o puede ser otra secuencia.

Las sobreextensiones 5' o 3' en la misma hebra sentido, hebra antisentido o ambas hebras del agente de ARNi pueden estar fosforiladas. En algunas formas de realización, la región sobreextendida contiene dos nucleótidos con un fosforotioato entre los dos nucleótidos, en donde los dos nucleótidos pueden ser iguales o diferentes. En una forma de realización, la sobreextensión está presente en el extremo 3' de la hebra sentido, hebra antisentido o ambas hebras. En una forma de realización, esta sobreextensión 3' está presente en la hebra antisentido. En una forma de realización, esta sobreextensión 3' está presente en la hebra sentido.

El agente de ARNi puede contener sólo una sobreextensión simple, que puede fortalecer la actividad de interferencia del ARNi, sin afectar su estabilidad global. Por ejemplo, la sobreextensión de hebra simple puede estar localizada en el extremo terminal 3' de la hebra sentido o, como alternativa, en el extremo terminal 3' de la hebra antisentido. El ARNi también puede tener un extremo romo, localizado en el extremo 5' de la hebra antisentido (o el extremo 3' de la hebra sentido) o viceversa. Generalmente, la hebra antisentido del ARNi tiene una sobreextensión de nucleótidos en el extremo 3', y el extremo 5' es romo. Si bien no se desea considerar ninguna teoría, el extremo romo

asimétrico en el extremo 5’ de la hebra antisentido y la sobreextensión del extremo 3’ de la hebra antisentido favorece la carga de la hebra guía en el proceso de RISC.

Cualquiera de los ácidos nucleicos presentados en la invención se pueden sintetizar y/o modificar mediante métodos bien establecidos en el arte, tales como los que se describen en “Current protocols in nucleic acid chemistry”, Beaucage, S.L. *et al.,* (Editores.), John Wiley & Sons, Inc., Nueva York, NY, EEUU, que se incorpora en la presente a modo de referencia. Las modificaciones incluyen, por ejemplo, modificaciones de los extremos, por ejemplo, modificaciones del extremo 5’ (fosforilación, conjugación, ligamientos invertidos) o modificaciones del extremo 3’ (conjugación, nucleótidos de ADN, ligamientos invertidos, *etc*.); modificaciones de bases, por ejemplo, reemplazo por bases estabilizantes, bases desestabilizantes o bases que se aparean con un repertorio expandido de miembros, eliminación de bases (nucleótidos abásicos) o bases conjugadas; modificaciones con azúcares (por ejemplo, en la posición 2’ o en la posición 4’) o reemplazo del azúcar; y/o modificaciones del esqueleto, incluyendo la modificación o el reemplazo de los enlaces fosfodiéster. Los ejemplos específicos de compuestos de ARNi de utilidad en las formas de realización que se describen en la presente incluyen, pero en un sentido no taxativo, los ARN que contienen esqueletos modificados o enlaces internucleósidos no naturales. Los ARN que tienen esqueletos modificados incluyen, entre otros, aquellos que no tienen un átomo de fósforo en el esqueleto. A los efectos de esta Descripción, y como en ocasiones se menciona en el arte, los ARN modificados que no tienen un átomo de fósforo en su esqueleto internucleósido también se pueden considerar como

oligonucleósidos. En algunas formas de realización, el ARNi modificado tendrá un átomo de fósforo en su esqueleto internucleósido.

Los esqueletos de ARN modificados que no incluyen un átomo de fósforo son esqueletos formados por enlaces internucleósidos de alquilo o cicloalquilo de cadena corta, heteroátomos mixtos y enlaces internucleósido de alquilo o cicloalquilo, o uno o más enlaces internucleósidos heteroatómicos o heterocíclicos de cadena corta. Estos incluyen aquellos 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 metilenformacetilo y tioformacetilo; esqueletos que contienen alqueno; esqueletos de sulfamato; esqueletos de metilenimino y metilenhidrazino; esqueletos de sulfonato y sulfonamida; esqueletos de amida; y otros que tienen partes de componentes mixtos de N, O, S y CH_2.

Las Patentes de los EEUU representativas que divulgan la preparación de los oligonucleósidos anteriores incluyen, pero en un sentido no taxativo, las Patentes de los EEUU N°: 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, cuyos contenidos completos se incorporan en la presente a modo de referencia.

En otras formas de realización, se contemplan miméticos de ARN adecuados para su uso en los ARNi, en donde tanto el azúcar como el enlace internucleósido, es decir, el esqueleto, de las unidades de nucleótidos se

reemplazan por grupos nuevos. Las unidades de bases se mantienen para su hibridación con un compuesto de ácido nucleico blanco apropiado. Un compuesto oligomérico tal, un mimético de ARN que ha demostrado excelentes propiedades hibridación, se conoce como un ácido nucleico peptídico (PNA). En los compuestos PNA, el esqueleto de azúcar de un ARN es reemplazado por un esqueleto que contiene amida, en particular un esqueleto de aminoetilglicina. Las nucleobases se retienen y se unen de manera directa o indirecta a los átomos de nitrógeno aza de la porción amida del esqueleto. Las Patentes de los EEUU representativas que divulgan la preparación de compuestos PNA incluyen, pero en un sentido no taxativo, las Patentes de los EEUU N°: 5.539.082; 5.714.331; y 5.719.262, cuyos contenidos completos se incorporan en la presente a modo de referencia. Otros compuestos PNA adecuados para su uso en los ARNi de la invención se describen, por ejemplo, en Nielsen *et al*., *Science*, 1991, 254, 1497-1500.

Algunas formas de realización presentadas en la invención incluyen ARN con esqueletos de fosforotioato y oligonucleósidos con esqueletos de heteroátomos y, en particular, --CH_2--NH--CH_2-, --CH_2--N(CH_3)--O--CH_2-- [conocido como un esqueleto de metileno (metilimino) o MMI], --CH_2--O--N(CH_3)--CH_2--, --CH_2--N(CH_3)--N(CH_3)--CH_2-- y --N(CH_3)--CH_2--CH_2-- [en donde el esqueleto fosfodiéster nativo está representado como --O--P--O--CH_2--] de la Patente de los EEUU N°: 5.489.677 ya mencionada, y los esqueletos de amida de la Patente de los EEUU N°: 5.602.240 ya mencionada. En algunas formas de realización, los ARN presentados en la presente tienen las estructuras de esqueletos de morfolino de la Patente de los EEUU N°: 5.034.506 ya mencionada.

Los ARN modificados también pueden contener uno o más grupos de azúcares sustituidos. Los ARNi, por ejemplo, los ARNhd, presentados en la presente pueden incluir 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-alquilo-O-alquilo, en donde el alquilo, el alquenilo y el alquinilo pueden ser C_1 a C_{10} alquilo o C_2 a C_{10} alquenilo y alquinilo sustituidos o no sustituidos. Los ejemplos de modificaciones adecuadas incluyen $O[(CH_2)_nO]_mCH_3$, $O(CH_2)_nOCH_3$, $O(CH_2)_nNH_2$, $O(CH_2)_nCH_3$, $O(CH_2)_nONH_2$ y $O(CH_2)_nON[(CH_2)_nCH_3)]_2$, donde n y m comprenden entre 1 y 10 aproximadamente. En otras formas de realización, los ARNhd incluyen uno de los siguientes en la posición 2': C_1 a C_{10} alquilo inferior, alquilo inferior sustituido, alcarilo, aralquilo, O-alcarilo o O-aralquilo, SH, SCH_3, OCN, Cl, Br, CN, CF_3, OCF_3, $SOCH_3$, SO_2CH_3, ONO_2, NO_2, N_3, NH_2, heterocicloalquilo, heterocicloalcarilo, aminoalquilamino, polialquilamino, sililo sustituido, un grupo de clivaje de ARN, un grupo informante, un intercalador, un grupo para mejorar las propiedades farmacocinéticas de un ARNi o un grupo para mejorar las propiedades farmacodinámicas de un ARNi y otros sustituyentes que tienen propiedades similares. En algunas formas de realización, la modificación incluye un grupo 2'-metoxietoxi (2'-O--$CH_2CH_2OCH_3$, 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. Otro ejemplo de modificación es el grupo 2'-dimetilaminoxietoxi, es decir, un grupo $O(CH_2)_2ON(CH_3)_2$, también conocido como 2'-DMAOE, como se describe más adelante en los ejemplos de la presente, y 2'-dimetilaminoetoxietoxi (también conocido en el arte como 2'-O-dimetilaminoetoxietilo o 2'-DMAEOE), es decir, 2'-O--CH_2--O--CH_2--$N(CH_2)_2$. Otros ejemplos de modificaciones

incluyen: nucleótidos 5’-Me-2’-F, nucleótidos 5’-Me-2’-OMe, nucleótidos 5’-Me-2’-desoxinucleótidos, (ambos isómeros R y S en estas tres familias); 2’-alcoxialquilo; y 2’-NMA (N-metilacetamida).

Otras modificaciones incluyen 2'-metoxi (2'-OCH_3), 2'-aminopropoxi(2'-$OCH_2CH_2CH_2NH_2$) y 2'-fluoro (2'-F). También se pueden efectuar modificaciones similares en otras posiciones del ARN de un ARNi, en particular en la posición 3' del azúcar en el nucleótido 3' terminal o en ARNcd unidos en 2'-5' y en la posición 5' del nucleótido 5' terminal. Los ARNi también pueden contener miméticos de azúcar, tales como grupos ciclobutilo, en lugar del azúcar pentofuranosilo. Las Patentes de los EEUU representativas que divulgan la preparación de dichas estructuras de azúcares modificados incluyen, pero en un sentido no taxativo, las Patentes de los EEUU N°: 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, algunas de las cuales son del mismo solicitante que la presente solicitud. El contenido completo de cada una de las publicaciones precedentes se incorpora en la presente a modo de referencia.

Un ARNi de la invención también puede incluir modificaciones o substituciones de nucleobases (a menudo denominadas simplemente “bases” en el arte). Según se usa en la presente, las nucleobases “no modificadas” 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, tal como 5-metilcitosina (5-me-C), 5-hidroximetilcitosina, xantina, hipoxantina, 2-

aminoadenina, 6-metilo y otros derivados alquilo de adenina y guanina, 2-propilo y otros derivados alquilo de adenina y guanina, 2-tiouracilo, 2-tiotimina y 2-tiocitosina, 5-halouracilo y citosina, 5-propiniluracilo y citosina, 6-azo-uracilo, citosina y timina, 5-uracilo (pseudouracilo), 4-tiouracilo, 8-halo, 8-amino, 8-tiol, 8-tioalquilo, 8-hidroxil anal y otras adeninas y guaninas 8-sustituidas, 5-halo, en particular 5-bromo, 5-trifluorometilo y otros uracilos y citosinas 5-sustituidos, 7-metilguanina y 7-metiladenina, 8-azaguanina y 8-aza-adenina, 7-deazaguanina y 7-deazaadenina y 3-deazaguanina y 3-deazaadenina. Otras nucleobases incluyen las que se divulgan en la Patente de los EE.UU. N°: 3.687.808; las que se divulgan en *Modified Nucleosides in Biochemistry, Biotechnology and Medicine*, Herdewijn, P. ed. Wiley-VCH, 2008; las que se divulgan en *The Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering*, páginas 858-859, Kroschwitz, J. L, ed. John Wiley & Sons, 1990; las que divulgan Englisch *et al*., (1991) *Angewandte Chemie*, Edición Internacional, 30: 613; y las divulgadas por Sanghvi, Y S., Capítulo 15, *dsRNA Research and Applications*, páginas 289-302, Crooke, S. T. y Lebleu, B., Ed., CRC Press, 1993. Algunas de estas nucleobases son de particular utilidad para aumentar la afinidad de unión de los compuestos oligoméricos presentados en la invención. Estas incluyen pirimidinas 5-sustituidas, 6-azapirimidinas y purinas N-2, N-6 y 0-6 sustituidas, incluyendo 2-aminopropiladenina, 5-propiniluracilo y 5-propinilcitosina. Se ha demostrado que las sustituciones 5-metilcitosina aumentan la estabilidad de la dupla de ácidos nucleicos en 0,6-1,2 °C (Sanghvi, Y. S., Crooke, S. T. y Lebleu, B., Eds., *dsRNA Research and Applications*, CRC Press, Boca Raton, 1993, páginas 276-278) y son ejemplos de sustituciones de la base, aún más particularmente cuando se combinan con modificaciones 2'-O-metoxietilo de los

azúcares.

Las Patentes de los EEUU representativas que divulgan la preparación de algunas de las nucleobases modificadas indicadas previamente, así como otras nucleobases modificadas incluyen, pero en un sentido no taxativo, las Patentes de los EEUU N°: 3.687.808. 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; 5.750.692; 6.015.886; 6.147.200; 6.166.197; 6.222.025; 6.235.887; 6.380.368; 6.528.640; 6.639.062; 6.617.438; 7.045.610; 7.427.672; y 7.495.088 indicadas previamente y cuyos contenidos completos se incorporan en la presente a modo de referencia.

Un ARNi de la invención también se puede modificar para que incluya uno o más ácidos nucleicos cerrados (LNA). Un ácido nucleico cerrado es un nucleótido que contiene una porción de ribosa modificada, en donde dicha porción de ribosa comprende un puente adicional que conecta los carbonos 2' y 4'. Esta estructura "cierra" la ribosa de manera efectiva en la conformación estructural 3'-endo. Se ha demostrado que la adición de ácidos nucleicos cerrados a los ARNsi aumenta la estabilidad en suero del ARNsi y reduce los efectos fuera del blanco (Elmen, J. *et al.*, (2005) *Nucleic Acids Research* 33(1): 439-447; Mook, O. *et al.*, (2007) *Mol Canc Ther* 6(3): 833-843; Grunweller, A. *et al.*, (2003) *Nucleic Acids Research* 31(12): 3185-3193).

Un ARNi de la invención también se puede modificar para que incluya una o más unidades de azúcares bicíclicos. Un “azúcar bicíclico” es un anillo furanosilo modificado por formación de un puente de dos átomos. Un “nucleósido bicíclico” (“BNA”) se refiere a un nucleósido que tiene un grupo de

azúcar que comprende un puente que une a dos átomos de carbono del anillo de azúcar, formando de esa manera un sistema de anillos bicíclico. En determinadas formas de realización, el puente une el carbono 4’ y el carbono 2’ del anillo de azúcar. Por consiguiente, en algunas formas de realización un agente de la invención puede incluir uno o más ácidos nucleicos cerrados (LNA). Un ácido nucleico cerrado es un nucleótido que contiene una porción de ribosa modificada, en donde dicha porción de ribosa comprende un puente adicional que conecta los carbonos 2' y 4'. En otras palabras, un LNA es un nucleótido que comprende un grupo azúcar bicíclico que comprende un puente 4'-CH2-O-2'. Esta estructura "cierra" la ribosa de manera efectiva en la conformación estructural 3'-endo. Se ha demostrado que la adición de ácidos nucleicos cerrados a los ARNsi aumenta la estabilidad en suero del ARNsi y reduce los efectos fuera del blanco (Elmen, J. *et al.*, (2005) *Nucleic Acids Research* 33(1): 439-447; Mook, O. *et al.*, (2007) *Mol Canc Ther* 6(3): 833-843; Grunweller, A. *et al.*, (2003) *Nucleic Acids Research* 31(12): 3185-3193). Los ejemplos de nucleósidos bicíclicos para usar en los polinucleótidos de la invención incluyen, en un sentido no taxativo, nucleósidos que comprenden un puente entre los átomos 4' y 2' del anillo ribosilo. En determinadas formas de realización, los agentes polinucleotídicos antisentido de la invención incluyen uno o más nucleósidos bicíclicos que comprenden un puente 4' y 2'. Los ejemplos de dichos nucleósidos bicíclicos con puente 4' a 2', incluyen, pero en un sentido no taxativo, 4'-(CH_2)—O-2' (LNA); 4'-(CH2)—S-2'; 4'-(CH_2)$_2$—O-2' (ENA); 4'-CH(CH_3)—O-2' (también denominado “etilo con impedimento” o “cEt”) y 4'-CH(CH_2OCH_3)—O-2' (y análogos de los mismos; véase, por ejemplo, Patente de los EEUU N°: 7.399.845); 4'-C(CH3)(CH3)—O-2' (y análogos de los

mismos; véase por ejemplo, Patente de los EEUU N°: 8.278.283); 4'-CH_2—$N(OCH_3)$-2' (y análogos de los mismos; véase por ejemplo, Patente de los EEUU N°: 8.278.425); 4'-CH_2—O—$N(CH_3)$-2' (véase, por ejemplo, la publicación de Patente de los EEUU N°: 2004/0171570); 4'-CH_2—N(R)—O-2', en donde R es H, C_1-C_{12} alquilo, o un grupo protector (véase, por ejemplo, Patente de los EEUU N°: 7.427.672); 4'-CH_2—$C(H)(CH_3)$-2' (véase, por ejemplo, Chattopadhyaya et al*., J. Org. Chem*., 2009, 74, 118-134); y 4'-CH_2—$C(=CH_2)$-2' (y análogos de los mismos; véase, por ejemplo, la Patente de los EEUU N°: 8.278.426). El contenido completo de cada una de las publicaciones precedentes se incorpora en la presente a modo de referencia.

Las Patentes de los EEUU y publicaciones de Patentes de los EEUU representativas adicionales que detallan la preparación de nucleótidos de ácidos nucleicos cerrados incluyen, pero en un sentido no taxativo, las siguientes: Patentes de los EEUU N°: 6.268.490; 6.525.191; 6.670.461; 6.770.748; 6.794.499; 6.998.484; 7.053.207; 7.034.133; 7.084.125; 7.399.845; 7.427.672; 7.569.686; 7.741.457; 8.022.193; 8.030.467; 8.278.425; 8.278.426; 8.278.283; US 2008/0039618; y US 2009/0012281, cada uno de cuyos contenidos se incorpora por completo en la presente a modo de referencia.

Cualquiera de los nucleósidos bicíclicos precedentes se puede preparar con una o más configuraciones estereoquímicas del azúcar incluyendo, por ejemplo, α-L-ribofuranosa y β-D-ribofuranosa (véase WO 99/14226).

El ARNi de la invención también puede modificarse para que incluya uno o más etil nucleótidos con impedimento. Según se usa en la presente, un "etil nucleótido restringido" o "cEt" es un ácido nucleico cerrado que comprende una unidad de azúcar bicíclico que comprende un puente 4'-CH(CH3)-O-2'. En una

forma de realización, un etil nucleótido restringido se encuentra en la conformación S denominada “S-cEt” en la presente.

Un ARNi de la invención también puede incluir uno o más “nucleótidos conformacionalmente impedidos” (“CRN”). Los CRN son análogos de nucleótidos con un conector entre los carbonos C2’ y C4’ de la ribosa o los carbonos C3 y C5' de la ribosa. El CRN bloquea el anillo de ribosa en una conformación estable y aumenta la afinidad de hibridación por ARNm. El conector tiene la longitud suficiente para situar el oxígeno en una posición óptima para brindar estabilidad y afinidad que da como resultado un plegado del anillo de ribosa.

Las publicaciones representativas que divulgan la preparación de determinados CRN indicados anteriormente incluyen, pero en un sentido no taxativo, la publicación de Patente de los EEUU N°: 2013/0190383; y la publicación de PCT WO 2013/036868, cada uno de cuyos contenidos se incorpora a la presente a modo de referencia.

En algunas formas de realización, un ARNi de la invención comprende uno o más monómeros que son nucleótidos UNA (ácido nucleico no cerrado). UNA es un ácido nucleico acíclico no cerrado, en el cual se ha eliminado cualquiera de los enlaces del azúcar, formando un residuo "azúcar" no cerrado. En un ejemplo, UNA también abarca un monómero donde se han eliminado los enlaces entre C1'-C4' (es decir, el enlace covalente carbono-oxígeno-carbono entre los carbonos C1' y C4'). En otro ejemplo, se ha eliminado el enlace C2'-C3' (es decir, el enlace covalente carbono-carbono entre los carbonos C2' y C3') del azúcar (véase *Nuc. Acids Symp. Series,* 52, 133-134 (2008) y Fluiter et al., *Mol. Biosyst.,* 2009, 10, 1039, incorporada en la presente a modo de

referencia).

Las publicaciones de las Patentes de los EEUU representativas que divulgan la preparación de UNA incluyen, pero en un sentido no taxativo, la Patente de los EEUU N°: 8.314.227; y las publicaciones de Patente de los EEUU N°: 2013/0096289; 2013/0011922; y 2011/0313020, cada uno de cuyos contenidos se incorpora a la presente a modo de referencia.

Las modificaciones potencialmente estabilizantes de los extremos de las moléculas de ARN pueden incluir N-(acetilaminocaproil)-4-hidroxiprolinol (Hip-C6-NHAc), N-(caproil-4-hidroxiprolinol (Hip-C6), N-(acetil-4-hidroxiprolinol (Hip-NHAc), timidina-2'-0-desoxitimidina (éter), N-(aminocaproil)-4-hidroxiprolinol (Hip-C6-amino), 2-docosanoil-uridina-3"-fosfato, base dT(idT) invertida y otras. La divulgación de esta modificación se puede consultar en la publicación PCT N°: WO 2011/005861.

Otras modificaciones de un ARNi de la invención incluyen un 5’ fosfato o un 5’ fosfato mimético, por ejemplo, un fosfato 5’-terminal o un fosfato mimético en la hebra antisentido de un agente de ARNi. Los miméticos de fosfato adecuados se divulgan, por ejemplo, en la publicación de Patente de los EEUU N°: 2012/0157511, cuyos contenidos se incorporan a la presente a modo de referencia.

A. ARNi que comprenden modificaciones térmicamente desestabilizantes.

Según se describe en la presente, se ha descubierto, entre otros, que se pueden reducir o inhibir los efectos fuera del blanco de los agentes de ARNhd direccionados a Serpina1 mediante la incorporación de nucleótidos térmicamente desestabilizantes en determinadas posiciones de la hebra antisentido del ARNhd. Con estas modificaciones térmicamente

desestabilizantes en determinadas posiciones de la hebra antisentido, los agentes de ARNhd pudieron retener una actividad de silenciamiento de genes similar a la del ARNhd parental en tanto presenta un silenciamiento genético fuera del blanco reducido. Además, también se reduce la cantidad de genes fuera del blanco cuya expresión disminuye o aumenta por acción de los agentes de ARNhd que comprenden estas modificaciones térmicamente desestabilizantes en comparación con el ARNhd parental.

Como tal, en un aspecto, la invención provee un agente de ARNi de hebra doble (ARNhd) capaz de inhibir la expresión de un gen Serpina1 blanco. En general, los agentes de ARNhd de la invención muestran un elevado silenciamiento del gen blanco al mismo tiempo que reducen o minimizan el silenciamiento fuera del blanco y/o la toxicidad. En un sentido no taxativo, los agentes de ARNhd de la invención se pueden sustituir por los agentes de ARNhd y se pueden usar para técnicas de silenciamiento de genes basado en interferencia de ARN, incluyendo, pero en un sentido no taxativo, aplicaciones *in vitro* o *in vivo*.

En general, el agente de ARNhd comprende una hebra sentido (también denominada hebra pasajero) y una hebra antisentido (también denominada hebra guía). Cada hebra del agente de ARNhd puede variar entre 12 y 40 nucleótidos de longitud. Por ejemplo, cada hebra puede ser de 14-40 nucleótidos de longitud, 17-37 nucleótidos de longitud, 25-37 nucleótidos de longitud, 27-30 nucleótidos de longitud, 17-23 nucleótidos de longitud, 17-21 nucleótidos de longitud, 17-19 nucleótidos de longitud, 19-25 nucleótidos de longitud, 19-23 nucleótidos de longitud, 19-21 nucleótidos de longitud, 21-25 nucleótidos de longitud o 21-23 nucleótidos de longitud. En un sentido no

limitante, las hebras sentidas y antisentidas pueden ser de la misma longitud o pueden ser de longitudes diferentes.

En algunas formas de realización, la hebra antisentido es de 18 a 35 nucleótidos de longitud. En algunas formas de realización, la hebra antisentido es de 21-25, 19-25, 19-21 ó 21-23 nucleótidos de longitud. En algunas formas de realización particulares, la hebra antisentido es de 23 nucleótidos de longitud. De manera similar a la hebra antisentido, la hebra sentido puede ser, en algunas formas de realización, de 18-35 nucleótidos de longitud. En algunas formas de realización, la hebra sentido es de 21-25, 19-25, 19-21 ó 21-23 nucleótidos de longitud. En algunas formas de realización particulares, la hebra antisentido es de 21 nucleótidos de longitud.

En algunas formas de realización, las hebras sentido y antisentido son, de manera independiente, de 19, 20, 21, 22, 23, 24 ó 25 nucleótidos de longitud, en donde la hebra antisentido contiene por lo menos un nucleótido térmicamente desestabilizante, y donde dicho por lo menos un nucleótido térmicamente desestabilizante se encuentra en la región de siembra de la hebra antisentido (es decir, en las posiciones 2-9 del extremo 5’ de la hebra antisentido), y en donde el ARNhd opcionalmente presenta además por lo menos una (por ejemplo, una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete o las ocho) de las siguientes características: (i) la secuencia antisentido comprende 2, 3, 4, 5 ó 6 modificaciones 2’-fluoro; (ii) la secuencia antisentido comprende 1, 2, 3 ó 4 enlaces internucleótidos de fosforotioato; (iii) la hebra sentido está conjugada con un ligando; (iv) la hebra sentido comprende 2, 3, 4 ó 5 modificaciones 2’-fluoro; (v) la hebra sentido comprende 1, 2, 3 ó 4 enlaces internucleótidos de fosforotioato; (vi) el ARNhd comprende por lo menos cuatro modificaciones 2’-

fluoro; (vii) el ARNhd comprende una región dúplex de 18, 19, 21, 22, 23, 24 ó 24 pares de nucleótidos de longitud; y (viii) el ARNhd comprende un extremo romo en el extremo 5’ de la hebra sentido. En algunas formas de realización particulares, la hebra sentido es de 19, 20 ó 21 ó 22 nucleótidos de longitud y la hebra antisentido es de 20, 21 ó 22 nucleótidos de longitud.

La hebra hebras sentido y antisentido típicamente forman un ARNhd dúplex. La región dúplex de un agente de ARNi puede tener entre 12 y 30 pares de nucleótidos de longitud. Por ejemplo, la región del dúplex puede comprender entre 14-40 pares de nucleótidos de longitud, 17-30 pares de nucleótidos de longitud, 25-35 nucleótidos de longitud, 27-35 pares de nucleótidos de longitud, 17-23 pares de nucleótidos de longitud, 17-21 pares de nucleótidos de longitud, 17-19 pares de nucleótidos de longitud, 19-25 pares de nucleótidos de longitud, 19-23 pares de nucleótidos de longitud, 19- 21 pares de nucleótidos de longitud, 21-25 pares de nucleótidos de longitud o 21-23 pares de nucleótidos de longitud. En otro ejemplo, la región dúplex se selecciona entre 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26 y 27 nucleótidos de longitud.

En algunas formas de realización, el agente de ARNhd de la invención tiene una región dúplex de 12-40 pares de nucleótidos de longitud, en donde la hebra antisentido contiene por lo menos un nucleótido térmicamente desestabilizante, y donde dicho por lo menos un nucleótido térmicamente desestabilizante se encuentra en la región de siembra de la hebra antisentido (es decir, en las posiciones 2-9 del extremo 5’ de la hebra antisentido), y en donde el ARNhd opcionalmente presenta además por lo menos una (por ejemplo, una, dos, tres, cuatro, cinco, seis o las siete) de las siguientes

características: (i) la secuencia antisentido comprende 2, 3, 4, 5 ó 6 modificaciones 2'-fluoro; (ii) la secuencia antisentido comprende 1, 2, 3 ó 4 enlaces internucleótidos de fosforotioato; (iii) la hebra sentido está conjugada con un ligando; (iv) la hebra sentido comprende 2, 3, 4 ó 5 modificaciones 2'-fluoro; (v) la hebra sentido comprende 1, 2, 3 ó 4 enlaces internucleótidos de fosforotioato; y (vi) el ARNhd comprende por lo menos cuatro modificaciones 2'-fluoro; y (vii) el ARNhd comprende un extremo romo en el extremo 5' de la hebra antisentido. En algunas formas de realización particulares, la región del dúplex es de 18, 19, 20, 21, 22 ó 23 pares de nucleótidos de longitud. En una forma de realización particular, la región del dúplex es de 21 pares de nucleótidos de longitud.

En algunas formas de realización, el agente de ARNhd de la invención comprende una o más regiones de sobreextensión y/o grupos protectores del agente de ARNhd en el extremo 3' o el extremo 5' o ambos extremos de una hebra. La sobreextensión puede ser de 1-10 nucleótidos de longitud, 1-6 nucleótidos de longitud, por ejemplo, de 2-6 nucleótidos de longitud, 1-5 nucleótidos de longitud, 2-5 nucleótidos de longitud, 1-4 nucleótidos de longitud, 2-4 nucleótidos de longitud, 1-3 nucleótidos de longitud, 2-3 nucleótidos de longitud o 1-2 nucleótidos de longitud. Las sobreextensiones pueden ser el resultado de que una hebra sea más larga que la otra, o el resultado de dos hebras de la misma longitud que estén escalonadas. La sobreextensión puede formar una no coincidencia con el ARNm blanco o puede ser complementaria con las secuencias del gen que es blanco o puede ser otra secuencia. La primera y segunda hebras también pueden estar unidas, por ejemplo, por bases adicionales para formar una horquilla, o por otros

conectores no bases.

En algunas formas de realización, los nucleótidos en la región sobreextendida del agente de ARNhd de la invención pueden ser de manera independiente cada uno un nucleótido modificado o no modificado que incluye, pero en un sentido no taxativo, 2'-azúcar modificado, tal como, 2-F 2'-O-metilo, timidina (T), 2`-O-metoxietil-5-metiluridina (Teo), 2`-O-metoxietiladenosina (Aeo), 2`-O-metoxietil-5-metilcitidina (m5Ceo) y cualquier combinación de los mismos. Por ejemplo, TT puede ser una secuencia sobreextendida para cada extremo en cualquier hebra. La sobreextensión puede formar una no coincidencia con el ARNm blanco o puede ser complementaria con las secuencias del gen que es blanco o puede ser otra secuencia.

Las sobreextensiones 5' o 3' en la hebra sentido, la hebra antisentido o ambas hebras del agente de ARNhd de la invención pueden estar fosforiladas. En algunas formas de realización, la región sobreextendida contiene dos nucleótidos con un fosforotioato entre los dos nucleótidos, en donde los dos nucleótidos pueden ser iguales o diferentes. En algunas formas de realización, la sobreextensión está presente en el extremo 3' de la hebra sentido, hebra antisentido o ambas hebras. En algunas formas de realización, esta sobreextensión 3' está presente en la hebra antisentido. En algunas formas de realización, esta sobreextensión 3' está presente en la hebra sentido.

El agente de ARNhd de la invención puede comprender solo una sobreextensión, que puede fortalecer la actividad de interferencia del ARNhd, sin afectar su estabilidad global. Por ejemplo, la sobreextensión de hebra simple está localizada en el extremo terminal 3' de la hebra sentido o, como alternativa, en el extremo terminal 3' de la hebra antisentido. El ARNhd

también puede tener un extremo romo, localizado en el extremo 5’ de la hebra antisentido (o el extremo 3’ de la hebra sentido) o viceversa. Generalmente, la hebra antisentido del ARNhd tiene una sobreextensión de nucleótidos en el extremo 3’, y el extremo 5’ es romo. Sin considerar ninguna teoría, el extremo romo asimétrico en el extremo 5’ de la hebra antisentido y la sobreextensión del extremo 3’ de la hebra antisentido favorece la carga de la hebra guía en el proceso de RISC. Por ejemplo, la sobreextensión simple comprende por lo menos dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o diez nucleótidos de longitud. En algunas formas de realización, el ARNhd tiene una sobreextensión de 2 nucleótidos en el extremo 3’ de la hebra antisentido y un extremo romo en el extremo 5’ de la hebra antisentido.

En algunas formas de realización, un extremo del ARNhd es un extremo romo y el otro extremo tiene una sobreextensión, en donde la hebra antisentido contiene por lo menos un nucleótido térmicamente desestabilizante, y donde dicho por lo menos un nucleótido térmicamente desestabilizante se encuentra en la región de siembra de la hebra antisentido (es decir, en las posiciones 2-9 del extremo 5’ de la hebra antisentido), y en donde el ARNhd opcionalmente presenta además por lo menos una (por ejemplo, una, dos, tres, cuatro, cinco, seis o las siete) de las siguientes características: (i) la secuencia antisentido comprende 2, 3, 4, 5 ó 6 modificaciones 2’-fluoro; (ii) la secuencia antisentido comprende 1, 2, 3 ó 4 enlaces internucleótidos de fosforotioato; (iii) la hebra sentido está conjugada con un ligando; (iv) la hebra sentido comprende 2, 3, 4 ó 5 modificaciones 2’-fluoro; (v) la hebra sentido comprende 1, 2, 3 ó 4 enlaces internucleótidos de fosforotioato; (vi) el ARNhd comprende por lo menos cuatro modificaciones 2’-fluoro; (vii) y el ARNhd comprende una región dúplex de 12-

40 pares de nucleótidos de longitud. En algunas formas de realización, la sobreextensión se encuentra en el extremo 3’ de la hebra antisentido y el extremo romo se encuentra en el extremo 5’ de la hebra antisentido. En algunas formas de realización particulares, la sobreextensión es de 2, 3 ó 4 nucleótidos de longitud.

En algunas formas de realización, el agente de ARNhd tiene una región dúplex de 19, 21, 22 ó 23 pares de bases de nucleótidos de longitud, en donde un extremo del ARNhd es un extremo romo y el otro extremo tiene una sobreextensión, en donde la hebra antisentido contiene por lo menos una modificación térmicamente desestabilizante del dúplex ubicada en la región de siembra de la hebra antisentido (es decir, en las posiciones 2-9 del extremo 5’ de la hebra antisentido), y en donde el ARNhd opcionalmente presenta además por lo menos una (por ejemplo, una, dos, tres, cinco o las seis) de las siguientes características: (i) la secuencia antisentido comprende 2, 3, 4, 5 ó 6 modificaciones 2’-fluoro; (ii) la secuencia antisentido comprende 1, 2, 3 ó 4 enlaces internucleótidos de fosforotioato; (iii) la hebra sentido está conjugada con un ligando; (iv) la hebra sentido comprende 2, 3, 4 ó 5 modificaciones 2’-fluoro; (v) la hebra sentido comprende 1, 2, 3 ó 4 enlaces internucleótidos de fosforotioato; y (vi) el ARNhd comprende por lo menos cuatro modificaciones 2’-fluoro, y opcionalmente la sobreextensión de 2 nucleótidos se encuentra en el extremo 3’ de la hebra antisentido y el extremo romo se encuentra en el extremo 5’ de la hebra antisentido. En algunas formas de realización, la sobreextensión se encuentra en el extremo 3’ de la hebra antisentido y el extremo romo se encuentra en el extremo 5’ de la hebra antisentido.

En algunas formas de realización, el agente de ARNhd de la invención

también puede tener dos extremos romos, en ambos extremos del dúplex de ARNhd.

En algunas formas de realización, el ARNhd tiene un extremo romo en ambos extremos del dúplex, en donde la hebra antisentido contiene por lo menos un nucleótido térmicamente desestabilizante, y donde dicho por lo menos un nucleótido térmicamente desestabilizante se encuentra en la región de siembra de la hebra antisentido (es decir, en las posiciones 2-9 del extremo 5’ de la hebra antisentido), y en donde el ARNhd opcionalmente presenta además por lo menos una (por ejemplo, una, dos, tres, cuatro, cinco, seis o las siete) de las siguientes características: (i) la secuencia antisentido comprende 2, 3, 4, 5 ó 6 modificaciones 2’-fluoro; (ii) la secuencia antisentido comprende 1, 2, 3 ó 4 enlaces internucleótidos de fosforotioato; (iii) la hebra sentido está conjugada con un ligando; (iv) la hebra sentido comprende 2, 3, 4 ó 5 modificaciones 2’-fluoro; (v) la hebra sentido comprende 1, 2, 3 ó 4 enlaces internucleótidos de fosforotioato; (vi) el ARNhd comprende por lo menos cuatro modificaciones 2’-fluoro; y (vii) el ARNhd comprende una región dúplex de 12-40 pares de nucleótidos de longitud.

En algunas formas de realización, el agente de ARNhd tiene una región dúplex de 19, 21, 22 ó 23 pares de bases de nucleótidos de longitud y tiene un extremo romo en ambos extremos del dúplex, en donde un extremo del ARNhd es un extremo romo y el otro extremo tiene una sobreextensión, en donde la hebra antisentido contiene por lo menos una modificación térmicamente desestabilizante del dúplex ubicada en la región de siembra de la hebra antisentido (es decir, en las posiciones 2-9 del extremo 5’ de la hebra antisentido), y en donde el ARNhd opcionalmente presenta además por lo

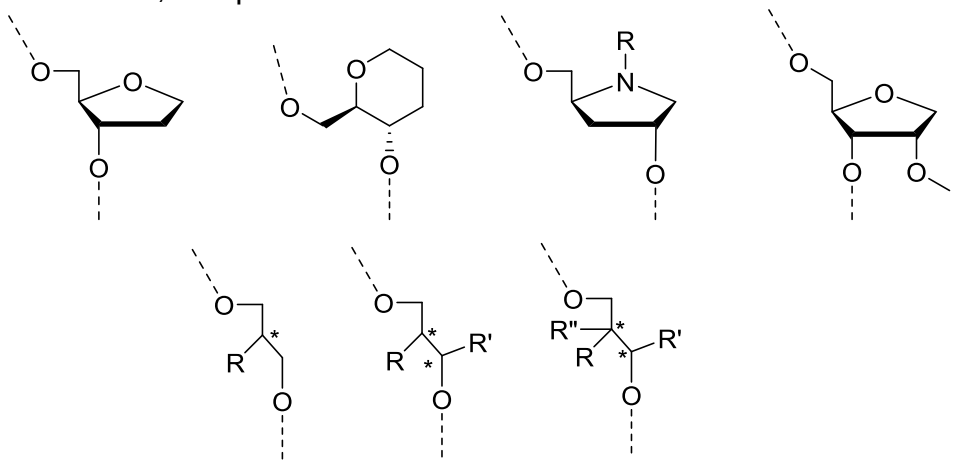
menos una (por ejemplo, una, dos, tres, cinco o las seis) de las siguientes características: (i) la secuencia antisentido comprende 2, 3, 4, 5 ó 6 modificaciones 2'-fluoro; (ii) la secuencia antisentido comprende 1, 2, 3 ó 4 enlaces internucleótidos de fosforotioato; (iii) la hebra sentido está conjugada con un ligando; (iv) la hebra sentido comprende 2, 3, 4 ó 5 modificaciones 2'-fluoro; (v) la hebra sentido comprende 1, 2, 3 ó 4 enlaces internucleótidos de fosforotioato; y (vi) el ARNhd comprende por lo menos cuatro modificaciones 2'-fluoro.

En algunas formas de realización, la hebra antisentido comprende por lo menos uno (por ejemplo, uno, dos, tres, cuatro, cinco o más) modificación térmicamente desestabilizante del dúplex en las primeras 9 posiciones de nucleótido de la región 5' de la hebra antisentido. En algunas formas de realización, la modificación térmicamente desestabilizante del dúplex se ubica en las posiciones 2-9, o preferiblemente en las posiciones 4-8, desde el extremo 5' de la hebra antisentido. En algunas otras formas de realización, la modificación térmicamente desestabilizante del dúplex se ubica en la posición 6, 7 ú 8 desde el extremo 5' de la hebra antisentido. En aún otras formas de realización, la modificación térmicamente desestabilizante del dúplex se ubica en la posición 7 desde el extremo 5' de la hebra antisentido. El término "modificación/modificaciones térmicamente desestabilizante/s" incluye una o más modificaciones que darían como resultado un ARNhd con una temperatura de fusión (Tm) global menor (preferiblemente una Tm de uno, dos, tres o cuatro grados por debajo de la Tm del ARNhd sin dichas una o más modificaciones.

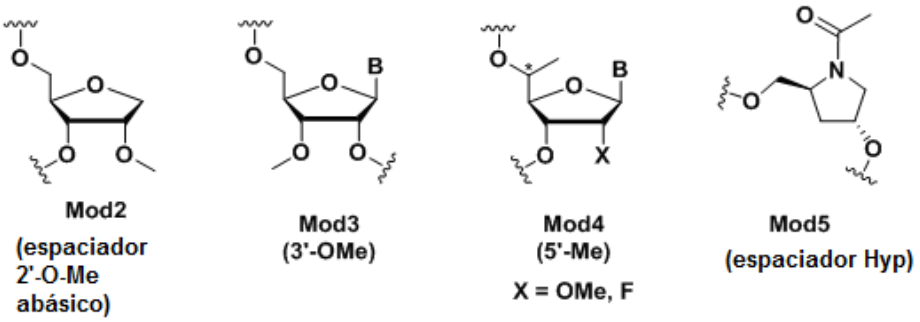
Las modificaciones térmicamente desestabilizantes pueden incluir, pero en un sentido no taxativo, una modificación abásica; falta de coincidencia con

el nucleótido opuesto en la hebra opuesta; y una modificación con un azúcar tal como una modificación 2'-desoxi o un nucleótido acíclico, por ejemplo, ácidos nucleicos no cerrados (UNA) o ácido nucleico de glicol (GNA).

Los ejemplos de modificaciones abásicas incluyen, pero en un sentido no taxativo, las que se indican a continuación:

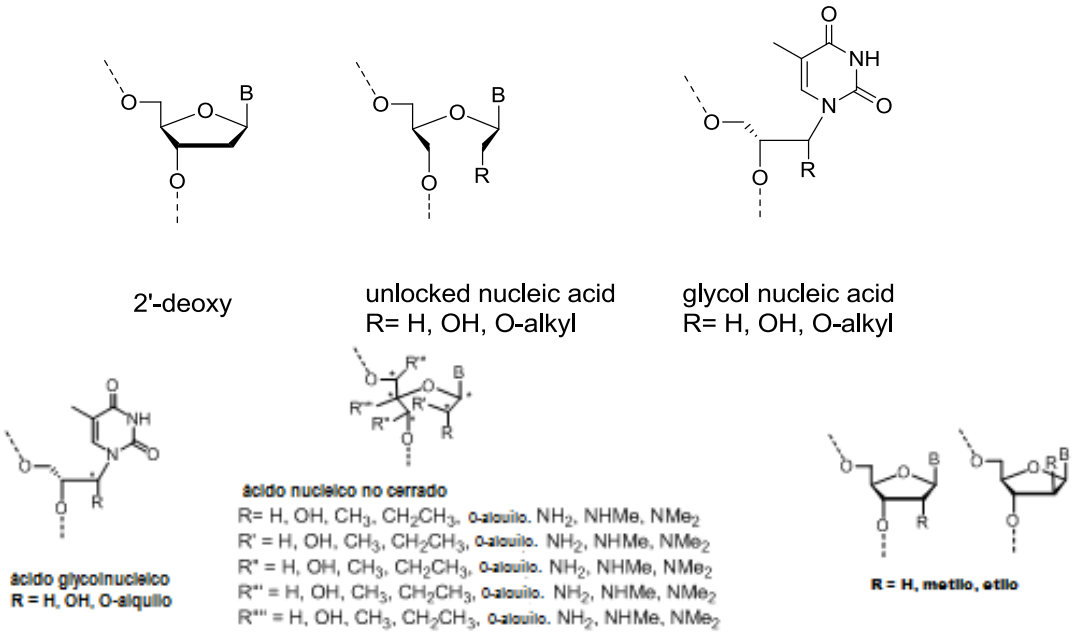


En donde R = H, Me, Et o OMe; R' = H, Me, Et o OMe; R" = H, Me, Et o OMe



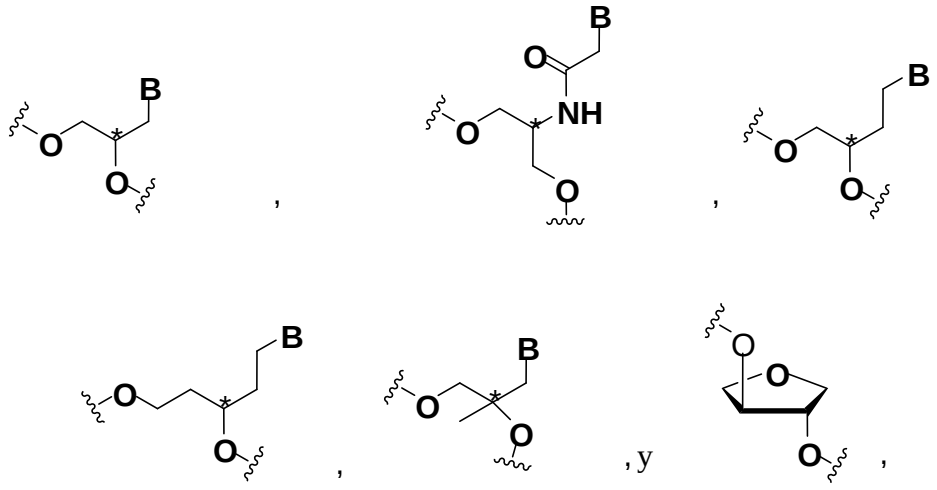
en donde B es una nucleobase modificada o no modificada.

Los ejemplos de modificaciones de azúcares incluyen, pero en un sentido no taxativo, las que se indican a continuación:



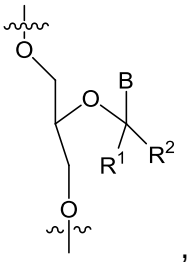
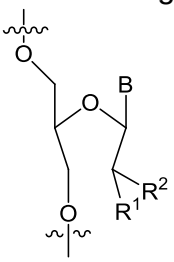
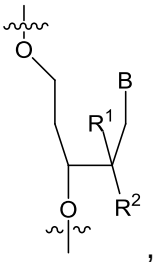
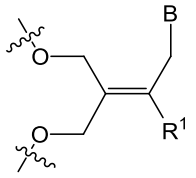
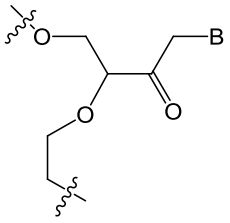
en donde B es una nucleobase modificada o no modificada.

En algunas formas de realización, la modificación térmicamente desestabilizante del dúplex se selecciona del grupo que consiste en:



en donde B es una nucleobase modificada o no modificada.

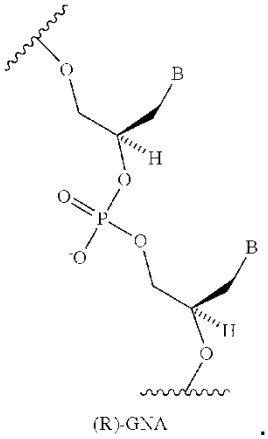
El término "nucleótido acíclico" se refiere a cualquier nucleótido que contiene un azúcar de ribosa acíclico, por ejemplo, cuando está ausente cualquiera de los enlaces entre los carbonos de ribosa (por ejemplo, C1'-C2',

C2’-C3’, C3’-C4’, C4’-O4’ o C1’-O4’) y/o cuando falta por lo menos uno de los carbonos u oxígenos de la ribosa (por ejemplo, C1’, C2’, C3’, C4’ u O4’), de manera independiente o en combinación, en el nucleótido. En algunas formas de realización, el nucleótido acíclico es  ,  ,  ,  o  , en donde B es una nucleobase modificada o no modificada, R^1 y R^2 son, de manera independiente, H, halógeno, OR_3, o alquilo; y R_3 es H, alquilo, cicloalquilo, arilo, aralquilo, heteroarilo o azúcar).

El término “UNA” se refiere a un ácido nucleico acíclico no cerrado, en el cual se ha eliminado cualquiera de los enlaces del azúcar, formando un residuo "azúcar" no cerrado. En un ejemplo, UNA también abarca monómeros en los cuales se han eliminado los enlaces entre C1'-C4' (es decir, el enlace covalente carbono-oxígeno-carbono entre los carbonos C1' y C4'). En otro ejemplo, se elimina el enlace C2'-C3' (es decir, el enlace covalente carbono-carbono entre los carbonos C2' y C3') del azúcar (véase Mikhailov et. al., *Tetrahedron Letters*, 26 (17): 2059 (1985); y Fluiter et al., *Mol. Biosyst*., 10: 1039 (2009), que se incorporan por completo en la presente a modo de referencia). El derivado acíclico provee una mayor flexibilidad al esqueleto sin afectar los apareamientos de Watson-Crick. El nucleótido acíclico se puede unir por medio de un enlace 2’-5’ o 3’-5’.

El término ‘GNA’ se refiere a un ácido nucleico de glicol que es un

polímero similar al ADN o ARN pero difiere en la composición de su “esqueleto” por cuanto está compuesto por unidades repetitivas de glicerol unidas mediante enlaces fosfodiéster:

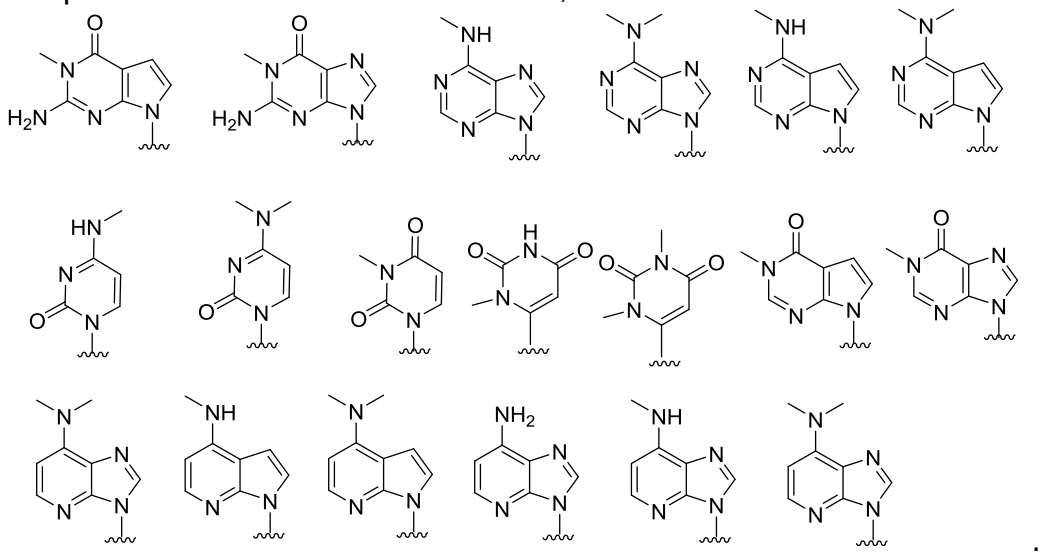


.

La modificación térmicamente desestabilizante del dúplex puede comprender faltas de coincidencia (es decir, pares de bases no complementarias) entre el nucleótido térmicamente desestabilizante y el nucleótido opuesto de la hebra opuesta en el ARNhd dúplex. Los ejemplos de pares de bases con faltas de coincidencia incluyen G:G, G:A, G:U, G:T, A:A, A:C, C:C, C:U, C:T, U:U, T:T, U:T, o una combinación de los mismos. Otros apareamientos de bases con faltas de coincidencia conocidos en el arte también son adecuados en la presente invención. La falta de coincidencia se puede producir entre nucleótidos que son ya sea nucleótidos naturales o nucleótidos modificados, es decir, el apareamiento con falta de coincidencia puede ser entre las nucleobases de los respectivos nucleótidos independientes de las modificaciones en los azúcares ribosa de los nucleótidos. En determinadas formas de realización, el agente de ARNhd contiene por lo menos una nucleobase en el apareamiento con falta de coincidencia que es una nucleobase 2’-desoxi; por ejemplo, la nucleobase 2’-desoxi se encuentra

en la hebra sentido.

En algunas formas de realización, la modificación térmicamente desestabilizante del dúplex en la región de siembra de la hebra antisentido incluye nucleótidos con puentes de H W-C deficientes con la base complementaria sobre el ARNm blanco, tales como:



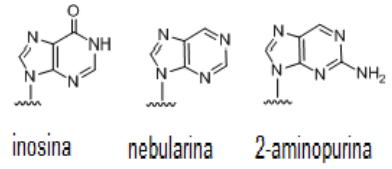
.

Se describen más ejemplos de modificaciones de nucleótidos abásicos, nucleótidos acíclicos (que incluyen UNA y GNA) y modificaciones por faltas de coincidencia con detalle en WO 2011/133876, que se incorpora por completo en la presente a modo de referencia.

Las modificaciones térmicamente desestabilizantes también pueden incluir bases universales con capacidad reducida o nula para formar puentes de hidrógeno con las bases opuestas, y modificaciones con fosfato.

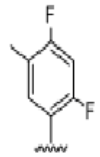
En algunas formas de realización, la modificación térmicamente desestabilizante del dúplex incluye nucleótidos con bases no canónicas tales como, pero en un sentido no taxativo, modificaciones de nucleobases con una capacidad deteriorada o completamente anulada para formar puentes de hidrógeno con las bases en la hebra opuesta. Estas modificaciones de

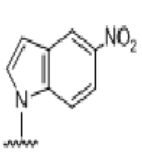
nucleobases fueron evaluadas por la desestabilización de la región central del dúplex de ARNhd como se describe en WO 2010/0011895, que se incorpora por completo en la presente a modo de referencia. Los ejemplos de modificaciones de nucleobase son:

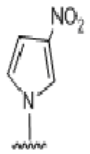

inosina

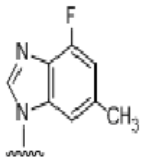
nebularina

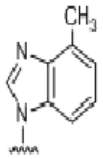
2-aminopurina


2,4-difluorotolueno

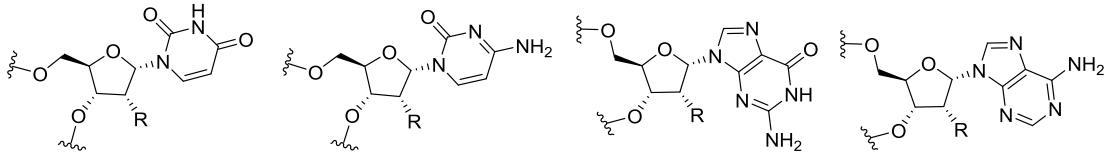

5-nitroindol


3-nitropirrol


4-fluoro-6-metilbenzimidazol

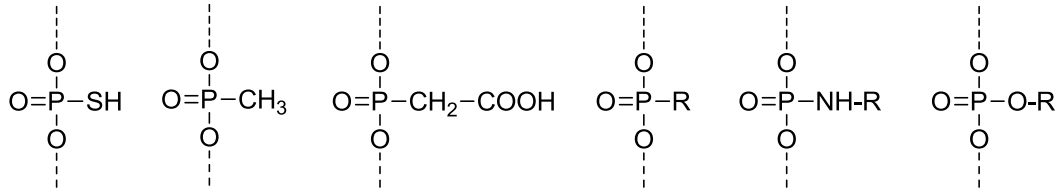

4-metilbenzimidazol

En algunas formas de realización, la modificación térmicamente desestabilizante del dúplex en la región de siembra de la hebra antisentido incluye uno o más nucleótidos α complementarios de la base en el ARNm blanco, tales como:



En donde R es H, OH, OCH_3, F, NH_2, NHMe, NMe_2 o O-alquilo

Los ejemplos de modificaciones con fosfato conocidos por disminuir la estabilidad térmica de los dúplex de ARNhd en comparación con los enlaces fosfodiéster naturales son:



R = alkyl

El alquilo del grupo R puede ser un C_1-C_6alquilo. Los alquilos específicos para el grupo R incluyen, pero en un sentido no taxativo, metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, pentilo y hexilo.

Además de la hebra antisentido que comprende una modificación térmicamente desestabilizante, el ARNhd también puede comprender una o más modificaciones estabilizantes. Por ejemplo, el ARNhd puede comprender por lo menos dos (por ejemplo, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez o más) modificaciones estabilizantes. En un sentido no taxativo, todas las modificaciones estabilizantes pueden estar presentes en una hebra. En algunas formas de realización, ambas hebras sentido y antisentido comprenden por lo menos dos modificaciones estabilizantes. La modificación estabilizante puede tener lugar en cualquier nucleótido de la hebra sentido o la hebra antisentido. Por ejemplo, la modificación estabilizante ser en cada nucleótido de la hebra sentido y/o hebra antisentido; cada modificación estabilizante puede seguir un patrón alternante en la hebra sentido o la hebra antisentido; o la hebra sentido o la hebra antisentido comprenden ambas una modificación estabilizante según un patrón alternante. El patrón alternante de las modificaciones estabilizantes en la hebra sentido puede ser igual o diferente de la hebra antisentido, y el patrón alternante de las modificaciones estabilizantes en la hebra sentido puede presentar un desplazamiento con relación al patrón alternante de las modificaciones estabilizantes en la hebra antisentido.

En algunas formas de realización, la hebra antisentido comprende por lo menos dos (por ejemplo, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez o más) modificaciones estabilizantes. En un sentido no taxativo, la modificación estabilizante en la hebra antisentido puede estar presente en

cualquier posición. En algunas formas de realización, la secuencia antisentido comprende modificaciones estabilizantes en las posiciones 2, 6, 8, 9, 14 y 16 desde el extremo 5'. En algunas otras formas de realización, la secuencia antisentido comprende modificaciones estabilizantes en las posiciones 2, 6, 14 y 16 desde el extremo 5'. En aún algunas otras formas de realización, la secuencia antisentido comprende modificaciones estabilizantes en las posiciones 2, 14 y 16 desde el extremo 5'.

En algunas formas de realización, la hebra antisentido comprende por lo menos una modificación estabilizante adyacente a la modificación desestabilizante. Por ejemplo, la modificación estabilizante se puede ser el nucleótido del extremo 5' o del extremo 3' de la modificación desestabilizante, es decir, en la posición -1 o +1 desde la posición de la modificación desestabilizante. En algunas formas de realización, la hebra antisentido comprende una modificación estabilizante en cada una de los extremos 5' y 3' de la modificación desestabilizante, es decir, en las posiciones -1 y +1 desde la posición de la modificación desestabilizante.

En algunas formas de realización, la hebra antisentido comprende por lo menos dos modificaciones estabilizantes en el extremo 3' de la modificación desestabilizante, es decir, en las posiciones +1 y +2 desde la posición de la modificación desestabilizante.

En algunas formas de realización, la hebra sentido comprende por lo menos dos (por ejemplo, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez o más) modificaciones estabilizantes. En un sentido no taxativo, la modificación estabilizante en la hebra sentido puede estar presente en cualquier posición. En algunas formas de realización, la hebra sentido

comprende modificaciones estabilizantes en las posiciones 7, 10 y 11 desde el extremo 5'. En algunas otras formas de realización, la hebra sentido comprende modificaciones estabilizantes en las posiciones 7, 9, 10 y 11 desde el extremo 5'. En algunas formas de realización, la hebra sentido comprende modificaciones estabilizantes en las posiciones opuestas o complementarias de las posiciones 11, 12 y 15 de la hebra antisentido, contando desde el extremo 5' de la hebra antisentido. En algunas otras formas de realización, la hebra sentido comprende modificaciones estabilizantes en las posiciones opuestas o complementarias de las posiciones 11, 12, 13 y 15 de la hebra antisentido, contando desde el extremo 5' de la hebra antisentido. En algunas formas de realización, la hebra sentido comprende un bloque de dos, tres o cuatro modificaciones estabilizantes.

En algunas formas de realización, la hebra sentido no comprende una modificación estabilizante en una posición opuesta o complementaria de la modificación térmicamente desestabilizante del dúplex en la hebra antisentido.

Los ejemplos de modificaciones térmicamente estabilizantes incluyen, pero en un sentido no taxativo, modificaciones 2'-fluoro.

En algunas formas de realización, el ARNhd de la invención comprende por lo menos cuatro (por ejemplo, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez o más) nucleótidos 2'-fluoro. En un sentido no taxativo, todos los nucleótidos 2'-fluoro pueden estar presentes en una hebra. En algunas formas de realización, ambas hebras sentido y antisentido comprenden por lo menos dos nucleótidos 2'-fluoro. La modificación 2'-fluoro puede tener lugar en cualquier nucleótido de la hebra sentido o la hebra antisentido. Por ejemplo, la modificación 2'-fluoro ser en cada nucleótido de la hebra sentido y/o hebra antisentido; cada

modificación 2'-fluoro puede seguir un patrón alternante en la hebra sentido o la hebra antisentido; o la hebra sentido o la hebra antisentido comprenden ambas modificaciones 2'-fluoro según un patrón alternante. El patrón alternante de las modificaciones 2'-fluoro en la hebra sentido puede ser igual o diferente de la hebra antisentido, y el patrón alternante de las modificaciones 2'-fluoro en la hebra sentido puede presentar un desplazamiento con relación al patrón alternante de las modificaciones 2'-fluoro en la hebra antisentido.

En algunas formas de realización, la hebra antisentido comprende por lo menos dos (por ejemplo, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez o más) nucleótidos 2'-fluoro. En un sentido no taxativo, una modificación 2'-fluoro en la hebra antisentido puede estar presente en cualquier posición. En algunas formas de realización, la secuencia antisentido comprende nucleótidos 2'-fluoro en las posiciones 2, 6, 8, 9, 14 y 16 desde el extremo 5'. En algunas otras formas de realización, la secuencia antisentido comprende nucleótidos 2'-fluoro en las posiciones 2, 6, 14 y 16 desde el extremo 5'. En aún algunas otras formas de realización, la secuencia antisentido comprende nucleótidos 2'-fluoro en las posiciones 2, 14 y 16 desde el extremo 5'.

En algunas formas de realización, la hebra antisentido comprende por lo menos un nucleótido 2'-fluoro adyacente a la modificación desestabilizante. Por ejemplo, el nucleótido 2'-fluoro puede ser el nucleótido en el extremo 5' o el extremo 3' de la modificación desestabilizante, es decir, en la posición -1 o +1 desde la posición de la modificación desestabilizante. En algunas formas de realización, la hebra antisentido comprende un nucleótido 2'-fluoro en cada uno de los extremos 5' y 3' de la modificación desestabilizante, es decir, las posiciones -1 y +1 desde la posición de la modificación desestabilizante.

En algunas formas de realización, la hebra antisentido comprende por lo menos dos nucleótidos 2'-fluoro en el extremo 3' de la modificación desestabilizante, es decir, en las posiciones +1 y +2 desde la posición de la modificación desestabilizante.

En algunas formas de realización, la hebra sentido comprende por lo menos dos (por ejemplo, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez o más) nucleótidos 2'-fluoro. En un sentido no taxativo, una modificación 2'-fluoro en la hebra sentido puede estar presente en cualquier posición. En algunas formas de realización, la secuencia antisentido comprende nucleótidos 2'-fluoro en las posiciones 7, 10 y 11 desde el extremo 5'. En algunas otras formas de realización, la hebra sentido comprende nucleótidos 2'-fluoro en las posiciones 7, 9, 10 y 11 desde el extremo 5'. En algunas formas de realización, la hebra sentido comprende nucleótidos 2'-fluoro en las posiciones opuestas o complementarias de las posiciones 11, 12 y 15 de la hebra antisentido, contando desde el extremo 5' de la hebra antisentido. En algunas otras formas de realización, la hebra sentido comprende nucleótidos 2'-fluoro en las posiciones opuestas o complementarias de las posiciones 11, 12, 13 y 15 de la hebra antisentido, contando desde el extremo 5' de la hebra antisentido. En algunas formas de realización, la hebra sentido comprende un bloque de dos, tres o cuatro nucleótidos 2'-fluoro.

En algunas formas de realización, la hebra sentido no comprende un nucleótido 2'-fluoro en la posición opuesta o complementaria de la modificación térmicamente desestabilizante del dúplex en la hebra antisentido.

En algunas formas de realización, el agente de ARNhd de la invención comprende una hebra sentido de 21 nucleótidos (nt) y una hebra antisentido de

23 nucleótidos (nt), en donde la hebra antisentido contiene por lo menos un nucleótido térmicamente desestabilizante, donde dicho por lo menos un nucleótido térmicamente desestabilizante está presente en la región de siembra de la hebra antisentido (es decir, en las posiciones 2-9 del extremo 5’ de la hebra antisentido), en donde un extremo del ARNhd es romo, en tanto el otro extremo comprende una sobreextensión de 2 nt, y en donde el ARNhd opcionalmente presenta además por lo menos una (por ejemplo, una, dos, tres, cuatro, cinco, seis o las siete) de las siguientes características: (i) la secuencia antisentido comprende 2, 3, 4, 5 ó 6 modificaciones 2’-fluoro; (ii) la secuencia antisentido comprende 1, 2, 3 ó 4 enlaces internucleótidos de fosforotioato; (iii) la hebra sentido está conjugada con un ligando; (iv) la hebra sentido comprende 2, 3, 4 ó 5 modificaciones 2’-fluoro; (v) la hebra sentido comprende 1, 2, 3 ó 4 enlaces internucleótidos de fosforotioato; (vi) el ARNhd comprende por lo menos cuatro modificaciones 2’-fluoro; y (vii) el ARNhd comprende un extremo romo en el extremo 5’ de la hebra antisentido. Preferiblemente, la sobreextensión de 2 nt se encuentra en el extremo 3’ de la hebra antisentido.

En algunas formas de realización, el agente de ARNhd de la invención que comprende una hebra sentido y una hebra antisentido, en donde: la hebra sentido es de 25-30 residuos de nucleótidos de longitud, en donde, comenzando desde el nucleótido 5’ terminal (posición 1), las posiciones 1 a 23 de dicha hebra sentido comprenden por lo menos 8 ribonucleótidos; la hebra antisentido es de 36-66 residuos de nucleótidos de longitud y, comenzando desde el nucleótido 3’ terminal, por lo menos 8 ribonucleótidos en las posiciones apareadas con las posiciones 1-23 de la hebra sentido forman un dúplex; en donde por lo menos el nucleótido 3 ‘ terminal de la hebra antisentido

no está apareado con la hebra sentido, y hasta 6 nucleótidos 3’ terminales consecutivos no están apareados con la hebra sentido, formando de esa manera una sobreextensión 3’ de hebra simple de 1-6 nucleótidos; en donde el extremo 5’ terminal de la hebra antisentido comprende 10-30 nucleótidos consecutivos que no están apareados con la hebra sentido, formando de esa manera una sobreextensión 5' de 10-30 nucleótidos de hebra simple; en donde por lo menos los nucleótidos 5' terminal y 3' terminal de la hebra sentido están apareados por sus bases con los nucleótidos de la hebra antisentido cuando las hebras sentido y antisentido se alinean para una complementariedad máxima, formando de esa manera una región sustancialmente dúplex entre las hebras sentido y antisentido; y la hebra antisentido es suficientemente complementaria de un ARN blanco a lo largo de por lo menos 19 ribonucleótidos de la extensión de la hebra antisentido para reducir la expresión del gen blanco cuando dicho ácido nucleico de hebra doble se introduce en una célula de mamífero; y en donde la hebra antisentido contiene por lo menos un nucleótido térmicamente desestabilizante, donde por lo menos un nucleótido térmicamente desestabilizante se encuentra en la región de siembra de la hebra antisentido (es decir en las posiciones 2-9 del extremo 5’ de la hebra antisentido). Por ejemplo, el nucleótido térmicamente desestabilizante está presente entre las posiciones opuestas o complementarias de las posiciones 14-17 del extremo 5’ de la hebra sentido, y en donde el ARNhd opcionalmente presenta además por lo menos una (por ejemplo, una, dos, tres, cuatro, cinco, seis o las siete) de las siguientes características: (i) la secuencia antisentido comprende 2, 3, 4, 5 ó 6 modificaciones 2’-fluoro; (ii) la secuencia antisentido comprende 1, 2, 3 ó 4 enlaces internucleótidos de fosforotioato; (iii) la hebra

sentido está conjugada con un ligando; (iv) la hebra sentido comprende 2, 3, 4 ó 5 modificaciones 2'-fluoro; (v) la hebra sentido comprende 1, 2, 3 ó 4 enlaces internucleótidos de fosforotioato; y (vi) el ARNhd comprende por lo menos cuatro modificaciones 2'-fluoro; y (vii) el ARNhd comprende una región dúplex de 12-30 pares de nucleótidos de longitud.

En algunas formas de realización, el agente de ARNhd de la invención comprende una hebra sentido y una hebra antisentido, en donde dicho agente de ARNhd comprende una hebra sentido que tiene una longitud que es de por lo menos 25 y como máximo de 29 nucleótidos y una hebra antisentido que tiene una longitud que es como máximo de 30 nucleótidos con la hebra sentido comprende un nucleótido modificado que es susceptible a degradación enzimática en la posición 11 desde el extremo 5', en donde el extremo 3' de dicha hebra sentido y el extremo 5' de dicha hebra antisentido forman un extremo romo y dicha hebra antisentido es 1-4 nucleótidos más larga por su extremo 3' que la hebra sentido, en donde la región dúplex que es de por lo menos 25 nucleótidos de longitud, y dicha hebra antisentido es suficientemente complementaria de un ARN blanco, a lo largo de por lo menos 19 nt de dicha hebra antisentido longitud para reducir la expresión del gen blanco cuando dicho agente de ARNhd se introduce en una célula de mamífero, y en donde el clivaje con Dicer de dicho ARNhd resulta preferencialmente en un ARNip que comprende dicho extremo 3' de dicha hebra antisentido, reduciendo de esa manera la expresión del gen blanco en el mamífero, en donde la hebra antisentido contiene por lo menos un nucleótido térmicamente desestabilizante, donde dicho por lo menos un nucleótido térmicamente desestabilizante se encuentra en la región de siembra de la hebra antisentido (es decir en las

posiciones 2-9 del extremo 5’ de la hebra antisentido), y en donde el ARNhd opcionalmente presenta además por lo menos una (por ejemplo, una, dos, tres, cuatro, cinco, seis o las siete) de las siguientes características: (i) la secuencia antisentido comprende 2, 3, 4, 5 ó 6 modificaciones 2’-fluoro; (ii) la secuencia antisentido comprende 1, 2, 3 ó 4 enlaces internucleótidos de fosforotioato; (iii) la hebra sentido está conjugada con un ligando; (iv) la hebra sentido comprende 2, 3, 4 ó 5 modificaciones 2’-fluoro; (v) la hebra sentido comprende 1, 2, 3 ó 4 enlaces internucleótidos de fosforotioato; y (vi) el ARNhd comprende por lo menos cuatro modificaciones 2’-fluoro; y (vii) el ARNhd tiene una región dúplex de 12-29 pares de nucleótidos de longitud.

En algunas formas de realización, cada nucleótido en las hebras sentido y antisentido del agente de ARNhd puede estar modificado. Cada nucleótido se puede modificar con la misma modificación o diferente que puede incluir una o más alteraciones de uno o ambos de los oxígenos de fosfato que no se une y/o de uno o más oxígenos de fosfato que se une; alteración de un constituyente del azúcar ribosa, por ejemplo, del hidroxilo 2’ en el azúcar ribosa; el reemplazo general del grupo fosfato por conectores “desfosfo”; modificación o reemplazo de una base de origen natural; y reemplazo o modificación de la estructura ribosa-fosfato.

Debido a que los ácidos nucleicos son polímeros de subunidades, muchas de las modificaciones se producen en una posición que se repite en un ácido nucleico, por ejemplo, una modificación de una base, o un grupo fosfato, o un O no conector de un grupo fosfato. En algunos casos la modificación se producirá en todas las posiciones del sujeto en el ácido nucleico pero en muchos casos no ocurrirá. A modo de ejemplo, una modificación puede sólo

ocurrir en una posición 3’ o 5’ terminal, puede sólo ocurrir en una región terminal, por ejemplo, en una posición en un nucleótido terminal o en los últimos 2, 3, 4, 5, o 10 nucleótidos de una hebra. Una modificación puede ocurrir en una región de hebra doble, una región de hebra simple o en ambas. Una modificación puede ocurrir sólo en la región de cadena doble de un ARN o puede sólo ocurrir en una región de hebra simple de un ARN. Por ejemplo, una modificación fosforotioato en una posición de O no conector puede sólo ocurrir en uno o ambos extremos, puede sólo ocurrir en una región terminal, por ejemplo, en una posición en un nucleótido terminal o en los últimos 2, 3, 4, 5, o 10 nucleótidos de una cadena, o puede ocurrir en las regiones de cadena doble o simple cadena, particularmente en el extremo terminal. Los extremos 5’ pueden estar fosforilados.

Sería posible, por ejemplo, mejorar la estabilidad, incluir bases particulares en sobreextensiones, o incluir nucleótidos modificados o nucleótidos sustitutos, en sobreextensiones de simple cadena, por ejemplo, en una sobreextensión 5’ o 3’, o en ambas. Por ejemplo, puede ser deseable incluir nucleótidos de purina en las sobreextensiones. En algunas formas de realización todas o algunas de las bases en una sobreextensión 3’ o 5’ pueden ser modificadas, por ejemplo, con una modificación descrita en la presente. Las modificaciones pueden incluir, por ejemplo, el uso de modificaciones en la posición 2’ del azúcar ribosa con modificaciones que son conocidas en el arte, por ejemplo, el uso de desoxirribonucleótidos, 2’-desoxi-2’-fluoro (2’-F) o 2’-O-metilo modificados en lugar del riboazúcar de la nucleobase, y modificaciones en el grupo fosfato, por ejemplo, modificaciones fosforotioato. Las sobreextensiones no necesitan ser homólogas con la secuencia blanco.

En algunas formas de realización, cada residuo de la cadena orientada en el sentido del marco de lectura y cadena antisentido se modifica de manera independiente con LNA, HNA, CeNA, 2’-metoxietilo, 2’-O-metilo, 2’-O-alilo, 2’-C-alilo, 2’-desoxi o 2’-fluoro. Las hebras pueden contener más de una modificación. En algunas formas de realización, cada residuo de la cadena orientada en el sentido del marco de lectura y cadena antisentido está modificada de manera independiente con 2’-O-metilo o 2’-fluoro. Se comprenderá que estas modificaciones son adicionales a dicha por lo menos una modificación térmicamente desestabilizante del dúplex presente en la hebra antisentido.

Típicamente hay por lo menos dos modificaciones diferentes en la hebra sentido y la hebra antisentido. Dichas dos modificaciones pueden ser las modificaciones 2’-desoxi, 2’-O-metilo o 2’-fluoro, nucleótidos acíclicos u otros. En algunas formas de realización, las hebras sentido y antisentido comprende cada una dos nucleótidos modificados de manera diferente seleccionados entre 2’-O-metilo o 2’-desoxi. En algunas formas de realización, cada residuo de las hebras sentido y antisentido está modificado de manera independiente con un nucleótido 2'-O-metilo, un nucleótido 2’-desoxi, un nucleótido 2´-desoxifluoro, un nucleótido 2'-O-N-metilacetamida (2'-O-NMA), un nucleótido 2'-O-dimetilaminoetoxietilo (2'-O-DMAEOE), un nucleótido 2'-O-aminopropilo (2'-O-AP) o un nucleótido 2'-ara-F. Nuevamente, se comprenderá que estas modificaciones son adicionales a dicha por lo menos una modificación térmicamente desestabilizante del dúplex presente en la hebra antisentido.

En algunas formas de realización, el agente de ARNhd de la invención comprende modificaciones según un patrón alternante, en particular en las

regiones B1, B2, B3, B1', B2', B3', B4'. El término "motivo alternante" o "patrón alternante" según se usa en la presente hace referencia a un motivo que tiene una o más modificaciones, en donde cada modificación se produce en nucleótidos alternados de una cadena. El nucleótido alternado puede hacer referencia a uno cada otro nucleótido o uno cada tres nucleótidos, o un patrón similar. Por ejemplo, si A, B y C representan cada uno un tipo de modificación del nucleótido, el motivo alternante puede ser "ABABABABABAB…", "AABBAABBAABB…", "AABAABAABAAB…", "AAABAAABAAAB…", "AAABBBAAABBB…", o "ABCABCABCABC…", etc.

El tipo de modificaciones contenidas en el motivo alternante puede ser el mismo o diferente. Por ejemplo, si cada uno de A, B, C, D representa un tipo de modificación en el nucleótido, el patrón alternante, es decir, modificaciones en los nucleótidos por medio, pueden ser las mismas, pero cada una de las hebra sentido o hebra antisentido se pueden seleccionar de varias posibilidades de modificaciones en el motivo alternante tal como "ABABAB…", "ACACAC…" "BDBDBD…" o "CDCDCD…", etc.

En algunas formas de realización, el agente de ARNhd de la invención comprende el patrón de modificación para el motivo alternante en la hebra sentido está desplazado en relación al patrón de modificación para el motivo alternante en la hebra antisentido. El desplazamiento puede ser tal que el grupo modificado de nucleótidos de la hebra sentido corresponde a un grupo diferencialmente modificado de nucleótidos de la hebra antisentido y viceversa. Por ejemplo, cuando se aparea la hebra sentido con la hebra antisentido en el dúplex de ARNhd, el motivo alternante en la hebra sentido puede comenzar con "ABABAB" de 5'-3' de la hebra y el motivo alternante en la hebra

antisentido puede comenzar con “BABABA” de 3’-5’ de la hebra en la región dúplex. Como otro ejemplo, el motivo alternante en la hebra sentido puede comenzar con “AABBAABB” de 5’-3’ de la hebra y el motivo alternante en la hebra antisentido puede comenzar con “BBAABBAA” de 3’-5’ de la hebra en la región dúplex, de modo que hay un desplazamiento completo o parcial de los patrones de modificación entre la hebra sentido y la hebra antisentido.

El agente de ARNhd de la invención puede comprende además por lo menos un enlace fosforotioato o metilfosfonato internucleótido. La modificación de la unión internucleótido fosforotioato o metilfosfonato puede ser en cualquier nucleótido de la hebra sentido o la hebra antisentido o ambas en cualquier posición de la hebra. Por ejemplo, la modificación de la unión internucleótido puede ser en cualquier nucleótido de la hebra sentido y/o la hebra antisentido; cada modificación de unión internucleótido puede ser en un patrón alternante sobre la hebra orientada en el sentido del marco de lectura o la hebra antisentido; o la hebra sentido o la hebra antisentido pueden contener las dos modificaciones de unión de internucleótidos en un patrón alternante. El patrón alternante de la modificación de unión internucleótido en la hebra sentido puede ser el mismo o diferente de la hebra antisentido, y el patrón alternante de la modificación de unión internucleótido en la hebra sentido puede tener un desplazamiento con relación al patrón alternante de la modificación de unión internucleótido en la hebra antisentido.

En algunas formas de realización, el agente de ARNhd comprende la modificación del enlace fosforotioato o metilfosfonato internucleótido en la región de sobreextensión. Por ejemplo, la región sobreextendida comprende dos nucleótidos que tienen una unión internucleótido fosforotioato o

metilfosfonato entre los dos nucleótidos. Las modificaciones de unión internucleótido también se pueden efectuar para unir los nucleótidos de la sobreextensión con los nucleótidos apareados terminales en la región dúplex. Por ejemplo, por lo menos 2, 3, 4, o todos los nucleótidos de la sobreextensión pueden estar unidos por medio de una unión internucleótido fosforotioato o metilfosfonato, y opcionalmente, puede haber uniones adicionales internucleótido fosforotioato o metilfosfonato que unan el nucleótido de la sobreextensión con un nucleótido apareado que es próximo al nucleótido de la sobreextensión. Por ejemplo, puede haber por lo menos dos uniones internucleótido fosforotioato entre los tres nucleótidos terminales, en donde dos de los tres nucleótidos son nucleótidos sobreextendidos, y el tercero es un nucleótido apareado próximo al nucleótido de la sobreextensión. Preferiblemente, estos tres nucleótidos terminales se encuentran en el extremo 3’ de la hebra antisentido.

En algunas formas de realización, la hebra sentido del agente de ARNhd comprende 1-10 bloques de dos a diez enlaces internucleótidos de fosforotioato o metilfosfonato separados por 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 ó 16 enlaces internucleótidos de fosfato, en donde uno de los enlaces internucleótidos de fosforotioato o metilfosfonato se ubica en cualquier posición en la secuencia de oligonucleótidos y dicha hebra sentido se aparea con una hebra antisentido que comprende cualquier combinación de enlaces internucleótidos de fosforotioato, metilfosfonato y de fosfato o una hebra antisentido que comprende ya sea un enlace fosforotioato o metilfosfonato o fosfato.

En algunas formas de realización, la hebra antisentido del agente de

ARNhd comprende dos bloques de dos enlaces internucleótidos de fosforotioato o metilfosfonato separados por 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 ó 18 enlaces internucleótidos de fosfato, en donde uno de los enlaces internucleótidos de fosforotioato o metilfosfonato se ubica en cualquier posición en la secuencia de oligonucleótidos y dicha hebra antisentido se aparea con una hebra sentido que comprende cualquier combinación de enlaces internucleótidos de fosforotioato, de metilfosfonato y de fosfato o una hebra antisentido que comprende ya sea un enlace fosforotioato o metilfosfonato o fosfato.

En algunas formas de realización, la hebra antisentido del agente de ARNhd comprende dos bloques de tres enlaces internucleótidos de fosforotioato o metilfosfonato separados por 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 ó 16 enlaces internucleótidos de fosfato, en donde uno de los enlaces internucleótidos de fosforotioato o metilfosfonato se ubica en cualquier posición en la secuencia de oligonucleótidos y dicha hebra antisentido se aparea con una hebra sentido que comprende cualquier combinación de enlaces internucleótidos de fosforotioato, de metilfosfonato y de fosfato o una hebra antisentido que comprende ya sea un enlace fosforotioato o metilfosfonato o fosfato.

En algunas formas de realización, la hebra antisentido del agente de ARNhd comprende dos bloques de cuatro enlaces internucleótidos de fosforotioato o metilfosfonato separados por 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 ó 14 enlaces internucleótidos de fosfato, en donde uno de los enlaces internucleótidos de fosforotioato o metilfosfonato se ubica en cualquier posición en la secuencia de oligonucleótidos y dicha hebra antisentido se aparea con

una hebra sentido que comprende cualquier combinación de enlaces internucleótidos de fosforotioato, de metilfosfonato y de fosfato o una hebra antisentido que comprende ya sea un enlace fosforotioato o metilfosfonato o fosfato.

En algunas formas de realización, la hebra antisentido del agente de ARNhd comprende dos bloques de cinco enlaces internucleótidos de fosforotioato o metilfosfonato separados por 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 ó 12 enlaces internucleótidos de fosfato, en donde uno de los enlaces internucleótidos de fosforotioato o metilfosfonato se ubica en cualquier posición en la secuencia de oligonucleótidos y dicha hebra antisentido se aparea con una hebra sentido que comprende cualquier combinación de enlaces internucleótidos de fosforotioato, de metilfosfonato y de fosfato o una hebra antisentido que comprende ya sea un enlace fosforotioato o metilfosfonato o fosfato.

En algunas formas de realización, la hebra antisentido del agente de ARNhd comprende dos bloques de seis enlaces internucleótidos de fosforotioato o metilfosfonato separados por 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10 enlaces internucleótidos de fosfato, en donde uno de los enlaces internucleótidos de fosforotioato o metilfosfonato se ubica en cualquier posición en la secuencia de oligonucleótidos y dicha hebra antisentido se aparea con una hebra sentido que comprende cualquier combinación de enlaces internucleótidos de fosforotioato, de metilfosfonato y de fosfato o una hebra antisentido que comprende ya sea un enlace fosforotioato o metilfosfonato o fosfato.

En algunas formas de realización, la hebra antisentido del agente de ARNhd comprende dos bloques de siete enlaces internucleótidos de

fosforotioato o metilfosfonato separados por 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 ú 8 enlaces internucleótidos de fosfato, en donde uno de los enlaces internucleótidos de fosforotioato o metilfosfonato se ubica en cualquier posición en la secuencia de oligonucleótidos y dicha hebra antisentido se aparea con una hebra sentido que comprende cualquier combinación de enlaces internucleótidos de fosforotioato, de metilfosfonato y de fosfato o una hebra antisentido que comprende ya sea un enlace fosforotioato o metilfosfonato o fosfato.

En algunas formas de realización, la hebra antisentido del agente de ARNhd comprende dos bloques de ocho enlaces internucleótidos de fosforotioato o metilfosfonato separados por 1, 2, 3, 4, 5 ó 6 enlaces internucleótidos de fosfato, en donde uno de los enlaces internucleótidos de fosforotioato o metilfosfonato se ubica en cualquier posición en la secuencia de oligonucleótidos y dicha hebra antisentido se aparea con una hebra sentido que comprende cualquier combinación de enlaces internucleótidos de fosforotioato, de metilfosfonato y de fosfato o una hebra antisentido que comprende ya sea un enlace fosforotioato o metilfosfonato o fosfato.

En algunas formas de realización, la hebra antisentido del agente de ARNhd comprende dos bloques de nueve enlaces internucleótidos de fosforotioato o metilfosfonato separados por 1, 2, 3 ó 4 enlaces internucleótidos de fosfato, en donde uno de los enlaces internucleótidos de fosforotioato o metilfosfonato se ubica en cualquier posición en la secuencia de oligonucleótidos y dicha hebra antisentido se aparea con una hebra sentido que comprende cualquier combinación de enlaces internucleótidos de fosforotioato, de metilfosfonato y de fosfato o una hebra antisentido que comprende ya sea un enlace fosforotioato o metilfosfonato o fosfato.

En algunas formas de realización, el agente de ARNhd de la invención comprende además una o más modificaciones de enlaces internucleótidos de fosforotioato o metilfosfonato dentro de 1-10 de las posiciones terminales de las hebras sentido y/o antisentido. Por ejemplo, se pueden unir por lo menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10 nucleótidos por medio de un enlace internucleótidos de fosforotioato o metilfosfonato por un extreme o ambos extremos de las hebras sentido y/o antisentido.

En algunas formas de realización, el agente de ARNhd de la invención comprende además una o más modificaciones de enlaces internucleótidos de fosforotioato o metilfosfonato dentro de 1-10 posiciones de la región interna del dúplex de cada de hebra sentido y/o antisentido. Por ejemplo, se pueden unir por lo menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10 nucleótidos por medio de un enlace internucleótidos de fosforotioato o metilfosfonato en la posición 8-16 de la región del dúplex contando desde el extremo 5’ de la hebra sentido; el agente de ARNhd además puede comprender opcionalmente una o más modificaciones de enlaces internucleótidos de fosforotioato o metilfosfonato dentro de 1-10 de las posiciones de una o más posiciones terminales.

En algunas formas de realización, el agente de ARNhd de la invención comprende además entre una y cinco modificaciones de enlaces internucleótidos de fosforotioato o metilfosfonato en las posiciones 1-5 y entre una y cinco modificaciones de enlaces internucleótidos de fosforotioato o metilfosfonato en las posiciones 18-23 de la hebra sentido (contando desde el extremo 5’), y entre una y cinco modificaciones de enlaces internucleótidos de fosforotioato o metilfosfonato en las posiciones 1 y 2 y entre una y cinco en las posiciones 18-23 de la hebra antisentido (contando desde el extremo 5’).

En algunas formas de realización, el agente de ARNhd de la invención comprende además una modificación de un enlace internucleótidos de fosforotioato en las posiciones 1-5 y una modificación de enlaces internucleótidos de fosforotioato o metilfosfonato en las posiciones 18-23 de la hebra sentido (contando desde el extremo 5'), y una modificación de un enlace internucleótidos de fosforotioato en las posiciones 1 y 2 y dos modificaciones de enlaces internucleótidos de fosforotioato o metilfosfonato en las posiciones 18-23 de la hebra antisentido (contando desde el extremo 5').

En algunas formas de realización, el agente de ARNhd de la invención comprende además dos modificaciones de enlaces internucleótidos de fosforotioato en las posiciones 1-5 y una modificación de un enlace internucleótidos de fosforotioato en las posiciones 18-23 de la hebra sentido (contando desde el extremo 5'), y una modificación de un enlace internucleótidos de fosforotioato en las posiciones 1 y 2 y dos modificaciones de enlaces internucleótidos de fosforotioato en las posiciones 18-23 de la hebra antisentido (contando desde el extremo 5').

En algunas formas de realización, el agente de ARNhd de la invención comprende además dos modificaciones de enlaces internucleótidos de fosforotioato en las posiciones 1-5 y dos modificaciones de enlaces internucleótidos de fosforotioato en las posiciones 18-23 de la hebra sentido (contando desde el extremo 5'), y una modificación de un enlace internucleótidos de fosforotioato en las posiciones 1 y 2 y dos modificaciones de enlaces internucleótidos de fosforotioato en las posiciones 18-23 de la hebra antisentido (contando desde el extremo 5').

En algunas formas de realización, el agente de ARNhd de la invención

comprende además dos modificaciones de enlaces internucleótidos de fosforotioato en las posiciones 1-5 y dos modificaciones de enlaces internucleótidos de fosforotioato en las posiciones 18-23 de la hebra sentido (contando desde el extremo 5'), y una modificación de un enlace internucleótidos de fosforotioato en las posiciones 1 y 2 y una modificación de un enlace internucleótidos de fosforotioato en las posiciones 18-23 de la hebra antisentido (contando desde el extremo 5').

En algunas formas de realización, el agente de ARNhd de la invención comprende además una modificación de un enlace internucleótidos de fosforotioato en las posiciones 1-5 y una modificación de un enlace internucleótidos de fosforotioato en las posiciones 18-23 de la hebra sentido (contando desde el extremo 5'), y dos modificaciones de enlaces internucleótidos de fosforotioato en las posiciones 1 y 2 y dos modificaciones de enlaces internucleótidos de fosforotioato en las posiciones 18-23 de la hebra antisentido (contando desde el extremo 5').

En algunas formas de realización, el agente de ARNhd de la invención comprende además una modificación de un enlace internucleótidos de fosforotioato en las posiciones 1-5 y una en las posiciones 18-23 de la hebra sentido (contando desde el extremo 5'), y dos modificaciones de enlaces internucleótidos de fosforotioato en las posiciones 1 y 2 y una modificación de un enlace internucleótidos de fosforotioato en las posiciones 18-23 de la hebra antisentido (contando desde el extremo 5').

En algunas formas de realización, el agente de ARNhd de la invención comprende además una modificación de un enlace internucleótidos de fosforotioato en las posiciones 1-5 (contando desde el extremo 5') de la hebra

sentido, y dos modificaciones de enlaces internucleótidos de fosforotioato en las posiciones 1 y 2 y una modificación de un enlace internucleótidos de fosforotioato en las posiciones 18-23 de la hebra antisentido (contando desde el extremo 5').

En algunas formas de realización, el agente de ARNhd de la invención comprende además dos modificaciones de enlaces internucleótidos de fosforotioato en las posiciones 1-5 (contando desde el extremo 5') de la hebra sentido, y una modificación de un enlace internucleótidos de fosforotioato en las posiciones 1 y 2 y dos modificaciones de enlaces internucleótidos de fosforotioato en las posiciones 18-23 de la hebra antisentido (contando desde el extremo 5').

En algunas formas de realización, el agente de ARNhd de la invención comprende además dos modificaciones de enlaces internucleótidos de fosforotioato en las posiciones 1-5 y una en las posiciones 18-23 de la hebra sentido (contando desde el extremo 5'), y dos modificaciones de enlaces internucleótidos de fosforotioato en las posiciones 1 y 2 y una modificación de un enlace internucleótidos de fosforotioato en las posiciones 18-23 de la hebra antisentido (contando desde el extremo 5').

En algunas formas de realización, el agente de ARNhd de la invención comprende además dos modificaciones de enlaces internucleótidos de fosforotioato en las posiciones 1-5 y una modificación de un enlace internucleótidos de fosforotioato en las posiciones 18-23 de la hebra sentido (contando desde el extremo 5'), y dos modificaciones de enlaces internucleótidos de fosforotioato en las posiciones 1 y 2 y dos modificaciones de enlaces internucleótidos de fosforotioato en las posiciones 18-23 de la hebra

antisentido (contando desde el extremo 5’).

En algunas formas de realización, el agente de ARNhd de la invención comprende además dos modificaciones de enlaces internucleótidos de fosforotioato en las posiciones 1-5 y una modificación de un enlace internucleótidos de fosforotioato en las posiciones 18-23 de la hebra sentido (contando desde el extremo 5’), y una modificación de un enlace internucleótidos de fosforotioato en las posiciones 1 y 2 y dos modificaciones de enlaces internucleótidos de fosforotioato en las posiciones 18-23 de la hebra antisentido (contando desde el extremo 5’).

En algunas formas de realización, el agente de ARNhd de la invención comprende además dos modificaciones de enlaces internucleótidos de fosforotioato en la posición 1 y 2, y dos modificaciones de enlaces internucleótidos de fosforotioato en la posición 20 y 21 de la hebra sentido (contando desde el extremo 5’), y una modificación de un enlace internucleótidos de fosforotioato en las posiciones 1 y una en la posición 21 de la hebra antisentido (contando desde el extremo 5’).

En algunas formas de realización, el agente de ARNhd de la invención comprende además una modificación de un enlace internucleótidos de fosforotioato en la posición 1, y una modificación de un enlace internucleótidos de fosforotioato en la posición 21 de la hebra sentido (contando desde el extremo 5’), y dos modificaciones de enlaces internucleótidos de fosforotioato en las posiciones 1 y 2 y dos modificaciones de enlaces internucleótidos de fosforotioato en las posiciones 20 y 21 la hebra antisentido (contando desde el extremo 5’).

En algunas formas de realización, el agente de ARNhd de la invención

comprende además dos modificaciones de enlaces internucleótidos de fosforotioato en la posición 1 y 2, y dos modificaciones de enlaces internucleótidos de fosforotioato en la posición 21 y 22 de la hebra sentido (contando desde el extremo 5'), y una modificación de un enlace internucleótidos de fosforotioato en la posición 1 y una modificación de un enlace internucleótidos de fosforotioato en la posición 21 de la hebra antisentido (contando desde el extremo 5').

En algunas formas de realización, el agente de ARNhd de la invención comprende además una modificación de un enlace internucleótidos de fosforotioato en la posición 1, y una modificación de un enlace internucleótidos de fosforotioato en la posición 21 de la hebra sentido (contando desde el extremo 5'), y dos modificaciones de enlaces internucleótidos de fosforotioato en las posiciones 1 y 2 y dos modificaciones de enlaces internucleótidos de fosforotioato en las posiciones 21 y 22 la hebra antisentido (contando desde el extremo 5').

En algunas formas de realización, el agente de ARNhd de la invención comprende además dos modificaciones de enlaces internucleótidos de fosforotioato en la posición 1 y 2, y dos modificaciones de enlaces internucleótidos de fosforotioato en la posición 22 y 23 de la hebra sentido (contando desde el extremo 5'), y una modificación de un enlace internucleótidos de fosforotioato en la posición 1 y una modificación de un enlace internucleótidos de fosforotioato en la posición 21 de la hebra antisentido (contando desde el extremo 5').

En algunas formas de realización, el agente de ARNhd de la invención comprende además una modificación de un enlace internucleótidos de

fosforotioato en la posición 1, y una modificación de un enlace internucleótidos de fosforotioato en la posición 21 de la hebra sentido (contando desde el extremo 5'), y dos modificaciones de enlaces internucleótidos de fosforotioato en las posiciones 1 y 2 y dos modificaciones de enlaces internucleótidos de fosforotioato en las posiciones 23 y 23 la hebra antisentido (contando desde el extremo 5').

En algunas formas de realización, la hebra antisentido comprende enlaces internucleótidos de fosforotioato entre las posiciones de nucleótido 21 y 22, y entre las posiciones de nucleótido 22 y 23, en donde la hebra antisentido contiene por lo menos una modificación térmicamente desestabilizante del dúplex ubicada en la región de siembra de la hebra antisentido (es decir, en las posiciones 2-9 del extremo 5' de la hebra antisentido), y en donde el ARNhd opcionalmente presenta además por lo menos una (por ejemplo, una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete o las ocho) de las siguientes características: (i) la secuencia antisentido comprende 2, 3, 4, 5 ó 6 modificaciones 2'-fluoro; (ii) la secuencia antisentido comprende 3 ó 4 enlaces internucleótidos de fosforotioato; (iii) la hebra sentido está conjugada con un ligando; (iv) la hebra sentido comprende 2, 3, 4 ó 5 modificaciones 2'-fluoro; (v) la hebra sentido comprende 1, 2, 3 ó 4 enlaces internucleótidos de fosforotioato; (vi) el ARNhd comprende por lo menos cuatro modificaciones 2'-fluoro; (vii) el ARNhd comprende una región dúplex de 12-40 pares de nucleótidos de longitud; y (viii) el ARNhd tiene un extremo romo en el extremo 5' de la hebra antisentido.

En algunas formas de realización, la hebra antisentido comprende enlaces internucleótidos de fosforotioato entre las posiciones de nucleótido 1 y 2, entre las posiciones de nucleótido 2 y 3, entre las posiciones de nucleótido

21 y 22, y entre las posiciones de nucleótido 22 y 23, en donde la hebra antisentido contiene por lo menos una modificación térmicamente desestabilizante del dúplex ubicada en la región de siembra de la hebra antisentido (es decir, en las posiciones 2-9 del extremo 5’ de la hebra antisentido), y en donde el ARNhd opcionalmente presenta además por lo menos una (por ejemplo, una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete o las ocho) de las siguientes características: (i) la secuencia antisentido comprende 2, 3, 4, 5 ó 6 modificaciones 2’-fluoro; (ii) la hebra sentido está conjugada con un ligando; (iii) la hebra sentido comprende 2, 3, 4 ó 5 modificaciones 2’-fluoro; (iv) la hebra sentido comprende 1, 2, 3 ó 4 enlaces internucleótidos de fosforotioato; (v) el ARNhd comprende por lo menos cuatro modificaciones 2’-fluoro; (vi) el ARNhd comprende una región dúplex de 12-40 pares de nucleótidos de longitud; (vii) el ARNhd comprende una región dúplex de 12-40 pares de nucleótidos de longitud; y (viii) el ARNhd tiene un extremo romo en el extremo 5’ de la hebra antisentido.

En algunas formas de realización, la hebra sentido comprende enlaces internucleótidos de fosforotioato entre las posiciones de nucleótido 1 y 2, y entre las posiciones de nucleótido 2 y 3, en donde la hebra antisentido contiene por lo menos una modificación térmicamente desestabilizante del dúplex ubicada en la región de siembra de la hebra antisentido (es decir, en las posiciones 2-9 del extremo 5’ de la hebra antisentido), y en donde el ARNhd opcionalmente presenta además por lo menos una (por ejemplo, una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete o las ocho) de las siguientes características: (i) la secuencia antisentido comprende 2, 3, 4, 5 ó 6 modificaciones 2’-fluoro; (ii) la secuencia antisentido comprende 1, 2, 3 ó 4 enlaces internucleótidos de

fosforotioato; (iii) la hebra sentido está conjugada con un ligando; (iv) la hebra sentido comprende 2, 3, 4 ó 5 modificaciones 2'-fluoro; (v) la hebra sentido comprende 3 ó 4 enlaces internucleótidos de fosforotioato; (vi) el ARNhd comprende por lo menos cuatro modificaciones 2'-fluoro; (vii) el ARNhd comprende una región dúplex de 12-40 pares de nucleótidos de longitud; y (viii) el ARNhd tiene un extremo romo en el extremo 5' de la hebra antisentido.

En algunas formas de realización, la hebra sentido comprende enlaces internucleótidos de fosforotioato entre las posiciones de nucleótido 1 y 2, y entre las posiciones de nucleótido 2 y 3, la hebra antisentido comprende enlaces internucleótidos de fosforotioato entre las posiciones de nucleótido 1 y 2, entre las posiciones de nucleótido 2 y 3, entre las posiciones de nucleótido 21 y 22, y entre las posiciones de nucleótido 22 y 23, en donde la hebra antisentido contiene por lo menos una modificación térmicamente desestabilizante del dúplex ubicada en la región de siembra de la hebra antisentido (es decir, en las posiciones 2-9 del extremo 5' de la hebra antisentido), y en donde el ARNhd opcionalmente presenta además por lo menos una (por ejemplo, una, dos, tres, cuatro, cinco, seis o las siete) de las siguientes características: (i) la secuencia antisentido comprende 2, 3, 4, 5 ó 6 modificaciones 2'-fluoro; (ii) la hebra sentido está conjugada con un ligando; (iii) la hebra sentido comprende 2, 3, 4 ó 5 modificaciones 2'-fluoro; (iv) la hebra sentido comprende 3 ó 4 enlaces internucleótidos de fosforotioato; (v) el ARNhd comprende por lo menos cuatro modificaciones 2'-fluoro; (vi) el ARNhd comprende una región dúplex de 12-40 pares de nucleótidos de longitud; y (vii) el ARNhd tiene un extremo romo en el extremo 5' de la hebra antisentido.

En algunas formas de realización, el agente de ARNhd de la invención

comprende una o más faltas de coincidencia con el blanco, en el dúplex o combinaciones de los mismos. La no coincidencia se puede producir en la región de sobreextensión o la región dúplex. El par de bases se puede clasificar basado en su tendencia para promover la disociación o fusión (por ejemplo, en la energía libre de asociación o disociación de un apareamiento particular, la estrategia más simple es examinar los pares basado en un apareamiento individual, aunque también se puede usar análisis del vecino próximo o similar). En términos de promover la disociación: se prefiere A:U ante G:C; se prefiere G:U ante G:C; y se prefiere I:C ante G:C (I = inosina). Se prefieren las coincidencias erróneas, por ejemplo, apareamientos no canónicos u otros diferentes de los canónicos (como se describe en otra parte en la presente) respecto a los apareamientos canónicos (A:T, A:U, G:C); y se prefieren los apareamientos que incluyen una base universal antes que los apareamientos canónicos.

En una forma de realización, el agente de ARNi comprende por lo menos uno de los primeros 1, 2, 3, 4 ó 5 pares de bases en las regiones dúplex del extremo 5’ de la hebra antisentido que se pueden seleccionar de manera independiente del grupo de: A:U, G:U, I:C, y pares de coincidencias erróneas, por ejemplo, apareamientos no canónicos u otros diferentes de los canónicos o apareamientos que incluyen una base universal, para promover la disociación de la hebra antisentido en el extremo 5’ del dúplex.

En una forma de realización, el nucleótido de la posición 1 en la región dúplex del extremo 5’ en la hebra antisentido se selecciona del grupo que consiste en A, dA, dU, U y dT. Como alternativa, por lo menos uno de los primeros 1, 2 ó 3 pares de bases en la región dúplex del extremo 5’ de la hebra

antisentido es un par de bases AU. Por ejemplo, el primer par de bases en la región dúplex del extremo 5’ de la hebra antisentido es un par de bases AU.

También se ha descubierto que la introducción de un nucleótido 4’-modificado y/o 5’-modificado en el extremo 3’ de un enlace fosfodiéster (PO), fosforotioato (PS) y/o fosforoditioato (PS2) de un dinucleótido en cualquier posición de un oligonucleótido de hebra simple o de hebra doble puede ejercer un efecto estérico sobre los enlaces internucleótidos y, por ende, puede protegerlo o estabilizarlo contra las nucleasas.

En algunas formas de realización, se introduce un nucleósido 5’-modificado en el extremo 3’ de un dinucleótido en cualquier posición del ARNip de hebra simple o de hebra doble. Por ejemplo, se puede introducir un nucleósido 5’-alquilado en el extremo 3’ de un dinucleótido en cualquier posición del ARNip de hebra simple o de hebra doble. El grupo alquilo en la posición 5’ del azúcar ribosa puede ser un isómero racémico o R o S quiralmente puro. Un ejemplo de un nucleósido 5’-alquilado es un nucleósido 5’-metilo. El 5’-metilo puede ser un isómero racémico o R o S quiralmente puro.

En algunas formas de realización, se introduce un nucleósido 4’-modificado en el extremo 3’ de un dinucleótido en cualquier posición del ARNip de hebra simple o de hebra doble. Por ejemplo, se puede introducir un nucleósido 4’-alquilado en el extremo 3’ de un dinucleótido en cualquier posición del ARNip de hebra simple o de hebra doble. El grupo alquilo en la posición 4’ del azúcar ribosa puede ser un isómero racémico o R o S quiralmente puro. Un ejemplo de un nucleósido 4’-alquilado es un nucleósido 4’-metilo. El 4’-metilo puede ser un isómero racémico o R o S quiralmente

puro. Por ejemplo, se puede introducir un nucleósido 4'-4'-*O*-alquilado en el extremo 3' de un dinucleótido en cualquier posición del ARNip de hebra simple o de hebra doble. El 4'-*O*-alquilo del azúcar ribosa puede ser un isómero racémico o R o S quiralmente puro. Un ejemplo de un nucleósido 4'-*O*-alquilado es un nucleósido 4'-*O*-metilo. El 4'-*O*-metilo puede ser un isómero racémico o R o S quiralmente puro.

En algunas formas de realización, se introduce un nucleósido 5'-alquilado en cualquier posición de la hebra sentido o la hebra antisentido de un ARNhd, y dicha modificación mantiene o mejora la potencia del ARNhd. El 5'-alquilo puede ser un isómero racémico o R o S quiralmente puro. Un ejemplo de un nucleósido 5'-alquilado es un nucleósido 5'-metilo. El 5'-metilo puede ser un isómero racémico o R o S quiralmente puro.

En algunas formas de realización, se introduce un nucleósido 4'-alquilado en cualquier posición de la hebra sentido o la hebra antisentido de un ARNhd, y dicha modificación mantiene o mejora la potencia del ARNhd. El 4'-alquilo puede ser un isómero racémico o R o S quiralmente puro. Un ejemplo de un nucleósido 4'-alquilado es un nucleósido 4'-metilo. El 4'-metilo puede ser un isómero racémico o R o S quiralmente puro.

En algunas formas de realización, se introduce un nucleósido 4'-*O*-alquilado en cualquier posición de la hebra sentido o la hebra antisentido de un ARNhd, y dicha modificación mantiene o mejora la potencia del ARNhd. El 5'-alquilo puede ser un isómero racémico o R o S quiralmente puro. Un ejemplo de un nucleósido 4'-*O*-alquilado es un nucleósido 4'-*O*-metilo. El 4'-*O*-metilo puede ser un isómero racémico o R o S quiralmente puro.

En algunas formas de realización, el agente de ARNhd de la invención

puede comprender enlaces 2'-5' (con 2'-H, 2'-OH y 2'-OMe y con P=O o P=S). Por ejemplo, se pueden usar modificaciones de enlaces 2'-5' para promover la resistencia a nucleasas o para inhibir la unión de la hebra sentido a la hebra antisentido, o se pueden usar en el extremo 5' de la hebra sentido para evitar una activación de la hebra sentido por RISC.

En otra forma de realización, el agente de ARNhd de la invención puede comprender azúcares L (por ejemplo, L-ribosa, L-arabinosa con 2'-H, 2'-OH y 2'-OMe). Por ejemplo, se pueden usar estas modificaciones de azúcares L para promover la resistencia a nucleasas o para inhibir la unión de la hebra sentido a la hebra antisentido, o se pueden usar en el extremo 5' de la hebra sentido para evitar una activación de la hebra sentido por RISC.

Varias publicaciones describen ARNip multiméricos todos los cuales se pueden usar con el ARNhd de la invención. Dichas publicaciones incluyen WO2007/091269, Patente de los EEUU N°: 7858769, WO2010/141511, WO2007/117686, WO2009/014887 y WO2011/031520 que se incorporan por completo en la presente a modo de referencia.

Como se describirá con detalle más adelante, el agente de ARNhd que contiene conjugaciones de una o más unidades de carbohidratos con un agente de ARNhd puede optimizar una o más propiedades del agente de ARNhd. En muchos casos, el grupo de hidrato de carbono se unirá a una subunidad modificada del agente de ARNhd. Por ejemplo, el azúcar ribosa de una o más subunidades de ribonucleótido de un agente ARNdh se puede reemplazar por otro grupo, por ejemplo, un vehículo no hidrato de carbono (preferentemente cíclico) al que se une un ligando de hidrato de carbono. Una subunidad de ribonucleótido en la que se ha reemplazado el azúcar ribosa de

la subunidad se denomina en la presente como a subunidad con una modificación de reemplazo de ribosa (RRMS). Un vehículo cíclico puede ser un sistema de anillos carbocíclico, es decir, en donde todos los átomos de anillo son átomos de carbono, o un sistema de anillos heterocíclico, es decir, en donde uno o más átomos de anillo pueden ser un heteroátomo, por ejemplo, nitrógeno, oxígeno, azufre. El vehículo cíclico puede ser un sistema de anillos monocíclico, o puede contener dos o más anillos, por ejemplo anillos fusionados. El vehículo cíclico puede ser un sistema de anillos totalmente saturado, o el mismo puede contener uno o más enlaces dobles.

El ligando puede estar unido al polinucleótido por medio de un vehículo. Los vehículos incluyen a (i) por lo menos un “punto de unión al esqueleto”, preferiblemente dos “puntos de unión al esqueleto” y (ii) por lo menos un “punto de unión de amarre.” Un “punto de unión al esqueleto” según se usa en la presente se refiere a un grupo funcional, por ejemplo un grupo hidroxilo o, en general, un enlace disponible y apropiado para la incorporación del vehículo en el esqueleto, por ejemplo, el fosfato, o fosfato modificado, por ejemplo, un esqueleto que contiene azufre, de un ácido ribonucleico. Un “punto de unión de amarre” (TAP) se refiere, en algunas formas de realización, a un átomo constituyente del anillo del vehículo cíclico, por ejemplo, un átomo de carbono o un heteroátomo (distinto de un átomo que provee un punto de unión al esqueleto), que lo conecta a un grupo seleccionado. El grupo puede ser, por ejemplo, un hidrato de carbono, por ejemplo monosacárido, disacárido, trisacárido, tetrasacárido, oligosacárido y polisacárido. Opcionalmente, el grupo seleccionado se conecta mediante un amarre interpuesto al vehículo cíclico. Por consiguiente, el vehículo cíclico con frecuencia incluirá un grupo

funcional, por ejemplo, un grupo amino, o en general, proveerá un enlace, que es adecuado para la incorporación o amarre de otra entidad química, por ejemplo, un ligando para el anillo constituyente.

En una forma de realización, el agente de ARNhd se puede conjugar con un ligando a través de un vehículo, en donde el vehículo puede ser un grupo cíclico o grupo no cíclico; preferiblemente, el grupo cíclico se selecciona entre pirrolidinilo, pirazolinilo, pirazolidinilo, imidazolinilo, imidazolidinilo, piperidinilo, piperazinilo, [1,3]dioxolano, oxazolidinilo, isoxazolidinilo, morfolinilo, tiazolidinilo, isotiazolidinilo, quinoxalinilo, piridazinonilo, tetrahidrofurilo y decalina; preferiblemente, el grupo no cíclico se selecciona entre un esqueleto de serinol o un esqueleto de dietanolamina.

Los agentes de ARN de hebra doble (ARNhd) de la invención pueden estar conjugados opcionalmente con uno o más ligandos. El ligando puede estar unido a la hebra sentido, la hebra antisentido o a ambas hebras, en el extremo 3', el extremo 5' o ambos extremos. Por ejemplo, el ligando se puede conjugar con la hebra sentido, en particular, el extremo 3' de la hebra sentido.

En algunas formas de realización, los agentes de ARNhd de la invención están fosforilados en 5' o incluyen un análogo fosforilo en el extremo 5' terminal. Las modificaciones 5' con fosfato incluyen aquellas que son compatibles con un silenciamiento de genes mediado por RISC. Las modificaciones adecuados incluyen: 5'-monofosfato ($(HO)_2(O)P$-O-5'); 5'-difosfato ($(HO)_2(O)P$-O-P(HO)(O)-O-5'); 5'-trifosfato ($(HO)_2(O)P$-O-(HO)(O)P-O-P(HO)(O)-O-5'); protector de 5'-guanosina (7-metilado o no metilado) (7m-G-O-5'-(HO)(O)P-O-(HO)(O)P-O-P(HO)(O)-O-5'); protector 5'-adenosina (Appp), y cualquier estructura protectora de nucleótidos modificados o no modificados (N-

O-5'-(HO)(O)P-O-(HO)(O)P-O-P(HO)(O)-O-5'); 5'-monotiofosfato (fosforotioato; $(HO)_2$(S)P-O-5'); 5'-monoditiofosfato (fosforoditioato; (HO)(HS)(S)P-O-5'), 5'-fosforotiolato ((HO)2(O)P-S-5'); cualquier combinación adicional de monofosfatos, difosfatos y trifosfatos reemplazados con oxígeno/azufre (por ejemplo 5'-alfa-tiotrifosfato, 5'-gamma-tiotrifosfato, etc.), 5'-fosforamidatos ($(HO)_2$(O)P-NH-5', (HO)(NH_2)(O)P-O-5'), 5'-alquilfosfonatos (R = alquilo = metilo, etilo, isopropilo, propilo, etc., por ejemplo RP(OH)(O)-O-5'-, 5'-alquenilfosfonatos (es decir, vinilo, vinilo sustituido), $(OH)_2$(O)P-5'-CH2-), 5'-alquiléterfosfonatos (R = alquiléter = metoximetilo (MeOCH2-), etoximetilo, etc., por ejemplo RP(OH)(O)-O-5'-). En un ejemplo, la modificación se puede ubicar en la hebra antisentido de un agente de ARNhd.

III. ARNi conjugados a ligandos

Otra modificación del ARN de un ARNi de la invención comprende unir químicamente al ARNi uno o más ligandos, grupos o conjugados que mejoran la actividad, la administración celular o la captación celular del ARNi, por ejemplo, en una célula. Dichas unidades incluyen, pero en un sentido no taxativo, grupos de lípidos, tal como un grupo colesterol (Letsinger *et al.*, *Proc. Natl. Acid. Sci. USA*, 1989, 86: 6553-6556). En otras formas de realización, el ligando es ácido cólico (Manoharan *et al.*, *Biorg. Med. Chem. Let*., 1994, 4: 1053-1060), un tioéter, por ejemplo, beril-S-tritiltiol (Manoharan *et al.*, *Ann. N.Y. Acad. Sci*., 1992, 660: 306-309; Manoharan *et al.*, *Biorg. Med. Chem. Let*., 1993, 3: 2765-2770), un tiocolesterol (Oberhauser *et al.*, *Nucl. Acids Res*., 1992, 20: 533-538), una cadena alifática, por ejemplo, residuos dodecandiol o undecilo (Saison-Behmoaras *et al.*, *EMBO J*, 1991, 10: 1111-1118; Kabanov *et al.*, *FEBS Lett*., 1990, 259: 327-330; Svinarchuk *et al.*, *Biochimie*, 1993, 75: 49-

54), un fosfolípido, por ejemplo, di-hexadecil-rac-glicerol o 1,2-di-O-hexadecil-rac-glicero-3-fosfonato de trietilamonio (Manoharan *et al.*, *Tetrahedron Lett*., 1995, 36: 3651-3654; Shea *et al.*, *Nucl. Acids Res*., 1990, 18: 3777-3783), una cadena de poliamina o de polietilenglicol (Manoharan *et al.*, *Nucleosides & Nucleotides*, 1995, 14: 969-973) o ácido adamantanacético (Manoharan *et al.*, *Tetrahedron Lett*., 1995, 36: 3651-3654), una unidad palmitilo (Mishra *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta*, 1995, 1264: 229-237) o una unidad octadecilamina o hexilaminocarboniloxicolesterol (Crooke *et al.*, J. *Pharmacol. Exp. Ther*., 1996, 277: 923-937).

En determinadas formas de realización, el ligando altera la administración, el direccionamiento o la vida media del agente de ARNi en el cual será incorporado. En formas de realización preferidas, el ligando provee una mayor afinidad por un blanco seleccionado, por ejemplo, una molécula, una célula o un tipo celular, compartimento, por ejemplo, un compartimento celular o de un órgano, una región de tejido, órgano o corporal, por ejemplo, en comparación con una especie sin dicho ligando. Los ligandos preferidos no forman parte del apareamiento de la dupla en un ácido nucleico en dupla.

Los ligandos pueden incluir una sustancia natural, tal como una proteína (por ejemplo, albúmina de suero humano (HSA), lipoproteína de baja densidad (LDL) o globulina); un carbohidrato (por ejemplo, un dextrano, pululano, quitina, quitosán, inulina, ciclodextrina, N-acetilglucosamina, N-acetilgalactosamina o ácido hialurónico); o un lípido. El ligando también puede ser una molécula recombinante o sintética, tal como un polímero sintético, por ejemplo, un poliaminoácido sintético. Los ejemplos de poliaminoácidos incluyen una polilisina (PLL), ácido poli-L-aspártico, ácido poli L-glutámico, copolímero de

estireno-anhídrido del ácido maleico, copolímero de poli(L-láctido-co-glicólido), copolímero de éter divinílico-anhídrido maleico, copolímero de N-(2-hidroxipropil)metacrilamida (HMPA), polietilenglicol (PEG), alcohol poliviníllico (PVA), poliuretano, ácido poli(2-etilacrílico), polímeros de N-isopropilacrilamida o polifosfazina. Los ejemplos de poliaminas incluyen: polietilenimina, polilisina (PLL), espermina, espermidina, poliamina, pseudopéptido-poliamina, poliamina peptidomimético, poliamina dendrímero, arginina, amidina, protamina, lípido catiónico, porfirina catiónica, sal cuaternaria de una poliamina o un alfa-péptido helicoidal.

Los ligandos también pueden incluir grupos de direccionamiento, por ejemplo, un agente de direccionamiento hacia una célula o un tejido, por ejemplo, una lectina, una glicoproteína, un lípido o una proteína, por ejemplo, un anticuerpo, que se unirá a un tipo celular específico, tal como una célula de riñón. El grupo de direccionamiento puede ser una tirotropina, melanotropina, lectina, glicoproteína, proteína A tensioactiva, carbohidrato de mucina, lactosa multivalente, galactosa multivalente, N-acetil-galactosamina, N-acetil-glucosamina manosa multivalente, fucosa multivalente, poliaminoácidos glicosilados, galactosa multivalente, transferrina, bifosfonato, poliglutamato, poliaspartato, un lípido, colesterol, un esteroide, ácido biliar, folato, vitamina B12, vitamina A, biotina o un péptido RGD o un péptido mimético RGD.

En una forma de realización, el ligando es un ligando del receptor de la asialoglicoproteína. Según se usa en la presente un “ligando del receptor de la asialoglicoproteína” o “ligando del ASGPR” es un ligando, tal como un ligando de carbohidrato (descrito más adelante), que direcciona un agente de ARNhd de la invención a los hepatocitos. En determinadas formas de realización, el

ligando comprende una o más galactosas, por ejemplo, una N-acetil-galactosamina (GalNAc) o uno o más derivados de GalNAc.

Otros ejemplos de ligandos incluyen colorantes, agentes intercaladores (por ejemplo, acridinas), conectores cruzados (por ejemplo, psoraleno, mitomicina C), porfirinas (TPPC4, texafirina, sapfirina), hidrocarburos aromáticos policíclicos (por ejemplo, fenazina, dihidrofenazina), endonucleasas artificiales (por ejemplo, EDTA), moléculas lipofílicas, por ejemplo, colesterol, ácido cólico, ácido adamantanacético, ácido 1-pirenbutírico, dihidrotestosterona, 1,3-bi-O(hexadecil)glicerol, un grupo geraniloxihexilo, hexadecilglicerol, borneol, mentol, 1,3-propandiol, un grupo heptadecilo, ácido palmítico, ácido mirístico, ácido O3-(oleoil)litocólico, ácido O3-(oleoil)colénico, dimetoxitritilo o fenoxazina) y conjugados de péptido (por ejemplo, el péptido antenapedia, el péptido Tat), agentes alquilantes, fosfato, amino, mercapto, PEG (por ejemplo, PEG-40K), MPEG, $[MPEG]_2$, poliamino, alquilo, alquilo sustituido, marcadores radiomarcados, enzimas, haptenos (por ejemplo, biotina), facilitadores de transporte/absorción (por ejemplo, aspirina, vitamina E, ácido fólico), ribonucleasas sintéticas (por ejemplo, imidazol, bisimidazol, histamina, agrupaciones de imidazol, conjugados de acridina-imidazol, complejos Eu3+ de tetra-azamacrociclos), dinitrofenilo, HRP o AP.

Los ligandos pueden ser proteínas, por ejemplo, glicoproteínas, o péptidos, por ejemplo, moléculas que tienen una afinidad específica por un co-ligando, o anticuerpos por ejemplo, un anticuerpo, que se unen a un tipo celular específico, tal como una célula hepática. Los ligandos también pueden incluir hormonas y receptores de hormonas. También pueden incluir especies no peptídicas, tales como lípidos, lectinas, carbohidratos, vitaminas, cofactores,

lactosa multivalente, galactosa multivalente, N-acetil-galactosamina, N-acetil-glucosamina manosa multivalente o fucosa multivalente. El ligando puede ser, por ejemplo, un lipopolisacárido, un activador de la p38 MAP quinasa o un activador de NF-κB.

El ligando puede ser una sustancia, por ejemplo, una droga, que puede aumentar la captación del agente de ARNi en la célula, por ejemplo, por ruptura del citoesqueleto de la célula, por ejemplo, por ruptura de los microtúbulos de la célula, microfilamentos o filamentos intermedios. La droga puede ser, por ejemplo, taxona, vincristina, vinblastina, citocalasina, nocodazol, japlaquinolida, latrunculina A, faloidina, swinholida A, indanocina o mioservina.

En algunas formas de realización, el ligando unido a un ARNi como se describe en la presente actúa como un modulador farmacocinético (modulador PK). Los moduladores de la PK incluyen lipófilos, ácidos biliares, esteroides, análogos de fosfolípidos, péptidos, agentes de unión a proteínas, PEG, vitaminas, etc. Los ejemplos de moduladores PK incluyen, pero en un sentido no taxativo, colesterol, ácidos grasos, ácido cólico, ácido litocólico, dialquilglicéridos, diacilglicérido, fosfolípidos, esfingolípidos, naproxeno, ibuprofeno, vitamina E, biotina. Los oligonucleótidos que comprenden numerosos enlaces fosforotioato también se unen a las proteínas séricas, por lo cual los oligonucleótidos cortos, por ejemplo, oligonucleótidos de aproximadamente 5 bases, 10 bases, 15 bases o 20 bases, que comprenden múltiples de enlaces fosforotioato en el esqueleto también son adecuados en la presente invención como ligandos (por ejemplo, como ligandos moduladores de la PK). Además, los aptámeros que se unen a los componentes del suero (por ejemplo, proteínas del suero) también son adecuados para su uso como

ligandos moduladores de la PK en las formas de realización que se describen en la presente.

Los ARNi conjugados a ligandos de la invención se pueden sintetizar mediante el uso de un oligonucleótido que tiene una funcionalidad reactiva colgante, tal como una funcionalidad derivada de la unión de una molécula conectora sobre el oligonucleótido (se describe más adelante). Este oligonucleótido reactivo se puede hacer reaccionar directamente con los ligandos disponibles comercialmente, los ligandos sintetizados que contienen cualquiera de una variedad de grupos protectores o los ligandos a los cuales se ha unido una porción conectora.

Los oligonucleótidos usados en los conjugados de la presente invención se pueden elaborar convenientemente y de manera rutinaria mediante la técnica bien conocida de síntesis en fase sólida. Los equipos para dicha síntesis son comercializados por diversos proveedores incluyendo, por ejemplo, Applied Biosystems® (Foster City, Calif.). Además, o como alternativa, se puede emplear cualquier otro método para dicha síntesis que sea conocido en el arte. También se pueden usa técnicas similares para preparar otros oligonucleótidos, tales como los derivados de fosforotioatos y alquilados.

En los ARNi conjugados con ligandos y los nucleósidos unidos específicos de la secuencia que contienen una molécula de ligando de la presente invención, dichos oligonucleótidos y oligonucleósidos se pueden ensamblar con un sintetizador de ADN adecuado utilizando precursores de nucleótidos o nucleósidos estándar, o precursores de nucleótidos o nucleósidos conjugados que ya contienen a la porción al grupo conector, precursores de nucleótidos o nucleósidos conjugados a ligandos que ya llevan a la molécula de

ligando o bloques de construcción que contienen un ligando no nucleósido.

Cuando se usan precursores de conjugados de nucleótidos que contienen un grupo conector, típicamente se completa la síntesis de los nucleósidos ligados específicos de la secuencia y la molécula de ligando se hace reaccionar luego con el grupo conector para formar el oligonucleótido conjugado a ligando. En algunas formas de realización, los oligonucleótidos o los nucleósidos ligados de la presente invención son sintetizados con un sintetizador automático usando fosforamiditas derivadas de conjugados de nucleósido-ligando además de las fosforamiditas estándar y las fosforamiditas no estándar que se encuentran disponibles comercialmente y que son de uso rutinario en la síntesis de oligonucleótidos.

A. Conjugados de lípidos

En determinadas formas de realización, el ligando o conjugado es una molécula de lípido o una molécula basada en lípidos. Dicha molécula de lípido o molécula basada en lípidos preferiblemente se une a una proteína de suero, por ejemplo, albúmina de suero humano (HSA). Un ligando que se une a HSA permite distribuir el conjugado en un tejido blanco, por ejemplo, un tejido corporal blanco distinto del renal. Por ejemplo, el tejido blanco puede ser el hígado, incluyendo las células parenquimáticas del hígado. También se pueden usar otras moléculas que se pueden unir a HSA. Por ejemplo, se puede usar naproxeno o aspirina. Un ligando de lípido o un ligando basado en lípidos puede (a) aumentar la resistencia a la degradación del conjugado, (b) aumentar el direccionamiento o el transporte en la célula o la membrana celular blanco o (c) usarse para ajustar la unión a una proteína del suero, por ejemplo, HSA.

El ligando basado en lípidos se puede usar para inhibir, por ejemplo, para controlar la unión del conjugado con un tejido blanco. Por ejemplo, es menos probable que un ligando de lípido o un ligando basado en lípidos que se une a HSA más fuertemente sea dirigido al riñón y por ello es menos probable que sea depurado del cuerpo. Un ligando de lípidos o un ligando basado en lípidos que se une a HSA menos fuertemente se puede usar para dirigir el conjugado al riñón.

En determinadas formas de realización, el ligando basado en lípidos se une a HSA. Preferiblemente, se une a HSA con una afinidad suficiente de modo tal que el conjugado preferiblemente se administrará en un tejido distinto del riñón. Sin embargo, se prefiere que la afinidad no sea tan fuerte como para que no se pueda revertir la unión de HSA-ligando.

En otras formas de realización, el ligando basado en lípidos se une débilmente HSA o no se une a HSA, de modo tal que el conjugado preferiblemente se administrará en el riñón. También se pueden usar otros grupos en lugar de o además del ligando basado en lípidos.

En otro aspecto, el ligando es un grupo, por ejemplo, una vitamina, que es captada por una célula blanco, por ejemplo, una célula en proliferación. Estos son particularmente útiles para tratar trastornos caracterizados por una proliferación celular no deseada, por ejemplo, del tipo maligno o no maligno, por ejemplo, células cancerosas. Los ejemplos de vitaminas incluyen las vitaminas A, E y K. Otros ejemplos de vitaminas incluyen la vitamina B, por ejemplo, ácido fólico, B12, riboflavina, biotina, piridoxal u otras vitaminas o nutrientes captados por las células blanco tales como células de hígado. También se incluye HSA y la lipoproteína de baja densidad (LDL).

B. Agentes de permeación celular

En otro aspecto, el ligando es un agente de permeación celular, preferiblemente una agente de permeación celular helicoidal. Preferiblemente, el agente es anfipático. Un ejemplo de un agente es un péptido tal como tat o antenapedia. Si el agente es un péptido, puede ser un péptido modificado, incluyendo un peptidilmimético, invertómeros, con enlaces no peptídicos o pseudopeptídicos y con el uso de D-aminoácidos. El agente helicoidal preferiblemente es un agente alfa-helicoidal, que preferiblemente tiene una fase lipofílica y una fase lipofóbica.

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

Un péptido o un peptidomimético puede ser, por ejemplo, una péptido de permeación celular, un péptido catiónico, un péptido anfipático o un péptido hidrofóbico (por ejemplo, que consiste primariamente de Tyr, Trp o Phe). La porción peptídica puede ser un péptido dendrímero, un péptido restringido o un péptido entrecruzado. En otra alternativa, la porción peptídica puede incluir una secuencia de traslocación de membrana hidrofóbica (MTS). Un ejemplo de péptido que contiene una MTS hidrofóbica es RFGF cuya secuencia de

aminoácidos es AAVALLPAVLLALLAP (SEQ ID N°: 29). Un análogo de RFGF (por ejemplo, la secuencia de aminoácidos AALLPVLLAAP (SEQ ID N°: 30) que contiene una MTS hidrofóbica también puede ser una porción de direccionamiento. La porción peptídica puede ser un péptido de "administración", que puede llevar grandes moléculas polares incluyendo péptidos, oligonucleótidos y proteínas a través de las membranas celulares. Por ejemplo, se ha encontrado que las secuencias de la proteína Tat VIH (GRKKRRQRRRPPQ (SEQ ID N°: 31) y la proteína antenapedia de *Drosophila* (RQIKIWFQNRRMKWKK (SEQ ID N°: 32) pueden funcionar como péptidos de administración. Un péptido o peptidomimético puede estar codificado por una secuencia al azar de ADN, como por ejemplo un péptido identificado en una biblioteca de presentación de fagos, o una biblioteca combinatoria una-cuenta-un-compuesto (OBOC) (Lam *et al.*, *Nature*, 354: 82-84, 1991). Los ejemplos de un péptido o peptidomimético unido a un agente de ARNcd por medio de una unidad monomérica incorporada para el direccionamiento a la célula es un péptido de arginina-glicina-ácido aspártico (RGD) o RGD mimético. La longitud de la porción peptídica puede variar en un rango de entre aproximadamente 5 aminoácidos y aproximadamente 40 aminoácidos. Los grupos peptídicos pueden presentar una modificación estructural, tal como para aumentar la estabilidad o para dirigir las propiedades de conformación. Se puede utilizar cualquiera de las modificaciones estructurales que se describen a continuación.

Un péptido RGD que se puede usar en las composiciones y los métodos de la invención puede ser lineal o cíclico, y puede estar modificado, por ejemplo, glicosilado o metilado, para facilitar el direccionamiento a un tejido específico. Los péptidos y peptidomiméticos que contienen RGD pueden incluir

D-aminoácidos, así como RGD miméticos sintéticos. Además de RGD, se pueden usar otros grupos dirigidos al ligando de integrina. Los conjugados preferidos de este ligando están dirigidos a PECAM-1 o VEGF.

Un “péptido de permeación celular” es capaz de permear una célula, por ejemplo, una célula microbiana, como por ejemplo una célula bacteriana o fúngica, o una célula de mamífero, como por ejemplo una célula humana. Un péptido que permea una célula microbiana puede ser, por ejemplo, un péptido lineal α-helicoidal (por ejemplo, LL-37 o Ceropina P1), un péptido que contiene un enlace disulfuro (por ejemplo, α-defensina, β-defensina o bactenecina), o un péptido que solamente contiene uno o dos aminoácidos dominantes (por ejemplo, PR-39 o indolicidina). El péptido de permeación celular también puede incluir una señal de localización nuclear (NLS). Por ejemplo, el péptido de permeación celular puede ser un péptido anfipático bipartito, tal como MPG, que deriva del dominio del péptido de fusión de VIH-1 gp41 y la NLS del antígeno T grande SV40 (Simeoni *et al*., *Nucl. Acids Res*., 31: 2717-2724, 2003).

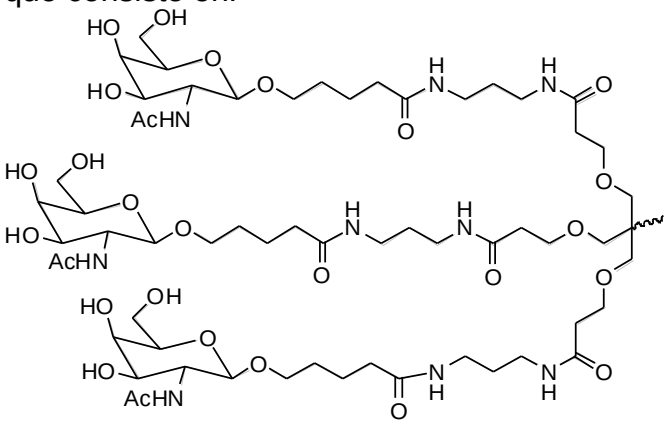
C. Conjugados de carbohidratos

En algunas formas de realización de las composiciones y los métodos de la invención, un ARNi comprende además un carbohidrato. El ARNi conjugado a un carbohidrato es ventajoso para la administración *in vivo* de los ácidos nucleicos, así como en composiciones adecuadas para su uso terapéutico *in vivo*, como se describe en la presente. Según se usa en la presente, un “carbohidrato” se refiere a un compuesto que es un carbohidrato *per se* conformado por una o más unidades de monosacáridos que tienen al menos 6 átomos de carbono (que pueden ser lineales, ramificadas o cíclicos)

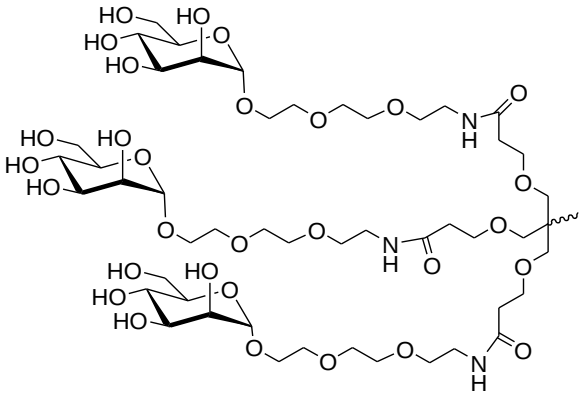
con un átomo de oxígeno, nitrógeno o azufre unido a cada átomo de carbono; o un compuesto una parte del cual es un carbohidrato conformado por una o más unidades de monosacáridos, cada una de las cuales consta de por lo menos seis átomos de carbono (que pueden ser lineales, ramificadas o cíclicas), con un átomo de oxígeno, nitrógeno o azufre unido a cada átomo de carbono. Los carbohidratos representativos incluyen azúcares (mono-, di-, tri- y oligosacáridos que contienen aproximadamente 4, 5, 6, 7, 8 ó 9 unidades de monosacáridos) y polisacáridos tales como almidones, glucógeno, celulosa y gomas de polisacáridos. Los monosacáridos específicos incluyen azúcares de C5 y superiores (por ejemplo, de C5, C6, C7 o C8); los di y trisacáridos incluyen azúcares que tienen dos o tres unidades de monosacáridos (por ejemplo, C5, C6, C7 o C8).

En determinadas formas de realización, el conjugado de carbohidrato para usar en las composiciones y los métodos de la invención es un monosacárido.

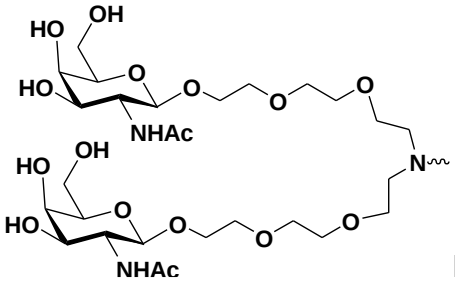
En una forma de realización, el conjugado de carbohidrato para su uso en las composiciones y los métodos de la invención se selecciona del grupo que consiste en:



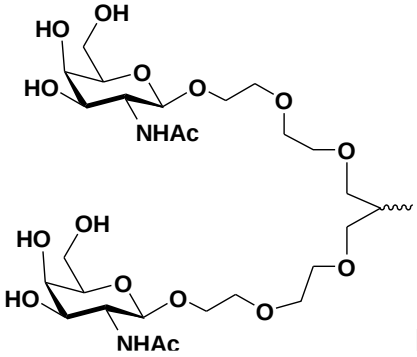
Fórmula II,



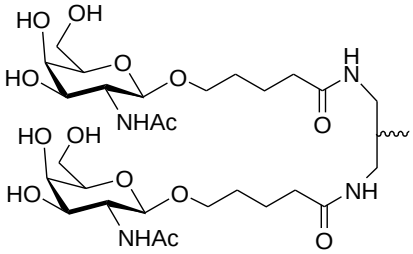
Fórmula III,



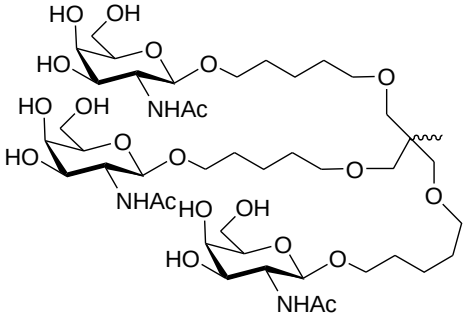
Fórmula IV,



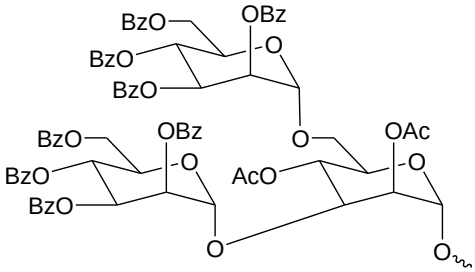
Fórmula V,



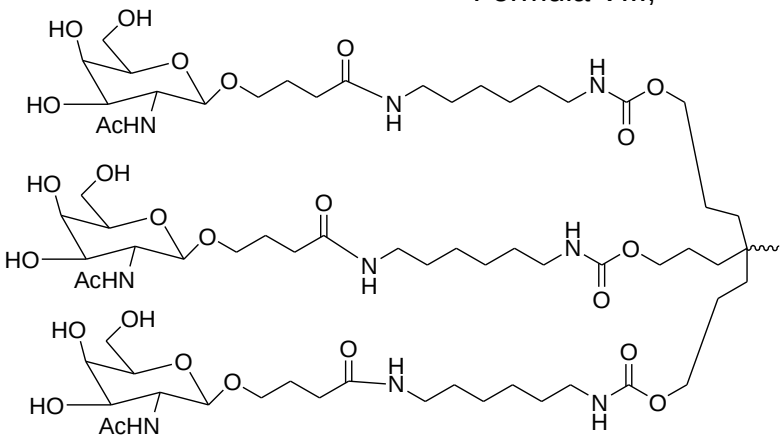
Fórmula VI,



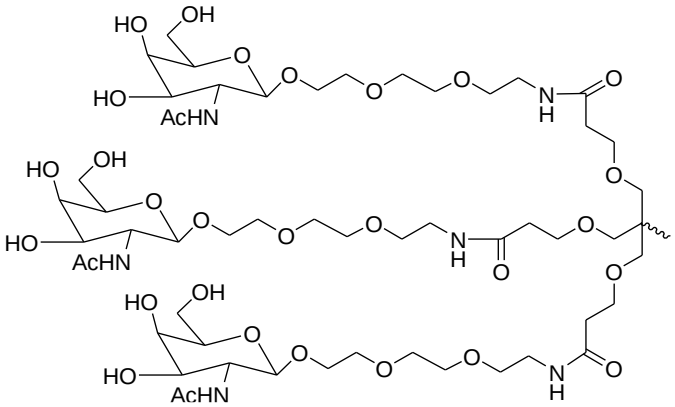
Fórmula VII,



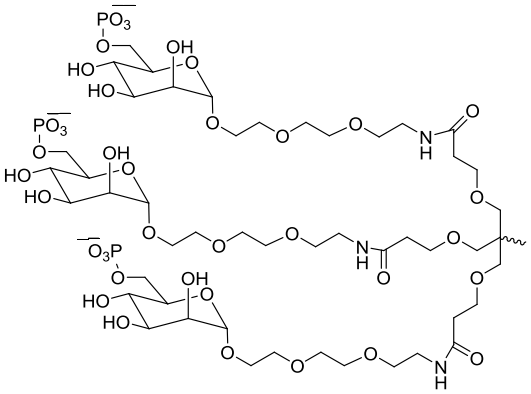
Fórmula VIII,



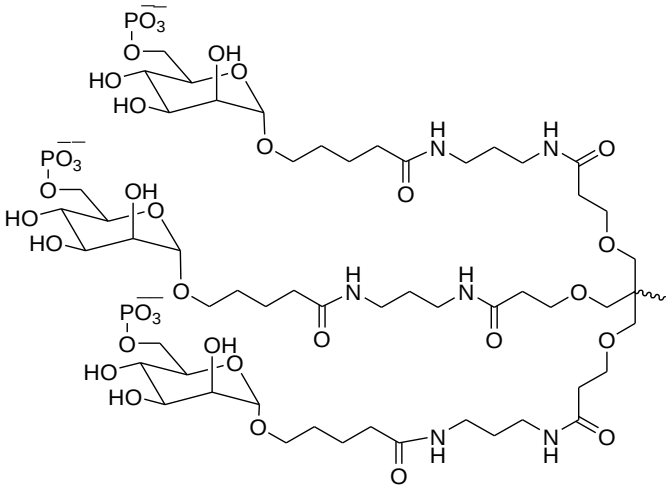
Fórmula IX,



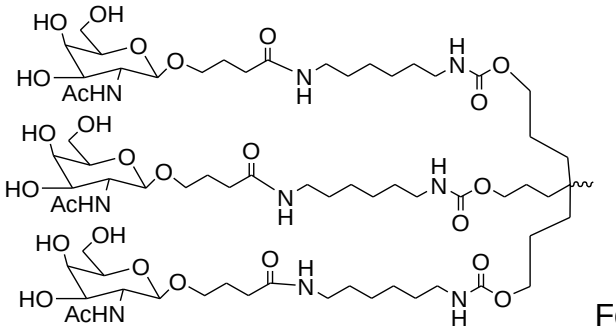
Fórmula X,



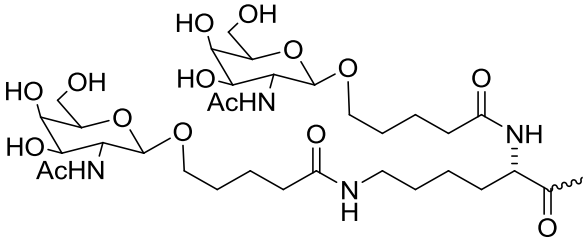
Fórmula XI,



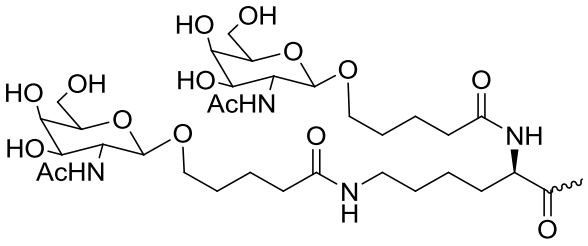
Fórmula XII,



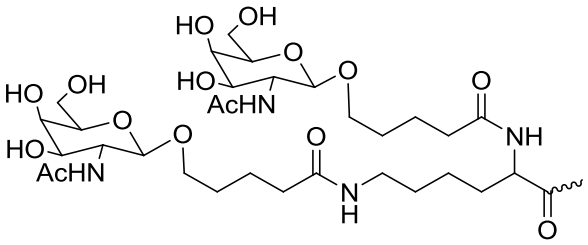
Fórmula XIII,



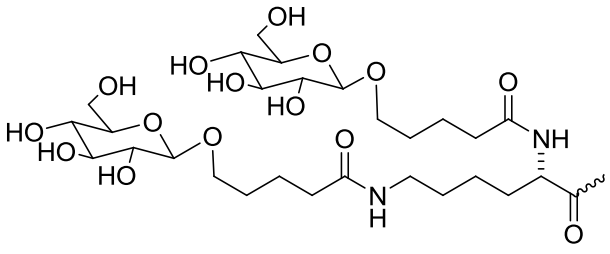
Fórmula XIV,



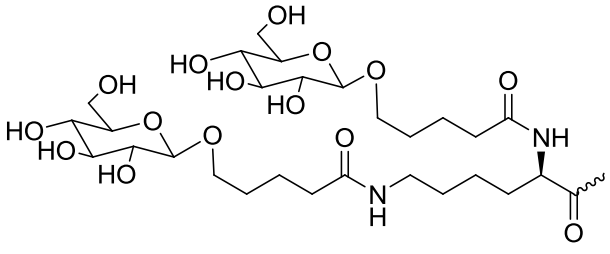
Fórmula XV,



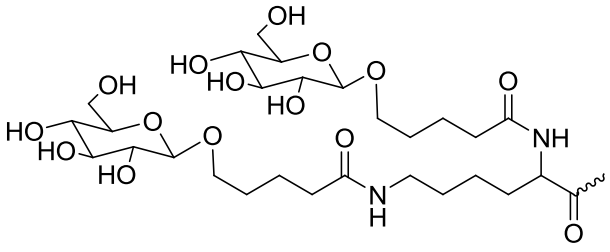
Fórmula XVI,



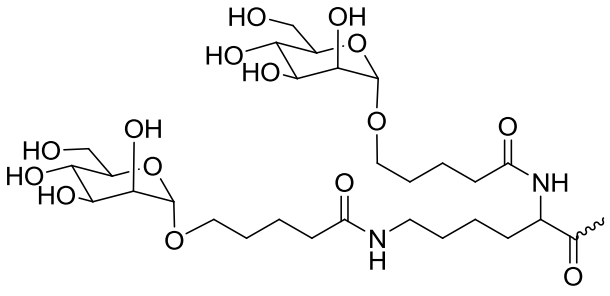
Fórmula XVII,



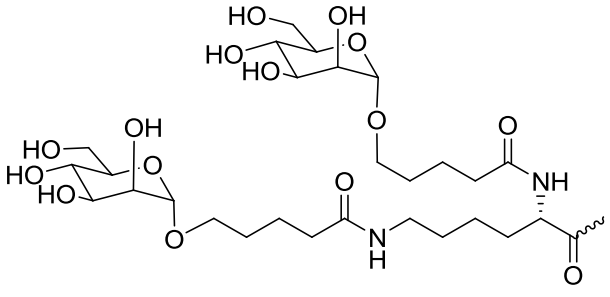
Fórmula XVIII,



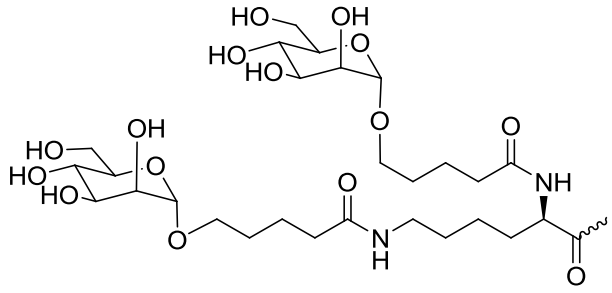
Fórmula XIX,



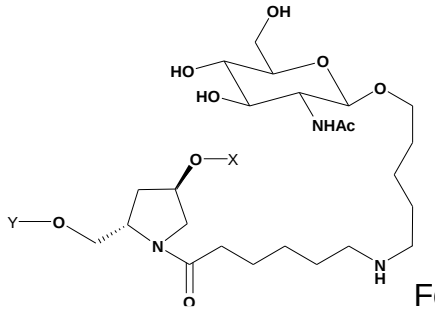
Fórmula XX,



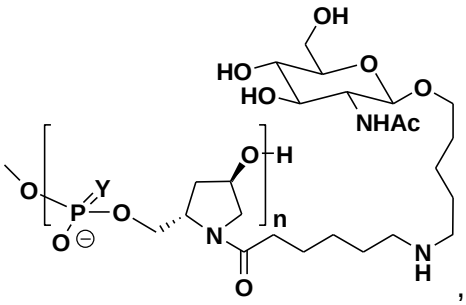
Fórmula XXI,



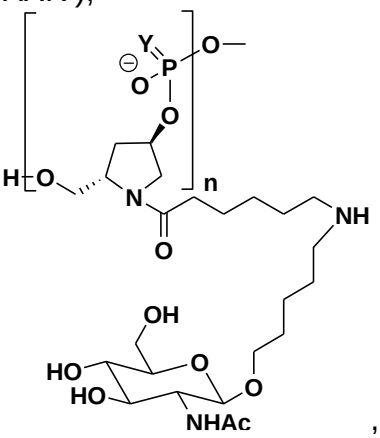
Fórmula XXII,



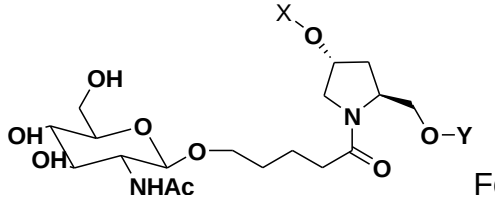
Fórmula XXIII;



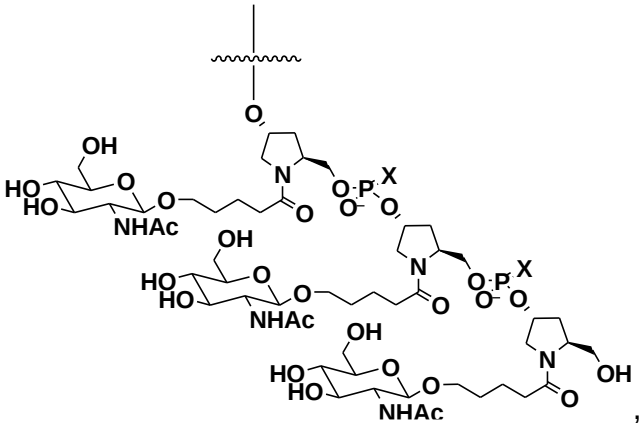
, en donde Y es O o S y n es 3-6 (Fórmula XXIV);



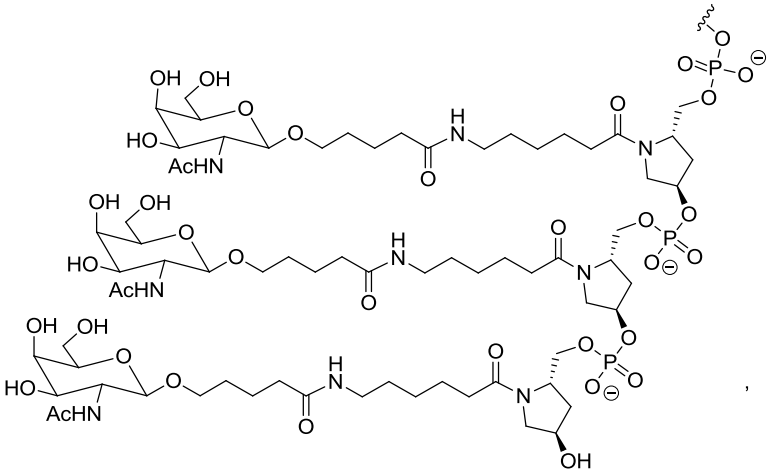
, en donde Y es O o S y n es 3-6 (Fórmula XXV);



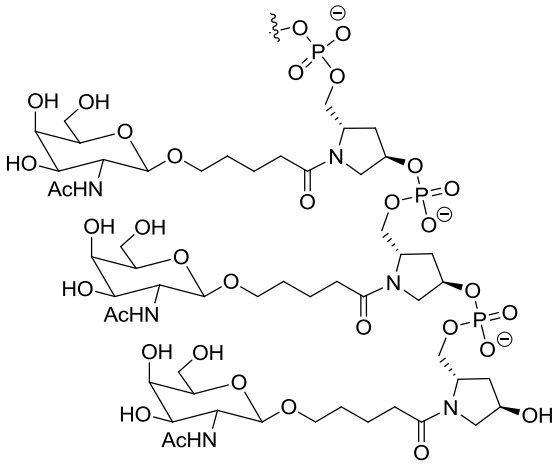
Fórmula XXVI;



, en donde X es O o S (Fórmula XXVII);

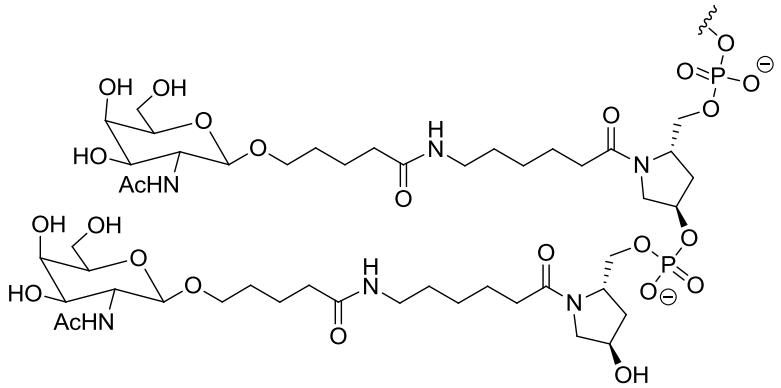


,

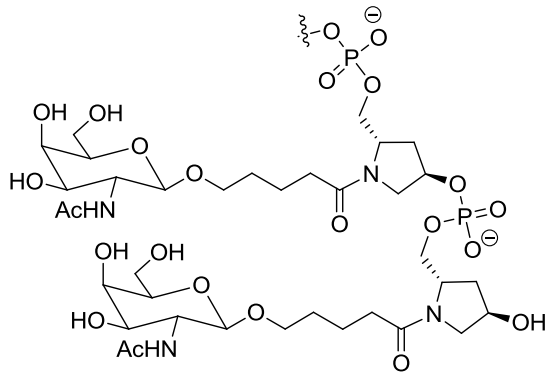


,

Fórmula XXVII; Fórmula XXIX;



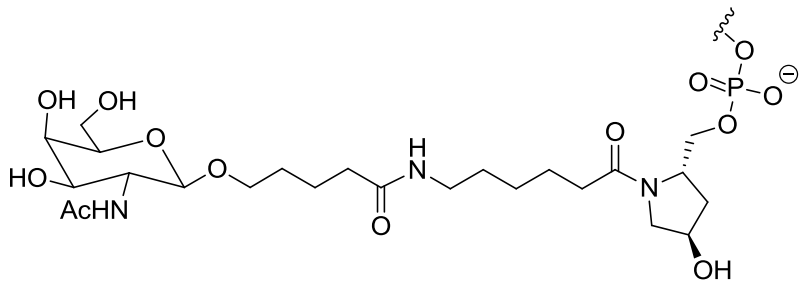
,



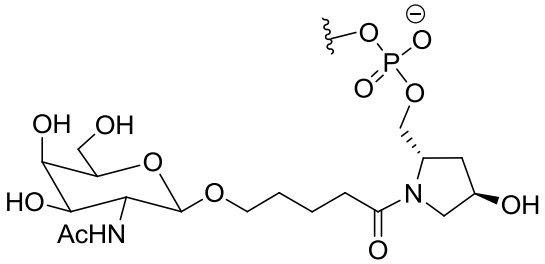
,

Fórmula XXX;

Fórmula XXXI;



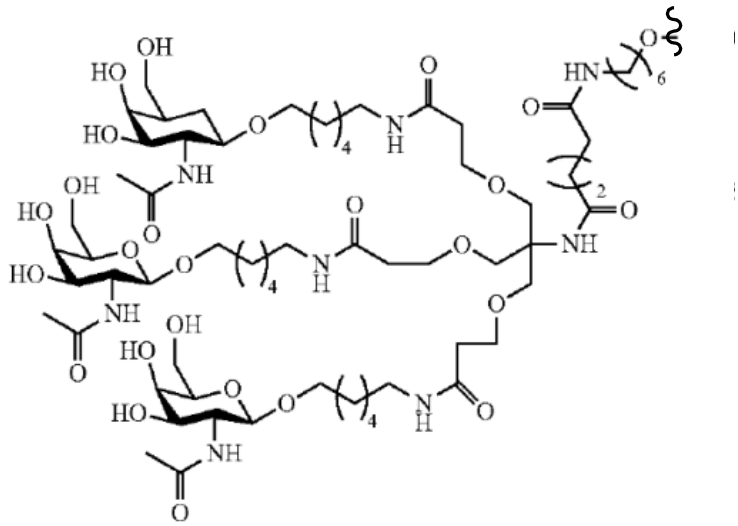
, and



.

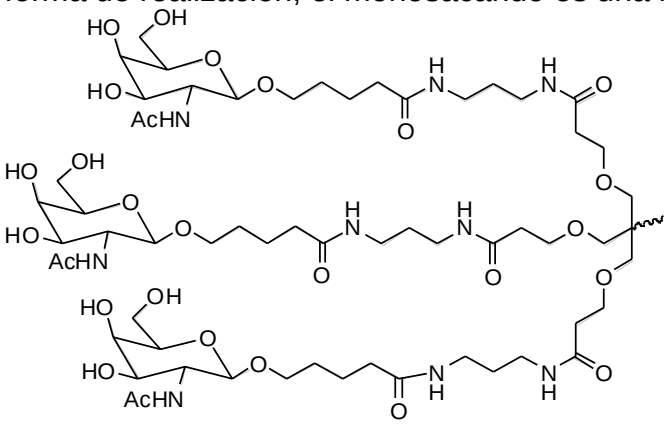
Fórmula XXXII;

Fórmula XXXIII.



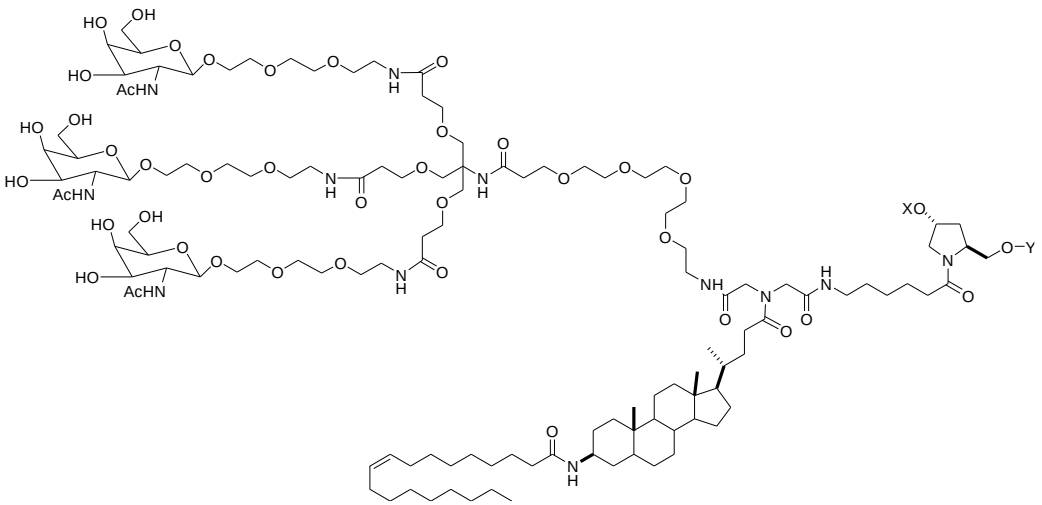
Fórmula XXXIV.

En otra forma de realización, el conjugado de carbohidrato para usar en las composiciones y los métodos de la invención es un monosacárido. En una forma de realización, el monosacárido es una N-acetilgalactosamina, tal como



Fórmula II.

Otro conjugado de carbohidrato representativo para su uso en las formas de realización que se describen en la presente incluye, pero en un sentido no taxativo,



(Fórmula XXXVI),

cuando uno entre X o Y es un oligonucleótido, el otro es un hidrógeno.

En determinadas formas de realización de la invención, el GalNAc o derivado de GalNAc se une a un agente de ARNi de la invención por medio de un conector monovalente. En algunas formas de realización de la invención, el GalNAc o el derivado de GalNAc está unido a un agente de ARNi de la invención por medio de un conector bivalente. En aún otras formas de realización de la invención, el GalNAc o derivado de GalNAc está unid a un agente de ARNi de la invención por medio de un conector trivalente.

En una forma de realización, los agentes de ARNi de hebra doble de la invención comprenden un derivado GalNAc o GalNAc unido al agente de ARNi, por ejemplo, el extremo 5' de la hebra sentido de un agente de ARNhd, o el extremo 5' de una o ambas hebras sentido de un agente de ARNi de direccionamiento doble que se describe en la presente. En otra forma de realización, los agentes de ARNi de hebra doble de la invención comprenden una pluralidad (por ejemplo, 2, 3, 4, 5 ó 6) de GalNAc o de derivados de GalNAc, cada uno unido de manera independiente a una pluralidad de nucleótidos del agente de ARNi de hebra doble por medio de una pluralidad de

conectores monovalentes.

En algunas formas de realización, por ejemplo, cuando las dos hebras de un agente de ARNi de la invención forman parte de una molécula más grande unida mediante una cadena no interrumpida de nucleótidos entre el extremo 3’ de una hebra y el extremo 5’ de la otra hebra respectiva formando así un bucle en horquilla que comprende una pluralidad de nucleótidos no apareados, donde cada nucleótido no apareado dentro del bucle en horquilla puede comprender de manera independiente un GalNAc o un derivado de GalNAc unido por medio de un conector monovalente.

En algunas formas de realización, el conjugado de carbohidrato comprende además uno o más ligandos adicionales como se describió previamente, tal como, pero en un sentido no taxativo, un modulador PK o un péptido de permeación celular.

Otros conjugados de carbohidrato y conectores adecuados para usar en la presente invención incluyen los descritos en las publicaciones PCT N°: WO 2014/179620 y WO 2014/179627, cuyos contenidos completos se incorporan a la presente a modo de referencia.

D. Conectores

En algunas formas de realización, el conjugado o el ligando descrito en la presente se puede unir a un oligonucleótido de ARNi con diversos conectores que pueden ser clivables o no clivables.

El término "conector" o “grupo conector” se refiere a un grupo orgánico que conecta dos partes de un compuesto, por ejemplo, que une de manera covalente dos partes de un compuesto. Los conectores comprenden típicamente un enlace directo o un átomo, tal como de oxígeno o de azufre, una

unidad tal como NR8, C(O), C(O)NH, SO, SO_2, SO_2NH o una cadena de átomos, tal como, pero en un sentido no taxativo, alquilo sustituido o no sustituido, alquenilo sustituido o no sustituido, alquinilo sustituido o no sustituido, arilalquilo, arilalquenilo, arilalquinilo, heteroarilalquilo, heteroarilalquenilo, heteroarilalquinilo, heterociclilalquilo, heterociclilalquenilo, heterociclilalquinilo, arilo, heteroarilo, heterociclilo, cicloalquilo, cicloalquenilo, alquilarilalquilo, alquilarilalquenilo, alquilarilalquinilo, alquenilarilalquilo, alquenilarilalquenilo, alquenilarilalquinilo, alquinilarilalquilo, alquinilarilalquenilo, alquinilarilalquinilo, alquilheteroarilalquilo, alquilheteroarilalquenilo, alquilheteroarilalquinilo, alquenilheteroarilalquilo, alquenilheteroarilalquenilo, alquenilheteroarilalquinilo, alquinilheteroarilalquilo, alquinilheteroarilalquenilo, alquinilheteroarilalquinilo, alquilheterociclilalquilo, alquilheterociclilalquenilo, alquilheterociclilalquinilo, alquenilheterociclilalquilo, alquenilheterociclilalquenilo, alquenilheterociclilalquinilo, alquinilheterociclilalquilo, alquinilheterociclilalquenilo, alquinilheterociclilalquinilo, alquilarilo, alquenilarilo, alquinilarilo, alquilheteroarilo, alquenilheteroarilo, alquinilheteroarilo, donde uno o más metilenos pueden estar interrumpidos o terminados por O, S, S(O), SO_2, N(R8), C(O), arilo sustituido o no sustituido, heteroarilo sustituido o no sustituido, heterocíclicos sustituidos o no sustituidos; donde R8 es hidrógeno, acilo, un alifático o un alifático sustituido. En una forma de realización, el conector es de aproximadamente 1-24 átomos, 2-24, 3-24, 4-24, 5-24, 6-24, 6-18, 7-18, 8-18 átomos, 7-17, 8-17, 6-16, 7-17 ó 8-16 átomos.

Un grupo conector clivable es uno que es suficientemente estable fuera de la célula, pero que al entrar en una célula blanco se cliva liberando las dos partes del conector que las mantiene unidas. En una forma de realización

preferida, el grupo conector clivable se cliva al menos aproximadamente 10 veces, 20, veces, 30 veces, 40 veces, 50 veces, 60 veces, 70 veces, 80 veces, 90 veces o más o al menos 100 veces más rápido en la célula blanco o bajo una primera condición de referencia (que se puede seleccionar, por ejemplo, para imitar o representar condiciones intracelulares) que en la sangre de un sujeto, o bajo una segunda condición de referencia (que se puede seleccionar, por ejemplo, para imitar o representar las condiciones propias de la sangre o del suero).

Los grupos conectores clivables son susceptible a los agentes de clivaje, por ejemplo, pH, potencial rédox o la presencia de moléculas degradadoras. En general, los agentes de clivaje son más prevalentes o se encuentran a niveles o actividades más altos en el interior de las células que en el suero o en la sangre. Los ejemplos de tales agentes de degradación incluyen: agentes rédox o reductores que se seleccionan para sustratos particulares o que no tienen especificidad por el sustrato, incluyendo, por ejemplo, enzimas oxidativas o reductoras o agentes reductores tales como mercaptanos, presentes en las células, que pueden degradar un grupo conector clivable rédox por reducción; estearasas; endosomas o agentes que pueden crear un entorno ácido, por ejemplo, aquellos que dan como resultado un pH de cinco o menos; enzimas que pueden hidrolizar o degradar un grupo conector clivable ácido al actuar como un ácido general, peptidasas (que pueden ser específicas del sustrato) y fosfatasas.

Un grupo de enlace clivable, tal como un enlace disulfuro, puede ser susceptible al pH. El pH del suero humano es de 7,4, en tanto el pH intracelular promedio es ligeramente menor, que varía en un rango de

aproximadamente 7,1-7,3. Los endosomas tienen un pH más ácido, en el rango de 5,5-6,0; y los lisosomas tienen un pH aún más ácido de alrededor de 5,0. Algunos conectores tendrán un grupo conector clivable que es clivado a un pH preferido, liberando así un lípido catiónico del ligando en el interior de la célula o en el compartimento deseado de la célula.

El conector puede incluir un grupo conector clivable que es clivable por una enzima particular. El tipo de grupo conector clivable incorporado en el conector puede depender de la célula buscada como blanco. Por ejemplo, el ligando dirigido al hígado se puede unir a un lípido catiónico por medio de un conector que incluye un grupo éster. Las células hepáticas son ricas en estearasas, y por ello el conector se clivará más eficazmente en las células hepáticas que en los tipos celulares que no son ricos en estearasa. Otros tipos celulares ricos en estearasas incluyen células de pulmón, de la corteza renal y de testículo.

Los conectores que contienen enlaces peptídicos se pueden usar cuando se dirigirán tipos celulares ricos en peptidasas, tal como células hepáticas y sinoviocitos.

En general, la conveniencia de un grupo conector clivable candidato puede evaluarse según la capacidad de un agente de degradación (o condición) para clivar el grupo conector candidato. Además resulta deseable evaluar también al grupo conector clivable candidato por su capacidad para resistir el clivaje en la sangre o cuando está en contacto con otro tejido no blanco. Por consiguiente, es posible determinar la susceptibilidad relativa al clivaje entre una primera y una segunda condición, donde la primera se selecciona para que sea indicativa del clivaje en una célula blanco y la segunda

se selecciona para que sea indicativa del clivaje en otros tejidos o fluidos biológicos, por ejemplo, sangre o suero. Las evaluaciones se pueden llevar a cabo en sistemas sin células, en células, en cultivos celulares, en órganos o cultivos tisulares, o en animales completos. Puede ser útil realizar evaluaciones iniciales en condiciones sin células o de cultivo celular y confirmarlas mediante evaluaciones adicionales en animales completos. En formas de realización preferidas, los compuestos candidato que son de utilidad se clivan al menos aproximadamente 2, 4, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ó 100 veces más rápido en las células (o bajo condiciones *in vitro* seleccionadas para imitar las condiciones intracelulares) en comparación con la sangre o el suero (o bajo condiciones *in vitro* seleccionadas para imitar las condiciones extracelulares).

i. Grupos conectores clivables rédox

En determinadas formas de realización, el grupo conector clivable es un grupo conector clivable rédox que es clivado con una reducción u oxidación. Un ejemplo de un grupo conector clivable bajo condiciones reductoras es un grupo conector disulfuro (-S-S-). Para determinar si un grupo conector clivable candidato es un “grupo conector clivable bajo condiciones reductoras” adecuado o si por ejemplo es adecuado para su uso con un grupo de ARNi y un agente de direccionamiento particular, se pueden considerar los métodos que se describen en la presente. Por ejemplo, el candidato se puede evaluar por incubación con ditiotreitol (DTT) u otro agente reductor usando reactivos conocidos en el arte, que imitan la velocidad de clivaje observada en una célula, por ejemplo, una célula blanco. Los candidatos también se pueden evaluar bajo condiciones seleccionadas para imitar las condiciones en sangre o

suero. En un caso, se cliva como máximo un 10% aproximadamente de los compuestos candidato en la sangre. En otras formas de realización, los compuestos candidato que son de utilidad se degradan al menos aproximadamente 2, 4, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o aproximadamente 100 veces más rápido en las células (o bajo condiciones *in vitro* seleccionadas para imitar las condiciones intracelulares) en comparación con la sangre (o bajo condiciones *in vitro* seleccionadas para imitar las condiciones extracelulares). La velocidad de clivaje de los compuestos candidato se puede determinar usando ensayos estándar de cinética enzimática bajo las condiciones elegidas para imitar el medio intracelular y luego se puede comparar con las condiciones elegidas para imitar el medio extracelular.

ii. Grupos conectores clivables basados en fosfatos

En otras formas de realización, el conector clivable comprende un grupo conector clivable basado en fosfato. El grupo conector clivable basado en fosfato es clivado por agentes que degradan o hidrolizan el grupo fosfato. Un ejemplo de un agente que cliva los grupos fosfato en las células son enzimas tales como las fosfatasas en las células. Los ejemplos de grupos conectores basados en fosfato son -O-P(O)(ORk)-O-, -O-P(S)(ORk)-O-, -O-P(S)(SRk)-O-, -S-P(O)(ORk)-O-, -O-P(O)(ORk)-S-, -S-P(O)(ORk)-S-, -O-P(S)(ORk)-S-, -S-P(S)(ORk)-O-, -O-P(O)(Rk)-O-, -O-P(S)(Rk)-O-, -S-P(O)(Rk)-O-, -S-P(S)(Rk)-O-, -S-P(O)(Rk)-S-, -O-P(S)(Rk)-S-. Las formas de realización preferidas son -O-P(O)(OH)-O-, -O-P(S)(OH)-O-, -O-P(S)(SH)-O-, -S-P(O)(OH)-O-, -O-P(O)(OH)-S-, -S-P(O)(OH)-S-, -O-P(S)(OH)-S-, -S-P(S)(OH)-O-, -O-P(O)(H)-O-, -O-P(S)(H)-O-, -S-P(O)(H)-O, -S-P(S)(H)-O-, -S-P(O)(H)-S- y -O-P(S)(H)-S-. Una forma de realización preferida es -O-P(O)(OH)-O-. Estos candidatos se pueden

evaluar usando métodos análogos a los descritos previamente.

iii. Grupos conectores clivables ácidos

En otra forma de realización, un conector clivable comprende un grupo conector clivable ácido. Un grupo conector clivable ácido es un grupo conector que es clivado bajo condiciones ácidas. En formas de realización preferidas, los grupos conectores clivables ácidos son clivados en un entorno ácido con un pH de aproximadamente 6,5 o menor (por ejemplo, aproximadamente 6,0, 5,5, 5,0 o menor) o por agentes tales como enzimas que pueden actuar como un ácido general. En una célula, las organelas específicas de pH bajo, tales como endosomas y lisosomas, pueden proveer un entorno de clivaje para los grupos conectores clivables ácidos. Los ejemplos de grupos conectores clivables ácidos incluyen, pero en un sentido no taxativo, hidrazonas, ésteres y ésteres de aminoácidos. Los grupos clivables ácidos pueden ser de la fórmula general -C=NN-, C(O)O o -OC(O). Una forma de realización preferida es cuando el carbono unido al oxígeno del éster (el grupo alcoxi) es un grupo arilo, un grupo alquilo sustituido o un grupo alquilo terciario tal como dimetilpentilo o t-butilo. Estos candidatos se pueden evaluar usando métodos análogos a los descritos previamente.

iv. Grupos conectores basados en ésteres

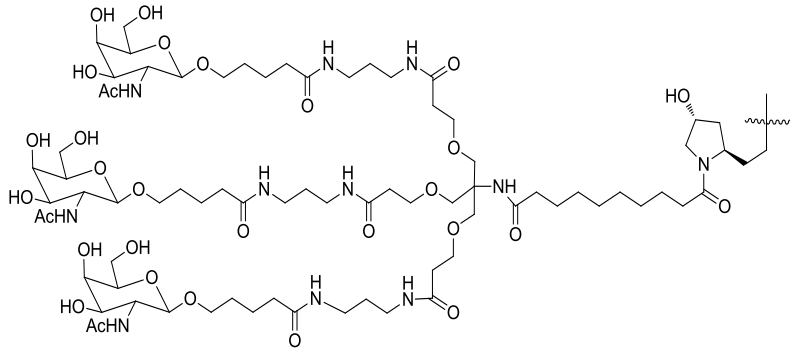
En otras formas de realización, el conector clivable comprende un grupo conector clivable basado en ésteres. Un grupo conector clivable basado en ésteres es clivado por enzimas tales como estearasas y amidasas en las células. Los ejemplos de grupos conectores basados en ésteres que son clivables incluyen, pero en un sentido no taxativo, grupos de ésteres de alquileno, alquenileno y alquinileno. Los grupos conectores clivables de

ésteres son de la fórmula general -C(O)O- o -OC(O)-. Estos candidatos se pueden evaluar usando métodos análogos a los descritos previamente.

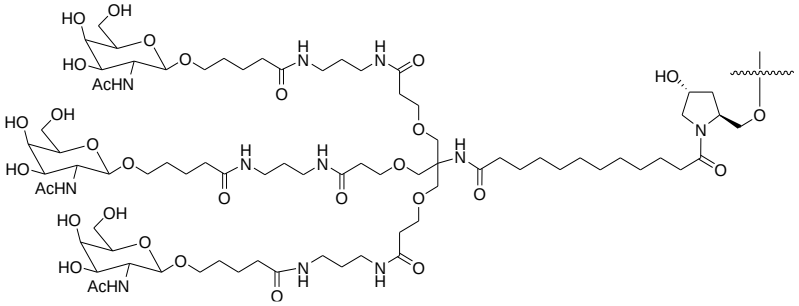
v. Grupos de clivaje basados en péptidos

En aún otras formas de realización, el conector clivable comprende un grupo conector clivable basado en péptidos. Un grupo conector clivable basado en péptidos es clivado por enzimas tales como peptidasas y proteasas en las células. El grupo conector clivable basado en péptidos comprende enlaces peptídicos formados entre aminoácidos para obtener oligopéptidos (por ejemplo, dipéptidos, tripéptidos *etc*.) y polipéptidos. Los grupos clivables basados en péptidos no incluyen al grupo amida (-C(O)NH-). El grupo amida se puede formar entre cualquier alquileno, alquenileno o alquinileno. El enlace peptídico es un tipo especial de enlace amida formado entre aminoácidos para obtener péptidos y proteínas. El grupo de clivaje basado en péptidos generalmente se limita al enlace peptídico (es decir, el enlace amida) formado entre aminoácidos para obtener péptidos y proteínas y no incluye a todo el grupo amida funcional. Un grupo conector clivable basado en péptidos presentan la fórmula general – NHCHRAC(O)NHCHRBC(O)-, donde RA y RB son los grupos R de los dos aminoácidos adyacentes. Estos candidatos se pueden evaluar usando métodos análogos a los descritos previamente.

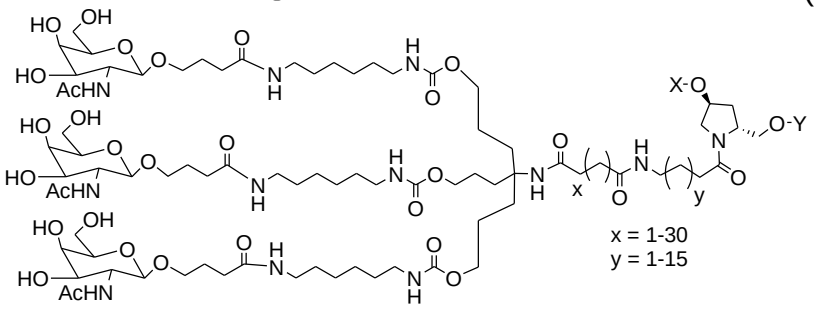
En algunas formas de realización, un ARNi de la invención está conjugado a un carbohidrato por medio de un conector. Los ejemplos no taxativos de conjugados de ARNi con carbohidratos con los conectores de las composiciones y los métodos de la invención incluyen, pero en un sentido no taxativo,



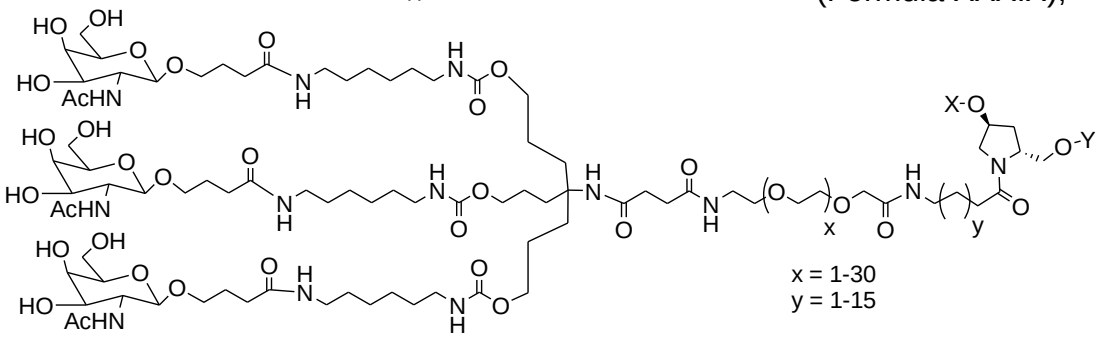
(Fórmula XXXVII),



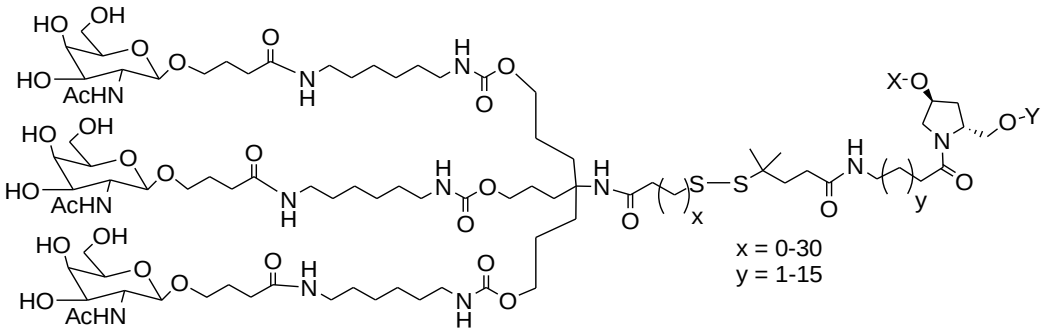
(Fórmula XXXVIII),



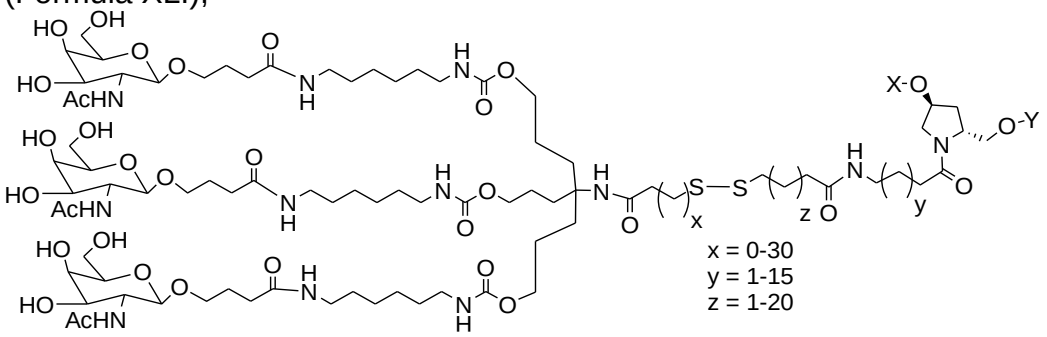
(Fórmula XXXIX),



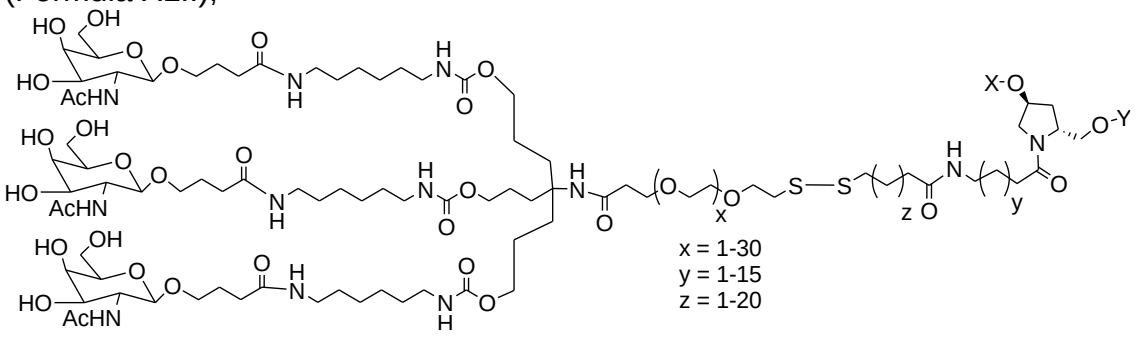
(Fórmula XL),



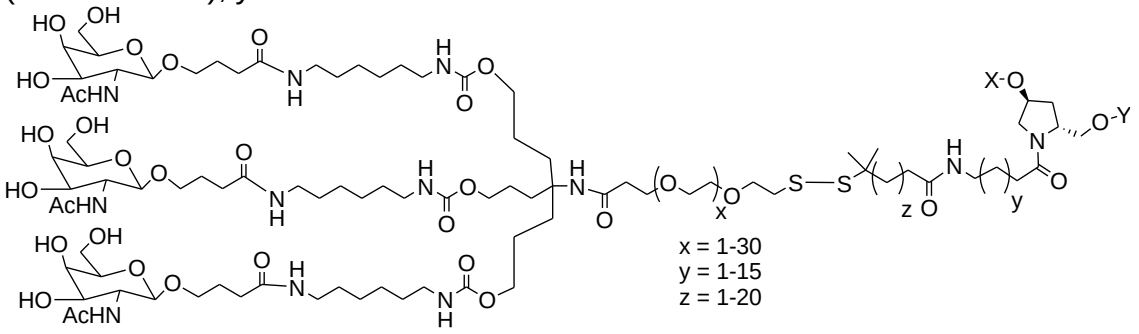
(Fórmula XLI),



(Fórmula XLII),



(Fórmula XLIII), y

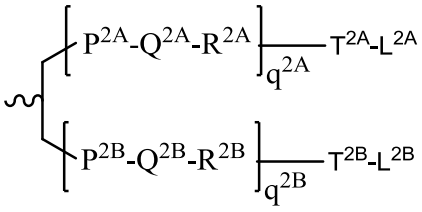


(Fórmula XLIV), cuando uno entre X o Y es un oligonucleótido, el otro es un hidrógeno.

En determinadas formas de realización de las composiciones y los métodos de la invención, el ligando comprende uno o más derivados N-acetilgalactosamina “GalNAc” unidos por medio de un conector ramificado bivalente o trivalente.

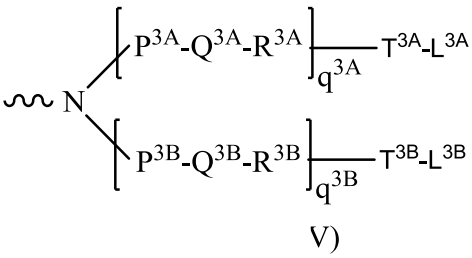
En una forma de realización, el ARNhd de la invención está conjugado a un conector ramificado bivalente o trivalente seleccionado del grupo de estructuras que se muestra en cualquiera de las fórmulas (XLV) – (XLVI):

Fórmula XXXXV

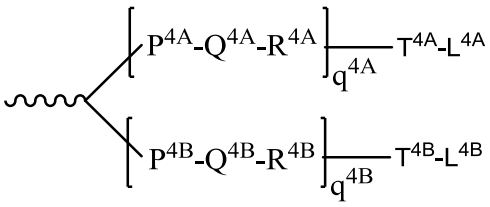


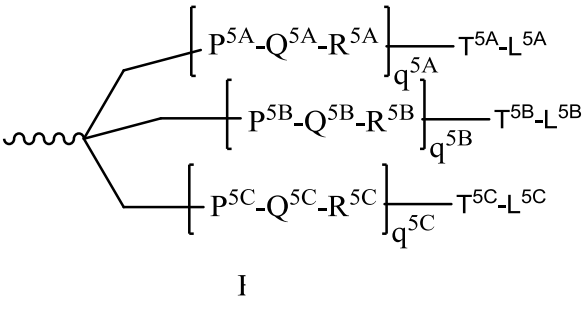
,

Fórmula XLVI



,





.

Fórmula XLVII

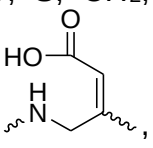
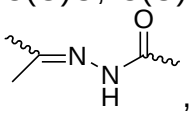
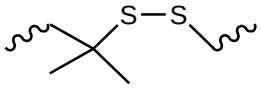
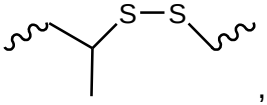
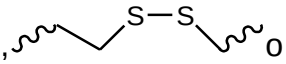
Fórmula XLVIII

en donde:

q2A, q2B, q3A, q3B, q4A, q4B, q5A, q5B y q5C representan de manera independiente en cada oportunidad 0-20 y en donde la unidad repetitiva puede ser igual o diferente;

P^{2A}, P^{2B}, P^{3A}, P^{3B}, P^{4A}, P^{4B}, P^{5A}, P^{5B}, P^{5C}, T^{2A}, T^{2B}, T^{3A}, T^{3B}, T^{4A}, T^{4B}, T^{4A}, T^{5B}, T^{5C}, cada uno de manera independiente en cada oportunidad, están ausentes, o son CO, NH, O, S, OC(O), NHC(O), CH_2, CH_2NH o CH_2O;

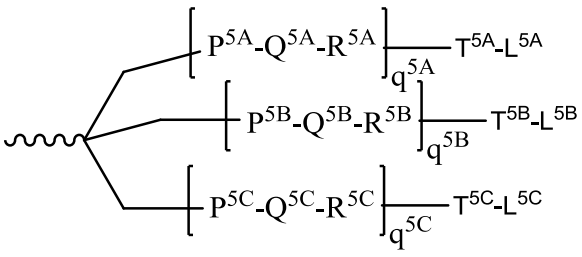
Q^{2A}, Q^{2B}, Q^{3A}, Q^{3B}, Q^{4A}, Q^{4B}, Q^{5A}, Q^{5B}, Q^{5C}, de manera independiente en cada oportunidad, están ausentes, o son alquileno, alquileno sustituido en donde uno o más de los metilenos se puede interrumpir o terminar con uno o más de O, S, S(O), SO_2, $N(R^N)$, C(R')=C(R''), C≡C o C(O);

R^{2A}, R^{2B}, R^{3A}, R^{3B}, R^{4A}, R^{4B}, R^{5A}, R^{5B}, R^{5C}, cada uno de manera independiente en cada oportunidad, están ausente, o son NH, O, S, CH_2, C(O)O, C(O)NH, $NHCH(R^a)C(O)$, $-C(O)-CH(R^a)-NH-$, CO, CH=N-O,  ,  ,  ,  , 

heterociclilo;

L^{2A}, L^{2B}, L^{3A}, L^{3B}, L^{4A}, L^{4B}, L^{5A}, L^{5B} y L^{5C} representan al ligando; es decir, cada uno es de manera independiente en cada oportunidad un monosacárido (tal como GalNAc), un disacárido, un trisacárido, un tetrasacárido, un oligosacárido o un polisacárido; y R^a es H o una cadena lateral de un aminoácido. Los derivados GalNAc de conjugación trivalente son de particular utilidad para su uso con los agentes de ARNi para inhibir la expresión de un gen blanco, tal como los de la fórmula (XLIX):

Fórmula XLIX



,

Fórmula (VII)

en donde L^{5A}, L^{5B} y L^{5C} representan un monosacárido, tal como un

derivado GalNAc.

Los ejemplos de grupos conectores ramificados bivalentes y trivalentes adecuados que se conjugan con derivados de GalNAc incluyen, pero en un sentido no taxativo, las estructuras indicadas previamente como las fórmulas II, VII, XI, X y XIII.

Las Patentes de los EEUU N°: representativas que divulgan la preparación de ARN conjugados incluyen, pero en un sentido no taxativo, las Patentes de los EEUU N°: 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; 6.294.664; 6.320.017; 6.576.752; 6.783.931; 6.900.297; 7.037.646; y 8.106.022, cuyos contenidos completos se incorporan en la presente a modo de referencia.

No es necesario que todas las posiciones en un compuesto dado se modifiquen de manera uniforme y de hecho más de uno de las modificaciones mencionadas previamente pueden incorporarse en un solo compuesto o aún en un solo nucleósido en un ARNi. La presente invención también incluye compuestos de ARNi que son compuestos quiméricos.

Los compuestos de ARNi “quiméricos” o “quimeras”, en el contexto de esta invención, son compuestos de ARNi, preferiblemente agentes de ARNihd,

que contienen dos o más regiones químicamente distintas, cada una conformada por al menos una unidad monomérica, es decir, un nucleótido en el caso de un compuesto de ARNcd. Estos ARNi contienen típicamente al menos una región en donde el ARN está modificado para poder conferirle al ARNi una mayor resistencia a la degradación por nucleasas, una mayor captación celular o una mayor afinidad de unión por el ácido nucleico blanco. Una región adicional del ARNi puede servir como sustrato para las enzimas capaces de clivar híbridos de ARN:ADN o de ARN:ARN. A modo de ejemplo, la RNasa H es una endonucleasa celular que cliva la hebra de ARN de un dúplex de ARN:ADN. Por ello, la activación de la RNasa H da como resultado el clivaje del blanco de ARN, mejorando así la eficiencia de la inhibición por ARNi de la expresión del gen. En consecuencia, a menudo se pueden obtener resultados comparables con ARNi más cortos cuando se usan ARNhd quiméricos, en comparación con los desoxifosforotioato ARNhd que se hibridizan con la misma región blanco. El clivaje del blanco de ARN puede detectarse de manera rutinaria mediante electroforesis en gel y, si fuera necesario, mediante las técnicas de hibridación de ácidos nucleicos asociadas que son conocidas en el arte.

En determinados casos, el ARN de un ARNi se puede modificar con un grupo no ligando. Se ha conjugado numerosas moléculas de no ligandos con los ARNi con el fin de mejorar la actividad, la administración celular o la captación celular del ARNi, y los procedimientos para efectuar dichas conjugaciones se encuentran disponibles en la literatura científica. Tales grupos no ligando han incluido porciones de lípidos, tal como el colesterol (Kubo, T. *et al., Biochem. Biophys. Res., Comm*., 2007, 365(1): 54-61;

Letsinger *et al*., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, 86: 6553), ácido cólico (Manoharan *et al*., *Bioorg. Med. Chem. Lett*., 1994, 4: 1053), un tioéter, por ejemplo, hexil-S-tritiltiol (Manoharan *et al*., *Ann. N.Y. Acad. Sci*., 1992, 660: 306; Manoharan *et al*., *Bioorg. Med. Chem. Let*., 1993, 3: 2765), un tiocolesterol (Oberhauser *et al*., *Nucl. Acids Res*., 1992, 20: 533), una cadena alifática, por ejemplo, residuos dodecandiol o undecilo (Saison-Behmoaras *et al*., *EMBO J*., 1991, 10: 111; Kabanov *et al*., *FEBS Lett*., 1990, 259: 327; Svinarchuk *et al*., *Biochimie*, 1993, 75: 49), un fosfolípido, 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 cadena de poliamina o polietilenglicol (Manoharan *et al*., *Nucleosides & Nucleotides*, 1995, 14: 969) o ácido adamantanacético (Manoharan *et al*., *Tetrahedron Lett*., 1995, 36: 3651), un grupo palmitilo (Mishra *et al*., *Biochim. Biophys. Acta*, 1995, 1264: 229) o un grupo octadecilamina o hexilamino-carbonil-oxicolesterol (Crooke *et al*., *J. Pharmacol. Exp. Ther*., 1996, 277: 923). Las Patentes de los EEUU representativas que divulgan la preparación de dichos conjugados de ARN ya se enumeraron precedentemente. Los típicos protocolos de conjugación comprenden la síntesis de ARN que contienen un conector amino en una o más posiciones de la secuencia. El grupo amino se hace reaccionar luego con la molécula que se está conjugando usando reactivos apropiados de acoplamiento o de activación. La reacción de conjugación se puede efectuar ya sea con el ARN aún unido al soporte sólido o después del clivaje del ARN, en fase solución. La purificación del conjugado de ARN por HPLC típicamente permite obtener el conjugado puro.

IV. Administración de un ARNi de la invención

La administración de un ARNi de la invención a una célula, por ejemplo, una célula en un sujeto, tal como un sujeto humano se puede efectuar de numerosas maneras diferentes. Por ejemplo, la administración se puede efectuar poniendo una célula en contacto con un ARNi de la invención, ya sea *in vitro* o *in vivo*. La administración *in vivo* también se puede efectuar directamente administrando una composición que comprende un ARNi, por ejemplo, un ARNhd, a un sujeto. Como alternativa, la administración *in vivo* se puede efectuar indirectamente administrando uno o más vectores que codifican y dirigen la expresión del ARNi. Estas alternativas se describirán más adelante.

En general, para administrar un agente de ARNi de acuerdo con la invención, podrá recurrirse al uso de cualquier método que resulte apropiado para administrar un ácido nucleico, tanto in vitro como in vivo (véase, por ejemplo, Akhtar, S., y Julian, R. L. (1992), *Trends Cell. Biol*., 2(5): 139-144 y WO94/02595, que se incorporan en la presente a modo de referencia en su totalidad). Para la administración *in vivo*, los factores a considerar con el fin de administrar una molécula de ARNi incluyen, por ejemplo, la estabilidad biológica de la molécula administrada, la prevención de efectos no específicos, y la acumulación de la molécula administrada en el tejido blanco. Los efectos no específicos de un ARNi se pueden minimizar por administración local, por ejemplo, por inyección o implantación directa en un tejido o por administración tópica de la preparación. La administración local en el sitio de tratamiento maximiza la concentración local del agente, limita la exposición del agente a los tejidos sistémicos que de lo contrario podrían sufrir daños debido al agente o

que pueden degradar al agente y permite administrar una dosis total más baja de la molécula de ARNi. Diversos estudios han demostrado un noqueo exitoso de los productos genéticos cuando un agente de ARNihd se administra localmente. Por ejemplo, la administración intraocular de un ARNcd del VEGF por inyección intravítrea en monos cinomolgos (Tolentino, MJ., *et al* (2004) *Retina* 24: 132-138) y por inyecciones subretinales en ratones (Reich, SJ., *et al* (2003) *Mol. Vis*. 9: 210-216) demostraron en ambos casos que se prevenía la neovascularización en un modelo experimental de degeneración macular relacionada con la edad. Por otra parte, una inyección intratumoral directa de un ARNcd en ratones puede dar como resultado una disminución en el volumen de los tumores (Pille, J., et al. (2005), Mol. Ther., 11: 267-274) y la prolongación de la supervivencia de los ratones que los padecen (Kim, W. J., et al. (2006), Mol. Ther., 14: 343-350; Li, S., et al. (2007), Mol. Ther., 15: 523). La interferencia de ARN también ha resultado exitosa con la administración local al CNS mediante inyección directa (Dorn, G., *et al.,* (2004) *Nucleic Acids* 32: e49; Tan, PH., *et al* (2005) *Gene Ther.,* 12: 59-66; Makimura, H., *et al* (2002) *BMC Neurosci.,* 3: 18; Shishkina, GT., *et al* (2004) *Neuroscience* 129: 521-528; Thakker, ER., *et al* (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 101: 17270-17275; Akaneya, Y., *et al* (2005) *J. Neurophysiol*. 93: 594-602) y a los pulmones mediante administración intranasal (Howard, KA., *et al* (2006) *Mol. Ther.,* 14: 476-484; Zhang, X., *et al* (2004) *J. Biol. Chem*. 279: 10677-10684; Bitko, V., *et al* (2005) *Nat. Med*. 11: 50-55). Para administrar un ARNi por vía sistémica para la prevención de una infección, el ARN se puede modificar o, como alternativa, se puede administrar usando un sistema de administración de drogas; ambos métodos previenen la rápida degradación del ARNhd por las

endo y exonucleasas *in vivo*. La modificación del ARN o el vehículo farmacéutico también permite dirigir al ARNi hacia el tejido blanco y evitar los efectos indeseables fuera del blanco. Las moléculas de ARNi se pueden modificar mediante conjugación química a grupos lipofílicos, tal como el colesterol, para mejorar la captación celular y prevenir su degradación. Por ejemplo, se inyectó un ARNi dirigido contra ApoB conjugado a un grupo de colesterol lipofílico por vía sistémica en ratones y dio como resultado el noqueo del ARNm de apoB tanto en hígado como yeyuno (Soutschek, J., *et al* (2004) *Nature* 432: 173-178). Se ha demostrado que la conjugación de un ARNi a un aptámero inhibe el crecimiento tumoral e interviene en la regresión tumoral en un modelo de ratón de cáncer de próstata (McNamara, JO., *et al* (2006) *Nat. Biotechnol*. 24: 1005-1015). En una forma de realización alternativa, el ARNi se puede administrar usando sistemas de administración de drogas, tales como una nanopartícula, un dendrímero, un polímero, liposomas o un sistema de administración catiónico. Los sistemas de administración catiónicos de carga positiva facilitan la unión de una molécula de ARNi (de carga negativa) y también mejoran las interacciones en la membrana celular de carga negativa para permitir una captación eficiente de un ARNi por la célula. Los lípidos, dendrímeros o polímeros catiónicos se pueden unir a un ARNi o inducir para formar una vesícula o micela (véase, por ejemplo, Kim SH., *et al* (2008) *Journal of Controlled Release* 129(2): 107-116) que encierra a un ARNi. La formación de vesículas o micelas previene además la degradación del ARNi cuando es administrado por vía sistémica. Los métodos para elaborar y administrar complejos de ARNi catiónicos son conocidos y propios del especialista en el arte (véase, por ejemplo, Sorensen, DR., *et al* (2003) *J. Mol. Biol* 327: 761-766;

Verma, UN., *et al* (2003) Clin. Cancer *Res.,* 9: 1291-1300; Arnold, AS *et al* (2007) *J. Hypertens*. 25: 197-205, que se incorporan por completo en la presente a modo de referencia). Algunos ejemplos no taxativos de sistemas de administración de drogas que son de utilidad para una administración sistémica de los ARNi incluyen DOTAP (Sorensen, DR., *et al* (2003), *supra*; Verma, UN., *et al* (2003), *supra*), oligofectamina, "partículas sólidas de lípido-ácido nucleico" (Zimmermann, TS., *et al* (2006) *Nature* 441: 111-114), cardiolipina (Chien, PY., *et al* (2005) *Cancer Gene Ther.,* 12: 321-328; Pal, A., *et al* (2005) *Int J. Oncol*. 26: 1087-1091), polietilenimina (Bonnet ME., *et al* (2008) *Pharm. Res.,* 16 de agosto, publicación en medio electrónico anterior a la impresión; Aigner, A. (2006) *J. Biomed. Biotechnol*. 71659), péptidos Arg-Gly-Asp (RGD) (Liu, S. (2006) *Mol. Pharm*. 3: 472-487) y poliamidoaminas (Tomalia, DA., *et al* (2007) *Biochem. Soc. Trans.* 35: 61-67; Yoo, H., *et al* (1999) *Pharm. Res.,* 16: 1799-1804). En algunas formas de realización, el ARNi forma un complejo con ciclodextrina para la administración sistémica. Los métodos de administración y las composiciones farmacéuticas de los ARNi y ciclodextrinas se pueden consultar en la Patente de los EE.UU. N°: 7.427.605, que se incorpora por completo en la presente a modo de referencia.

A. ARNi codificados por vectores de la invención

El ARNi dirigido al gen Serpina1 se puede expresar 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 los EEUU N°: 6.054.299). La expresión puede ser transitoria (en el orden de horas a semanas) o sostenida (semanas a

meses o más), dependiendo de la construcción específica usada y el tejido o tipo celular blanco. Estos transgenes se pueden introducir como una construcción lineal, un plásmido circular o un vector viral, que puede ser un vector de integración o de no integración. El transgen también se puede construir para permitir que sea heredado como un plásmido extracromosómico (Gassmann, *et al*., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1995) 92: 1292).

La o las hebras individuales de un ARNi se pueden transcribir a partir de un promotor en un vector de expresión. Cuando se expresarán dos hebras separadas para generar, por ejemplo, un ARNhd, se pueden cointroducir dos vectores de expresión separados (por ejemplo, por transfección o infección) en una célula blanco. Como alternativa, cada hebra individual de un ARNhd puede transcribirse por promotores, ambas localizadas en el mismo plásmido de expresión. En una forma de realización, el ARNhd se expresa como una repetición invertida de polinucleótidos unidos por una secuencia de polinucleótidos conectora de modo tal que el ARNhd tiene una estructura de tallo y bucle.

Los vectores de expresión de ARNi generalmente son ADN plasmídicos o vectores virales. Los vectores de expresión compatibles con células eucariotas, preferiblemente los que son compatibles con células de vertebrados, se pueden usar para producir construcciones recombinantes para la expresión de un ARNi descrito en la presente. Los vectores de expresión en células eucariotas son bien conocidos en la técnica y se encuentran disponibles de numerosas fuentes comerciales. Típicamente, dichos vectores están provistos de sitios de restricción convenientes para la inserción del segmento de ácido nucleico deseado. La administración de vectores que expresan puede

ser sistémica, tal como por administración intravenosa o intramuscular, por administración a las células blanco ex-plantadas del paciente seguido por reintroducción en el paciente o mediante cualquier otro medio que permita su introducción en una célula blanco deseada.

Los sistemas de vectores virales que se pueden utilizar con los métodos y las composiciones que se describen en la presente incluyen, pero en un sentido no taxativo, (a) vectores de adenovirus; (b) vectores de retrovirus incluyendo, pero en un sentido no taxativo, vectores lentivirales, virus de leucemia murino Moloney, *etc*.; (c) vectores de virus adenoasociados; (d) vectores del virus *Herpes simplex*; (e) vectores de SV 40; (f) vectores del virus polioma; (g) vectores del virus papiloma; (h) vectores del picornavirus; (i) vectores del virus pox, tal como un ortopox, por ejemplo, vectores del virus *Vaccinia* o avipox, por ejemplo pox de canario o pox de aves de corral; y (j) un adenovirus dependiente de un ayudante o cobarde. También puede ser ventajoso emplear virus de replicación defectuosa. Los diferentes vectores se incorporarán, o no, en el genoma de la célula. Las construcciones pueden incluir secuencias virales para la transfección, si se desea. Como alternativa, la construcción se puede incorporar en vectores capaces de una replicación episómica, por ejemplo los vectores EPV y EBV. Las construcciones para la expresión recombinante de un ARNi generalmente necesitan elementos reguladores, por ejemplo, promotores, potenciadores, *etc*., para asegurar la expresión del ARNi en las células blanco. Otros aspectos a considerar con los vectores y las construcciones son conocidos en el arte.

V. Composiciones farmacéuticas de la invención

La presente invención también incluye composiciones farmacéuticas y

formulaciones que incluyen a los ARNi de la invención. En una forma de realización, en la presente se proveen composiciones farmacéuticas que contienen un ARNi, descrito en la presente, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Las composiciones farmacéuticas que contienen al ARNi son de utilidad para tratar una enfermedad o trastorno asociado con la expresión o la actividad de un gen de Serpina1, por ejemplo, un trastorno asociado con una deficiencia de Serpina1, por ejemplo, un trastorno hepático por deficiencia de Serpina1. Dichas composiciones farmacéuticas se formulan sobre la base del modo de administración. Un ejemplo comprende composiciones que se formulan para una administración sistémica mediante una administración parenteral, por ejemplo, mediante una administración intravenosa (IV). Otro ejemplo comprende composiciones que se formulan para una administración directa en el parénquima de cerebro, por ejemplo, por infusión en el cerebro, tal como mediante infusión con una bomba continua.

Las composiciones farmacéuticas que comprenden los agentes de ARNi de acuerdo con la invención pueden tomar la forma, por ejemplo, de soluciones, que pueden comprender o no amortiguadores, o de composiciones que comprenden vehículos farmacéuticamente aceptables. A modo de ejemplo, estas composiciones pueden ser composiciones acuosas o cristalinas, formulaciones liposomales, formulaciones micelares, emulsiones o vectores apropiados para la terapia génica.

En los métodos de la invención, el agente de ARNi se puede administrar en una solución. Un agente de ARNi libre se puede administrar en una solución no amortiguada, por ejemplo, en una solución salina o en agua. Como alternativa, el ARNpi libre también se puede administrar en una solución

amortiguadora adecuada. La solución amortiguadora puede comprender acetato, citrato, prolamina, carbonato o fosfato, o cualquier combinación de los mismos. En una forma de realización preferida, la solución amortiguadora es una solución amortiguadora salina fosfato (PBS). Se puede ajustar el pH y la osmolaridad de la solución amortiguadora que contiene al agente de ARNi de modo tal que sean adecuados para la administración a un sujeto.

En algunas formas de realización, la solución amortiguadora también comprende un agente que es apropiado para controlar su osmolaridad en un valor deseado, por ejemplo, en el valor que puede presentar el plasma humano bajo condiciones fisiológicas. Los solutos que se pueden agregar a la solución amortiguadora para controlar la osmolaridad incluyen, en un sentido no taxativo, proteínas, péptidos, aminoácidos, polímeros que no pueden ser metabolizados, vitaminas, iones, azúcares, metabolitos, ácidos orgánicos, lípidos y sales. En algunas formas de realización, el agente apropiado para controlar la osmolaridad de la solución es una sal. En determinadas formas de realización, el agente para controlar la osmolaridad de la solución es cloruro de sodio o cloruro de potasio.

Las composiciones farmacéuticas de la invención se pueden administrar en dosificaciones suficientes como para inhibir la expresión de un gen Serpina1. En general, una dosis adecuada de un ARNi de la invención se encontrará en el rango de entre aproximadamente 0,001 y aproximadamente 200,0 miligramos por kilogramo de peso corporal del receptor por día, en general en el rango de entre aproximadamente 1 y 50 mg por kilogramo de peso corporal por día. Por ejemplo, el ARNhd se puede administrar a razón de aproximadamente 0,01 mg/kg, aproximadamente 0,05 mg/kg,

aproximadamente 0,5 mg/kg, aproximadamente 1 mg/kg, aproximadamente 1,5 mg/kg, aproximadamente 2 mg/kg, aproximadamente 3 mg/kg, aproximadamente 10 mg/kg, aproximadamente 20 mg/kg, aproximadamente 30 mg/kg, aproximadamente 40 mg/kg o aproximadamente 50 mg/kg por dosis individual.

La composición farmacéutica se puede administrar una vez por día o el ARNi se puede administrar como dos, tres o más subdosis a intervalos apropiados durante el día o aún usando una infusión continua o administración mediante una formulación de liberación controlada. En tal caso, el ARNi contenido en cada subdosis debe ser correspondientemente menor con el fin de obtener la dosificación diaria total. La unidad de dosificación también se puede adaptar para su administración sobre varios días, por ejemplo, usando una formulación de liberación sostenida convencional que provee una liberación sostenida del ARNi sobre un período de varios días. Las formulaciones de liberación sostenida son bien conocidas en el arte y son de particular utilidad para la administración de agentes en un sitio particular, tal como el caso de los agentes de la presente invención. En esta forma de realización, la unidad de dosificación contiene un múltiplo correspondiente de la dosis diaria.

En otras formas de realización, una sola dosis de las composiciones farmacéuticas puede ser de duración prolongada, de manera tal que las dosis subsiguientes se administran a intervalos de no más de 3, 4 ó 5 días, o a intervalos de no más de 1, 2, 3 ó 4 semanas. En algunas formas de realización de la invención, la dosis individual de las composiciones farmacéuticas de la invención se administra una vez por semana. En otras formas de realización

de la invención, la dosis individual de las composiciones farmacéuticas de la invención se administra bimestralmente.

El especialista podrá apreciar que existen determinados factores que pueden afectar la dosificación y el tiempo requeridos para tratar efectivamente a un sujeto, incluyendo pero en un sentido no taxativo la severidad de la enfermedad o el trastorno, tratamientos anteriores, el estado de salud general y/o la edad del sujeto, y la presencia de otras enfermedades. Aún más, el tratamiento de un sujeto con una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición puede incluir un tratamiento único o una serie de tratamientos. Se pueden efectuar estimaciones de las dosificaciones efectivas y la vida media *in vivo* para los ARNi individuales comprendidos por la invención usando metodologías convencional o sobre la base de pruebas *in vivo* usando un modelo en animales apropiado, según se describe en otra parte en la presente.

Los avances en la genética de ratones han generado numerosos modelos en ratón para el estudio de diversas enfermedades humanas, tal como un trastorno hepático, que pudieran verse beneficiadas con la reducción en la expresión de Serpina1. Dichos modelos se pueden usar para evaluar el ARNi *in vivo*, así como para determinar la dosis terapéuticamente eficaz. En el arte se conocen numerosos modelos basados en el ratón, entre los que pueden mencionarse los ratones que comprenden transgenes apropiados para expresar la Serpina1 humana.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden administrar de numerosas maneras dependiendo de si se desea un tratamiento local o sistémico y del área a tratar. La administración puede ser tópica (por ejemplo, mediante un parche transdérmico), pulmonar, por ejemplo, por

inhalación o insuflación de polvos o aerosoles, incluyendo con un nebulizador; intratraqueal, intranasal, epidérmica y transdérmica, oral o parenteral. La administración parenteral incluye una administración intravenosa, intraarterial, subcutánea, intraperitoneal intramuscular o por inyección o infusión; subdérmica, por ejemplo, por medio de un dispositivo implantado; o intracraneal, por ejemplo, por administración intraparenquimática, intratecal o intraventricular. El ARNi se puede administrar de una manera tal que permita tratar un tejido particular, tal como el hígado (por ejemplo, los hepatocitos del hígado).

Las composiciones y las formulaciones farmacéuticas para una administración tópica pueden incluir parches transdérmicos, ungüentos, lociones, cremas, geles, gotas, supositorios, rocíos, líquidos y polvos. Puede ser necesario o deseable emplear vehículos farmacéuticos convencionales, bases acuosas, en polvo u oleosas, espesantes y semejantes. También pueden ser útiles los condones y los guantes recubiertos, y semejantes. Las formulaciones tópicas adecuadas incluyen aquellas en donde los ARNi presentados en la invención se encuentran en una mezcla con un agente de administración tópica tales como lípidos, liposomas, ácidos grasos, ésteres de ácidos grasos, esteroides, agentes quelantes y agentes tensioactivos. Se consideran adecuados los lípidos y liposomas neutros (por ejemplo, dioleoilfosfatidilo DOPE etanolamina, dimiristoilfosfatidilcolina DMPC, diestearoilfosfatidilcolina), negativos (por ejemplo, dimiristoilfosfatidilglicerol DMPG) y catiónicos (por ejemplo, dioleoiltetrametilaminopropilo DOTAP y dioleoilfosfatidiletanolamina DOTMA). Los ARNi presentados en la invención se puede encapsular en liposomas o pueden formar complejos con los mismos, en

particular con los liposomas catiónicos. Como alternativa, los ARNi se pueden acomplejar con lípidos, en particular con lípidos catiónicos. Los ácidos grasos y ésteres adecuados incluyen, pero en un sentido no taxativo, ácido araquidónico, ácido oleico, ácido eicosanoico, ácido láurico, ácido caprílico, ácido cáprico, ácido mirístico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido linoleico, ácido linolénico, dicaprato, tricaprato, monooleína, dilaurina, 1-monocaprato de glicerilo, 1-dodecilazaciclohéptan-2-ona, una acilcarnitina, una acilcolina o un C_{1-20} alquil éster (por ejemplo, isopropilmiristato IPM), monoglicérido, diglicérido o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos). Las formulaciones tópicas se describen con detalle en la Patente de los EE.UU. Nº: 6.747.014, que se incorpora en la presente a modo de referencia.

A. Formulaciones de ARNi que comprenden ensamblajes moleculares membranosos

El ARNi de utilidad en las composiciones y los métodos de la invención se puede formular para su administración en un ensamblaje molecular membranoso, por ejemplo, un liposoma o una micela. Según se usa en la presente, el término “liposoma” se refiere a una vesícula compuesta por lípidos anfifílicos dispuestos en por lo menos una bicapa, por ejemplo, una bicapa o una pluralidad de bicapas. Los liposomas incluyen vesículas unilamelares y multilamelares que poseen una membrana formada a partir de un material lipofílico y un interior acuoso. La porción acuosa contiene a la composición de ARNi. El material lipofílico aísla al interior acuoso de un exterior acuoso, que típicamente no incluye a la composición de ARNi, aunque en algunos ejemplos de hecho puede hacerlo. Los liposomas son de utilidad para la transferencia y administración de ingredientes activos en el sitio de acción. Dado que la

membrana liposómica es estructuralmente similar a las membranas biológicas, cuando los liposomas se aplican a un tejido, la bicapa liposómica se funde con la bicapa de las membranas celulares. A medida que avanza la fusión del liposoma y la célula, el contenido acuoso interno que incluye al ARNi es suministrado en la célula, donde el ARNi se puede unir específicamente a un ARN blanco y puede mediar al ARNi. En algunos casos los liposomas también se emplean específicamente, por ejemplo, para dirigir el ARNi hacia tipos celulares particulares.

El liposoma que contiene un agente de ARNi se puede preparar mediante una variedad de métodos. En un ejemplo, el componente lipídico del liposoma se disuelve en un detergente de modo tal que se forman micelas con el componente lipídico. Por ejemplo, el componente lipídico puede ser un lípido catiónico anfipático o un conjugado de lípidos. El detergente puede tener una concentración alta crítica de micelas y puede ser no iónico. Los ejemplos de detergentes incluyen colato, CHAPS, octilglucósido, desoxicolato y lauroil sarcosina. La preparación del agente de ARNi se agrega luego a las micelas que incluyen al componente lipídico. Los grupos catiónicos en el lípido interactúan con el agente de ARNi y se condensan alrededor del agente de ARNi para formar un liposoma. Después de la condensación, se elimina el detergente, por ejemplo, mediante diálisis, para obtener una preparación liposómica de un agente de ARNi.

Si fuera necesario se puede agregar un compuesto de vehículo que ayude en la condensación durante la reacción de condensación, por ejemplo, mediante una adición controlada. Por ejemplo, el compuesto de vehículo puede ser un polímero distinto de un ácido nucleico (por ejemplo, espermina o

espermidina). También se puede ajustar el pH para favorecer la condensación.

Los métodos para producir vehículos estables para la administración de polinucleótidos, que incorporan un complejo de polinucleótido/lípido catiónico como componentes estructurales del vehículo de administración, se describen además, por ejemplo, en WO 96/37194, cuyos contenidos completos se incorporan en la presente a modo de referencia. La formación de los liposomas también puede incluir uno o más aspectos de los ejemplos de métodos que se describen en Felgner, P. L. *et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 8: 7413-7417, 1987; en la Patente de los EE.UU. N°: 4,897,355; en la Patente de los EE.UU. N°: 5,171,678; Bangham, *et al., M. Mol. Biol*. 23: 238, 1965; Olson, *et al., Biochim. Biophys. Acta* 557: 9, 1979; Szoka, *et al., Proc. Natl. Acad. Sci*. 75: 4194, 1978; Mayhew, et al., *Biochim. Biophys. Acta* 775: 169, 1984; Kim, *et al., Biochim. Biophys. Acta* 728: 339, 1983; y Fukunaga, *et al., Endocrinol.,* 115: 757, 1984. 115:757, 1984. Las técnicas usadas comúnmente para preparar agregados de lípido del tamaño apropiado para su uso como vehículos de administración incluyen sonicación y congelamiento-descongelamiento más extrusión (véase, por ejemplo, Mayer, *et al., Biochim. Biophys. Acta* 858: 161, 1986). Se puede usar microfluidización cuando se desea obtener agregados consistentemente pequeños (50 a 200 nm) y relativamente uniformes (Mayhew, *et al., Biochim. Biophys. Acta* 775: 169, 1984). Estos métodos se adaptan fácilmente al empaquetamiento de las preparaciones del agente de ARNi en liposomas.

Los liposomas se dividen en dos grandes clases. Los liposomas catiónicos son liposomas de carga positiva que interactúan con las moléculas de ácidos nucleicos de carga negativa para formar un complejo estable. El

complejo de ácido nucleico/liposoma de carga positiva se une a la superficie celular de carga negativa y es internalizado en un endosoma. Debido al pH ácido dentro del endosoma, los liposomas se rompen liberando así su contenido hacia el citoplasma de la célula (Wang *et al*., *Biochem. Biophys. Res., Commun*., 1987, 147, 980-985).

Los liposomas que son sensibles al pH o de carga negativa, en realidad atrapan a los ácidos nucleicos en lugar de formar complejos con ellos. Dado que tanto el ácido nucleico como el lípido son carga similar, se produce una repulsión en lugar de formación de complejos. Sin embargo, parte de los ácidos nucleicos queda atrapada en el interior acuoso de estos liposomas. Los liposomas sensibles al pH se han usado para administrar ácidos nucleicos que codifican al gen de la timidina quinasa en monocapas celulares en cultivo. La expresión del gen exógeno se detectó en las células blanco (Zhou *et al*., *Journal of Controlled Release*, 1992, 19, 269-274).

Un tipo importante de composición liposómica incluye fosfolípidos distintos de la fosfatidilcolina natural. Las composiciones de liposomas neutros, por ejemplo, se pueden formar a partir de dimiristoil fosfatidilcolina (DMPC) o dipalmitoil fosfatidilcolina (DPPC). Las composiciones de liposomas aniónicos generalmente se forman a partir de dimiristoil fosfatidilglicerol, en tanto los liposomas aniónicos fusogénicos se forman primariamente a partir de dioleoil fosfatidiletanolamina (DOPE). Otro tipo de composición liposómica 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.

Los ejemplos de otros métodos para introducir liposomas en células *in*

vitro e *in vivo* se describen en la Patente de los EE.UU. N°: 5.283.185; la Patente de los EE.UU. N°: 5.171.678; WO 94/00569; WO 93/24640; WO 91/16024; Felgner, *J. Biol. Chem.* 269: 2550, 1994; Nabel, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90: 11307, 1993; Nabel, *Humano Gene Ther.,* 3: 649, 1992; Gershon, *Biochem*., 32: 7143, 1993; y Strauss *EMBO J.,* 11: 417, 1992.

También se han examinado sistemas liposómicos no iónicos para determinar su utilidad en la administración de drogas sobre la piel, en particular sistemas que comprenden un tensioactivo no iónico y colesterol. Las formulaciones liposómicas no iónicas que comprenden Novasome™ I (dilaurato de glicerilo/colesterol/polioxietilen-10-estearil éter) y Novasome™ II (diestearato de glicerilo/colesterol/polioxietilen-10-estearil éter) se usaron para administrar ciclosporina-A en la dermis de la piel de ratón. Los resultados indicaron que dichos sistemas liposómicos no iónicos eran efectivos para facilitar la deposición de la ciclosporina A en las 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, según se usa en la presente, se refiere a liposomas que comprenden uno o más lípidos especializados que, cuando se incorporan en los liposomas, dan como resultado un aumento de la vida media en circulación con relación a los liposomas que no contienen dichos lípidos especializados. Los ejemplos de liposomas estéricamente estabilizados son aquellos en los cuales parte de la porción de lípido formadora vesículas del liposoma (A) comprende uno o más glucolípidos, tal como monosialoganglósido G_{M1}, o (B) se derivatiza con uno o más polímeros hidrofílicos, tal como una porción de polietilenglicol (PEG). Sin considerar

ninguna teoría particular, se cree en el arte que, al menos para los liposomas estéricamente estabilizados que contienen gangliósidos, esfingomielina o lípidos derivatizados con PEG, la mayor vida media en circulación de estos liposomas estéricamente estabilizados deriva de una menor captación por las células del sistema reticuloendotelial (RES) (Allen *et al*., *FEBS Letters*, 1987, 223, 42; Wu *et al*., *Cancer Research*, 1993, 53, 3765).

En el arte se conocen diversos liposomas que comprenden uno o más glucolípidos. Papahadjopoulos *et al.,* (*Ann. N.Y. Acad. Sci*., 1987, 507, 64) informaron de la capacidad del monosialoganglósido G_{M1}, sulfato de galactocerebrósido y fosfatidilinositol para mejorar la vida media en sangre de los liposomas. Estos hallazgos fueron abordados por Gabizon *et al.,* (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*., 1988, 85, 6949). En la Patente de los EEUU N°: 4.837.028 y en WO 88/04924, ambas de Allen *et al*., se divulgan liposomas que comprenden (1) esfingomielina y (2) el ganglósido G_{M1} o un éster del sulfato de galactocerebrósido. En la Patente de los EE.UU. N°: 5.543.152 (Webb *et al*.) se divulgan liposomas que comprenden esfingomielina. Los liposomas que comprende 1,2-sn-dimiristoilfosfatidilcolina se divulgan en WO 97/13499 (Lim *et al*).

En una forma de realización, se usan liposomas catiónicos. Los liposomas catiónicos presentan la ventaja de poder fusionarse con la membrana celular. Los liposomas no catiónicos, si bien no se pueden fusionar tan eficientemente con la membrana plasmática, son captados por los macrófagos *in vivo* y se pueden usar para administrar los agentes de ARNi a los macrófagos.

Otras ventajas de los liposomas incluyen: los liposomas obtenidos de

fosfolípidos naturales son biocompatibles y biodegradables; los liposomas pueden incorporar un amplio rango de drogas solubles en agua y lípidos; los liposomas pueden proteger a los agentes de ARNi encapsulados en sus compartimentos internos contra el metabolismo y la degradación (Rosoff, en "*Pharmaceutical Dosage Forms*", Lieberman, Rieger y Banker (Eds.), 1988, volumen 1, página 245). Las consideraciones más importantes en la preparación de formulaciones de liposomas son la carga en la superficie del lípido, el tamaño de la vesícula y el volumen acuoso de los liposomas.

Se puede usar el lípido catiónico sintético de carga positiva, cloruro de N-[1-(2,3-dioleiloxi)propil]-N,N,N-trimetilamonio (DOTMA) para formar liposomas pequeños que interactúan espontáneamente con el ácido nucleico para formar complejos de lípido-ácido nucleico que tienen la capacidad de fusionarse con los lípidos de carga negativa de las membranas celulares de células en cultivo tisular, lo que resulta en la administración del agente de ARNi (véase, por ejemplo, Felgner, P.L. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 8: 7413-7417, 1987 y la Patente de los EEUU N°: 4.897.355 por una descripción de DOTMA y su uso con ADN).

Se puede usar un análogo de DOTMA, 1,2-bi(oleoiloxi)-3-(trimetilamonio)propano (DOTAP), en combinación con un fosfolípido para formar vesículas que forman complejos con ADN. El producto Lipofectin™ Bethesda Research Laboratories, Gaithersburg, Md.) es un agente efectivo para la administración de ácidos nucleicos altamente aniónicos a células vivas de cultivos de tejidos, que comprende liposomas de DOTMA cargados positivamente que interactúan espontáneamente con los polinucleótidos cargados negativamente para formar complejos. Cuando se usan suficientes

liposomas de carga positiva, la carga neta sobre los complejos resultantes también es positiva. Los complejos de carga positiva preparados de esta manera se unen espontáneamente a las superficies celulares de carga negativa, se fusionan con la membrana plasmática y suministran eficazmente a los ácidos nucleicos funcionales, por ejemplo, en las células en cultivo tisular. Otro lípido catiónico disponible comercialmente, 1,2-bi(oleoiloxi)-3,3-(trimetilamonio)propano ("DOTAP") (Boehringer Mannheim, Indianápolis, Indiana) difiere de DOTMA en que las porciones oleoílo están unidas por un éster, en lugar de enlaces éter.

Otros compuestos de lípidos catiónicos informados incluyen aquellos que fueron conjugados a una variedad de grupos incluyendo, por ejemplo, carboxiespermina que fue conjugado a uno de dos tipos de lípidos e incluye compuestos tales como 5-carboxiespermilglicina dioctaoleoilamida ("DOGS") (Transfectam™, Promega, Madison, Wisconsin) y dipalmitoilfosfatidiletanolamina 5-carboxiespermil-amida ("DPPES") (véase, por ejemplo, la Patente de los EEUU N°: 5.171.678).

Otro lípido catiónico conjugado incluye derivatización del lípido con colesterol ("DC-Col") que se ha formulado en los liposomas en combinación con DOPE (Véase, Gao, X. y Huang, L., *Biochim. Biophys. Res. Commun*., 179: 280, 1991). Se ha informado que la lipopolilisina, elaborada por conjugación de polilisina con DOPE, es efectiva para la transfección en la presencia de suero (Zhou, X. et al., *Biochim. Biophys. Acta* 1065: 8, 1991). En determinadas líneas celulares, estos liposomas que contienen lípidos catiónicos conjugados exhiben una menor toxicidad y provee una transfección más eficiente que las composiciones que contienen DOTMA. Otros productos

de lípidos catiónicos disponibles comercialmente incluyen DMRIE y DMRIE-HP (Vical, La Jolla, California) y Lipofectamina (DOSPA) (Life Technology, Inc., Gaithersburg, Maryland). Otros lípidos catiónicos adecuados para la administración de oligonucleótidos se describen en WO 98/39359 y WO 96/37194.

Las formulaciones liposómicas son particularmente adecuadas para la administración tópica, ya que los liposomas presentan diversas ventajas ante otras formulaciones. Dichas ventajas incluyen menos efectos secundarios relacionados con una elevada absorción sistémica de la droga administrada, una mayor acumulación de la droga administrada en el blanco deseado y la capacidad para administrar al agente de ARNi en la piel. En algunas implementaciones, los liposomas se usan para administrar al agente de ARNi en células epidérmicas y también para mejorar la penetración del agente de ARNi en los tejidos dérmicos, por ejemplo, en la piel. Por ejemplo, los liposomas se pueden aplicar de manera tópica. Se ha documentado la administración tópica de drogas formuladas como liposomas en la piel (véase, por ejemplo, Weiner *et al., Journal of Drug Targeting,* 1992, vol. 2,405-410 y du Plessis *et al., Antiviral Research*, 18, 1992, 259-265; Mannino, R. J. y Fould-Fogerite, S., *Biotechniques* 6: 682-690, 1988; Itani, T. *et al., Gene* 56: 267-276. 1987; Nicolau, C. *et al., Meth. Enz.* 149: 157-176, 1987; Straubinger, R. M. y Papahadjopoulos, D. *Meth. Enz*. 101: 512-527, 1983; Wang, C. Y. y Huang, L., P*roc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 7851-7855, 1987).

También se han examinado sistemas liposómicos no iónicos para determinar su utilidad en la administración de drogas sobre la piel, en particular sistemas que comprenden un tensioactivo no iónico y colesterol. Las

formulaciones liposómicas no iónicas que comprenden Novasome I (dilaurato de glicerilo/colesterol/polioxietilen-10-estearil éter) y Novasome II (diestearato de glicerilo/colesterol/polioxietilen-10-estearil éter) se usaron para administrar una droga en la dermis de la piel de ratón. Dichas formulaciones con un agente de ARNi son de utilidad para tratar un trastorno dermatológico.

Los liposomas que incluyen ARNi pueden elaborarse para que sean altamente deformables. Dicha deformabilidad permite a los liposomas penetrar poros que son menores que el radio promedio del liposoma. Por ejemplo, los transfersomas son un tipo de liposoma deformable. Los transferosomas se pueden elaborar por adición de activadores de los bordes de las superficies, habitualmente agentes tensioactivos, a una composición liposómica estándar. Los transferosomas que incluyen un agente de ARNi se pueden administrar, por ejemplo, por vía subcutánea por infección con el fin de suministrar el agente de ARNi en los queratinocitos en la piel. Para poder atravesar la piel intacta de mamífero, las vesículas de lípidos deben pasar por una serie de poros finos, cada uno con un diámetro menor que 50 nm, bajo el efecto de un gradiente transdérmico adecuado. Además, debido a las propiedades del lípido, estos transferosomas se pueden auto-optimizar (adaptándose a la forma de los poros, por ejemplo, en la piel), auto-reparar y con frecuencia pueden alcanzar a sus blancos sin fragmentarse y a menudo se pueden auto-cargar.

Otras formulaciones adecuadas para la presente invención se describen en las Solicitudes de Patente Provisional de los EE.UU. N°: 61/018.616, presentada el 2 de enero, 2008; 61/018.611, presentada el 2 de enero, 2008; 61/039.748, presentada el 26 de marzo, 2008; 61/047.087, presentada el 22 de abril, 2008 y 61/051.528, presentada el 8 de mayo, 2008.En la Solicitud PCT

N°: PCT/US2007/080331, presentada el 3 de octubre, 2007, también se describen formulaciones que se pueden aplicar en la presente invención.

Los transfersomas constituyen aún otro tipo de liposoma, y son agregados de lípidos altamente deformables que son candidatos atractivos como vehículos para la administración de drogas. Los transfersomas se pueden describir como gotas de lípidos que son tan deformables que pueden penetrar fácilmente los poros que son menores que la gota. Los transfersomas son adaptables al entorno en el cual se utilizan, por ejemplo, son auto-optimizantes (se adaptan a la forma de los poros en la piel), auto-reparadoras, con frecuencia alcanzan a sus blancos sin fragmentarse y a menudo se pueden auto-cargar. Para elaborar los transfersomas se pueden agregar activadores de los bordes de las superficies, habitualmente agentes tensioactivos, a una composición liposómica estándar. Los transfersomas se han usado para administrar albúmina de suero en la piel. Se ha mostrado que la administración mediada por transfersomas de albúmina de suero es tan efectiva como la inyección subcutánea de una solución que contiene albúmina de suero.

Los agentes tensioactivos son de amplia aplicación en formulaciones tales como emulsiones (incluyendo microemulsiones) y liposomas. La manera más común de clasificar y categorizar las propiedades de los numerosos tipos diferentes de agentes tensioactivos, tanto naturales como sintéticos, comprende emplear el balance hidrófilo/lipófilo (HLB). La naturaleza del grupo hidrofílico (también conocido como la "cabeza") proporciona el medio de mayor utilidad para clasificar los diferentes agentes tensioactivos usados en las formulaciones (Rieger, en *Pharmaceutical Dosage Forms*, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y., 1988, página 285).

Si la molécula de agente tensioactivo no está ionizada, se clasifica como un agente tensioactivo no iónico. Los agentes tensioactivos no iónicos son de amplia aplicación en los productos farmacéuticos y cosméticos y se pueden utilizar sobre un amplio rango de valores de pH. En general, sus valores de HLB varían en un rango de entre 2 y 18 aproximadamente, dependiendo de su estructura. Los agentes tensioactivos no iónicos incluyen ésteres no iónicos tales como ésteres de etilenglicol, ésteres de propilenglicol, ésteres de glicerilo, ésteres de poliglicerilo, ésteres de sorbitán, ésteres de sacarosa y ésteres etoxilados. Las alcanolamidas y los éteres no iónicos, tales como etoxilatos de alcoholes grasos, alcoholes propoxilados y polímeros de bloques etoxilados/propoxilados, también están incluidos en esta clase. Los agentes tensioactivos de polioxietileno son los miembros más populares de la clase de agentes tensioactivos no iónicos.

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

Si la molécula de agente tensioactivo tiene carga positiva cuando se disuelve o dispersa en agua, el agente tensioactivo se clasifica como catiónico. Los agentes 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 agente tensioactivo tienen la capacidad para llevar una positiva o una carga negativa, el agente tensioactivo se clasifica como anfotérico. Los agentes tensioactivos anfotéricos incluyen derivados de ácido acrílico, alquilamidas sustituidas, N-alquilbetaínas y fosfátidos.

Se ha revisado el uso de agentes tensioactivos en fármacos, formulaciones y en emulsiones (Rieger, en *Pharmaceutical Dosage Forms*, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y., 1988, página 285).

El ARNi para su uso en los métodos de la invención también se puede proveer como formulaciones micelares. Las “micelas” se definen en la presente como un tipo particular de ensamblaje molecular en el cual se disponen moléculas anfipáticas en una estructura esférica de manera tal que todas las porciones hidrofóbicas de las moléculas están dirigidas hacia dentro, dejando las porciones hidrofílicas en contacto con la fase acuosa circundante. Si el entorno es hidrofóbico hay una disposición inversa.

Una formulación micelar mixta adecuada para su administración a través de las membranas transdérmicas se pueden preparar mezclando una solución acuosa de la composición de ARNsi, un C_8 a C_{22} alquilsulfato de un metal alcalino y un compuesto formador de micelas. Los ejemplos de compuestos formadores de micelas incluyen lecitina, ácido hialurónico, sales farmacéuticamente aceptables del ácido hialurónico, ácido glicólico, ácido láctico, extracto de manzanilla, extracto de pepino, ácido oleico, ácido linoleico, ácido linolénico, monooleína, monooleatos, monolauratos, aceite de borraja, aceite de prímula, mentol, trihidroxi oxo colanil glicina y sales farmacéuticamente aceptables de la misma, glicerina, poliglicerina, lisina,

polilisina, trioleína, polioxietilen éteres y análogos de los mismos, polidecanol alquil éteres y análogos de los mismos, quenodesoxicolato, desoxicolato y mezclas de los mismos. Los compuestos formadores de micelas se pueden agregar al mismo tiempo o después de la adición del alquilsulfato de metal alcalino. Las micelas mixtas se formarán con sustancialmente cualquier tipo de mezclado de los ingredientes pero un mezclado vigoroso proporcionará micelas de menor tamaño.

En un método, se prepara una primera composición micelar que contiene a la composición de ARNsi y al menos al alquilsulfato de un metal alcalino. La primera composición micelar se mezcla luego con al menos tres compuestos formadores de micelas para formar una composición micelar mixta. En otro método, la composición micelar se prepara mezclando la composición de ARNsi, el alquilsulfato de metal alcalino y al menos uno de los compuestos formadores de micelas, seguido por adición de los compuestos formadores de micelas remanentes, bajo mezclado vigoroso.

Se puede agregar fenol y/o m-cresol a la composición micelar mixta para estabilizar a la formulación y protegerla contra el crecimiento bacteriano. Como alternativa, se puede agregar fenol y/o m-cresol con los ingredientes formadores de micelas. También se puede agregar un agente isotónico, tal como glicerina, después de la formación de la composición micelar mixta.

Para la administración de la formulación micelar como un aerosol, la formulación se puede introducir en un recipiente de aerosol y luego se carga el recipiente con un propelente. El propelente, que se encuentra bajo presión, se encuentra en forma líquida en el recipiente. Las relaciones de los ingredientes se ajustan de manera tal que las fases acuoso y de propelente se convierten en

uno, es decir, hay una fase. Si hay dos fases, es necesario agitar el recipiente antes de administrar una porción del contenido, por ejemplo, mediante una válvula dosificadora. La dosis administrada del agente farmacéutico es impulsada con la válvula dosificadora como un rocío fino.

Los propelentes pueden incluir clorofluorocarburos que contienen hidrógeno, fluorocarburos que contienen hidrógeno, dimetil éter y dietil éter. En determinadas formas de realización, se puede usar HFA 134a (1,1,1,2-tetrafluoroetano).

Las concentraciones específicas de los ingredientes esenciales se pueden determinar mediante una experimentación relativamente sencilla. Para la absorción por las cavidades orales, a menudo resulta deseable aumentar, por ejemplo, al menos dos o tres veces, la dosificación mediante inyección o administración por el tracto gastrointestinal.

A. Partículas de lípidos

Los agentes de ARNi de acuerdo con la invención, por ejemplo un ARNhd, se pueden encapsular por completo en una formulación lipídica, por ejemplo, en una LNP o en otra partícula compuesta por lípidos y ácidos nucleicos.

Según se emplea en la presente, el término “LNP” hace referencia a una partícula estable que comprende lípidos y ácidos nucleicos. En particular, las LNP comprenden un lípido catiónico, un lípido no catiónico y un lípido útil para inhibir la agregación de las partículas (por ejemplo, un conjugado de PEG y un lípido). Las LNP son extremadamente útiles para las aplicaciones sistémicas, ya que se caracterizan por una vida media considerablemente prolongada después de una inyección intravenosa y pueden acumularse en sitios distantes

(por ejemplo, en sitios físicamente apartados del sitio donde efectúa la administración). Las LNP incluyen las "pSPLP", que incluyen un complejo de agente de condensación-ácido nucleico encapsulado descrito en la publicación PCT N°: WO 00/03683. La partículas de la presente invención típicamente tienen un diámetro promedio de entre aproximadamente 50 nm y aproximadamente 150 nm, más típicamente entre aproximadamente 60 nm y aproximadamente 0 nm, más típicamente entre aproximadamente 70 nm y aproximadamente 110 nm, más típicamente aún entre aproximadamente 70 nm y aproximadamente 90 nm, y son sustancialmente no tóxicas. Además, los ácidos nucleicos, cuando están presentes en las partículas de ácido nucleico-lípidos de la presente invención, son resistentes en solución acuosa a la degradación con una nucleasa. Las partículas de ácido nucleico-lípido y su método de preparación se divulgan, por ejemplo, en la Patente de los EEUU N°: 5.976.567; 5.981.501; 6.534.484; 6.586.410; 6.815.432; la publicación de Patente de los EEUU N°: 2010/0324120 y la publicación PCT N°: WO 96/40964.

En una forma de realización, la relación de lípido a droga (relación masa/masa) (por ejemplo, la relación de lípido a ARNhd) se encuentra en el rango de entre aproximadamente 1:1 y aproximadamente 50:1, entre aproximadamente 1:1 y aproximadamente 25:1, entre aproximadamente 3:1 y aproximadamente 15:1, entre aproximadamente 4:1 y aproximadamente 10:1, entre aproximadamente 5:1 y aproximadamente 9:1 o entre aproximadamente 6:1 y aproximadamente 9:1.Los rangos intermedios de los rangos indicados previamente también se contemplan como parte de esta invención.

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-dioleiloxi)propil)-N,N,N-trimetilamonio (DOTMA), N,N-dimetil-2,3-dioleiloxi)propilamina (DODMA), 1,2-dilinoleiloxi-N,N-dimetilaminopropano (DLinDMA), 1,2-dilinoleniloxi-N,N-dimetilaminopropano (DLenDMA), 1,2-dilinoleilcarbamoiloxi-3-dimetilaminopropano (DLin-C-DAP), 1,2-dilinoleiloxi-3-(dimetilamino)acetoxipropano (DLin-DAC), 1,2-dilinoleiloxi-3-morfolinpropano (DLin-MA), 1,2-dilinoleoil-3-dimetilaminopropano (DLinDAP), 1,2-dilinoleiltio-3-dimetilaminopropano (DLin-S-DMA), 1-linoleoil-2-linoleiloxi-3-dimetilaminopropano (DLin-2-DMAP), sal de cloruro de 1,2-dilinoleiloxi-3-trimetilaminopropano (DLin-TMA.Cl), sal de cloruro de 1,2-dilinoleoil-3-trimetilaminopropano (DLin-TAP.Cl), 1,2-dilinoleiloxi-3-(N-metilpiperazin)propano (DLin-MPZ) o 3-(N,N-dilinoleilamino)-1,2-propandiol (DLinAP), 3-(N,N-dioleilamino)-1,2-propandiol (DOAP), 1,2-dilinoleiloxo-3-(2-N,N-dimetilamino)etoxipropano (DLin-EG-DMA), 1,2-dilinoleniloxi-N,N-dimetilaminopropano (DLinDMA), 2,2-dilinoleil-4-dimetilaminometil-[1,3]-dioxolano (DLin-K-DMA) o análogos de los mismos, (3aR,5s,6aS)-N,N-dimetil-2,2-di((9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienil)tetrahidro-3aH-ciclopenta[d][1,3]dioxol-5-amina (ALN100), 4-(dimetilamino)butanoato de (6Z,9Z,28Z,31Z)-heptatriaconta-6,9,28,31-tetraen-19-ilo (MC3), 1,1'-(2-(4-(2-((2-(bi(2-hidroxidodecil)amino)etil)(2-hidroxidodecil)amino)etil)piperazin-1-il)etilazandiil)didodecan-2-ol (Tech G1) o una mezcla de los mismos. El lípido catiónico puede comprender entre aproximadamente 20% mol y aproximadamente 50% mol o aproximadamente 40% mol de los lípidos totales presentes en la partícula.

En otra forma de realización, se puede usar el compuesto 2,2-dilinoleil-4-dimetilaminoetil-[1,3]-dioxolano para preparar nanopartículas de lípido-ARNsi. La síntesis de 2,2-dilinoleil-4-dimetilaminoetil-[1,3]-dioxolano se describe en la Solicitud de Patente de los EEUU N°: 61/107.998 presentada el 23 de octubre, 2008, que se incorpora en la presente a modo de referencia.

En una forma de realización, la partícula de lípido-ARNsi incluye un 40% de 2,2-dilinoleil-4-dimetilaminoetil-[1,3]-dioxolano: 10% de DSPC: 40% de colesterol: 10% de PEG-C-DOMG (por ciento molar) con un tamaño de partícula de 63,0 ± 20 nm y una relación de ARNsi/lípido de 0,027.

El lípido ionizable/no catiónico puede ser un lípido aniónico o un lípido neutro incluyendo, pero en un sentido no taxativo, diestearoilfosfatidilcolina (DSPC), dioleoilfosfatidilcolina (DOPC), dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), dioleoilfosfatidilglicerol (DOPG), dipalmitoilfosfatidilglicerol (DPPG), dioleoil-fosfatidiletanolamina (DOPE), palmitoiloleoilfosfatidilcolina (POPC), palmitoiloleoilfosfatidiletanolamina (POPE), 4-(N-maleimidometil)-ciclohexan-1-carboxilato de dioleoil-fosfatidiletanolamina (DOPE-mal), dipalmitoil fosfatidil etanolamina (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 constituir entre aproximadamente 5% mol y aproximadamente 90% mol, aproximadamente 10% mol o aproximadamente 58% mol si se incluye colesterol, de los lípidos totales presentes en la partícula.

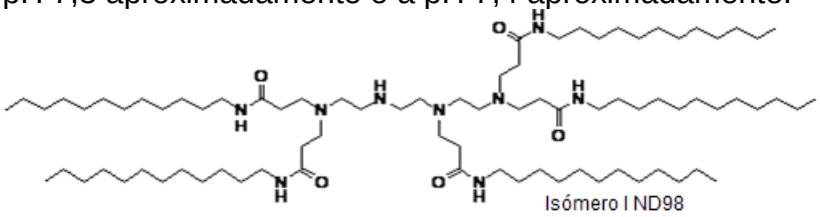
El lípido conjugado que inhibe la agregación de partículas puede ser, por ejemplo, un polietilenglicol (PEG)-lípido incluyendo, en un sentido no taxativo, un PEG-diacilglicerol (DAG), un PEG-dialquiloxipropilo (DAA), un PEG-

fosfolípido, una PEG-ceramida (Cer) o una mezcla de los mismos. El conjugado de PEG-DAA puede ser, por ejemplo, un PEG-dilauriloxipropilo (C_{i2}), un PEG-dimiristiloxipropilo (C_{i4}), un PEG-dipalmitiloxipropilo (C_{i6}) o un PEG-diestheariloxipropilo ($C]_8$). El lípido conjugado que previene la agregación de partículas puede constituir entre 0% mol y aproximadamente 20% mol o aproximadamente un 2% mol de los lípidos totales presentes en la partícula.

En algunas formas de realización, la partícula de ácido nucleico-lípido incluye además colesterol, por ejemplo, entre aproximadamente 10% mol y aproximadamente 60% mol o aproximadamente un 48% mol de los lípidos totales presentes en la partícula.

En una forma de realización, se puede usar el lipoide ND98·4HCl (PM 1487) (véase la Solicitud de Patente de los EE.UU. N°: 12/056.230, presentada el 26/3/2008, que se incorpora en la presente a modo de referencia), colesterol (Sigma-Aldrich) y PEG-ceramida C16 (Avanti Polar Lipids) para preparar las nanopartículas de lípido-ARNhd (es decir, partículas LNP01). Las soluciones madre de cada uno en etanol se pueden preparar de la siguiente manera: ND98, 133 mg/ml; colesterol, 25 mg/ml, PEG-ceramida C16, 100 mg/ml. Las soluciones madre de ND98, colesterol y PEG-ceramida C16 se pueden combinar luego, por ejemplo, a una relación molar de 42:48:10. La solución de lípido combinada se puede mezclar con el ARNhd acuoso (por ejemplo, en acetato de sodio a pH 5) de modo tal que la concentración final de etanol es de aproximadamente un 35-45% y la concentración final de acetato de sodio es de aproximadamente 100-300 mM. Las nanopartículas de lípido-ARNhd típicamente se forman espontáneamente con el mezclado. Según la distribución de tamaño de partículas deseada, la mezcla de nanopartículas

resultante se puede extrudir a través de una membrana de policarbonato (por ejemplo, un valor de corte de 100 nm) usando, por ejemplo, la extrusora de tipo termobarril, tal como Lipex Extruder (Northern Lipids, Inc). En algunos casos, se puede omitir el paso de extrusión. La eliminación de etanol y el intercambio simultáneo de solución amortiguadora se puede llevar a cabo, por ejemplo, mediante diálisis o filtración de flujo tangencial. La solución amortiguadora se puede intercambiar, por ejemplo, por amortiguadora salina fosfato (PBS) a pH 7 aproximadamente, por ejemplo, a pH 6,9 aproximadamente, a pH 7,0 aproximadamente, a pH 7,1 aproximadamente, a pH 7,2 aproximadamente, a pH 7,3 aproximadamente o a pH 7,4 aproximadamente.



Fórmula 1

Las formulaciones de LNP01 se describen, por ejemplo, en la publicación de Solicitud Internacional N°: WO 2008/042973, que se incorpora en la presente a modo de referencia.

En la Tabla A se describen ejemplos adicionales de formulaciones de lípido-ARNhd.

Tabla A.

	Lípido ionizable/catiónico	**lípido catiónico/lípido no catiónico/colesterol/conjugado PEG-lípido Relación de lípido:ARNip**
LNP-1	1,2-dilinoleniloxi-N,N-dimetilaminopropano (DLinDMA)	DLinDMA/DPPC/Colesterol/PEG-cDMA (57.1/7.1/34.4/1.4) lípido:ARNip ~ 7:1

2-XTC	2,2-dilinoleil-4-dimetilaminoetil-[1,3]-dioxolano (XTC)	XTC/DPPC/Colesterol/PEG-cDMA 57.1/7.1/34.4/1.4 lípido:ARNip ~ 7:1
LNP05	2,2-dilinoleil-4-dimetilaminoetil-[1,3]-dioxolano (XTC)	XTC/DSPC/Colesterol/PEG-DMG 57.5/7.5/31.5/3.5 lípido:ARNip ~ 6:1
LNP06	2,2-dilinoleil-4-dimetilaminoetil-[1,3]-dioxolano (XTC)	XTC/DSPC/Colesterol/PEG-DMG 57.5/7.5/31.5/3.5 lípido:ARNip ~ 11:1
LNP07	2,2-dilinoleil-4-dimetilaminoetil-[1,3]-dioxolano (XTC)	XTC/DSPC/Colesterol/PEG-DMG 60/7.5/31/1.5, lípido:ARNip ~ 6:1
LNP08	2,2-dilinoleil-4-dimetilaminoetil-[1,3]-dioxolano (XTC)	XTC/DSPC/Colesterol/PEG-DMG 60/7.5/31/1.5, lípido:ARNip ~ 11:1
LNP09	2,2-dilinoleil-4-dimetilaminoetil-[1,3]-dioxolano (XTC)	XTC/DSPC/Colesterol/PEG-DMG 50/10/38.5/1.5 Lípido:ARNip 10:1
LNP10	(3aR,5s,6aS)-N,N-dimetil-2,2-di((9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienil)tetrahidro-3aH-ciclopenta[d][1,3]dioxol-5-amina (ALN100)	ALN100/DSPC/Colesterol/PEG-DMG 50/10/38.5/1.5 Lípido:ARNip 10:1
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
LNP12	1,1'-(2-(4-(2-((2-(bi(2-hidroxidodecil)amino)etil)(2-hidroxidodecil)amino)etil)piperazin-1-il)etilazandiil)didodecan-2-ol (Tech G1)	Tech G1/DSPC/Colesterol/PEG-DMG 50/10/38.5/1.5 Lípido:ARNip 10:1
LNP13	XTC	XTC/DSPC/Col/PEG-DMG 50/10/38.5/1.5 Lípido:ARNip 33:1
LNP14	MC3	MC3/DSPC/Col/PEG-DMG 40/15/40/5 Lípido:ARNip 11:1

LNP15	MC3	MC3/DSPC/Col/PEG-DSG/GalNAc-PEG-DSG 50/10/35/4.5/0.5 Lípido:ARNip 11:1
LNP16	MC3	MC3/DSPC/Col/PEG-DMG 50/10/38.5/1.5 Lípido:ARNip 7:1
LNP17	MC3	MC3/DSPC/Col/PEG-DSG 50/10/38.5/1.5 Lípido:ARNip 10:1
LNP18	MC3	MC3/DSPC/Col/PEG-DMG 50/10/38.5/1.5 Lípido:ARNip 12:1
LNP19	MC3	MC3/DSPC/Col/PEG-DMG 50/10/35/5 Lípido:ARNip 8:1
LNP20	MC3	MC3/DSPC/Col/PEG-DPG 50/10/38.5/1.5 Lípido:ARNip 10:1
LNP21	C12-200	C12-200/DSPC/Col/PEG-DSG 50/10/38.5/1.5 Lípido:ARNip 7:1
LNP22	XTC	XTC/DSPC/Col/PEG-DSG 50/10/38.5/1.5 Lípido:ARNip 10:1

DSPC: diestearoilfosfatidilcolina

DPPC: dipalmitoilfosfatidilcolina

PEG-DMG: PEG-didimiristoilglicerol (C14-PEG o PEG-C14) (PEG con un peso molecular promedio de 2000)

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

PEG-cDMA: PEG-carbamoil-1,2-dimiristiloxipropilamina (PEG con un peso molecular promedio de 2000)

Las formulaciones que comprenden LNP (1,2-dilinoleniloxi-N,N-dimetilaminopropano (DLinDMA)) se describen en la publicación Internacional N°: WO2009/127060, presentada el 15 de abril, 2009, que se incorpora en la

presente a modo de referencia.

Las formulaciones que comprenden XTC se describen, por ejemplo, en la Patente Provisional de los EE.UU. N° Acta: 61/148,366, presentada el 29 de enero, 2009; la Patente Provisional de los EE.UU. N° Acta: 61/156.851, presentada el 2 de marzo, 2009; la Patente Provisional de los EE.UU. N° Acta: presentada el 10 de junio, 2009; Patente Provisional de los EE.UU. N° Acta: 61/228.373, presentada el 24 de julio, 2009; la Patente Provisional de los EE.UU. N° Acta: 61/239.686, presentada el 3 de septiembre, 2009, y la Solicitud Internacional N°: PCT/US2010/022614, presentada el 29 de enero, 2010, que se incorpora en la presente a modo de referencia.

Las formulaciones que comprenden MC3 se describen, por ejemplo, en la publicación de Patente de los EEUU N°: 2010/0324120, presentada el 10 de junio, 2010, cuyos contenidos completos se incorporan en la presente a modo de referencia.

Las formulaciones que comprenden ALNY-100 se describen, por ejemplo, en la Solicitud de Patente Internacional N°: PCT/US09/63933, presentada el 10 de noviembre, 2009, que se incorpora en la presente a modo de referencia.

Las formulaciones que comprenden C12-200 se describen en la Patente Provisional de los EEUU N° Acta: 61/175.770, presentada el 5 de mayo, 2009, y la Solicitud Internacional N°: PCT/US10/33777, presentada el 5 de mayo, 2010, que se incorpora en la presente a modo de referencia.

Síntesis de lípidos ionizables/catiónicos

Cualquiera de los compuestos, por ejemplo, lípidos catiónicos y semejantes, usado en las partículas de ácido nucleico-lípido de la invención se

pueden preparar mediante técnicas de síntesis orgánica conocidas, incluyendo los métodos descritos con mayor detalle en los Ejemplos. Todos los sustituyentes son como se definen a continuación a menos que se indique de otra manera.

"Alquilo" se refiere a un hidrocarburo alifático saturado, de cadena lineal o ramificada, no cíclico o cíclico, que contiene entre 1 y 24 átomos de carbono. Los alquilos de cadena lineal saturados representativos incluyen metilo, etilo, n-propilo, n-butilo, n-pentilo, n-hexilo, y semejantes; en tanto los alquilos ramificados saturados incluyen isopropilo, sec-butilo, isobutilo, ter-butilo, isopentilo y semejantes. Los alquilos cíclicos saturados representativos incluyen ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo y semejantes; en tanto los alquilos cíclicos insaturados incluyen ciclopentenilo y ciclohexenilo, arilos y semejantes.

"Alquenilo" se refiere a un alquilo, definido previamente, que contiene al menos un enlace doble entre átomos de carbono adyacentes. Los alquenilos incluyen ambos isómeros cis y trans. Los alquenilos de cadena lineal y ramificada representativos incluyen etilenilo, propilenilo, 1-butenilo, 2-butenilo, isobutilenilo, 1-pentenilo, 2-pentenilo, 3-metil-1-butenilo, 2-metil-2-butenilo, 2,3-dimetil-2-butenilo y semejantes.

"Alquinilo" se refiere a cualquier alquilo o alquenilo, definidos previamente, que además contienen al menos un enlace triple entre carbonos adyacentes. Los alquinilos de cadena lineal y ramificada representativo incluyen acetilenilo, propinilo, 1-butinilo, 2-butinilo, 1-pentinilo, 2-pentinilo, 3-metil-1 butinilo y semejantes.

"Acilo" se refiere a cualquier alquilo, alquenilo o alquinilo en donde el

carbono en el punto de unión está sustituido con un grupo oxo, como se definirá a continuación. Por ejemplo, los compuestos -C(=O)alquilo, -C(=O)alquenilo y -C(=O)alquinilo son grupos acilo.

Un “heterociclo” se refiere a anillos monocíclicos de 5 a 7 miembros o anillos heterocíclicos bicíclicos de 7 a 10 miembros, saturados, insaturados o aromáticos, y que contienen 1 ó 2 heteroátomos seleccionados de manera independiente entre nitrógeno, oxígeno y azufre, y en donde los heteroátomos de nitrógeno y azufre se pueden oxidar opcionalmente, y el heteroátomo de nitrógeno opcionalmente se puede cuaternizar, incluyendo anillos bicíclicos en los cuales cualquiera de los heterociclos anteriores están fusionados a un anillo benceno. El heterociclo se puede unir a través de cualquier heteroátomo o átomo de carbono. Los heterociclos incluyen heteroarilos como se define a continuación. Los heterociclos incluyen morfolinilo, pirrolidinonilo, pirrolidinilo, piperidinilo, piperazinilo, hidantoinilo, valerolactamilo, oxiranilo, oxetanilo, tetrahidrofuranilo, tetrahidropiranilo, tetrahidropiridinilo, tetrahidropirimidinilo, tetrahidrotiofenilo, tetrahidrotiopiranilo, tetrahidropirimidinilo, tetrahidrotiofenilo, tetrahidrotiopiranilo y semejantes.

Los términos “alquilo opcionalmente sustituido”, “alquenilo opcionalmente sustituido”, “alquinilo opcionalmente sustituido”, “acilo opcionalmente sustituido” y “heterociclo opcionalmente sustituido” significa que, cuando están sustituidos, al menos un átomo de hidrógeno fue reemplazado por un sustituyente. En el caso de un sustituyente oxo (=O), se reemplazan dos átomos de hidrógeno. En este sentido, los sustituyentes incluyen oxo, halógeno, heterociclo, -CN, -ORx, -NRxRy, -NRxC(=O)Ry, -NRxSO2Ry, -C(=O)Rx, -C(=O)ORx, -C(=O)NRxRy, –SOnRx y -SOnNRxRy, en donde n es 0,

1 ó 2, Rx y Ry son iguales o diferentes y de manera independiente son hidrógeno, alquilo o heterociclo, y cada uno de dichos sustituyentes de alquilo y heterociclo pueden estar sustituidos además con uno o más entre oxo, halógeno, -OH, -CN, alquilo, -ORx, heterociclo, -NRxRy, -NRxC(=O)Ry, -NRxSO2Ry, -C(=O)Rx, -C(=O)ORx, -C(=O)NRxRy, -SOnRx y -SOnNRxRy.

Un "halógeno" representa flúor, cloro, bromo o iodo.

En algunas formas de realización, en los métodos de la invención puede ser necesario emplear grupos protectores. La metodología de los grupos protectores es bien conocida por los especialistas en el arte (véase, por ejemplo, *Protective Groups in Organic Synthesis*, Green, T.W. *et al.*, Wiley-Interscience, ciudad de Nueva York, 1999). Brevemente, los grupos protectores son, en el contexto de esta invención, cualquier grupo que reduce o elimina la reactividad indeseada de un grupo funcional. Se puede agregar un grupo protector a un grupo funcional para enmascarar su reactividad durante determinadas reacciones y luego removerlo para revelar el grupo funcional original. En algunas formas de realización, se usa un “grupo protector de alcohol”. Un “grupo protector de alcohol” es cualquier grupo que disminuye o elimina la reactividad indeseada de un grupo funcional de alcohol. Los grupos protectores se pueden agregar y eliminar usando técnicas bien conocidas en el arte.

Las composiciones y las formulaciones para una administración oral incluyen polvos o gránulos, microparticulados, nanoparticulados, suspensiones o soluciones en agua o medios no acuosos, cápsulas, cápsulas de gel, sachéts, tabletas o minitabletas. Se pueden usar espesantes, agentes saborizantes, diluyentes, emulsionantes, auxiliares de dispersión o

aglutinantes. En algunas formas de realización, las formulaciones orales son aquellas en las cuales los ARNhd presentados en la invención se administran junto con uno o más agentes tensioactivos mejoradores de la penetración y queladores. Los agentes tensioactivos adecuados incluyen ácidos grasos y/o ésteres o sales de los mismos, ácidos biliares y/o sales de los mismos. Los ácidos biliares/sales adecuados incluyen ácido quenodesoxicólico (CDCA) y ácido ursodesoxiquenodesoxicólico (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 linolénico, dicaprato, tricaprato, monooleína, dilaurina, 1-monocaprato de glicerilo, 1-dodecilazaciclohéptan-2-ona, una acilcarnitina, una acilcolina o un monoglicérido, un diglicérido o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos (por ejemplo, sal de sodio). En algunas formas de realización, se usan combinaciones de mejoradores de penetración, por ejemplo, ácidos grasos/sales en combinación con ácidos biliares/sales. Un ejemplo de una combinación es la sal de sodio del ácido láurico, ácido cáprico y UDCA. Otros mejoradores de penetración incluyen polioxietilen-9-lauril éter, polioxietilen-20-cetil éter. Los ARNhd presentados en la invención se pueden administrar por vía oral, en forma granulada incluyendo partículas secas para aerosol o complejados para formar micro o nanopartículas. Los agentes complejantes de ARNhd incluyen poliaminoácidos; poliiminas; poliacrilatos; polialquilacrilatos, polioxetanos, polialquilcianoacrilatos; gelatinas cationizadas, albúminas,

almidones, acrilatos, polietilenglicoles (PEG) y almidones; polialquilcianoacrilatos; poliiminas derivatizadas con DEAE, polulanos, celulosas y almidones. Los agentes complejantes adecuados incluyen quitosán, N-trimetilquitosán, poli-L-lisina, polihistidina, poliornitina, poliesperminas, protamina, polivinilpiridina, politiodietilaminometiletileno 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, ácido poli(D,L-láctico), ácido poli(DL-láctico-co-glicólico (PLGA), alginato y polietilenglicol (PEG). Las formulaciones orales de los ARNcd y su preparación se describen con detalle en la Patente de los EEUU N°: 6.887.906, publicación de Patente de los EEUU N°: 20030027780 y Patente de los EEUU N°: 6.747.014, cada una de las cuales se incorpora en la presente a modo de referencia.

Las composiciones y las formulaciones para una administración por vía parenteral, intraparenquimática (en el cerebro), intratecal, intraventricular o intrahepática pueden incluir soluciones acuosas estériles que también contienen soluciones amortiguadoras, diluyentes y otros aditivos adecuados tales como, pero en un sentido no taxativo, mejoradores de penetración, compuestos de vehículo y otros vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención incluyen, pero en un sentido no taxativo, soluciones, emulsiones y formulaciones que contienen liposomas. Estas composiciones se pueden generar a partir de una

variedad de componentes que incluyen, pero en un sentido no taxativo, líquidos preformados, sólidos auto-emulsionantes y semisólidos auto-emulsionantes. Se prefieren particularmente las formulaciones dirigidas al hígado cuando se tratan trastornos hepáticos, tal como un carcinoma hepático.

Las formulaciones farmacéuticas de la presente invención, que convenientemente se pueden presentar en formas de dosificación unitarias, se pueden preparar de acuerdo con técnicas convencionales bien conocidas en la industria farmacéutica. Dichas técnicas incluyen el paso de asociar los ingredientes activos con el(los) vehículo(s) o excipiente(s) farmacéutico(s). En general, las formulaciones se preparan asociando uniforme e íntimamente el ingrediente activo con vehículos líquidos, vehículos sólidos finamente divididos o ambos, y luego dando forma al producto, de ser necesario.

Las composiciones de la presente invención se pueden formular en cualquiera de muchas formas de dosificación posibles tales como, pero en un sentido no taxativo, tabletas, cápsulas, cápsulas de gel, jarabes líquidos, geles blandos, supositorios y enemas. Las composiciones de la presente invención también se pueden formular como suspensiones en un medio acuoso, no acuoso o mixto. Las suspensiones acuosas pueden contener además sustancias que aumentan la viscosidad de la suspensión incluyendo, por ejemplo, carboximetilcelulosa de sodio, sorbitol y/o dextrano. La suspensión también puede contener estabilizantes.

A. Formulaciones adicionales

i. Emulsiones

Las composiciones de la presente invención se pueden preparar y formular como emulsiones. Típicamente, las emulsiones son sistemas

heterogéneos de un líquido disperso en otro en la forma de gotas que habitualmente exceden 0,1 μm de diámetro (véase, por ejemplo, *Dosage Forms and Drug Delivery Systems*, Allen, LV., Popovich NG., y Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8ª ed.), Nueva York, NY; Idson, en *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger y Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y., volumen 1, página 199; Rosoff, en *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger y Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y., Volumen 1, página 245; Bloque en *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger y Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y., volumen 2, página 335; Higuchi *et al*., en *Remington's Pharmaceutical Sciences*, Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1985, página 301). A menudo las emulsiones son sistemas bifásicos que comprenden dos fases líquidas inmiscibles mezcladas íntimamente y una dispersa en la otra. En general, las emulsiones pueden ser de la variedad de agua-en-aceite (ag/ac) o de aceite-en-agua (ac/ag). Cuando la fase acuosa está finamente dividida y dispersa como gotas diminutas en una fase oleosa voluminosa, la composición resultante es una emulsión de agua-en-aceite (ag/ac). Como alternativa, cuando una fase oleosa se divide finamente y se dispersa como gotas diminutas en una fase acuosa voluminosa, la composición resultante es una emulsión de aceite-en-agua (ac/ag). Las emulsiones pueden contener componentes adicionales además de las fases dispersas y la droga activa puede estar presente como una solución ya sea en la fase acuosa, en la fase oleosa o ella misma puede ser una fase separada. Las emulsiones también pueden contener excipientes farmacéuticos, tales como emulsionantes, estabilizantes, colorantes y antioxidantes, según necesidad.

Las emulsiones farmacéuticas también pueden ser emulsiones múltiples compuestas por más de dos fases tal como, por ejemplo, es el caso de las emulsiones de aceite-en-agua-en-aceite (ac/ag/ac) y agua-en-aceite-en-agua (ag/ac/ag). Tales formulaciones complejas a menudo ofrecen determinadas ventajas que las simples emulsiones binarias no proporcionan. Las emulsiones múltiples en las cuales las gotas de aceite individuales de una emulsión de ac/ag encierran pequeñas gotas de agua constituyen una emulsión de ag/ac/ag. Asimismo un sistema de gotas de aceite encerradas en glóbulos de agua estabilizadas en una fase oleosa continua provee una emulsión de ac/ag/ac.

Las emulsiones se caracterizan por presentar poca o ninguna estabilidad termodinámica. A menudo, la fase dispersa o discontinua de la emulsión está bien dispersa en la fase externa o continua y se mantiene en esta forma por medio de emulsionantes o la viscosidad de la formulación. Cualquiera de las fases de la emulsión puede ser un semisólido o un sólido, como es el caso de las bases de ungüentos y cremas estilo emulsión. Otros medios para estabilizar emulsiones comprenden el uso de emulsionantes que se pueden incorporar en cualquiera de las fases de la emulsión. Los emulsionantes se pueden clasificar en términos generales en cuatro categorías: agentes tensioactivos sintéticos, emulsionantes naturales, bases de absorción y sólidos finamente dispersos (véase, por ejemplo, *Dosage Forms and Drug Delivery Systems*, Allen, LV., Popovich NG., y Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8ª ed.), Nueva York, NY; Idson, en *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger y Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y., volumen 1, página 199).

Los agentes tensioactivos sintéticos, también conocidos como agentes de superficie activa, tienen una amplia aplicabilidad en la formulación de emulsiones y se han revisado en la literatura (véase, por ejemplo, *Dosage Forms and Drug Delivery Systems*, Allen, LV., Popovich NG., y Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8ª ed.), Nueva York, NY; Rieger, en *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger y Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y., volumen 1, página 285; Idson, en *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger y Banker (Eds.), Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y., 1988, volumen 1, página 199). Los agentes tensioactivos típicamente son anfifílicos y comprenden una porción hidrofílica y una porción hidrofóbica. La relación de la naturaleza hidrofílica a hidrofóbica del agente tensioactivo se ha denominado balance hidrófilo/lipófilo (HLB) y constituye una herramienta valiosa en la clasificación y selección de los agentes tensioactivos en la preparación de formulaciones. Los agentes tensioactivos se pueden clasificar en diferentes clases basado en la naturaleza del grupo hidrofílico:no iónico, aniónico, catiónico y anfotérico (véase, por ejemplo, *Dosage Forms and Drug Delivery Systems*, Allen, LV., Popovich NG., y Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8ª ed.), Nueva York, NY Rieger, en *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger y Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y., volumen 1, página 285).

Los emulsionantes naturales usados en las formulaciones de la emulsión incluyen lanolina, cera de abejas, fosfátidos, lecitina y acacia. Las bases de absorción tienen propiedades hidrofílicas de modo tal que pueden absorber agua para formar emulsiones ag/ac y aún retener sus consistencias semisólidas, tal como lanolina anhidra y petrolato hidrofílica. Los sólidos

finamente divididos también se han usado como buenos emulsionantes en especial en combinación con agentes tensioactivos y en preparaciones viscosas. Incluyen sólidos inorgánicos polares, tales como hidróxidos de metales pesados, arcillas no expansibles tal como bentonita, atapulgita, hectorita, caolín, montmorilonita, silicato de aluminio coloidal y silicato de aluminio y magnesio coloidal, pigmentos, y sólidos no polares tal como carbón o triestearato de glicerilo.

También se puede incluir una gran variedad de materiales no emulsionantes en las formulaciones en emulsión y contribuyen en las propiedades de las emulsiones. Incluyen grasas, aceites, ceras, ácidos grasos, alcoholes grasos, ésteres grasos, humectantes, coloides hidrofílicos, conservantes y antioxidantes (Block, en *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger y Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y., volumen 1, página 335; Idson, en *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger y Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y., volumen 1, página 199).

Los hidrocoloides o coloides hidrofílicos incluyen gomas naturales y polímeros sintéticos tales como polisacáridos (por ejemplo, acacia, agar, ácido algínico, carragenina, goma guar, goma de karaya y tragacanto), derivados de celulosa (por ejemplo, carboximetilcelulosa y carboxipropilcelulosa), y polímeros sintéticos (por ejemplo, carbómeros, éteres de celulosa y polímeros de carboxivinilo). Se dispersan o hinchan en agua para formar soluciones coloidales que estabilizan a las emulsiones por formación de fuertes películas interfase alrededor de las gotas de fase dispersa y por aumento de la viscosidad de la fase externa.

Dado que las emulsiones a menudo contienen numerosos ingredientes tales como carbohidratos, proteínas, esteroles y fosfátidos que fácilmente pueden sustentar el crecimiento de microbios, estas formulaciones a menudo incorporan conservantes. Los conservantes comúnmente usados incluidos en las formulaciones en emulsión incluyen metil parabeno, propil parabeno, sales de amonio cuaternario, cloruro de benzalconio, ésteres del ácido p-hidroxibenzoico y ácido bórico. Comúnmente, también se agregan 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 tal como ácido ascórbico y metabisulfito de sodio y sinergistas de antioxidantes tales como ácido cítrico, ácido tartárico y lecitina.

La aplicación de las formulaciones en emulsión por las rutas dermatológicas, orales y parenterales y los métodos para su elaboración se han revisado en la literatura (véase, por ejemplo, *Dosage Forms and Drug Delivery Systems*, Allen, LV., Popovich NG., y Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8ª ed.), Nueva York, NY; Idson, en *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger y Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y., volumen 1, página 199). Las formulaciones en emulsión para la administración por vía oral se han utilizado ampliamente por la facilidad de su formulación, así como su eficacia desde el punto de vista de la absorción y biodisponibilidad (véase, por ejemplo, *Dosage Forms and Drug Delivery Systems*, Allen, LV., Popovich NG., y Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8ª ed.), Nueva York, NY; Rosoff, en *Pharmaceutical Dosage Forms*,

Lieberman, Rieger y Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y., volumen 1, página 245; Idson, en *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger y Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y., volumen 1, página 199). Los laxantes con bases de aceite mineral, vitaminas solubles en aceite y las preparaciones nutritivas ricas en grasas se encuentran entre los materiales que se administran comúnmente por vía oral como emulsiones de ac/ag.

ii. Microemulsiones

En una forma de realización de la presente invención, las composiciones de los ARNi y ácidos nucleicos se formulan como microemulsiones. Una microemulsión se puede definir como un sistema de agua, aceite y anfifilo, que es una solución líquida simple ópticamente isotrópica y termodinámicamente estable (véase, por ejemplo, *Dosage Forms and Drug Delivery Systems*, Allen, LV., Popovich NG., y Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8ª ed.), Nueva York, NY; Rosoff, en *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger y Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y., volumen 1, página 245). Típicamente, las microemulsiones son sistemas que se preparan dispersando primero un aceite en una solución tensioactiva acuosa y agregando luego una cantidad suficiente de un cuarto componente, generalmente un alcohol de longitud de cadena intermedia para formar un sistema transparente. Por ello, las microemulsiones también se han descrito como dispersiones termodinámicamente estables, isotrópicamente claras de dos líquidos inmiscibles que son estabilizados por películas interfaciales de moléculas de superficie activa (Leung y Shah, en: *Controlled Release of Drugs: Polymers and Aggregate Systems*, Rosoff, M., Ed., 1989, VCH Publishers,

Nueva York, páginas 185-215). Las microemulsiones se preparan comúnmente mediante una combinación de tres a cinco componentes que incluyen aceite, agua, un agente tensioactivo, un agente cotensioactivo y un electrolito. El hecho que la microemulsión sea de tipo agua-en-aceite (ag/ac) o aceite-en-agua (ac/ag) depende de las propiedades del aceite y agente tensioactivo usados y de la estructura y la forma geométrica de las cabezas polares y las colas de hidrocarburos de las moléculas de agente tensioactivo (Schott, en *Remington's Pharmaceutical Sciences*, Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1985, página 271).

El enfoque fenomenológico que utiliza diagramas de fase se ha estudiado ampliamente y ha proporcionado un conocimiento comprensible al especialista en el arte acerca de cómo formular microemulsiones (véase, por ejemplo, *Dosage Forms and Drug Delivery Systems*, Allen, LV., Popovich NG., y Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8ª ed.), Nueva York, NY; Rosoff, en *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger y Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y., volumen 1, página 245; Block, en *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger y Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y., volumen 1, página 335). En comparación con las emulsiones convencionales, las microemulsiones ofrecen la ventaja de solubilizar las drogas insolubles en agua en una formulación de gotas termodinámicamente estables que se forman espontáneamente.

Los agentes tensioactivos usados en la preparación de microemulsiones incluyen, pero en un sentido no taxativo, agentes tensioactivos iónicos, agentes tensioactivos no iónicos, Brij 96, polioxietilenoleil éteres, poliglicerol ésteres de ácidos grasos, monolaurato de tetraglicerol (ML310), monooleato de

tetraglicerol (MO310), monooleato de hexaglicerol (PO310), pentaoleato de hexaglicerol (PO500), monocaprato de decaglicerol (MCA750), monooleato de decaglicerol (MO750), sesquioleato de decaglicerol (SO750), decaoleato de decaglicerol (DAO750), solos o en combinación con agentes cotensioactivos. El agente cotensioactivo, habitualmente un alcohol de cadena corta, tal como etanol, 1-propanol y 1-butanol, sirve para aumentar la fluidez interfacial por penetración en la película de agente tensioactivo y en consecuencia crear una película desordenada debido al espacio vacío generado entre las moléculas de agente tensioactivo. Sin embargo, las microemulsiones se pueden preparar sin el uso de agentes cotensioactivos y en el arte se conocen sistemas de microemulsiones auto-emulsionantes libre de alcohol. La fase acuosa puede ser típicamente, pero en un sentido no taxativo, agua, una solución acuosa de la droga, glicerol, PEG300, PEG400, poligliceroles, propilenglicoles y derivados de etilenglicol. La fase de aceite puede incluir, pero en un sentido no taxativo, materiales tales como Captex 300, Captex 355, Capmul MCM, ésteres de ácidos grasos, mono, di y triglicéridos de cadena mediana (C8-C12), gliceril ésteres de ácidos grasos polioxietilados, alcoholes grasos, glicéridos poliglicolizados, C8-C10 glicéridos saturados poliglicolizados, aceites vegetales y aceite de silicona.

Las microemulsiones son de particular interés desde el punto de vista de la solubilización de la droga y la absorción mejorada de drogas. Se ha propuesto que las microemulsiones basadas en lípidos (tanto de ac/ag y ag/ac) mejoran la biodisponibilidad oral de drogas, incluyendo péptidos (véase, por ejemplo, las Patentes de los EE.UU. N°: 6.191.105; 7.063.860; 7.070.802; 7.157.099; Constantinides *et al*., *Pharmaceutical Research*, 1994, 11, 1385-

1390; Ritschel, *Meth. Find. Exp. Clin. Pharmacol*., 1993, 13, 205). Las microemulsiones ofrecen ventajas de una solubilización mejorada de drogas, la protección de droga contra una hidrólisis enzimática, una posible mejora de la absorción de drogas debido a alteraciones inducidas por el agente tensioactivo en la fluidez y la permeabilidad de la membrana, facilidad de preparación, facilidad de administración oral ante las formas de dosificación sólidas, potencia clínica mejorada y mejor toxicidad (véase, por ejemplo, las Patentes de los EE.UU. N°: 6.191.105; 7.063.860; 7.070.802; 7.157.099; Constantinides *et al*., *Pharmaceutical Research*, 1994, 11, 1385; Ho *et al*., *J. Pharm. Sci.,* 1996, 85, 138-143). Las microemulsiones a menudo se pueden formar espontáneamente cuando sus componentes se reúnen a temperatura ambiente. Esto puede resultar particularmente ventajoso cuando se formulan drogas termolábil les, péptidos o ARNi. Las microemulsiones también son efectivas en la administración transdérmica de los componentes activos en aplicaciones tanto cosméticas como farmacéuticas. Se espera que las composiciones y formulaciones en microemulsión de la presente invención puedan facilitar una mayor absorción sistémica de los ARNi y ácidos nucleicos desde el tracto gastrointestinal, así como mejorarán la captación celular local de los ARNi y ácidos nucleicos.

Las microemulsiones de la presente invención también pueden contener componentes y aditivos adicionales tales como monoestearato de sorbitán (Grill 3), Labrasol y mejoradores de penetración para mejorar las propiedades de la formulación y para aumentar la absorción de los ARNi y ácidos nucleicos de la presente invención. Los mejoradores de penetración usados en las microemulsiones de la presente invención se pueden clasificar como

pertenecientes a uno de cinco grandes categorías: agentes tensioactivos, ácidos grasos, sales biliares, agentes quelantes y agentes no quelantes no tensioactivos (Lee *et al*., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, página 92). Cada una de estas clases ya se describió precedentemente.

iii. Micropartículas

Se puede incorporar un agente de ARNi de la invención en una partícula, por ejemplo, una micropartícula. Las micropartículas se pueden producir mediante secado por aspersión, pero también se pueden producir mediante otros métodos incluyendo liofilización, evaporación, secado en lecho fluido, secado bajo vacío o una combinación de estas técnicas.

iv. Mejoradores de penetración

En una forma de realización, la presente invención emplea diversos mejoradores de penetración para lograr una administración eficiente de ácidos nucleicos, en particular de los ARNi, en la piel de animales. La mayoría de las drogas está presente en solución en ambas formas ionizada y no ionizada. Sin embargo, habitualmente sólo las drogas solubles en lípidos o lipofílicas pueden cruzar fácilmente las membranas celulares. Se ha descubierto que aún las drogas no lipofílicas pueden atravesar las membranas celulares si la membrana a cruzar es tratada con un mejorador de penetración. Además de ayudar en la difusión de drogas no lipofílicas a través de las membranas celulares, los mejoradores de penetración también mejoran la permeabilidad de las drogas lipofílicas.

Los mejoradores de penetración se pueden clasificar como pertenecientes a una de cinco grandes categorías, es decir, agentes tensioactivos, ácidos grasos, sales biliares, agentes quelantes y agentes no

quelantes no tensioactivos (véase, por ejemplo, Malmsten, M. *Surfactants and polymers in drug delivery*, Informa Health Care, Nueva York, NY, 2002; Lee *et al*., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, página 92). Cada una de las clases de mejoradores de penetración mencionadas precedentemente se describirá a continuación con mayor detalle.

Los agentes tensioactivos (o "agentes de superficie activa") son entidades químicas que, cuando se disuelven en una solución acuosa, reducen la tensión superficial de la solución o la tensión interfacial entre la solución acuosa y otro líquido, con el resultado que mejora la absorción de los ARNi a través de la mucosa. Además de las sales biliares y los ácidos grasos, estos mejoradores de penetración incluyen, por ejemplo, laurilsulfato de sodio, polioxietilen-9-lauril éter y polioxietilen-20-cetil éter) (véase, por ejemplo, Malmsten, M. *Surfactants and polymers in drug delivery*, Informa Health Care, Nueva York, NY, 2002; Lee *et al*., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, página 92); y emulsiones perfluoroquímicos, tal como FC-43. Takahashi *et al*., *J. Pharm. Pharmacol.*, 1988, 40, 252).

Los diversos ácidos grasos y sus derivados que actúan como mejoradores de 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, mono-oleína (1-mono-oleoil-rac-glicerol), dilaurina, ácido caprílico, ácido araquidónico, 1-monocaprato de glicerol, 1-dodecilazacicloheptan-2-ona, acilcarnitinas, acilcolinas, C_{1-20} alquil ésteres de los mismos (por ejemplo, metil, isopropil y t-butil), y mono- y di-glicéridos de los mismos (es decir, oleato, laurato, caprato, miristato, palmitato, estearato, linoleato, *etc*.) (véase, por ejemplo, Touitou, E.,

et al., Enhancement in Drug Delivery, CRC Press, Danvers, MA, 2006; Lee *et al*., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, página 92; Muranishi, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1990, 7, 1-33; El Hariri *et al*., *J. Pharm. Pharmacol*., 1992, 44, 651-654).

El rol fisiológico de la bilis incluye la facilitación de la dispersión y absorción de lípidos y vitaminas solubles en grasas (véase, por ejemplo, Malmsten, M. *Surfactants and polymers in drug delivery*, Informa Health Care, Nueva York, NY, 2002; Brunton, Capítulo 38 en: Goodman & Gilman's *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 9ª Ed., Hardman *et al.,* Eds., McGraw-Hill, Nueva York, 1996, páginas 934-935). 934-935). Hay varias sales biliares naturales, y sus derivados sintéticos, que actúan como mejoradores de penetración. Por consiguiente, el término "sales biliares" incluye cualquiera de los componentes naturales de la bilis así como cualquiera de sus derivados sintéticos. Las sales 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), glicodihidrofusidato de sodio y polioxietilen-9-lauril éter (POE) (véase, por ejemplo, Malmsten, M. *Surfactants and polymers in drug delivery*, Informa Health Care, Nueva York, NY, 2002; Lee *et al*., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, página 92; Swinyard, Capítulo 39, en: *Remington's Pharmaceutical*

Sciences, 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).

Los agentes quelantes, según se usan con relación a la presente invención, se pueden definir como compuestos que eliminan a los iones metálicos de una solución por formación de complejos con la misma, con el resultado que mejoran la absorción de los ARNi a través de la mucosa. Con respecto a su uso como potenciadores de penetración en la presente invención, los agentes quelantes tienen la ventaja adicional de también servir como un inhibidor de DNasa, ya que la mayoría de las ADN nucleasas caracterizadas requiere de un ion metálico divalente para la catálisis y por consiguiente son inhibidas por los agentes quelantes (Jarrett, *J. Chromatogr.*, 1993, 618, 315-339). Los agentes quelantes adecuado incluyen, pero en un sentido no taxativo, etilendiamintetraacetato disódico (EDTA), ácido cítrico, salicilatos (por ejemplo, salicilato, 5-metoxisalicilato y homovanilato de sodio), derivados N-acilo de colágeno, lauret-9 y derivados N-amino acilo de beta-dicetonas (enaminas)(véase, por ejemplo, Katdare, A. *et al.*, *Excipient development for pharmaceutical, biotechnology, and drug delivery*, CRC Press, Danvers, MA, 2006; Lee *et al*., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, página 92; Muranishi, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1990, 7, 1-33; Buur *et al*., *J. Control Rel.*, 1990, 14, 43-51).

Según se usan en la presente, los compuestos potenciadores de la penetración no quelantes no tensioactivos se pueden definir como compuestos que presentan una actividad insignificante como agentes quelantes o como

agentes tensioactivos pero que no obstante mejoran la absorción de los ARNi por la mucosa alimentaria (véase, por ejemplo, Muranishi, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1990, 7, 1-33). Esta clase de potenciadores de penetración incluye, por ejemplo, ureas cíclicas insaturadas, derivados 1-alquil- y 1-alquenil-azaciclo-alcanona (Lee *et al*., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, página 92); y agentes antiinflamatorios no esteroides tales como diclofenac sódico, indometacina y fenilbutazona (Yamashita *et al*., *J. Pharm. Pharmacol*., 1987, 39, 621-626).

Los agentes que mejoran la captación de los ARNi a nivel celular también se pueden agregar a las composiciones farmacéuticas y otras composiciones de la presente invención. Por ejemplo, también se sabe que los lípidos catiónicos, tal como lipofectina (Junichi *et al*, Patente de los EE.UU. N°: 5.705.188), derivados de glicerol catiónicos y moléculas policatiónicas, tal como la polilisina (Lollo *et al*., Solicitud PCT WO 97/30731) mejoran la captación celular de los ARNcd. Los ejemplos de reactivos de transfección disponibles comercialmente incluyen, por ejemplo Lipofectamina™ (Invitrogen; Carlsbad, CA), Lipofectamina 2000™ (Invitrogen; Carlsbad, CA), 293fectin™ (Invitrogen; Carlsbad, CA), Cellfectin™ (Invitrogen; Carlsbad, CA), DMRIE-C™ (Invitrogen; Carlsbad, CA), FreeStyle™ MAX (Invitrogen; Carlsbad, CA), Lipofectamina™ 2000 CD (Invitrogen; Carlsbad, CA), Lipofectamina™ (Invitrogen; Carlsbad, CA), RNAiMAX (Invitrogen; Carlsbad, CA), Oligofectamina™ (Invitrogen; Carlsbad, CA), Optifect™ (Invitrogen; Carlsbad, CA), reactivo de transfección X-tremeGENE Q2 (Roche; Grenzacherstrasse, Suiza), reactivo de transfección liposómico DOTAP (Grenzacherstrasse, Suiza), reactivo de transfección liposómico DOSPER (Grenzacherstrasse, Suiza) o Fugene

(Grenzacherstrasse, Suiza), reactivo Transfectam® (Promega; Madison, WI), reactivo de transfección TransFast™ (Promega; Madison, WI), reactivo Tfx™-20 (Promega; Madison, WI), reactivo Tfx™-50 (Promega; Madison, WI), DreamFect™ (OZ Biosciences; Marseille, Francia), EcoTransfect (OZ Biosciences; Marseille, Francia), reactivo de transfección TransPassª D1 (New England Biolabs; Ipswich, MA, EE.UU.), LyoVec™/LipoGen™ (Invitrogen; San Diego, CA, EE.UU.), reactivo de transfección PerFectin (Genlantis; San Diego, CA, EE.UU.), reactivo de transfección NeuroPORTER (Genlantis; San Diego, CA, EE.UU.), reactivo de transfección GenePORTER (Genlantis; San Diego, CA, EE.UU.), reactivo de transfección GenePORTER 2 (Genlantis; San Diego, CA, EE.UU.), reactivo de transfección Citofectin (Genlantis; San Diego, CA, EE.UU.), reactivo de transfección BaculoPORTER (Genlantis; San Diego, CA, EE.UU.), reactivo de transfección TroganPORTER™ (Genlantis; San Diego, CA, EE.UU.), RiboFect (Bioline; Taunton, MA, EE.UU.), PlasFect (Bioline; Taunton, MA, EE.UU.), UniFECTOR (B-Bridge International; Mountain View, CA, EE.UU.), SureFECTOR (B-Bridge International; Mountain View, CA, EE.UU.) o HiFect™ (B-Bridge International, Mountain View, CA, EE.UU.), entre otros.

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

v. Vehículos

En determinadas composiciones de la presente invención también se incorporan compuestos de vehículo en la formulación. Según se usa en la

presente, un “compuesto vehículo” o “vehículo” se refiere a un ácido nucleico, o un análogo del mismo, que es inerte (es decir, que no tiene actividad biológica *per se*) pero que es reconocido como un ácido nucleico por los procesos *in vivo* que reducen la biodisponibilidad de un ácido nucleico que tiene actividad biológica, por ejemplo, por degradación del ácido nucleico biológicamente activo o porque promueve su eliminación de la circulación. La coadministración de un ácido nucleico y un compuesto vehículo, típicamente con un exceso de esta última sustancia, puede dar como resultado una reducción sustancial de la cantidad de ácido nucleico recuperada en hígado, riñón u otros reservorios extracirculatorios, presumiblemente debido a la competencia entre el compuesto vehículo y el ácido nucleico por un receptor común. Por ejemplo, se puede reducir la recuperación de un ARNcd fosforotioato parcial en tejido hepático cuando se coadministra con ácido poliinosínico, sulfato de dextrano, ácido policitídico o ácido 4-acetamido-4'isotiociano-estilben-2,2'-disulfónico (Miyao *et al*., *DsRNA Res., Dev*., 1995, 5, 115-121; Takakura *et al*., *DsRNA & Nucl. Acid Drug Dev*., 1996, 6, 177-183.

vi. Excipientes

A diferencia de un compuesto vehículo, un “vehículo farmacéutico” o “excipiente” es un solvente, un agente de suspensión o cualquier otro vehículo farmacológicamente inerte farmacéuticamente aceptable para administrar uno o más ácidos nucleicos a un animal. El excipiente puede ser líquido o sólido y se selecciona, teniendo en mente la manera de administración, para proporcionar el volumen, la consistencia, etc, deseados cuando se combina con un ácido nucleico y con los demás componentes de una composición farmacéutica dada. Los vehículos farmacéuticos típicos incluyen, pero en un

sentido no taxativo, agentes de unión (por ejemplo, almidón de maíz pregelatinizado, polivinilpirrolidona o hidroxipropilmetilcelulosa, *etc*.); rellenos (por ejemplo, lactosa y otros azúcares, celulosa microcristalina, pectina, gelatina, sulfato de calcio, etilcelulosa, poliacrilatos o fosfato ácido de calcio, *etc*.); lubricantes (por ejemplo, estearato de magnesio, talco, sílica, dióxido de silicona coloidal, ácido esteárico, estearatos metálicos, aceites vegetales hidrogenados, almidón de maíz, polietilenglicoles, benzoato de sodio, acetato de sodio, *etc*.); desintegrantes (por ejemplo, almidón, almidón glicolado de sodio, *etc*.); y agentes humectantes (por ejemplo, laurilsulfato de sodio, *etc*).

Los excipientes orgánicos o inorgánicos farmacéuticamente aceptables adecuados para una administración no parenteral que no reaccionan adversamente con ácidos nucleicos también se pueden usar para formular las composiciones de la presente invención. Los vehículos farmacéuticamente aceptables adecuados incluyen, pero en un sentido no taxativo, agua, soluciones de sales, alcoholes, polietilenglicoles, gelatina, lactosa, amilosa, estearato de magnesio, talco, ácido silícico, parafina viscosa, hidroximetilcelulosa, polivinilpirrolidona y semejantes.

Las formulaciones para una administración tópica de ácidos nucleicos pueden incluir soluciones acuosas estériles y no estériles, soluciones no acuosas en solventes comunes tales como alcoholes, o soluciones de los ácidos nucleicos en bases de aceite líquidas o sólidas. Las soluciones también pueden contener soluciones amortiguadoras, diluyentes y otros aditivos adecuados. Se pueden usar excipientes orgánicos o inorgánicos farmacéuticamente aceptables adecuados para una administración no parenteral que no reaccionan adversamente con ácidos nucleicos.

Los excipientes farmacéuticamente aceptables adecuados incluyen, pero en un sentido no taxativo, agua, soluciones de sales, alcohol, polietilenglicoles, gelatina, lactosa, amilosa, estearato de magnesio, talco, ácido silícico, parafina viscosa, hidroximetilcelulosa, polivinilpirrolidona y semejantes.

vi. Otros componentes

Las composiciones de la presente invención pueden contener además otros componentes adjuntos presentes convencionalmente en las composiciones farmacéuticas, a los niveles de uso establecidos en el arte. Así, por ejemplo, las composiciones pueden contener materiales adicionales, compatibles, farmacéuticamente activas, tales como, por ejemplo, antipruríticos, astringentes, anestésicos locales o agentes antiinflamatorios, o pueden contener materiales adicional de utilidad en la formulación física de diversas formas de dosificación de las composiciones de la presente invención, tales como colorantes, agentes saborizantes, conservantes, antioxidantes, opacantes, agentes espesantes y estabilizantes. Sin embargo, cuando se agregan tales materiales, no deberían interferir indebidamente con las actividades biológicas de los componentes de las composiciones de la presente invención. Las formulaciones se pueden esterilizar y, si se deseara, mezclar con agentes auxiliares, por ejemplo, lubricantes, conservantes, estabilizantes, agentes humectantes, emulsionantes, sales para afectar la presión osmótica, soluciones amortiguadoras, colorantes, sustancias saborizantes y/o aromáticas y semejantes que no interactúan adversamente con los ácidos nucleicos de la formulación.

Las suspensiones acuosas pueden contener sustancias que aumentan la viscosidad de la suspensión incluyendo, por ejemplo, carboximetilcelulosa de

sodio, sorbitol y/o dextrano. La suspensión también puede contener estabilizantes.

En algunas formas de realización, las composiciones farmacéuticas presentadas en la invención incluyen (a) uno o más compuestos de ARNi y (b) uno o más agentes que funcionan mediante un mecanismo distinto del ARNi y que son de utilidad en el tratamiento de un trastorno de sangrado. Los ejemplos de dichos agentes incluyen, pero en un sentido no taxativo, un agente antiinflamatorio, un agente antiesteatosis, un agente antiviral y/o un agente antifibrosis. Además, también se pueden usar otras sustancias usadas comúnmente como hepatoprotectores, tal como silimarina, junto con los ARNi descritos en la presente. Otros agentes de utilidad para tratar enfermedades del hígado incluyen telbivudina, entecavir e inhibidores de proteasa tal como telaprevir y otros que se divulgan, por ejemplo, en Tung *et al.*, publicaciones de Solicitudes de Patente de los EE.UU. N°: 2005/0148548, 2004/0167116 y 2003/0144217; y en Hale *et al.*, publicación de Solicitud de Patente de los EE.UU. N°: 2004/0127488.

La toxicidad y la eficacia terapéutica de dichos compuestos se pueden determinar empleando procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos celulares o en animales experimentales, por ejemplo, para determinar la LD_{50} (la dosis letal para el 50% de la población) y la ED_{50} (la dosis con efectividad terapéutica en el 50% de la población). La relación de dosis entre los efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico y se puede expresar con la relación LD_{50} /ED_{50}. Se prefieren los compuestos con mayores índices terapéuticos.

Los datos obtenidos de dichos ensayos de cultivos celulares y estudios

en animales se pueden utilizar para formular un rango de dosificación para utilizar en seres humanos. La dosificación de las composiciones presentadas en la presente invención generalmente se encuentra en un rango de concentraciones en circulación que incluyen a la ED50 con poca o ninguna toxicidad. La dosificación puede variar dentro de este rango dependiendo de la forma de dosificación empleada y la ruta de administración utilizada. Para cualquier compuesto de los que se utilizan en los métodos presentados en la invención, la dosis terapéuticamente eficaz se puede estimar inicialmente a partir de ensayos de cultivos celulares. En los modelos en animales, la dosis se puede formular para obtener un rango de concentración circulante en plasma del compuesto o, cuando fuera apropiado, del producto polipeptídico de una secuencia blanco (por ejemplo, para obtener una menor concentración del polipéptido) que incluye al valor de IC50 (es decir, la concentración del compuesto de prueba que permite una inhibición medio máxima de los síntomas) determinada en un cultivo celular. Dicha información se puede utilizar para determinar más exactamente las dosis útiles en humanos. Los niveles en plasma se pueden medir, por ejemplo, con cromatografía líquida de alta presión.

Además de su administración, como se describió previamente, los ARNi presentados en la invención se pueden administrar en combinación con otros agentes conocidos que son efectivos en el tratamiento de procesos patológicos mediados por la expresión de Serpina1. En cualquier caso, el médico a cargo de la administración puede ajustar la cantidad y el programa de administración de ARNi sobre la base de los resultados observados usando mediciones estándar de la eficacia conocidos en el arte o que se describen en la presente.

VI. Métodos para inhibir la expresión de Serpina1

La presente invención provee métodos para inhibir la expresión de una Serpina1 en una célula. Los métodos incluyen poner una célula en contacto con un agente de ARNi, por ejemplo, un agente de ARNi de hebra doble, en una cantidad efectiva para inhibir la expresión de Serpina1 en la célula, a fin de inhibir de esa manera la expresión de Serpina1 en la célula.

El contacto de una célula con un agente de ARNi, por ejemplo, un agente de ARNi de hebra doble, se puede realizar *in vitro* o *in vivo*. El contacto de una célula *in vivo* con el agente de ARNi incluye poner una célula o grupo de células dentro de un sujeto, por ejemplo, un sujeto humano, en contacto con el agente de ARNi. También es posible combinar los métodos de contacto *in vitro* e *in vivo*. El contacto con una célula puede ser directo o indirecto, según se expuso anteriormente. Además, el contacto con la célula se puede obtener mediante un ligando de direccionamiento hacia un blanco, incluyendo a cualquiera de los ligandos descritos aquí o conocidos en el arte. En las formas de realización preferidas, el ligando de direccionamiento hacia un blanco es una unidad carbohidrato, por ejemplo, un ligando $GalNAc_3$, o cualquier otro ligando que dirija al agente de ARNi hacia un sitio de interés, por ejemplo, el hígado de un sujeto.

El término “inhibición”, según se usa en la presente, se usa indistintamente con los términos “reducción”, “silenciamiento”, “subregulación” y otros términos similares, e incluye cualquier nivel de inhibición.

La expresión “que inhibe la expresión de un Serpina1”, hace referencia a la inhibición de la expresión de cualquier gen de Serpina1 (tal como, por ejemplo, un gen de Serpina1 de ratón, un gen de Serpina1 de rata, un gen de

Serpina1 de mono, o un gen de Serpina1 de humano) así como variantes o mutantes de un gen de Serpina1. Por lo tanto, el gen de Serpina1 puede ser un gen de Serpina1 de tipo salvaje, un gen de Serpina1 mutante o un gen de Serpina1 transgénico en el contexto de una célula, un grupo de células u organismo genéticamente manipulados.

El término “que inhibe la expresión de un gen de Serpina1” incluye cualquier nivel de inhibición de un gen de Serpina1, por ejemplo, una supresión por lo menos parcial de la expresión de un gen de Serpina1. La expresión del gen de Serpina1 se puede evaluar en base al nivel, o el cambio del nivel, de cualquier variable asociada con la expresión del gen de Serpina1, por ejemplo, el nivel de ARNm de la Serpina1, el nivel de la proteína Serpina1, o el nivel de lípidos. Este nivel se puede evaluar en una célula individual o en un grupo de células, incluyendo, por ejemplo, una muestra que se obtuvo de un sujeto.

La inhibición se puede evaluar por la reducción de un nivel absoluto o relativo de una o más variables asociadas a la expresión de Serpina1 en comparación con un nivel de control. El nivel control puede ser cualquier tipo de nivel control que se utilice en el arte, por ejemplo, un nivel basal de predosis, o un nivel determinado de un sujeto, célula o muestra similar no tratado o tratado con un control (tal como, por ejemplo, un control de solución amortiguadora solamente o un control con un agente inactivo).

En algunas formas de realización de los métodos de la invención, la expresión de un gen de Serpina1 se inhibe en por lo menos aproximadamente 5%, por lo menos aproximadamente 10%, por lo menos aproximadamente 15%, por lo menos aproximadamente 20%, por lo menos aproximadamente 25%, por lo menos aproximadamente 30%, por lo menos aproximadamente

35%,por lo menos aproximadamente 40%, por lo menos aproximadamente 45%, por lo menos aproximadamente 50%, por lo menos aproximadamente 55%, por lo menos aproximadamente 60%, por lo menos aproximadamente 65%, por lo menos aproximadamente 70%, por lo menos aproximadamente 75%, por lo menos aproximadamente 80%, por lo menos aproximadamente 85%, por lo menos aproximadamente 90%, por lo menos aproximadamente 91%, por lo menos aproximadamente 92%, por lo menos aproximadamente 93%, por lo menos aproximadamente 94%, por lo menos aproximadamente 95%, por lo menos aproximadamente 96%, por lo menos aproximadamente 97%, por lo menos aproximadamente 98% o por lo menos aproximadamente 99%.

La inhibición de la expresión de un gen de Serpina1 se puede manifestar por una reducción de la cantidad de ARNm expresada por una primera célula o grupo de células (dichas células pueden estar presentes, por ejemplo, en una muestra que se obtiene de un sujeto) en el cual se ha transcrito un gen de Serpina1 y que tiene o se ha tratado (por ejemplo, poniendo en contacto a la célula o células con un agente de ARNi de la invención, o por administración de un agente de ARNi de la invención a un sujeto en el cual las células están o estaban presentes) de manera tal que la expresión de inhibir al gen de Serpina1, en comparación con una segunda célula o grupo de células sustancialmente idéntica a la primera célula o grupo de células pero que no tiene o no ha sido tratada de esa manera (célula(s) de control). En las formas de realización preferidas, la inhibición se evalúa expresando el nivel de ARNm en las células tratadas como un porcentaje del nivel de ARNm en las células de control, usando la siguiente fórmula:

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

Como alternativa, se puede evaluar la inhibición de la expresión de un gen de Serpina1 en términos de la reducción de un parámetro que está funcionalmente ligado a la expresión del gen de Serpina1, por ejemplo, la expresión de una proteína Serpina1, tal como ALT, fosfatasa alcalina, bilirrubina, protrombina y albúmina. El silenciamiento del gen de Serpina1 se puede determinar en cualquier célula que expresa Serpina1, ya sea de manera constitutiva o por manipulación genómica, y mediante cualquier ensayo conocido en el arte. El hígado es el principal sitio de expresión de Serpina1. Otros sitios de expresión significativos incluyen pulmones e intestinos.

La inhibición de la expresión de una proteína Serpina1 se puede manifestar por una reducción en el nivel de la proteína Serpina1 que es expresada por una célula o grupo de células (por ejemplo, el nivel de proteína expresada en una muestra que se obtuvo de un sujeto). Como se explicó anteriormente para la evaluación de la supresión del ARNm, la inhibición de los niveles de expresión de la proteína en una célula o grupo de células tratadas se puede expresar de manera similar como un porcentaje del nivel de proteína en una célula o grupo de células de control.

Una célula o grupo de células de control que se pueden utilizar para evaluar la inhibición de la expresión de un gen de Serpina1 incluye una célula o grupo de células que aún no se ha puesto en contacto con un agente de ARNi de la invención. Por ejemplo, la célula o el grupo de células de control se pueden obtener de un sujeto individual (por ejemplo, un sujeto humano o animal) antes de tratar al sujeto con un agente de ARNi.

El nivel de ARNm de la Serpina1 que es expresado por una célula o

grupo de células, o el nivel de ARNm Serpina1 en la circulación, se puede determinar usando cualquier método conocido en el arte para evaluar la expresión de ARNm. En una forma de realización, el nivel de expresión de Serpina1 en una muestra se determina detectando un polinucleótido transcrito, o una parte del mismo, por ejemplo, ARNm del gen de Serpina1. El ARN se puede extraer de las células usando técnicas de extracción de ARN que incluyen, por ejemplo, el uso de extracción con fenol e isotiocianato de guanidinio en medio ácido (ARNzol B; Biogenesis), conjunto de elementos RNeasy para la preparación de ARN (Qiagen) o PAXgene (PreAnalytix, Suiza). Los formatos de ensayo típicos en los que se utiliza la hibridación de ácido ribonucleico incluyen ensayos nucleares de tipo *run-on*, RT-PCR, ensayos de protección de RNasa (Melton *et al.*, *Nuc. Acids Res*., 12: 7035), transferencia Northern, hibridación *in situ* y análisis de micromatrices.

En una forma de realización, el nivel de expresión de Serpina1 se determina usando una sonda de ácido nucleico. El término “sonda”, según se usa en la presente, se refiere a cualquier molécula que sea capaz de unirse selectivamente a una Serpina1 específica. El especialista en el arte puede sintetizar las sondas, o las mismas se pueden obtener de preparados biológicos apropiados. Las sondas se pueden diseñar específicamente para ser marcadas. Los ejemplos de moléculas que se pueden utilizar como sondas incluyen, pero de manera no taxativa, ARN, ADN, proteínas, anticuerpos y moléculas orgánicas.

El ARNm aislado se puede utilizar en ensayos de hibridación o amplificación que incluyen, pero de manera no taxativa, análisis Southern o Northern, análisis por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y matrices de

sondas. Un método para la determinación de los niveles de ARNm incluye poner en contacto al ARNm aislado con una molécula de ácido nucleico (sonda) que puede hibridizarse con un ARNm de la Serpina1. En una forma de realización, el ARNm se inmoviliza sobre una superficie sólida y se pone en contacto con una sonda, por ejemplo corriendo el ARNm aislado en un gel de agar/agarosa y transfiriendo al ARNm del gel a una membrana, por ejemplo de nitrocelulosa. En una forma de realización alternativa, la(s) sonda(s) se inmovilizan sobre una superficie sólida y el ARNm se pone en contacto con la(s) sonda(s), por ejemplo, en un chip de matriz de genes Affymetrix. Un especialista puede adaptar fácilmente algún método de detección de ARNm conocido para utilizarlo en la determinación del nivel de ARNm de la Serpina1.

Un método alternativo para determinar el nivel de expresión de Serpina1 en una muestra incluye el proceso de amplificación del ácido nucleico y/o transcriptasa inversa (para preparar ADNc) por ejemplo del ARNm de la muestra, por ejemplo, por RT-PCR (la forma de realización experimental que se establece en Mullis, 1987, Patente de los EE.UU. N°: 4.683.202), reacción en cadena de la ligasa (Barany (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 189-193), replicación de secuencia autosostenida (Guatelli et al. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 1874-1878), sistema de amplificación transcripcional (Kwoh *et al.* (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 1173-1177), Q-Beta Replicasa (Lizardi *et al*. (1988) *Bio/Technology* 6: 1197), replicación en círculo rodante (Lizardi et al., Patente de los EE.UU. N°: 5.854.033) o cualquier otro método de amplificación del ácido nucleico, seguido por la detección de las moléculas amplificadas usando técnicas bien conocidas por los especialistas en el arte. Dichos esquemas de detección son especialmente útiles para la detección de

moléculas de ácidos nucleicos si dichas moléculas están presentes en números muy bajos. En algunos aspectos particulares de la invención, el nivel de expresión de Serpina1 se determina por RT-PCR fluorogénica cuantitativa (*es decir*, el Sistema TaqMan™).

Los niveles de expresión de ARNm de la Serpina1 se pueden monitorear usando una transferencia con membrana (tal como se utiliza la en los análisis de hibridación tales como mediante transferencia Northern, Southern, puntual y otros similares), o micropocillos, tubos de muestra, geles, cuentas o fibras (o cualquier soporte sólido que comprenda ácidos nucleicos unidos). Véanse las Patentes de los EE.UU. N°: 5.770.722, 5.874.219, 5.744.305, 5.677.195 y 5.445.934, que se incorporan en la presente a modo de referencia. La determinación del nivel de expresión de Serpina1 también puede comprender el uso de sondas de ácido nucleico en solución.

En las formas de realización preferidas, el nivel de la expresión de ARNm se evalúa usando ensayos de ADN ramificado (ADNr) o PCR en tiempo real (qPCR). El uso de dichos métodos se describe y ejemplifica en los Ejemplos que se presentan aquí.

El nivel de expresión de la proteína Serpina1 se puede determinar usando cualquier método conocido en el arte para la medición de los niveles de proteínas. Dichos métodos incluyen, por ejemplo, electroforesis, electroforesis capilar, cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), cromatografía en capa delgada (TLC), cromatografía de hiperdifusión, reacciones de precipitinas en fluido o en gel, espectroscopía de absorción, ensayos colorimétricos, ensayos espectrofotométricos, citometría de flujo, inmunodifusión (única o doble), inmunoelectroforesis, transferencia Western, radioinmunoensayos

(RIA), ensayos de inmunosorción enzimática (ELISA), ensayos de inmunofluorescencia, ensayos de electroquimioluminiscencia, y otros similares.

El término “muestra” según se usa en la presente, se refiere a un conjunto de fluidos, células o tejidos similares aislados de un sujeto, así como fluidos, células o tejidos presentes dentro de un sujeto. Los ejemplos de fluidos biológicos incluyen: sangre, suero y fluidos serosos, plasma, linfa, orina, fluido cerebroespinal, saliva, fluidos oculares, y otros similares. Las muestras de tejido pueden incluir muestras de tejidos, de órganos o de regiones localizadas. Por ejemplo, las muestras pueden derivar de órganos particulares, de partes de órganos o de fluidos o de células de dichos órganos. En determinadas formas de realización, se pueden obtener muestras del hígado (por ejemplo, hígado completo o de ciertos segmentos del hígado o ciertos tipos de células del hígado, tales como, por ejemplo, hepatocitos). En las formas de realización preferidas, una “muestra que se obtuvo de un sujeto” se refiere a sangre o plasma extraídos del sujeto. En otras formas de realización, una “muestra que se obtuvo de un sujeto” se refiere a un tejido del hígado que se pueden obtener del sujeto.

En algunas formas de realización de los métodos de la invención, el agente de ARNi se administra a un sujeto de manera tal que el agente de ARNi se suministra a un sitio específico dentro del sujeto. La inhibición de la expresión de Serpina1 se puede evaluar usando mediciones del nivel o de los cambios del nivel de ARNm de la Serpina1 o de la proteína Serpina1 en una muestra de fluido o tejido que se puede obtener del sitio específico dentro del sujeto. En formas de realización preferidas, el sitio es el hígado. El sitio también puede ser una subsección o un subgrupo de células provenientes de

cualquiera de los sitios mencionados anteriormente. El sitio también puede incluir células que expresan un tipo de receptor en particular.

VII. Métodos para tratar o prevenir una enfermedad asociada a Serpina1

La presente invención también provee métodos para tratar o prevenir aquellas enfermedades y aquellas condiciones que se pueden modular mediante la regulación negativa de la expresión del gen que codifica la Serpina1. Por ejemplo, las composiciones que se describen en la presente se pueden usar para tratar enfermedades asociadas a la Serpina1, tales como enfermedades hepáticas, por ejemplo, una enfermedad hepática crónica, una inflamación hepática, cirrosis, fibrosis hepática y/o carcinoma hepatocelular, y otras condiciones patológicas que pueden estar asociados con estos trastornos, tal como una inflamación pulmonar, enfisema y EPOC.

La presente invención también provee métodos para inhibir el desarrollo de un carcinoma hepatocelular en un sujeto, por ejemplo, un sujeto que presenta una variante de la deficiencia de Serpina1. Los métodos incluyen administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición de la invención al sujeto, y así inhibir el desarrollo del carcinoma hepatocelular en el sujeto.

La presente invención también provee métodos y usos de las composiciones de la invención para reducir la acumulación de Serpina1 mal plegada en el hígado de un sujeto, por ejemplo, un sujeto que presenta una variante de la deficiencia de Serpina1. Los métodos incluyen administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición de la invención al sujeto, reduciendo así la acumulación de Serpina1 mal plegada en el hígado del sujeto.

Según se usa en la presente, un "sujeto" incluye un ser humano o un animal no humano, preferentemente un vertebrado, y más preferentemente un mamífero. Un sujeto puede incluir un organismo transgénico. Con mayor preferencia, el sujeto es un ser humano, tal como un ser humano que sufre o que tiene predisposición para desarrollar una enfermedad asociada a Serpina1. En una forma de realización, dicho sujeto que padece o que tiene predisposición para desarrollar una enfermedad asociada a Serpina1 tiene uno o más alelos deficientes en Serpina1, por ejemplo, un alelo PIZ, PIS o PIM(Malton).

En formas de realización adicionales de la invención, el agente de ARNi de la invención se administra en combinación con un agente terapéutico adicional. El agente de ARNi y el agente terapéutico adicional se pueden administrar en combinación en la misma composición, por ejemplo, por vía parenteral, o el agente terapéutico adicional se puede administrar como parte de una composición separada o mediante otro método descrito en la presente.

Los ejemplos de agentes terapéuticos adicionales adecuados para su uso en los métodos de la invención incluyen los agentes conocidos para el tratamiento de trastornos hepáticos, tal como una cirrosis hepática. Por ejemplo, el agente de ARNi divulgado en la invención se puede administrar, por ejemplo, con ácido ursodeoxicólico (UDCA), agentes inmunosupresores, metotrexato, corticosteroides, ciclosporina, colchicina, tratamientos antipruríticos, tales como antihistaminas, colestiramina, colestipol, rifampina, dronabinol (Marinol) y plasmaféresis, antibióticos profilácticos, luz ultravioleta, suplementos de zinc y vacunas contra hepatitis A, influenza y pneumococos.

En algunas formas de realización de los métodos de acuerdo con la

invención, la expresión de la Serpina1 se reduce durante un período prolongado, por ejemplo, durante por lo menos una semana, dos semanas, tres semanas, cuatro semanas o más. A modo de ejemplo, en determinados casos, la expresión del gen que codifica la Serpina1 se suprime por lo menos aproximadamente 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50% o 55% mediante la administración de un agente de ARNi como los que se describen en la presente. En algunas formas de realización, la expresión del gen que codifica la Serpina1 se suprime por lo menos aproximadamente un 60%, 70% u 80% mediante la administración del agente de ARNi. En algunas formas de realización, la expresión del gen que codifica la Serpina1 se suprime por lo menos aproximadamente 85%, 90% u 95% mediante la administración del agente de ARNi.

Los agentes de ARNi de la invención se pueden administrar a un sujeto usando cualquier modo de administración conocido en el arte, incluyendo, pero de manera no taxativa, subcutánea, intravenosa, intramuscular, intraocular, intrabronquial, intrapleural, intraperitoneal, intraarterial, linfática, cerebroespinal y cualquier combinación de los anteriores. En formas de realización preferidas, los agentes de ARNi se administran por vía subcutánea.

En algunas formas de realización, la administración se efectúa mediante una inyección depot. La inyección depot puede liberar los agentes de ARNi en una forma consistente sobre un periodo de tiempo prolongado. Por consiguiente, la inyección depot puede reducir la frecuencia de dosificación necesaria para obtener un efecto deseado, por ejemplo, la inhibición deseada de Serpina1, o un efecto terapéutico o profiláctico. La inyección depot también puede proporcionar concentraciones en suero más consistentes. Las

inyecciones depot pueden incluir inyecciones subcutáneas o inyecciones intramusculares. En formas de realización preferidas, la inyección depot es una inyección subcutánea.

En algunas formas de realización, la administración se efectúa mediante una bomba. La bomba puede ser una bomba externa o una bomba implantada quirúrgicamente. En determinadas formas de realización, la bomba es una bomba osmótica implantada subcutáneamente. En otras formas de realización, la bomba es una bomba de infusión. Se puede usar una bomba de infusión para las infusiones intravenosas, subcutáneas, arteriales o epidurales. En formas de realización preferidas, la bomba de infusión es una bomba de infusión subcutánea. En otras formas de realización, la bomba es una bomba implantada quirúrgicamente que administra el agente de ARNi en el hígado.

Otros modos de administración incluyen los modos epidural, intracerebral, intracerebroventricular, administración nasal, intraarterial, intracardíaca, infusión intraósea, intratecal, e intravítrea y pulmonar. El modo de administración se puede elegir sobre la base de si se desea un tratamiento local o sistémico y basado en el área a tratar. La ruta y el sitio de administración se pueden seleccionar para mejorar el direccionamiento.

Los métodos de la invención comprenden administrar un agente de ARNi en una dosis suficiente para suprimir/disminuir los niveles del ARNm de la Serpina1 durante por lo menos 5 días, más preferiblemente durante por lo menos 7, 10, 14, 21, 25, 30 ó 40 días, y opcionalmente administrar una segunda dosis del agente, donde la segunda administración individual puede realizarse por lo menos 5 días después de la primera, más preferiblemente por lo menos 7, 10, 14, 21, 25, 30 ó 40 días después de la primera, de manera tal

de inhibir la expresión del gen de Serpina1 en el sujeto.

En una forma de realización, las dosis del agente de ARNi se administran no más de una vez cada cuatro semanas, no más de una vez cada tres semanas, no más de una vez cada dos semanas o no más de una vez por semana. En otra forma de realización, la administración puede prolongarse durante uno, dos, tres o seis meses, o incluso durante un año o más.

En general, el agente de ARNi no activa el sistema inmune, por ejemplo, no provoca un incremento en el nivel de las citoquinas, tales como los niveles de TNF-alfa o IFN-alfa. A modo de ejemplo, cuando se recurre a un ensayo como un análisis con PBMC in vitro, que puede ponerse en práctica como se describe en la presente, el nivel del TNF-alfa o del IFN-alfa puede incrementarse menos de 30%, 20% o 10%, con relación al que podría determinarse en células de control que hubieran sido tratadas con un ARNi de control, por ejemplo, con un ARNi que no estuviera dirigido a la Serpina1.

A modo de ejemplo, a un sujeto se le puede administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente de ARNi, por ejemplo, 0,5 mg/kg, 1,0 mg/kg, 1,5 mg/kg, 2,0 mg/kg o 2,5 mg/kg de ARNhd. La administración del agente de ARNi puede llevarse a cabo por medio de una infusión intravenosa, sobre un período de tiempo determinado, por ejemplo, durante un período de 5 minutos, 10 minutos, 15 minutos, 20 minutos o 25 minutos. La administración puede repetirse, por ejemplo, de manera regular, por ejemplo, cada dos semanas, de manera mensual, cada dos meses, cada tres meses, cada cuatro meses o a intervalos más prolongados.

Después del régimen de tratamiento inicial, los tratamientos se pueden administrar sobre una base menos frecuente. Por ejemplo, después de llevar a

cabo una administración cada dos semanas durante un período de tres meses, la administración puede repetirse una vez por mes, durante seis meses, durante un año o durante un período más prolongado. La administración del agente de ARNi puede dar como resultado una disminución en el nivel de la Serpina1, por ejemplo, en una célula, en un tejido, en la sangre, en la orina, órgano (por ejemplo, el hígado) u otro compartimento del paciente, de por lo menos 10%, de por lo menos 15%, de por lo menos 20%, de por lo menos 25%, de por lo menos 30%, de por lo menos 40%, de por lo menos 50%, de por lo menos 60%, de por lo menos 70%, de por lo menos 80 % o de por lo menos 90%, o puede dar como resultado una disminución incluso mayor.

Antes de administrar una dosis completa de un agente de ARNi, a los pacientes puede administrárseles una dosis más pequeña, y monitorear si se produjeron efectos adversos, por ejemplo, reacciones alérgicas o incrementos en el nivel de lípidos o de la presión sanguínea. En otro ejemplo, el paciente puede ser monitoreado por efectos inmunoestimulantes indeseados, tal como un aumento en los niveles de citoquinas (por ejemplo, TNF-alfa o INF-alfa). Un ejemplo de dosis más pequeñas es aquel que da como resultado una incidencia de una reacción a la infusión menor o igual al 5%.

La eficacia del tratamiento o de la prevención de la enfermedad se puede evaluar, por ejemplo, midiendo el progreso de la enfermedad, la remisión de la enfermedad, la severidad de los síntomas, la reducción del dolor, la calidad de vida, la dosis de la medicación requerida para conservar el efecto del tratamiento, el nivel de un marcador de la enfermedad o cualquier otro parámetro mensurable apropiado para una enfermedad dada bajo tratamiento o buscada como blanco para la prevención. Es propio de la capacidad de un

especialista en el arte monitorear la eficacia del tratamiento o de la prevención mediante la medición de cualquiera de dichos parámetros o cualquier combinación de parámetros. Por ejemplo, se puede evaluar la eficacia del tratamiento de fibrosis hepática o el alivio de la fibrosis hepática, por ejemplo por monitoreo periódico de marcadores de fibrosis hepática: a-2-macroglobulin(a-MA), transferrina, apolipoproteína Al, ácido hialurónico (HA), laminina, procolágeno III (PIIINP) N terminal, colágeno 7S IV (7S-IV), bilirrubina total, bilirrubina indirecta, alanina aminotransferasa (ALT), aspartato aminotransferasa (AST), AST/ ALT, g-glutamil transpeptidasa (GGT), fosfatasa alcalina (ALP), albúmina, albúmina/globulina, nitrógeno ureico en sangre (BUN), creatinina (Cr), triglicéridos, colesterol, lipoproteína de alta densidad y lipoproteína de baja densidad y biopsia de punción hepática. Los marcadores hepáticos de fibrosis se pueden medir y/o se puede conducir una biopsia de punción hepática antes del tratamiento (lecturas iniciales) y después (lecturas posteriores) durante el régimen de tratamiento.

La comparación de las últimas lecturas con las lecturas iniciales le ofrece al médico una indicación de la eficacia del tratamiento. Es propio de la capacidad de un especialista en el arte monitorear la eficacia del tratamiento o de la prevención mediante la medición de cualquiera de dichos parámetros o cualquier combinación de parámetros. Con relación a la administración de un agente de ARNi dirigido a Serpina1 o de una composición farmacéutica con el mismo, el que sea "efectiva contra" una enfermedad asociada a Serpina1, tal como una enfermedad hepática, por ejemplo, una condición de fibrosis hepática, indica que la administración de un agente de ARNi de la invención de una manera clínicamente apropiada da como resultado un efecto beneficioso

en por lo menos una fracción estadísticamente significativa de los pacientes, tal como una mejora de los síntomas, una cura, una reducción en la carga de la enfermedad, una reducción de la masa tumoral o de la cantidad de células, una extensión de la vida, una mejora en la calidad de vida u otro efecto en general reconocida como positiva por los médicos familiarizados con el tratamiento de enfermedades hepáticas.

En los métodos de la invención, el agente de ARNi descrito en la presente se puede usar para tratar a los individuos que presentan los signos, los síntomas y/o marcadores, o que recibieron un diagnóstico o que tienen riesgo de sufrir una enfermedad asociada con Serpina1, tal como una enfermedad hepática, por ejemplo, una inflamación hepática, cirrosis, fibrosis hepática y/o carcinoma hepatocelular. Un especialista en el arte puede monitorear fácilmente los signos, los síntomas y/o los marcadores de tales trastornos en sujetos que reciben tratamiento con un agente de ARNi descrito en la presente y evaluar la reducción de estos signos, síntomas y/o marcadores en por lo menos un 10% y preferiblemente hasta un nivel clínico que representa un riesgo bajo de enfermedad hepática.

El tratamiento o efecto preventivo es evidente cuando hay una mejora estadísticamente significativa de uno o más parámetros del estado de enfermedad o cuando no hay un empeoramiento o no hay desarrollo de síntomas que por el contrario se podrían haber anticipado. A modo de ejemplo, un cambio favorable de por lo menos un 10% en un parámetro de enfermedad mensurable (tal como una función hepática descrita *supra*), y preferiblemente por lo menos un 20%, 30%, 40%, 50% o más, puede ser indicativo de un tratamiento eficaz.

La eficacia de un agente de ARNi dado de acuerdo con la invención o de una formulación de dicho agente de ARNi también se puede analizar en un modelo experimental basado en animales de la enfermedad que se desea tratar, lo cual ha de resultar conocido en el arte. Cuando se usa un modelo experimental en animales, la eficacia del tratamiento resulta evidente cuando se observa una reducción estadísticamente significativa de un marcador o síntoma.

El tratamiento o efecto preventivo también resulta evidente cuando hay una reducción o alivio de uno o más síntomas. Por ejemplo, el tratamiento o la prevención es efectivo cuando se reduce o alivia uno o más entre debilidad, fatiga, pérdida de peso, náuseas, vómitos, hinchazón abdominal, hinchazón de extremidades, picazón excesiva e ictericia de ojos y/o la piel.

Para determinadas indicaciones, la eficacia se puede medir con un incremento en los niveles en suero de la proteína Serpina1. A modo de ejemplo, un aumento de los niveles en suero de Serpina1 apropiadamente plegada de por lo menos un 10%, por lo menos un 20%, por lo menos un 50%, por lo menos un 100%, por lo menos un 200% más puede ser indicativo de la eficacia del tratamiento.

Como alternativa, la eficacia se puede medir por una reducción en la severidad de la enfermedad determinada por un especialista en el arte de diagnóstico sobre la base de una escala graduada de severidad de la enfermedad clínicamente aceptada, como por ejemplo la calificación de Child-Pugh (a veces la calificación de Child-Turcotte-Pugh). En este ejemplo, el pronóstico de una enfermedad hepática crónica, fundamentalmente cirrosis, se mide por una calificación de agregados de cinco medidas clínicas, bilirrubina,

albúmina en suero, INR, ascites y encefalopatía hepática. A cada marcador se le asigna un valor de 1-3, y el valor total se usa para proveer una calificación clasificación como A (5-6 puntos), B (7-9 puntos) o C (10-15 puntos), que se puede correlacionar con índices de supervivencia de uno y dos años. Los métodos para la determinación y el análisis de la calificación de Child-Pugh son bien conocidos en el arte (Farnsworth et al, *Am J Surgery* 2004 188: 580-583; Child y Turcotte, *Surgery and portal hipertension*, en: *The liver and portal hypertension*, editado por CG Child, Filadelfia: Saunders 1964: 50- 64; Pugh et al, *Br J Surg* 1973; 60: 648-52). La eficacia se puede medir en este ejemplo por el paso de un paciente, por ejemplo, de "B" a "A". Cualquier cambio positivo que, por ejemplo, da como resultado una disminución de la severidad de la enfermedad medida usando la escala apropiada, representa un tratamiento adecuado usando un ARNi o una formulación de ARNi descrita en la presente.

En una forma de realización, el agente de ARNi se administra a una dosis de entre aproximadamente 0,25 mg/kg y aproximadamente 50 mg/kg, por ejemplo, entre aproximadamente 0,25 mg/kg y aproximadamente 0,5 mg/kg, entre aproximadamente 0,25 mg/kg y aproximadamente 1 mg/kg, entre aproximadamente 0,25 mg/kg y aproximadamente 5 mg/kg, entre aproximadamente 0,25 mg/kg y aproximadamente 10 mg/kg, entre aproximadamente 1 mg/kg y aproximadamente 10 mg/kg, entre aproximadamente 5 mg/kg y aproximadamente 15 mg/kg, entre aproximadamente 10 mg/kg y aproximadamente 20 mg/kg, entre aproximadamente 15 mg/kg y aproximadamente 25 mg/kg, entre aproximadamente 20 mg/kg y aproximadamente 30 mg/kg, entre aproximadamente 25 mg/kg y aproximadamente 35 mg/kg, o entre

aproximadamente 40 mg/kg y aproximadamente 50 mg/kg.

La dosis del agente de ARNi que se le administra al sujeto puede ser apropiada para alcanzar un equilibrio entre los riesgos y los beneficios de una dosis particular, por ejemplo, para producir un nivel deseado de supresión del gen de Serpina1 (evaluado, por ejemplo, basado en la supresión del ARNm de Serpina1 o de la expresión de la proteína Serpina1) o para obtener un efecto terapéutico o profiláctico deseado y para evitar simultáneamente los efectos colaterales indeseables.

En algunas formas de realización, el agente de ARNi se administra en dos o más dosis. Si se desean facilitar las infusiones repetidas o frecuentes, puede ser aconsejable el implante de un dispositivo de administración, por ejemplo, una bomba, una cánula o Stent semipermanente (por ejemplo, intravenosa, intraperitoneal, intracisternal o intracapsular) o un reservorio. En algunas formas de realización, el número o la cantidad de dosis subsiguientes depende del logro de un efecto deseado, por ejemplo, la supresión de un gen de Serpina1, o el logro de un efecto profiláctico o terapéutico, por ejemplo, la reducción de un síntoma de hipercolesterolemia. En algunas formas de realización, el agente de ARNi se administra de acuerdo con un esquema programado. Por ejemplo, el agente de ARNi se puede administrar una vez por semana, dos veces por semana, tres veces por semana, cuatro veces por semana o cinco veces por semana. En algunas formas de realización, el esquema programado involucra administraciones separadas regularmente, por ejemplo, cada hora, cada cuatro horas, cada seis horas, cada ocho horas, cada doce horas, diariamente, cada 2 días, cada 3 días, cada 4 días, cada 5 días, semanalmente, bisemanalmente o mensualmente. En otras formas de

realización, el esquema programado involucra administraciones separadas por poco tiempo seguidas por un periodo de tiempo más largo durante el cual no se administra el agente.

En algunas formas de realización, el agente de ARNi se administra con un régimen de dosificación que incluye una “fase de carga” de administraciones muy frecuentes, que puede ser seguida de una “fase de mantenimiento”, en la cual el agente de ARNi se administra a intervalos más separados.

Cualquiera de dichos programas se puede repetir opcionalmente una o más veces. El número de iteraciones puede depender de si se obtiene un efecto deseado, por ejemplo, la supresión de un gen Serpina1, y/o de si se obtiene un efecto terapéutico o profiláctico, por ejemplo, la reducción de un síntoma de una enfermedad asociada con Serpina1, por ejemplo una enfermedad hepática.

En otro aspecto, la invención provee un método para instruir a un usuario final, por ejemplo, un profesional de la salud o un sujeto, sobre cómo administrar un agente de ARNi descrito en la presente. El método incluye, opcionalmente, proveer al usuario final una o más dosis del agente de ARNi, e instruir el usuario final sobre cómo administrar el agente de ARNi según un régimen descrito aquí, instruyendo de esa manera al usuario final.

La predisposición genética desempeña un papel en el desarrollo de enfermedades asociadas al gen blanco, por ejemplo, la hiperlipidemia. Por lo tanto, se puede identificar un paciente que necesita un ARNpi tomando un historial familiar, o, por ejemplo, realizando una selección de uno o más marcadores o variantes genéticos. Por lo tanto, en un aspecto, la invención provee un método de tratamiento de un paciente por selección del paciente

basado en que dicho paciente presenta uno o más entre una deficiencia de Serpina1 o una variante de deficiencia del gen de Serpina1, por ejemplo, un alelo PIZ, PIS o PIM(Malton). El método incluye administrar al paciente un agente de ARNi en una cantidad terapéuticamente eficaz.

Un proveedor de salud, como por ejemplo un doctor, una enfermera o un miembro de la familia, puede realizar una historia familiar antes de prescribir o administrar un agente de ARNi de la invención. Además, se puede llevar a cabo una prueba para determinar un genotipo o fenotipo. Por ejemplo, se puede llevar a cabo una prueba de ADN con una muestra del paciente, por ejemplo, una muestra de sangre, para identificar el genotipo y/o fenotipo de Serpina1 antes de administrar al paciente un ARNhd de Serpina1.

VIII. Kits

La presente invención también provee conjuntos de elementos para usar cualquiera de los agentes de ARNi y/o llevar a cabo cualquiera de los métodos de la invención. Dichos conjuntos de elementos incluyen uno o más agente(s) de ARNi e instrucciones para su uso, por ejemplo, instrucciones para inhibir la expresión de un Serpina1 en una célula por contacto de la célula con el(los) agente(s) de ARNi en una cantidad eficaz para inhibir la expresión del Serpina1. Los conjuntos de elementos además pueden comprender opcionalmente medios para poner la célula en contacto con el agente de ARNi (por ejemplo, un dispositivo de inyección), o medios para medir la inhibición de Serpina1 (por ejemplo, medios para medir la inhibición del ARNm de Serpina1). Dichos medios para medir la inhibición de Serpina1 pueden comprender medios para obtener una muestra de un sujeto, tal como, por ejemplo, una muestra de plasma. Los conjuntos de elementos de la invención pueden

comprender opcionalmente además medios para administrar el(los) agente(s) de ARNi a un sujeto o medios para determinar la cantidad terapéuticamente eficaz o profilácticamente eficaz.

A menos que se definan de otro modo, todos los términos científicos y técnicos usados en la presente tienen el mismo significado que le dan los especialistas en el arte al que concierne esta invención. Aunque se pueden usar métodos y materiales similares o equivalentes de aquellos que se describen en la presente en la práctica o para evaluar los ARNi y los métodos presentados en la invención, más adelante se describen los métodos y los materiales adecuados. Todas las publicaciones, solicitudes de patente, patentes y otras referencias mencionadas aquí se incorporan por completo en la presente a modo de referencia. En caso de conflicto, prevalecerá la presente descripción, inclusive las definiciones. Además, los materiales, los métodos y los ejemplos solamente se ofrecen a efectos ilustrativos y no en un sentido limitativo.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Mitigación de los efectos fuera del blanco y toxicidad *in vivo*

La interferencia de ARN o “ARNi” es un término que fue acuñado inicialmente por Fire y sus colaboradores para describir la observación que un ARNi de hebra doble (ARNhd) puede bloquear la expresión genética (Fire *et al.,* (1998) *Nature* 391, 806-811; Elbashir *et al.,* (2001) *Genes Dev*., 15, 188-200). El ARNhd corto dirige el silenciamiento de postranscripción específico del gen, en muchos organismos, incluyendo vertebrados, y ha proporcionado una herramienta nueva para estudia la función de los genes. El ARNi está mediados por el complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC), una

nucleasa de múltiples componentes, específica de la secuencia, que destruye los ARN mensajeros homólogos del disparador de silenciamiento. Se sabe que el RISC contiene ARN cortos (aproximadamente 22 nucleótidos) derivados del disparador de ARN de hebra doble, pero aún se desconocen los componentes proteicos de esta actividad.

Uno de los efectos fuera del blanco del ARNip es el efecto tipo ARNmi: la proteína argonauta, el efector central en la interferencia de ARN, trata al ARNip, que se introduce artificialmente a fin de inducir la interferencia de ARN, como un ARNmi (ARNmicro). (Lam *et al.,* (2015) *Molecular Therapy Nucleic Acids* (2015) 4, e252). El ARNmi reconoce un gen blanco mayormente a través del apareamiento de bases entre la región de siembra (posiciones 2-7 desde el extremo 5') y el ARNm blanco para la supresión del gen. Los efectos fuera del blanco causados por los ARNip se originan en la complementariedad de bases de las regiones de siembra de la hebra antisentido cargada con RISC del ARNip con uno o más ARNm. Se han descrito efectos fuera del blanco tipo ARNmi de los ARNip en varios estudios, y afectan la expresión de una pluralidad de genes dependiendo de las secuencias de las regiones de siembra y son suficientemente serios como para causar hasta un 30% de los aciertos positivos en la selección del fenotipo basada en el ARNip. Adicionalmente, en el caso de los ARNmi, también fueron descritos para silenciar genes blanco a través de apareamientos compensatorios dentro de sus regiones de extremos 3' terminales (apareamiento compensatorio 3') cuando las interacciones entre la región de siembra y los blancos se vuelven débiles, lo que implica que los efectos fuera del blanco tipo ARNmi probablemente están mediados por dicho mecanismo.

Como se describirá más adelante, se ha descubierto que los agentes de ARNhd, donde la hebra antisentido comprende por lo menos una modificación térmicamente desestabilizante del dúplex dentro de la región de siembra (es decir, en las posiciones 2-9 del extremo 5’ de la hebra antisentido, contando desde el extremo 5’) y/o el agente de ARNhd tiene una temperatura de fusión en el rango entre aproximadamente 40 °C y aproximadamente 80 °C puede ser más eficaz para mediar la interferencia de ARN que un agente de ARNhd parental sin la modificación desestabilizante. Dichos agentes son ventajosos para inhibir la expresión del gen blanco, al tiempo que tienen efectos de silenciamiento de genes fuera del blanco reducidos, así como las composiciones de ARNi adecuadas para uso terapéutico.

Materiales y métodos

Se utilizaron los siguientes materiales y métodos en los Ejemplos.

Diseño de ARNip

Se seleccionaron los principales agentes de ARNhd candidato en desarrollo dirigidos al inhibidor de serina peptidasa, clado A, miembro 1 (Serpina1) (AAT) para su evaluación en los experimentos que se describen en la presente. Los agentes de ARNhd dirigidos a Serpina1 que tienen la secuencia de nucleótidos modificada del principal candidato parental en desarrollo y que tienen una hebra antisentido que comprende por lo menos una modificación térmicamente desestabilizante del dúplex en la región de siembra (es decir, en las posiciones 2-9 del extremo 5’ de la hebra antisentido, contando desde el extremo 5’) y/o que tienen una temperatura de fusión en el rango entre aproximadamente 40 °C y aproximadamente 80 °C fueron diseñados, sintetizados y evaluados como se describirá a continuación.

Específicamente, como se describe en la Solicitud Provisional de Patente de los EEUU N°: 61/826.125, presentada el 22 de mayo, 2013, Solicitud Provisional de Patente de los EEUU N°: 61/898.695, presentada el 1 de noviembre, 2013; Solicitud Provisional de Patente de los EEUU N°: 61/979.727, presentada el 15 de abril, 2014; Solicitud Provisional de Patente de los EEUU N°: 61/989.028, presentada el 6 de mayo, 2014; Solicitud de Patente de los EEUU N°: 14/284.745, ahora presentada como Patente de los EEUU N°: 9.574.192, presentada el 21 de febrero, 2017; Solicitud de Patente de los EEUU N°: 15/399.820, presentada el 6 de enero, 2017; y la Solicitud de Patente Internacional N°: PCT/US2014/039109, presentada el 22 de mayo, 2014. La secuencia de nucleótidos de la hebra sentido no modificada de AD-61444 es 5’ – CUUCUUAAUGAUUGAACAAAA – 3’ (SEQ ID N°: 417) y la secuencia de nucleótidos no modificada de AD-61444 es 5’ – UUUUGUUCAAUCAUUAAGAAGAC – 3’ (SEQ ID N°: 419). La secuencia de nucleótidos de la hebra sentido modificada de AD-61444 es 5’ - csusucuuaauGfAfuugaacaaaaL96 – 3’ (SEQ ID N°: 418) y la secuencia de nucleótidos de la hebra antisentido modificada de AD-61444 es 5’ – usUfsuUfgUfuCfaAfucaUfuAfaGfaAfgsasc – 3’ (SEQ ID N°: 420).

Tabla B: Tabla 1: Abreviaturas de los monómeros de nucleótidos usados en la representación de las secuencias de los ácidos nucleicos.

Se comprenderá que estos monómeros, cuando están presentes en un oligonucleótido, están unidos mutuamente por medio de enlaces fosfodiéster 5'-3'.

Abreviatura	**Nucleótido(s)**
A	Adenosina-3’-fosfato
Af	2’-fluoroadenosina-3’-fosfato
Afs	2’-fluoroadenosina-3’-fosforotioato

Abreviatura	**Nucleótido(s)**
As	adenosina-3’-fosforotioato
C	citidina-3’-fosfato
Cf	2’-fluorocitidina-3’-fosfato
Cfs	2’-fluorocitidina-3’-fosforotioato
Cs	citidina-3’-fosforotioato
G	guanosina-3’-fosfato
Gf	2’-fluoroguanosina-3’-fosfato
Gfs	2’-fluoroguanosina-3’-fosforotioato
Gs	guanosina-3’-fosforotioato
T	5’-metiluridina-3’-fosfato
Tf	2’-fluoro-5-metiluridina-3’-fosfato
Tfs	2’-fluoro-5-metiluridina-3’-fosforotioato
Ts	5-metiluridina-3’-fosforotioato
U	Uridina-3’-fosfato
Uf	2’-fluorouridina-3’-fosfato
Ufs	2’-fluorouridina -3’-fosforotioato
Us	uridina -3’-fosforotioato
N	cualquier nucleótido (G, A, C, T o U)
a	2'-O-metiladenosina-3’-fosfato
as	2'-O-metiladenosina-3’- fosforotioato
c	2'-O-metilcitidina-3’-fosfato
cs	2'-O-metilcitidina-3’- fosforotioato
g	2'-O-metilguanosina-3’-fosfato
gs	2'-O-metilguanosina-3’- fosforotioato
t	2’-O-metil-5-metiluridina-3’-fosfato
ts	2’-O-metil-5-metiluridina-3’-fosforotioato
u)	2'-O-metiluridina-3’-fosfato
us	2'-O-metiluridina-3’-fosforotioato
s	enlace fosforotioato
L96	N-[tris(GalNAc-alquil)-amidodecanoil)]-4-hidroxiprolinol Hyp-(GalNAc-alquilo)3
Y44	ADN abásico invertido (2-hidroximetil-tetrahidrofuran-5-fosfato)
(Agn)	Ácido nucleico de adenosina-glicol (GNA)
(Cgn)	Ácido nucleico de citidina-glicol (GNA)
(Ggn)	Ácido nucleico de guanosina-glicol (GNA)
(Tgn)	Isómero S del ácido nucleico de timidina-glicol (GNA)
P	Fosfato
VP	Fosfato de vinilo
(Aam)	2`-O-(N-metilacetamida)adenosina-3`-fosfato
(Aams)	2`-O-(N-metilacetamida)adenosina-3`-fosforotioato
(Tam)	2`-O-(N-metilacetamida)timidina-3`-fosfato
(Tams)	2`-O-(N-metilacetamida)timidina-3`-fosforotioato

Abreviatura	Nucleótido(s)
dA	2`-desoxiadenosina-3`-fosfato
dAs	2`-desoxiadenosina-3`-fosforotioato
dC	2`-desoxicitidina-3`-fosfato
dCs	2`-desoxicitidina-3`-fosforotioato
dG	2`-desoxiguanosina-3`-fosfato
dGs	2`-desoxiguanosina-3`-fosforotioato
dT	2`-desoxitimidina-3`-fosfato
dTs	2`-desoxitimidina-3`-fosforotioato
dU	2`-desoxiuridina
dUs	2`-desoxiuridina-3`-fosforotioato

Síntesis y purificación

Todos los oligonucleótidos se prepararon con un sintetizador MerMade 192 a una escala de 1 µmol usando un soporte universal o personalizado. Todas las fosforamiditas se usaron a una concentración de 100 mM en 100% de acetonitrilo o acetonitrilo:DMF 9:1 con un protocolo estándar para fosforamiditas de 2-cianoetilo, excepto que el tiempo de acoplamiento se extendió a 400 segundos. La oxidación de los enlaces recién formados se logró usando una solución de I_2 50 mM en acetonitrilo:agua 9:1 para crear enlaces fosfato y DDTT 100 mM en piridina:acetonitrilo 9:1 para crear enlaces fosforotioato. Después de la síntesis sin tritilo, las columnas se incubaron con 150 µl de metilamina 40% acuoso durante 45 minutos y la solución se drenó en vacío a una placa de 96 pocillos. Después de repetir la incubación y el drenado con una porción fresca de metilamina acuosa, la placa que contiene la solución cruda de oligonucleótidos se selló y se agitó a temperatura ambiente durante 60 minutos adicionales para eliminar por completo todos los grupos protectores. de los oligonucleótidos crudos se llevó a cabo mediante adición de 1,2 ml de acetonitrilo:EtOH 9:1 a cada pocillo seguido por incubación a -20 °C durante la noche. Luego se centrifugó la placa a 3000 RPM durante 45 minutos, el sobrenadante se eliminó de cada pocillo y los pélets se

resuspendieron en 950 µl de NaOAc acuoso 20 mM. Cada solución cruda se desaló finalmente en una columna de desalado GE Hi-Trap (Sephadex G25 Superfine) usando agua para eluir los productos de oligonucleótidos finales. Todas las identidades y purezas se confirmaron usando HPLC ESI-MS y IEX, respectivamente.

Espectroscopía UV dependiente de la temperatura

Se condujeron estudios de fusión a una concentración del dúplex de 1 µM (que consiste en la hebra antisentido modificada apareada con la hebra sentido de ARN complementaria no modificada) en PBS 0,33 x (solución amortiguadora de fosfato con Na/K 3,3 mM, pH 7,4, con NaCl 46 mM y KCl 0,9 mM) en celdas de cuarzo con una longitud de paso de 1 cm en un espectrofotómetro Beckman DU800 equipado con termoprogramación. Cada cubeta contenía 200 µl de la solución de muestra cubierta por 125 µl de aceite mineral liviano. Las curvas de fusión se monitorearon a 260 nm con una velocidad de calentamiento de 1 °C/min de 15-90 °C. Las temperaturas de fusión (*T*m) se calcularon a partir de los primeros derivados de las curvas de calentamiento suavizadas y los valores informados son el resultado de por lo menos dos mediciones independientes.

Ensayos informantes in vitro

Se cultivaron células COS-7 a 37 °C, 5% de CO2 en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS). Las células se cotransfectaron en placas de 96 pocillos (15.000 células/pocillo) con 10 ng de plásmido informante de luciferasa y entre 50 fM y 50 nM de ARNip en diluciones 10x usando Lipofectamina 2000 2 µg/ml (Thermo Fisher Scientific) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Las

células se cosecharon a las 48 h después de la transfección en el ensayo de luciferasa doble (Promega) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. El plásmido informante en el blanco contenía un solo sitio perfectamente complementario de la hebra antisentido en la región no traducida 3' (3' UTR) de luciferasa Renilla. El plásmido informante fuera del blanco contenía cuatro sitios complementarios de siembra en tándem separados por 21 -28 nucleótidos en la 3' UTR de luciferasa Renilla. Ambos plásmidos coexpresaban la luciferasa de luciérnaga como un control de transfección.

Análisis de la expresión genética

Se cultivaron hepatocitos criopreservados de rata y humanos (Bioreclamation) a 37 °C, 5% de CO2, en una mezcla de medio InVitroGRO CP con antibióticos Torpedo. Las células se transfectaron en placas de 96 pocillos (20.000 células/pocillo) con ARNip 10 nM usando Lipofectamina RNAiMAX 2 µg/ml (Thermo Fisher Scientific) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Las células se cosecharon a las 24 h después de la transfección para la extracción de ARN con el kit miRNeasy (Qiagen) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Se prepararon bibliotecas de ADNc usando el kit TruSeq Stranded Total RNA Library Prep (Illumina) y se secuenciaron con un equipo NextSeq 500 (Illumina).

Estudios en ratón y rata in vivo

Todos los estudios se condujeron usando protocolos consistentes con las regulaciones locales, estatales y federales según corresponda y aprobados por los Comités Institucionales para el Cuidado y Uso de Animales de Experimentación [*Institutional Animal Care and Use Committees, (IACUC)*] en Alnylam Pharmaceuticals.

Para los estudios farmacodinámicos en ratón, se administró una sola dosis a ratones C57BL/6 hembra (Charles River Laboratories) de un control de vehículo (0,9% de cloruro de sodio, salina) o 0,5 ó 1 mg/kg de ARNip por vía subcutánea en la parte posterior del dorso. El Día 8, se recolectaron los hígados, se lavaron con salina fría, e inmediatamente se congelaron instantáneamente en nitrógeno líquido y se guardaron a -80 °C para el análisis de ARNm y ARNip.

En los estudios de toxicidad en rata, a ratas Sprague Dawley macho (Charles River Laboratories) tres dosis repetidas semanalmente (qw x 3) de un control de vehículo (0,9% de cloruro de sodio, salina) o ARNip 30 mg/kg por vía subcutánea en la parte superior del dorso. El Día 16, se recolectó suero para la evaluación de patología clínica y se recolectaron los hígados para la evaluación histopatológica y para el análisis de ARNm y ARNip.

Cuantificación del ARNm y ARNip

Se extrajo ARN con el kit miRNeasy (Qiagen) de acuerdo con las instrucciones del proveedor, se convirtió en ADNc con el kit para transcripción inversa High-Capacity DNAc Reverse Transcription (Thermo Fisher Scientific) de acuerdo con las instrucciones del proveedor, y se evaluaron los niveles de ARNm mediante una reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR) usando sondas Taqman específicas del gen (Thermo Fisher Scientific) con un equipo Roche Light Cycler 480 II usando LightCycler 480 Probes Master (Roche).

Para cuantificar la exposición a los ARNip, los pélets celulares se resuspendieron en solución amortiguadora salina con fosfato (PBS) que contiene 0,25% de Triton X-100, se calentaron a 95 °C durante 10 min, se

centrifugaron a 14.000 rpm a 4 °C durante 10 min, y se condujo una transcripción inversa con el sobrenadantes usando el kit de transcripción inversa TaqMan MicroRNA Reverse Transcription (Thermo Fisher Scientific) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. La qPCR se condujo con un equipo Roche Light Cycler 480 II usando LightCycler 480 Probes Master (Roche) de acuerdo con las instrucciones del proveedor.

Resultados

1. **Estudios *in vitro***

Los resultados del ensayo informante *in vitro* se resumen en la Tabla 1. Como lo muestran los datos de la Tabla 1, la modificación con ácido glicólico nucleico (GNA) en la posición 7 de la hebra antisentido conserva la actividad en el blanco mitigando al mismo tiempo la actividad fuera del blanco *in vitro*.

Tabla 1: Datos de los ensayos informantes *in vitro* para la modificación GNA en la posición 7 de las hebras antisentido

		IC_{50} en el blanco (nM)	**IC_{50} fuera del blanco (nM)**
AAT	**Parental**	0.013	0.97
	(*S*)-GNA en pos. 7 de AS	0.013	>500

Se cotransfectaron plásmidos informantes de luciferasa con los ARNip en células COS-7 y a las 48 h se condujo el ensayo con luciferasa.

2. **Análisis de la expresión genética**

Los resultados del análisis de la expresión genética *in vitro* se resumen en la Tabla 2. Como se puede observar en la Tabla 2, la modificación GNA en la posición 7 de la hebra antisentido mitigó la actividad fuera del blanco *in vitro*.

Tabla 2: Análisis de la expresión genética

		N° de genes de expresión disminuida (p < 0,05)	**N° de genes de expresión aumentada (p < 0,05)**

AAT	**Parental**	100	11
	(*S*)-GNA en pos. 7 de AS	1	2

Se transfectaron hepatocitos humanos (AAT) con los ARNip y el ARN se recolectó a las 24 h para la secuenciación del ARN.

3. **Estudios *in vivo en ratón***

Los resultados de los estudios *in vivo* se resumen en la Tabla 3. Como se puede observar, la modificación GNA en la posición 7 de la hebra antisentido conserva la potencia *in vivo* (Tabla 3).

Tabla 3: Datos farmacodinámicos de ratón

		% de ARNm remanente el Día 8
AAT	**Parental**	30
	(*S*)-GNA en pos. 7 de AS	29

A los ratones se les administró una sola dosis de ARNip direccionados a AAT a razón de 1 mg/kg y se evaluó el noqueo del ARNm de hígado el Día 8.

Ejemplo 2: Análisis *in vivo* e *in vitro* de los agentes de ARNhd direccionados a Serpina1

Para evaluar adicionalmente el efecto *in vivo* de incorporar un nucleótido GNA en AD-61444, el AD-61444 se modificó además con un nucleótido GNA en la posición 6 (AD-75994) o 7 (AD-75995) de la hebra antisentido (Figura 1A) y a ratones transgénicos para el AAT humano se les administraron una sola dosis 1 mg/kg del agente por vía subcutánea. Antes de la dosificación, y en los puntos de tiempo indicados en la Figura 1B, se obtuvo suero para la cuantificación del AAT en la circulación. Los niveles de la proteína AAT se determinaron mediante un ELISA sándwich, y los datos se normalizaron con respecto a los

valores basales de los niveles de la proteína AAT.

Como se muestra en la Figura 1B, la incorporación de un nucleótido GNA en cualquiera de las posiciones 6 ó 7 de la hebra antisentido de AD-61444 dio como resultado la pérdida de actividad en comparación con la molécula parental.

Por lo tanto, se redujo el número total de nucleótidos modificados con 2'-fluoro en AD-61444 dando como resultado AD-77407, y se incorporó un nucleótido GNA en la posición 7 antisentido de AD-77407 dando como resultado AD-77412 (Figura 1C). A ratones transgénicos para la AAT humana se les administró una sola dosis de 1 mg/kg del agente por vía subcutánea. Antes de la dosificación, y en los puntos de tiempo indicados en la Figura 1D, se obtuvo suero para la cuantificación del AAT en la circulación. Los niveles de la proteína AAT se determinaron mediante un ELISA sándwich, y los datos se normalizaron con respecto a los valores basales de los niveles de la proteína AAT.

En la Figura 1D se muestra que la reducción del contenido de 2'-flouro de AD-61444 (es decir, AD-77407) dio como resultado una mejora marcada de la actividad en los ratones. Aún más, la incorporación de un nucleótido GNA en este contexto (AD-77412) dio como resultado una mejora neta con relación a la molécula parental, AD-61444.

Para determinar el efecto de reducir el contenido de 2'-fluoro del AD-61444 y de la incorporación de un nucleótido GNA en la posición 7 de la hebra antisentido sobre los efectos fuera del blanco, se transfectaron células Hep3B con 10 nM de AD-61444 o AD-77412 usando Lipofectamina RNAiMax. Después de 16 horas, las células se lisaron y se prepararon para determinar el

perfil de transcripción. Según se muestra en las Figuras 2A y 2B, los datos resultantes se graficaron mostrando transcriptos cuya expresión era diferente de manera estadísticamente significativa con relación a células sometidas a un tratamiento simulado como círculos negros y los transcriptos cuya expresión no diferente de manera estadísticamente significativa con relación a células sometidas a un tratamiento simulado como círculos grises. El transcripto AAT está indicado y resaltado con un círculo.

Los datos representados en las Figures 2A y 2B demuestran que el tratamiento de la células con AD-61444 dio como resultado una expresión disminuida de cincuenta y dos transcriptos, incluyendo AAT. En comparación, el dúplex que contiene GNA, AD-77412, dio como resultado transcriptos de expresión disminuida de solamente tres transcriptos, incluyendo AAT. Por consiguiente, la incorporación de un nucleótido GNA redujo sustancialmente el número de efectos fuera del blanco observados cuya expresión era disminuida por AD-61444 *in vitro*.

El efecto de AD-77412 también se evaluó en primates no humanos. A monos cinomolgos se les administró por vía subcutánea una sola dosis de 0,3 mg/kg, 1,0 mg/kg, 3 mg/kg o 10 mg/kg ya sea de AD-61444 o AD-77412. Antes de la dosificación, y en los puntos de tiempo indicados en la Figura 3A-3D, se obtuvo suero para la cuantificación del AAT en la circulación. Los niveles de la proteína AAT se determinaron mediante un ELISA sándwich, y los datos se normalizaron con respecto a los valores basales de los niveles de la proteína AAT.

Según se muestra en las Figuras 3A-3D, todas las dosis de AD-61444 y AD-77412 silenciaron eficazmente la expresión de AAT con niveles máximos de

silenciamiento similares.

En resumen, estos ensayos demuestran que la incorporación de un nucleótido GNA en la región de siembra antisentido de la molécula parental, AD-61444, no da como resultado una pérdida de la actividad en comparación con la molécula parental y reduce significativamente los efectos fuera del blanco.

LISTADO DE SECUENCIAS
<110> ALNYLAM PHARMACEUTICALS, INC.
<120> COMPOSICIONES DE ARNi DE SERPINA1 Y SUS MÉTODOS DE USO
<130> 121301-07820
<140>
<141>
<150> 62/561.514
<151> 2017-09-21
<150> 62/549.099
<151> 2017-08-23
<150> 62/548.589
<151> 2017-08-22
<150> 62/425.907
<151> 2016-11-23
<160> 420
<170> PatentIn versión 3.5
<210> 1
<211> 3220
<212> ADN
<213> Homo sapiens
<400> 1
acaatgactc ctttcggtaa gtgcagtgga agctgtacac tgcccaggca aagcgtccgg 60
gcagcgtagg cgggcgactc agatcccagc cagtggactt agcccctgtt tgctcctccg 120
ataactgggg tgaccttggt taatattcac cagcagcctc ccccgttgcc cctctggatc 180
cactgcttaa atacggacga ggacagggcc ctgtctcctc agcttcaggc accaccactg 240
acctgggaca gtgaatcgac aatgccgtct tctgtctcgt ggggcatcct cctgctggca 300
ggcctgtgct gcctggtccc tgtctccctg gctgaggatc cccagggaga tgctgcccag 360
aagacagata catcccacca tgatcaggat cacccaacct tcaacaagat caccccccaac 420
ctggctgagt tcgccttcag cctataccgc cagctggcac accagtccaa cagcaccaat 480
atcttcttct ccccagtgag catcgctaca gcctttgcaa tgctctccct ggggaccaag 540
gctgacactc acgatgaaat cctggagggc ctgaatttca acctcacgga gattccggag 600
gctcagatcc atgaaggctt ccaggaactc ctccgtaccc tcaaccagcc agacagccag 660
ctccagctga ccaccggcaa tggcctgttc ctcagcgagg gcctgaagct agtggataag 720
tttttggagg atgttaaaaa gttgtaccac tcagaagcct tcactgtcaa cttcggggac 780
accgaagagg ccaagaaaca gatcaacgat tacgtggaga agggtactca agggaaaatt 840
gtggatttgg tcaaggagct tgacagagac acagtttttg ctctggtgaa ttacatcttc 900
tttaaaggca aatgggagag acccctttgaa gtcaaggaca ccgaggaaga ggacttccac 960
gtggaccagg tgaccaccgt gaaggtgcct atgatgaagc gtttaggcat gtttaacatc 1020
cagcactgta agaagctgtc cagctgggtg ctgctgatga aatacctggg caatgccacc 1080
gccatcttct tcctgcctga tgaggggaaa ctacagcacc tggaaaatga actcacccac 1140
gatatcatca ccaagttcct ggaaaatgaa gacagaaggt ctgccagctt acatttaccc 1200
aaactgtcca ttactggaac ctatgatctg aagagcgtcc tgggtcaact gggcatcact 1260
aaggtcttca gcaatggggc tgacctctcc ggggtcacag aggaggcacc cctgaagctc 1320
tccaaggccg tgcataaggc tgtgctgacc atcgacgaga aagggactga agctgctggg 1380
gccatgtttt tagaggccat acccatgtct atccccccccg aggtcaagtt caacaaaccc 1440
tttgtcttct taatgattga acaaaatacc aagtctcccc tcttcatggg aaaagtggtg 1500
aatcccaccc aaaaataact gcctctcgct cctcaacccc tcccctccat ccctggcccc 1560
ctccctggat gacattaaag aagggttgag ctggtccctg cctgcatgtg actgtaaatc 1620
cctcccatgt tttctctgag tctccctttg cctgctgagg ctgtatgtgg gctccaggta 1680
acagtgctgt cttcgggccc cctgaactgt gttcatggag catctggctg ggtaggcaca 1740
tgctgggctt gaatccaggg gggactgaat cctcagctta cggacctggg cccatctgtt 1800
tctggagggc tccagtcttc cttgtcctgt cttggagtcc ccaagaagga atcacagggg 1860
aggaaccaga taccagccat gaccccaggc tccaccaagc atcttcatgt ccccctgctc 1920
atcccccact ccccccccacc cagagttgct catcctgcca gggctggctg tgcccacccc 1980
aaggctgccc tcctgggggc cccagaactg cctgatcgtg ccgtggccca gttttgtggc 2040
atctgcagca acacaagaga gaggacaatg tcctcctctt gacccgctgt cacctaacca 2100
gactcgggcc ctgcacctct caggcacttc tggaaaatga ctgaggcaga ttcttcctga 2160

agcccattct ccatggggca acaaggacac ctattctgtc cttgtccttc catcgctgcc 2220
ccagaaagcc tcacatatct ccgtttagaa tcaggtccct tctccccaga tgaagaggag 2280

ggtctctgct ttgttttctc tatctcctcc tcagacttga ccaggcccag caggccccag 2340
aagaccatta ccctatatcc cttctcctcc ctagtcacat ggccataggc ctgctgatgg 2400
ctcaggaagg ccattgcaag gactcctcag ctatgggaga ggaagcacat cacccattga 2460
cccccgcaac ccctcccttt cctcctctga gtcccgactg gggccacatg cagcctgact 2520
tctttgtgcc tgttgctgtc cctgcagtct tcagagggcc accgcagctc cagtgccacg 2580
gcaggaggct gttcctgaat agcccctgtg gtaagggcca ggagagtcct tccatcctcc 2640
aaggccctgc taaaggacac agcagccagg aagtcccctg ggcccctagc tgaaggacag 2700
cctgctccct ccgtctctac caggaatggc cttgtcctat ggaaggcact gccccatccc 2760
aaactaatct aggaatcact gtctaaccac tcactgtcat gaatgtgtac ttaaaggatg 2820
aggttgagtc ataccaaata gtgatttcga tagttcaaaa tggtgaaatt agcaattcta 2880
catgattcag tctaatcaat ggataccgac tgtttcccac acaagtctcc tgttctctta 2940
agcttactca ctgacagcct ttcactctcc acaaatacat taaagatatg gccatcacca 3000
agcccccctag gatgacacca gacctgagag tctgaagacc tggatccaag ttctgacttt 3060
tccccctgac agctgtgtga ccttcgtgaa gtcgccaaac ctctctgagc cccagtcatt 3120
gctagtaaga cctgcctttg agttggtatg atgttcaagt tagataacaa aatgtttata 3180
cccattagaa cagagaataa atagaactac atttcttgca 3220

<210> 2
<211> 3199
<212> ADN
<213> Homo sapiens
<400> 2

tgggcaggaa ctgggcactg tgcccagggc atgcactgcc tccacgcagc aaccctcaga 60
gtcctgagct gaaccaagaa ggaggagggg gtcgggcctc cgaggaaggc ctagccgctg 120
ctgctgccag gaattccagg ttggaggggc ggcaacctcc tgccagcctt caggccactc 180
tcctgtgcct gccagaagag acagagcttg aggagagctt gaggagagca ggaaaggaca 240
atgccgtctt ctgtctcgtg gggcatcctc ctgctggcag gcctgtgctg cctggtccct 300
gtctccctgg ctgaggatcc ccagggagat gctgcccaga agacagatac atcccaccat 360
gatcaggatc acccaacctt caacaagatc acccccaacc tggctgagtt cgccttcagc 420
ctataccgcc agctggcaca ccagtccaac agcaccaata tcttcttctc cccagtgagc 480
atcgctacag cctttgcaat gctctccctg gggaccaagg ctgacactca cgatgaaatc 540
ctggagggcc tgaatttcaa cctcacggag attccggagg ctcagatcca tgaaggcttc 600
caggaactcc tccgtaccct caaccagcca gacagccagc tccagctgac caccggcaat 660
ggcctgttcc tcagcgaggg cctgaagcta gtggataagt ttttggagga tgttaaaaag 720

ttgtaccact cagaagcctt cactgtcaac ttcggggaca ccgaagaggc caagaaacag 780
atcaacgatt acgtggagaa gggtactcaa gggaaaattg tggatttggt caaggagctt 840
gacagagaca cagtttttgc tctggtgaat tacatcttct ttaaaggcaa atgggagaga 900
ccctttgaag tcaaggacac cgaggaagag gacttccacg tggaccaggt gaccaccgtg 960
aaggtgccta tgatgaagcg tttaggcatg tttaacatcc agcactgtaa gaagctgtcc 1020
agctgggtgc tgctgatgaa atacctgggc aatgccaccg ccatcttctt cctgcctgat 1080
gaggggaaac tacagcacct ggaaaatgaa ctcacccacg atatcatcac caagttcctg 1140
gaaaatgaag acagaaggtc tgccagctta catttaccca aactgtccat tactggaacc 1200
tatgatctga agagcgtcct gggtcaactg ggcatcacta aggtcttcag caatggggct 1260
gacctctccg gggtcacaga ggaggcaccc ctgaagctct ccaaggccgt gcataaggct 1320
gtgctgacca tcgacgagaa agggactgaa gctgctgggg ccatgttttt agaggccata 1380
cccatgtcta tccccccccga ggtcaagttc aacaaaccct ttgtcttctt aatgattgaa 1440
caaaatacca agtctccccct cttcatggga aaagtggtga atcccaccca aaaataactg 1500
cctctcgctc ctcaacccct cccctccatc cctggccccc tccctggatg acattaaaga 1560
agggttgagc tggtccctgc ctgcatgtga ctgtaaatcc ctcccatgtt ttctctgagt 1620
ctccctttgc ctgctgaggc tgtatgtggg ctccaggtaa cagtgctgtc ttcgggcccc 1680
ctgaactgtg ttcatggagc atctggctgg gtaggcacat gctgggcttg aatccagggg 1740
ggactgaatc ctcagcttac ggacctgggc ccatctgttt ctggagggct ccagtcttcc 1800
ttgtcctgtc ttggagtccc caagaaggaa tcacagggga ggaaccagat accagccatg 1860
accccaggct ccaccaagca tcttcatgtc cccctgctca tcccccactc ccccccaccc 1920
agagttgctc atcctgccag ggctggctgt gcccacccca aggctgccct cctgggggcc 1980
ccagaactgc ctgatcgtgc cgtggcccag ttttgtggca tctgcagcaa cacaagagag 2040
aggacaatgt cctcctcttg acccgctgtc acctaaccag actcgggccc tgcacctctc 2100
aggcacttct ggaaaatgac tgaggcagat tcttcctgaa gcccattctc catggggcaa 2160
caaggacacc tattctgtcc ttgtccttcc atcgctgccc cagaaagcct cacatatctc 2220
cgtttagaat caggtccctt ctccccagat gaagaggagg gtctctgctt tgttttctct 2280

atctcctcct cagacttgac caggcccagc aggccccaga agaccattac cctatatccc 2340
ttctcctccc tagtcacatg gccataggcc tgctgatggc tcaggaaggc cattgcaagg 2400
actcctcagc tatgggagag gaagcacatc acccattgac ccccgcaacc cctccctttc 2460
ctcctctgag tcccgactgg ggccacatgc agcctgactt ctttgtgcct gttgctgtcc 2520
ctgcagtctt cagagggcca ccgcagctcc agtgccacgg caggaggctg ttcctgaata 2580
gcccctgtgg taagggccag gagagtcctt ccatcctcca aggccctgct aaaggacaca 2640
gcagccagga agtcccctgg gcccctagct gaaggacagc ctgctccctc cgtctctacc 2700
aggaatggcc ttgtcctatg gaaggcactg ccccatccca aactaatcta ggaatcactg 2760
tctaaccact cactgtcatg aatgtgtact taaaggatga ggttgagtca taccaaatag 2820
tgatttcgat agttcaaaat ggtgaaatta gcaattctac atgattcagt ctaatcaatg 2880
gataccgact gtttcccaca caagtctcct gttctcttaa gcttactcac tgacagcctt 2940
tcactctcca caaatacatt aaagatatgg ccatcaccaa gccccctagg atgacaccag 3000
acctgagagt ctgaagacct ggatccaagt tctgactttt ccccctgaca gctgtgtgac 3060
cttcgtgaag tcgccaaacc tctctgagcc ccagtcattg ctagtaagac ctgcctttga 3120
gttggtatga tgttcaagtt agataacaaa atgtttatac ccattagaac agagaataaa 3180
tagaactaca tttcttgca 3199
<210> 3
<211> 3513
<212> ADN
<213> Homo sapiens
<400> 3
tgggcaggaa ctgggcactg tgcccagggc atgcactgcc tccacgcagc aaccctcaga 60
gtcctgagct gaaccaagaa ggaggagggg gtcgggcctc cgaggaaggc ctagccgctg 120
ctgctgccag gaattccagg ttggaggggc ggcaacctcc tgccagcctt caggccactc 180
tcctgtgcct gccagaagag acagagcttg aggagagctt gaggagagca ggaaagggcg 240
gcagtaagtc ttcagcatca ggcattttgg ggtgactcag taaatggtag atcttgctac 300
cagtggaaca gccactaagg attctgcagt gagagcagag ggccagctaa gtggtactct 360
cccagagact gtctgactca cgccaccccc tccaccttgg acacaggacg ctgtggtttc 420
tgagccaggt acaatgactc ctttcgcagc ctcccccgtt gcccctctgg atccactgct 480
taaatacgga cgaggacagg gccctgtctc ctcagcttca ggcaccacca ctgacctggg 540
acagtgaatc gacaatgccg tcttctgtct cgtggggcat cctcctgctg gcaggcctgt 600
gctgcctggt ccctgtctcc ctggctgagg atccccaggg agatgctgcc cagaagacag 660
atacatccca ccatgatcag gatcacccaa ccttcaacaa gatcaccccc aacctggctg 720
agttcgcctt cagcctatac cgccagctgg cacaccagtc caacagcacc aatatcttct 780
tctccccagt gagcatcgct acagcctttg caatgctctc cctggggacc aaggctgaca 840
ctcacgatga aatcctggag ggcctgaatt tcaacctcac ggagattccg gaggctcaga 900
tccatgaagg cttccaggaa ctcctccgta ccctcaacca gccagacagc cagctccagc 960
tgaccaccgg caatggcctg ttcctcagcg agggcctgaa gctagtggat aagtttttgg 1020
aggatgttaa aaagttgtac cactcagaag ccttcactgt caacttcggg gacaccgaag 1080
aggccaagaa acagatcaac gattacgtgg agaagggtac tcaagggaaa attgtggatt 1140
tggtcaagga gcttgacaga gacacagttt ttgctctggt gaattacatc ttctttaaag 1200
gcaaatggga gagacccttt gaagtcaagg acaccgagga agaggacttc cacgtggacc 1260
aggtgaccac cgtgaaggtg cctatgatga agcgtttagg catgtttaac atccagcact 1320
gtaagaagct gtccagctgg gtgctgctga tgaaatacct gggcaatgcc accgccatct 1380
tcttcctgcc tgatgagggg aaactacagc acctggaaaa tgaactcacc cacgatatca 1440
tcaccaagtt cctggaaaat gaagacagaa ggtctgccag cttacattta cccaaactgt 1500
ccattactgg aacctatgat ctgaagagcg tcctgggtca actgggcatc actaaggtct 1560
tcagcaatgg ggctgacctc tccggggtca cagaggaggc acccctgaag ctctccaagg 1620
ccgtgcataa ggctgtgctg accatcgacg agaaagggac tgaagctgct ggggccatgt 1680
ttttagaggc catacccatg tctatccccc ccgaggtcaa gttcaacaaa ccctttgtct 1740
tcttaatgat tgaacaaaat accaagtctc ccctcttcat gggaaaagtg gtgaatccca 1800
cccaaaaata actgcctctc gctcctcaac ccctcccctc catccctggc cccctccctg 1860
gatgacatta aagaagggtt gagctggtcc ctgcctgcat gtgactgtaa atccctccca 1920
tgttttctct gagtctccct ttgcctgctg aggctgtatg tgggctccag gtaacagtgc 1980
tgtcttcggg ccccctgaac tgtgttcatg gagcatctgg ctgggtaggc acatgctggg 2040
cttgaatcca ggggggactg aatcctcagc ttacggacct gggcccatct gtttctggag 2100
ggctccagtc ttccttgtcc tgtcttggag tccccaagaa ggaatcacag gggaggaacc 2160
agataccagc catgacccca ggctccacca agcatcttca tgtccccctg ctcatccccc 2220
actccccccc acccagagtt gctcatcctg ccagggctgg ctgtgcccac cccaaggctg 2280
ccctcctggg ggccccagaa ctgcctgatc gtgccgtggc ccagttttgt ggcatctgca 2340

gcaacacaag agagaggaca atgtcctcct cttgacccgc tgtcacctaa ccagactcgg 2400
gccctgcacc tctcaggcac ttctggaaaa tgactgaggc agattcttcc tgaagcccat 2460
tctccatggg gcaacaagga cacctattct gtccttgtcc ttccatcgct gccccagaaa 2520
gcctcacata tctccgttta gaatcaggtc ccttctcccc agatgaagag gagggtctct 2580
gctttgtttt ctctatctcc tcctcagact tgaccaggcc cagcaggccc cagaagacca 2640
ttaccctata tcccttctcc tccctagtca catggccata ggcctgctga tggctcagga 2700
aggccattgc aaggactcct cagctatggg agaggaagca catcacccat tgacccccgc 2760
aacccctccc tttcctcctc tgagtcccga ctggggccac atgcagcctg acttctttgt 2820
gcctgttgct gtccctgcag tcttcagagg gccaccgcag ctccagtgcc acggcaggag 2880
gctgttcctg aatagccccc gtggtaaggg ccaggagagt ccttccatcc tccaaggccc 2940
tgctaaagga cacagcagcc aggaagtccc ctgggccccc agctgaagga cagcctgctc 3000
cctccgtctc taccaggaat ggcccttgtcc tatggaaggc actgccccat cccaaactaa 3060
tctaggaatc actgtctaac cactcactgt catgaatgtg tacttaaagg atgaggttga 3120
gtcataccaa atagtgattt cgatagttca aaatggtgaa attagcaatt ctacatgatt 3180
cagtctaatc aatggatacc gactgtttcc cacacaagtc tcctgttctc ttaagcttac 3240
tcactgacag cctttcactc tccacaaata cattaaagat atggccatca ccaagccccc 3300
taggatgaca ccagacctga gagtctgaag acctggatcc aagttctgac ttttcccccc 3360
gacagctgtg tgaccttcgt gaagtcgcca aacctctctg agccccagtc attgctagta 3420
agacctgcct ttgagttggt atgatgttca agttagataa caaaatgttt atacccatta 3480
gaacagagaa taaatagaac tacatttctt gca 3513
<210> 4
<211> 3236
<212> ADN
<213> Homo sapiens
<400> 4
tgggcaggaa ctgggcactg tgcccagggc atgcactgcc tccacgcagc aaccctcaga 60
gtcctgagct gaaccaagaa ggaggagggg gtcgggcctc cgaggaaggc ctagccgctg 120
ctgctgccag gaattccagg ttggaggggc ggcaacctcc tgccagcctt caggccactc 180
tcctgtgcct gccagaagag acagagcttg aggagagctt gaggagagca ggaaaggtgg 240
gacattgctg ctgctgctca ctcagttcca caggacaatg ccgtcttctg tctcgtgggg 300
catcctcctg ctggcaggcc tgtgctgcct ggtccctgtc tccctggctg aggatcccca 360
gggagatgct gcccagaaga cagatacatc ccaccatgat caggatcacc caaccttcaa 420
caagatcacc cccaacctgg ctgagttcgc cttcagccta taccgccagc tggcacacca 480
gtccaacagc accaatatct tcttctcccc agtgagcatc gctacagcct ttgcaatgct 540
ctccctgggg accaaggctg acactcacga tgaaatcctg gagggcctga atttcaacct 600
cacggagatt ccggaggctc agatccatga aggcttccag gaactcctcc gtaccctcaa 660
ccagccagac agccagctcc agctgaccac cggcaatggc ctgttcctca gcgagggcct 720
gaagctagtg gataagtttt tggaggatgt taaaaagttg taccactcag aagccttcac 780
tgtcaacttc ggggacaccg aagaggccaa gaaacagatc aacgattacg tggagaaggg 840
tactcaaggg aaaattgtgg atttggtcaa ggagcttgac agagacacag tttttgctct 900
ggtgaattac atcttcttta aaggcaaatg ggagagaccc tttgaagtca aggacaccga 960
ggaagaggac ttccacgtgg accaggtgac caccgtgaag gtgcctatga tgaagcgttt 1020
aggcatgttt aacatccagc actgtaagaa gctgtccagc tgggtgctgc tgatgaaata 1080
cctgggcaat gccaccgcca tcttcttcct gcctgatgag gggaaactac agcacctgga 1140
aaatgaactc acccacgata tcatcaccaa gttcctggaa aatgaagaca gaaggtctgc 1200
cagcttacat ttacccaaac tgtccattac tggaacctat gatctgaaga gcgtcctggg 1260
tcaactgggc atcactaagg tcttcagcaa tggggctgac ctctccgggg tcacagagga 1320
ggcacccctg aagctctcca aggccgtgca taaggctgtg ctgaccatcg acgagaaagg 1380
gactgaagct gctggggcca tgtttttaga ggccataccc atgtctatcc cccccgaggt 1440
caagttcaac aaaccctttg tcttcttaat gattgaacaa aataccaagt ctcccctctt 1500
catgggaaaa gtggtgaatc ccacccaaaa ataactgcct ctcgctcctc aacccctccc 1560
ctccatccct ggcccccctcc ctggatgaca ttaaagaagg gttgagctgg tccctgcctg 1620
catgtgactg taaatccctc ccatgttttc tctgagtctc cctttgcctg ctgaggctgt 1680
atgtgggctc caggtaacag tgctgtcttc gggccccctg aactgtgttc atggagcatc 1740
tggctgggta ggcacatgct gggcttgaat ccaggggggа ctgaatcctc agcttacgga 1800
cctgggccca tctgtttctg gagggctcca gtcttccttg tcctgtcttg gagtccccaa 1860
gaaggaatca caggggagga accagatacc agccatgacc ccaggctcca ccaagcatct 1920
tcatgtcccc ctgctcatcc cccactcccc cccacccaga gttgctcatc ctgccagggc 1980
tggctgtgcc caccccaagg ctgccctcct gggggcccca gaactgcctg atcgtgccgt 2040
ggcccagttt tgtggcatct gcagcaacac aagagagagg acaatgtcct cctcttgacc 2100

cgctgtcacc taaccagact cgggccctgc acctctcagg cacttctgga aaatgactga 2160
ggcagattct tcctgaagcc cattctccat ggggcaacaa ggacacctat tctgtccttg 2220
tccttccatc gctgccccag aaagcctcac atatctccgt ttagaatcag gtcccttctc 2280
cccagatgaa gaggagggtc tctgctttgt tttctctatc tcctcctcag acttgaccag 2340
gcccagcagg ccccagaaga ccattaccct atatcccttc tcctccctag tcacatggcc 2400
ataggcctgc tgatggctca ggaaggccat tgcaaggact cctcagctat gggagaggaa 2460
gcacatcacc cattgacccc cgcaacccct ccctttcctc ctctgagtcc cgactggggc 2520
cacatgcagc ctgacttctt tgtgcctgtt gctgtccctg cagtcttcag agggccaccg 2580
cagctccagt gccacggcag gaggctgttc ctgaatagcc cctgtggtaa gggccaggag 2640
agtccttcca tcctccaagg ccctgctaaa ggacacagca gccaggaagt cccctgggcc 2700
cctagctgaa ggacagcctg ctccctccgt ctctaccagg aatggccttg tcctatggaa 2760
ggcactgccc catcccaaac taatctagga atcactgtct aaccactcac tgtcatgaat 2820
gtgtacttaa aggatgaggt tgagtcatac caaatagtga tttcgatagt tcaaaatggt 2880
gaaattagca attctacatg attcagtcta atcaatggat accgactgtt tcccacacaa 2940
gtctcctgtt ctcttaagct tactcactga cagcctttca ctctccacaa atacattaaa 3000
gatatggcca tcaccaagcc ccctaggatg acaccagacc tgagagtctg aagacctgga 3060
tccaagttct gacttttccc cctgacagct gtgtgacctt cgtgaagtcg ccaaacctct 3120
ctgagcccca gtcattgcta gtaagacctg cctttgagtt ggtatgatgt tcaagttaga 3180
taacaaaatg tttataccca ttagaacaga gaataaatag aactacattt cttgca 3236

<210> 5
<211> 3532
<212> ADN
<213> Homo sapiens
<400> 5

tgggcaggaa ctgggcactg tgcccagggc atgcactgcc tccacgcagc aaccctcaga 60
gtcctgagct gaaccaagaa ggaggagggg gtcgggcctc cgaggaaggc ctagccgctg 120
ctgctgccag gaattccagg ttggaggggc ggcaacctcc tgccagcctt caggccactc 180
tcctgtgcct gccagaagag acagagcttg aggagagctt gaggagagca ggaaaggtgg 240
gacattgctg ctgctgctca ctcagttcca cagggcggca gtaagtcttc agcatcaggc 300
attttggggt gactcagtaa atggtagatc ttgctaccag tggaacagcc actaaggatt 360
ctgcagtgag agcagagggc cagctaagtg gtactctccc agagactgtc tgactcacgc 420
cacccccctcc accttggaca caggacgctg tggtttctga gccagcagcc tcccccgttg 480
cccctctgga tccactgctt aaatacggac gaggacaggg ccctgtctcc tcagcttcag 540
gcaccaccac tgacctggga cagtgaatcg acaatgccgt cttctgtctc gtggggcatc 600
ctcctgctgg caggcctgtg ctgcctggtc cctgtctccc tggctgagga tccccaggga 660
gatgctgccc agaagacaga tacatcccac catgatcagg atcacccaac cttcaacaag 720
atcaccccca acctggctga gttcgccttc agcctatacc gccagctggc acaccagtcc 780
aacagcacca atatcttctt ctccccagtg agcatcgcta cagcctttgc aatgctctcc 840
ctggggacca aggctgacac tcacgatgaa atcctggagg gcctgaattt caacctcacg 900
gagattccgg aggctcagat ccatgaaggc ttccaggaac tcctccgtac cctcaaccag 960
ccagacagcc agctccagct gaccaccggc aatggcctgt tcctcagcga gggcctgaag 1020
ctagtggata agtttttgga ggatgttaaa aagttgtacc actcagaagc cttcactgtc 1080
aacttcgggg acaccgaaga ggccaagaaa cagatcaacg attacgtgga gaagggtact 1140
caagggaaaa ttgtggattt ggtcaaggag cttgacagag acacagtttt tgctctggtg 1200
aattacatct tctttaaagg caaatgggag agacccttg aagtcaagga caccgaggaa 1260
gaggacttcc acgtggacca ggtgaccacc gtgaaggtgc ctatgatgaa gcgtttaggc 1320
atgtttaaca tccagcactg taagaagctg tccagctggg tgctgctgat gaaatacctg 1380
ggcaatgcca ccgccatctt cttcctgcct gatgagggga aactacagca cctggaaaat 1440
gaactcaccc acgatatcat caccaagttc ctggaaaatg aagacagaag gtctgccagc 1500
ttacatttac ccaaactgtc cattactgga acctatgatc tgaagagcgt cctgggtcaa 1560
ctgggcatca ctaaggtctt cagcaatggg gctgacctct ccggggtcac agaggaggca 1620
cccctgaagc tctccaaggc cgtgcataag gctgtgctga ccatcgacga gaaagggact 1680
gaagctgctg gggccatgtt tttagaggcc atacccatgt ctatcccccc cgaggtcaag 1740
ttcaacaaac cctttgtctt cttaatgatt gaacaaaata ccaagtctcc cctcttcatg 1800
ggaaaagtgg tgaatcccac ccaaaaataa ctgcctctcg ctcctcaacc cctcccctcc 1860
atccctggcc ccctccctgg atgacattaa agaagggttg agctggtccc tgcctgcatg 1920
tgactgtaaa tccctcccat gttttctctg agtctccctt tgcctgctga ggctgtatgt 1980
gggctccagg taacagtgct gtcttcgggc cccctgaact gtgttcatgg agcatctggc 2040
tgggtaggca catgctgggc ttgaatccag gggggactga atcctcagct tacggacctg 2100
ggcccatctg tttctggagg gctccagtct tccttgtcct gtcttggagt ccccaagaag 2160

gaatcacagg ggaggaacca gataccagcc atgaccccag gctccaccaa gcatcttcat 2220
gtccccctgc tcatccccca ctcccccccа cccagagttg ctcatcctgc cagggctggc 2280
tgtgcccacc ccaaggctgc cctcctgggg gccccagaac tgcctgatcg tgccgtggcc 2340
cagttttgtg gcatctgcag caacacaaga gagaggacaa tgtcctcctc ttgacccgct 2400
gtcacctaac cagactcggg ccctgcacct ctcaggcact tctggaaaat gactgaggca 2460
gattcttcct gaagcccatt ctccatgggg caacaaggac acctattctg tccttgtcct 2520
tccatcgctg ccccagaaag cctcacatat ctccgtttag aatcaggtcc cttctcccca 2580
gatgaagagg agggtctctg ctttgttttc tctatctcct cctcagactt gaccaggccc 2640
agcaggcccc agaagaccat taccctatat cccttctcct ccctagtcac atggccatag 2700
gcctgctgat ggctcaggaa ggccattgca aggactcctc agctatggga gaggaagcac 2760
atcacccatt gacccccgca acccctccct ttcctcctct gagtcccgac tggggccaca 2820
tgcagcctga cttctttgtg cctgttgctg tccctgcagt cttcagaggg ccaccgcagc 2880
tccagtgcca cggcaggagg ctgttcctga atagcccctg tggtaagggc caggagagtc 2940
cttccatcct ccaaggccct gctaaaggac acagcagcca ggaagtcccc tgggccccta 3000
gctgaaggac agcctgctcc ctccgtctct accaggaatg gccttgtcct atggaaggca 3060
ctgccccatc ccaaactaat ctaggaatca ctgtctaacc actcactgtc atgaatgtgt 3120
acttaaagga tgaggttgag tcataccaaa tagtgatttc gatagttcaa aatggtgaaa 3180
ttagcaattc tacatgattc agtctaatca atggataccg actgtttccc acacaagtct 3240
cctgttctct taagcttact cactgacagc ctttcactct ccacaaatac attaaagata 3300
tggccatcac caagcccccт aggatgacac cagacctgag agtctgaaga cctggatcca 3360
agttctgact tttccccctg acagctgtgt gaccttcgtg aagtcgccaa acctctctga 3420
gccccagtca ttgctagtaa gacctgcctt tgagttggta tgatgttcaa gttagataac 3480
aaaatgttta tacccattag aacagagaat aaatagaact acatttcttg ca 3532

<210> 6
<211> 3340
<212> ADN
<213> Homo sapiens
<400> 6

tgggcaggaa ctgggcactg tgcccagggc atgcactgcc tccacgcagc aaccctcaga 60
gtcctgagct gaaccaagaa ggaggagggg gtcgggcctc cgaggaaggc ctagccgctg 120
ctgctgccag gaattccagg ttggaggggc ggcaacctcc tgccagcctt caggccactc 180
tcctgtgcct gccagaagag acagagcttg aggagagctt gaggagagca ggaaaggtgg 240
gacattgctg ctgctgctca ctcagttcca cagcagcctc ccccgttgcc cctctggatc 300
cactgcttaa atacggacga ggacagggcc ctgtctcctc agcttcaggc accaccactg 360
acctgggaca gtgaatcgac aatgccgtct tctgtctcgt ggggcatcct cctgctggca 420
ggcctgtgct gcctggtccc tgtctccctg gctgaggatc cccagggaga tgctgcccag 480
aagacagata catcccacca tgatcaggat cacccaacct tcaacaagat caccccccaac 540
ctggctgagt tcgccttcag cctataccgc cagctggcac accagtccaa cagcaccaat 600
atcttcttct ccccagtgag catcgctaca gcctttgcaa tgctctccct ggggaccaag 660
gctgacactc acgatgaaat cctggagggc ctgaatttca acctcacgga gattccggag 720
gctcagatcc atgaaggctt ccaggaactc ctccgtaccc tcaaccagcc agacagccag 780
ctccagctga ccaccggcaa tggcctgttc ctcagcgagg gcctgaagct agtggataag 840
tttttggagg atgttaaaaa gttgtaccac tcagaagcct tcactgtcaa cttcggggac 900
accgaagagg ccaagaaaca gatcaacgat tacgtggaga agggtactca agggaaaatt 960
gtggatttgg tcaaggagct tgacagagac acagtttttg ctctggtgaa ttacatcttc 1020
tttaaaggca aatgggagag acccttttgaa gtcaaggaca ccgaggaaga ggacttccac 1080
gtggaccagg tgaccaccgt gaaggtgcct atgatgaagc gtttaggcat gtttaacatc 1140
cagcactgta agaagctgtc cagctgggtg ctgctgatga aatacctggg caatgccacc 1200
gccatcttct tcctgcctga tgaggggaaa ctacagcacc tggaaaatga actcacccac 1260
gatatcatca ccaagttcct ggaaaatgaa gacagaaggt ctgccagctt acatttaccc 1320
aaactgtcca ttactggaac ctatgatctg aagagcgtcc tgggtcaact gggcatcact 1380
aaggtcttca gcaatggggc tgacctctcc ggggtcacag aggaggcacc cctgaagctc 1440
tccaaggccg tgcataaggc tgtgctgacc atcgacgaga aagggactga agctgctggg 1500
gccatgtttt tagaggccat acccatgtct atccccccccg aggtcaagtt caacaaaccc 1560
tttgtcttct taatgattga acaaaatacc aagtctcccc tcttcatggg aaaagtggtg 1620
aatcccaccc aaaaataact gcctctcgct cctcaacccc tcccctccat ccctggcccc 1680
ctccctggat gacattaaag aagggttgag ctggtccctg cctgcatgtg actgtaaatc 1740
cctcccatgt tttctctgag tctccctttg cctgctgagg ctgtatgtgg gctccaggta 1800
acagtgctgt cttcgggccc cctgaactgt gttcatggag catctggctg ggtaggcaca 1860
tgctgggctt gaatccaggg gggactgaat cctcagctta cggacctggg cccatctgtt 1920

tctggagggc tccagtcttc cttgtcctgt cttggagtcc ccaagaagga atcacagggg 1980
aggaaccaga taccagccat gaccccaggc tccaccaagc atcttcatgt ccccctgctc 2040
atcccccact ccccccccacc cagagttgct catcctgcca gggctggctg tgcccacccc 2100
aaggctgccc tcctgggggc cccagaactg cctgatcgtg ccgtggccca gttttgtggc 2160
atctgcagca acacaagaga gaggacaatg tcctcctctt gacccgctgt cacctaacca 2220
gactcgggcc ctgcacctct caggcacttc tggaaaatga ctgaggcaga ttcttcctga 2280
agcccattct ccatggggca acaaggacac ctattctgtc cttgtccttc catcgctgcc 2340
ccagaaagcc tcacatatct ccgtttagaa tcaggtccct tctccccaga tgaagaggag 2400
ggtctctgct ttgttttctc tatctcctcc tcagacttga ccaggcccag caggccccag 2460
aagaccatta ccctatatcc cttctcctcc ctagtcacat ggccataggc ctgctgatgg 2520
ctcaggaagg ccattgcaag gactcctcag ctatgggaga ggaagcacat cacccattga 2580
cccccgcaac ccctcccttt cctcctctga gtcccgactg gggccacatg cagcctgact 2640
tctttgtgcc tgttgctgtc cctgcagtct tcagagggcc accgcagctc cagtgccacg 2700
gcaggaggct gttcctgaat agcccctgtg gtaagggcca ggagagtcct tccatcctcc 2760
aaggccctgc taaaggacac agcagccagg aagtcccctg ggcccctagc tgaaggacag 2820
cctgctccct ccgtctctac caggaatggc cttgtcctat ggaaggcact gccccatccc 2880
aaactaatct aggaatcact gtctaaccac tcactgtcat gaatgtgtac ttaaaggatg 2940
aggttgagtc ataccaaata gtgatttcga tagttcaaaa tggtgaaatt agcaattcta 3000
catgattcag tctaatcaat ggataccgac tgtttcccac acaagtctcc tgttctctta 3060
agcttactca ctgacagcct ttcactctcc acaaatacat taaagatatg gccatcacca 3120
agccccctag gatgacacca gacctgagag tctgaagacc tggatccaag ttctgacttt 3180
tccccctgac agctgtgtga ccttcgtgaa gtcgccaaac ctctctgagc cccagtcatt 3240
gctagtaaga cctgcctttg agttggtatg atgttcaagt tagataacaa aatgtttata 3300
cccattagaa cagagaataa atagaactac atttcttgca 3340

<210> 7
<211> 3495
<212> ADN
<213> Homo sapiens
<400> 7

tgggcaggaa ctgggcactg tgcccagggc atgcactgcc tccacgcagc aaccctcaga 60
gtcctgagct gaaccaagaa ggaggagggg gtcgggcctc cgaggaaggc ctagccgctg 120
ctgctgccag gaattccagg ttggaggggc ggcaacctcc tgccagcctt caggccactc 180
tcctgtgcct gccagaagag acagagcttg aggagagctt gaggagagca ggaaagggcg 240
gcagtaagtc ttcagcatca ggcattttgg ggtgactcag taaatggtag atcttgctac 300
cagtggaaca gccactaagg attctgcagt gagagcagag ggccagctaa gtggtactct 360
cccagagact gtctgactca cgccaccccc tccaccttgg acacaggacg ctgtggtttc 420
tgagccagca gcctcccccg ttgcccctct ggatccactg cttaaatacg gacgaggaca 480
gggccctgtc tcctcagctt caggcaccac cactgacctg ggacagtgaa tcgacaatgc 540
cgtcttctgt ctcgtggggc atcctcctgc tggcaggcct gtgctgcctg gtccctgtct 600
ccctggctga ggatccccag ggagatgctg cccagaagac agatacatcc caccatgatc 660
aggatcaccc aaccttcaac aagatcaccc ccaacctggc tgagttcgcc ttcagcctat 720
accgccagct ggcacaccag tccaacagca ccaatatctt cttctcccca gtgagcatcg 780
ctacagcctt tgcaatgctc tccctgggga ccaaggctga cactcacgat gaaatcctgg 840
agggcctgaa tttcaacctc acggagattc cggaggctca gatccatgaa ggcttccagg 900
aactcctccg taccctcaac cagccagaca gccagctcca gctgaccacc ggcaatggcc 960
tgttcctcag cgagggcctg aagctagtgg ataagttttt ggaggatgtt aaaaagttgt 1020
accactcaga agccttcact gtcaacttcg gggacaccga agaggccaag aaacagatca 1080
acgattacgt ggagaagggt actcaaggga aaattgtgga tttggtcaag gagcttgaca 1140
gagacacagt ttttgctctg gtgaattaca tcttctttaa aggcaaatgg gagagaccct 1200
ttgaagtcaa ggacaccgag gaagaggact tccacgtgga ccaggtgacc accgtgaagg 1260
tgcctatgat gaagcgttta ggcatgttta acatccagca ctgtaagaag ctgtccagct 1320
gggtgctgct gatgaaatac ctgggcaatg ccaccgccat cttcttcctg cctgatgagg 1380
ggaaactaca gcacctggaa aatgaactca cccacgatat catcaccaag ttcctggaaa 1440
atgaagacag aaggtctgcc agcttacatt tacccaaact gtccattact ggaacctatg 1500
atctgaagag cgtcctgggt caactgggca tcactaaggt cttcagcaat ggggctgacc 1560
tctccggggt cacagaggag gcacccctga agctctccaa ggccgtgcat aaggctgtgc 1620
tgaccatcga cgagaaaggg actgaagctg ctggggccat gtttttagag gccataccca 1680
tgtctatccc ccccgaggtc aagttcaaca aacccttttgt cttcttaatg attgaacaaa 1740
ataccaagtc tcccctcttc atgggaaaag tggtgaatcc cacccaaaaa taactgcctc 1800
tcgctcctca acccctcccc tccatccctg gccccctccc tggatgacat taaagaaggg 1860

ttgagctggt ccctgcctgc atgtgactgt aaatccctcc catgttttct ctgagtctcc 1920
ctttgcctgc tgaggctgta tgtgggctcc aggtaacagt gctgtcttcg ggccccctga 1980
actgtgttca tggagcatct ggctgggtag gcacatgctg ggcttgaatc caggggggac 2040
tgaatcctca gcttacggac ctgggcccat ctgtttctgg agggctccag tcttccttgt 2100
cctgtcttgg agtccccaag aaggaatcac aggggaggaa ccagatacca gccatgaccc 2160
caggctccac caagcatctt catgtccccc tgctcatccc ccactccccc ccacccagag 2220
ttgctcatcc tgccagggct ggctgtgccc accccaaggc tgccctcctg ggggccccag 2280
aactgcctga tcgtgccgtg gcccagtttt gtggcatctg cagcaacaca agagagagga 2340
caatgtcctc ctcttgaccc gctgtcacct aaccagactc gggccctgca cctctcaggc 2400
acttctggaa aatgactgag gcagattctt cctgaagccc attctccatg gggcaacaag 2460
gacacctatt ctgtccttgt ccttccatcg ctgccccaga aagcctcaca tatctccgtt 2520
tagaatcagg tcccttctcc ccagatgaag aggagggtct ctgctttgtt ttctctatct 2580
cctcctcaga cttgaccagg cccagcaggc cccagaagac cattacccta tatcccttct 2640
cctccctagt cacatggcca taggcctgct gatggctcag gaaggccatt gcaaggactc 2700
ctcagctatg ggagaggaag cacatcaccc attgaccccc gcaacccctc cctttcctcc 2760
tctgagtccc gactggggcc acatgcagcc tgacttcttt gtgcctgttg ctgtccctgc 2820
agtcttcaga gggccaccgc agctccagtg ccacggcagg aggctgttcc tgaatagccc 2880
ctgtggtaag ggccaggaga gtccttccat cctccaaggc cctgctaaag gacacagcag 2940
ccaggaagtc ccctgggccc ctagctgaag gacagcctgc tccctccgtc tctaccagga 3000
atggccttgt cctatggaag gcactgcccc atcccaaact aatctaggaa tcactgtcta 3060
accactcact gtcatgaatg tgtacttaaa ggatgaggtt gagtcatacc aaatagtgat 3120
ttcgatagtt caaaatggtg aaattagcaa ttctacatga ttcagtctaa tcaatggata 3180
ccgactgttt cccacacaag tctcctgttc tcttaagctt actcactgac agcctttcac 3240
tctccacaaa tacattaaag atatggccat caccaagccc cctaggatga caccagacct 3300
gagagtctga agacctggat ccaagttctg acttttcccc ctgacagctg tgtgaccttc 3360
gtgaagtcgc caaacctctc tgagccccag tcattgctag taagacctgc ctttgagttg 3420
gtatgatgtt caagttagat aacaaaatgt ttatacccat tagaacagag aataaataga 3480
actacatttc ttgca 3495

<210> 8
<211> 3492
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 8
tgggcaggaa ctgggcactg tgcccagggc atgcactgcc tccacgcagc aaccctcaga 60
gtcctgagct gaaccaagaa ggaggagggg gtcgggcctc cgaggaaggc ctagccgctg 120
ctgctgccag gaattccagg ttggaggggc ggcaacctcc tgccagcctt caggccactc 180
tcctgtgcct gccagaagag acagagcttg aggagagctt gaggagagca ggaaagggcg 240

gcagtaagtc ttcagcatca ggcattttgg ggtgactcag taaatggtag atcttgctac 300
cagtggaaca gccactaagg attctgcagt gagagcagag ggccagctaa gtggtactct 360
cccagagact gtctgactca cgccaccccc tccaccttgg acacaggacg ctgtggtttc 420
tgagccagcc tcccccgttg cccctctgga tccactgctt aaatacggac gaggacaggg 480
ccctgtctcc tcagcttcag gcaccaccac tgacctggga cagtgaatcg acaatgccgt 540
cttctgtctc gtggggcatc ctcctgctgg caggcctgtg ctgcctggtc cctgtctccc 600
tggctgagga tccccaggga gatgctgccc agaagacaga tacatcccac catgatcagg 660
atcacccaac cttcaacaag atcaccccca acctggctga gttcgccttc agcctatacc 720
gccagctggc acaccagtcc aacagcacca atatcttctt ctccccagtg agcatcgcta 780
cagcctttgc aatgctctcc ctggggacca aggctgacac tcacgatgaa atcctggagg 840
gcctgaattt caacctcacg gagattccgg aggctcagat ccatgaaggc ttccaggaac 900
tcctccgtac cctcaaccag ccagacagcc agctccagct gaccaccggc aatggcctgt 960
tcctcagcga gggcctgaag ctagtggata agtttttgga ggatgttaaa aagttgtacc 1020
actcagaagc cttcactgtc aacttcgggg acaccgaaga ggccaagaaa cagatcaacg 1080
attacgtgga gaagggtact caagggaaaa ttgtggattt ggtcaaggag cttgacagag 1140
acacagtttt tgctctggtg aattacatct tctttaaagg caaatgggag agacccttg 1200
aagtcaagga caccgaggaa gaggacttcc acgtggacca ggtgaccacc gtgaaggtgc 1260
ctatgatgaa gcgtttaggc atgtttaaca tccagcactg taagaagctg tccagctggg 1320
tgctgctgat gaaatacctg ggcaatgcca ccgccatctt cttcctgcct gatgagggga 1380
aactacagca cctggaaaat gaactcaccc acgatatcat caccaagttc ctggaaaatg 1440
aagacagaag gtctgccagc ttacatttac ccaaactgtc cattactgga acctatgatc 1500
tgaagagcgt cctgggtcaa ctgggcatca ctaaggtctt cagcaatggg gctgacctct 156

ccggggtcac agaggaggca cccctgaagc tctccaaggc cgtgcataag gctgtgctga 1620
ccatcgacga gaaagggact gaagctgctg gggccatgtt tttagaggcc atacccatgt 1680
ctatcccccc cgaggtcaag ttcaacaaac cctttgtctt cttaatgatt gaacaaaata 1740
ccaagtctcc cctcttcatg ggaaaagtgg tgaatcccac ccaaaaataa ctgcctctcg 1800
ctcctcaacc cctcccctcc atccctggcc ccctccctgg atgacattaa agaagggttg 1860
agctggtccc tgcctgcatg tgactgtaaa tccctcccat gttttctctg agtctccctt 1920
tgcctgctga ggctgtatgt gggctccagg taacagtgct gtcttcgggc cccctgaact 1980
gtgttcatgg agcatctggc tgggtaggca catgctgggc ttgaatccag gggggactga 2040
atcctcagct tacggacctg ggcccatctg tttctggagg gctccagtct tccttgtcct 2100
gtcttggagt ccccaagaag gaatcacagg ggaggaacca gataccagcc atgaccccag 2160
gctccaccaa gcatcttcat gtccccctgc tcatccccca ctccccccca cccagagttg 2220
ctcatcctgc cagggctggc tgtgcccacc ccaaggctgc cctcctgggg gccccagaac 2280
tgcctgatcg tgccgtggcc cagttttgtg gcatctgcag caacacaaga gagaggacaa 2340
tgtcctcctc ttgacccgct gtcacctaac cagactcggg ccctgcacct ctcaggcact 2400
tctggaaaat gactgaggca gattcttcct gaagcccatt ctccatgggg caacaaggac 2460
acctattctg tccttgtcct tccatcgctg ccccagaaag cctcacatat ctccgtttag 2520
aatcaggtcc cttctcccca gatgaagagg agggtctctg ctttgttttc tctatctcct 2580
cctcagactt gaccaggccc agcaggcccc agaagaccat taccctatat cccttctcct 2640
ccctagtcac atggccatag gcctgctgat ggctcaggaa ggccattgca aggactcctc 2700
agctatggga gaggaagcac atcacccatt gacccccgca acccctccct ttcctcctct 2760
gagtcccgac tggggccaca tgcagcctga cttctttgtg cctgttgctg tccctgcagt 2820
cttcagaggg ccaccgcagc tccagtgcca cggcaggagg ctgttcctga atagcccctg 2880
tggtaagggc caggagagtc cttccatcct ccaaggccct gctaaaggac acagcagcca 2940
ggaagtcccc tgggccccta gctgaaggac agcctgctcc ctccgtctct accaggaatg 3000
gccttgtcct atggaaggca ctgccccatc ccaaactaat ctaggaatca ctgtctaacc 3060
actcactgtc atgaatgtgt acttaaagga tgaggttgag tcataccaaa tagtgatttc 3120
gatagttcaa aatggtgaaa ttagcaattc tacatgattc agtctaatca atggataccg 3180
actgtttccc acacaagtct cctgttctct taagcttact cactgacagc ctttcactct 3240
ccacaaatac attaaagata tggccatcac caagcccccc aggatgacac cagacctgag 3300
agtctgaaga cctggatcca agttctgact tttccccctg acagctgtgt gaccttcgtg 3360
aagtcgccaa acctctctga gccccagtca ttgctagtaa gacctgcctt tgagttggta 3420
tgatgttcaa gttagataac aaaatgttta tacccattag aacagagaat aaatagaact 3480
acatttcttg ca 3492

<210> 9
<211> 3510
<212> ADN
<213> Homo sapiens
<400> 9

tgggcaggaa ctgggcactg tgcccagggc atgcactgcc tccacgcagc aaccctcaga 60
gtcctgagct gaaccaagaa ggaggagggg gtcgggcctc cgaggaaggc ctagccgctg 120
ctgctgccag gaattccagg ttggaggggc ggcaacctcc tgccagcctt caggccactc 180
tcctgtgcct gccagaagag acagagcttg aggagagctt gaggagagca ggaaagggcg 240
gcagtaagtc ttcagcatca ggcattttgg ggtgactcag taaatggtag atcttgctac 300
cagtggaaca gccactaagg attctgcagt gagagcagag ggccagctaa gtggtactct 360
cccagagact gtctgactca cgccaccccc tccaccttgg acacaggacg ctgtggtttc 420
tgagccaggt acaatgactc ctttcgcctc ccccgttgcc cctctggatc cactgcttaa 480
atacggacga ggacagggcc ctgtctcctc agcttcaggc accaccactg acctgggaca 540
gtgaatcgac aatgccgtct tctgtctcgt ggggcatcct cctgctggca ggcctgtgct 600
gcctggtccc tgtctccctg gctgaggatc cccagggaga tgctgcccag aagacagata 660
catcccacca tgatcaggat cacccaacct tcaacaagat caccccccaac ctggctgagt 720
tcgccttcag cctataccgc cagctggcac accagtccaa cagcaccaat atcttcttct 780
ccccagtgag catcgctaca gcctttgcaa tgctctccct ggggaccaag gctgacactc 840
acgatgaaat cctggagggc ctgaatttca acctcacgga gattccggag gctcagatcc 900
atgaaggctt ccaggaactc ctccgtaccc tcaaccagcc agacagccag ctccagctga 960
ccaccggcaa tggcctgttc ctcagcgagg gcctgaagct agtggataag tttttggagg 1020
atgttaaaaa gttgtaccac tcagaagcct tcactgtcaa cttcggggac accgaagagg 1080
ccaagaaaca gatcaacgat tacgtggaga agggtactca agggaaaatt gtggatttgg 1140
tcaaggagct tgacagagac acagtttttg ctctggtgaa ttacatcttc tttaaaggca 1200
aatgggagag acccctttgaa gtcaaggaca ccgaggaaga ggacttccac gtggaccagg 1260
tgaccaccgt gaaggtgcct atgatgaagc gtttaggcat gtttaacatc cagcactgta 1320

agaagctgtc cagctgggtg ctgctgatga aatacctggg caatgccacc gccatcttct 1380
tcctgcctga tgaggggaaa ctacagcacc tggaaaatga actcacccac gatatcatca 1440
ccaagttcct ggaaaatgaa gacagaaggt ctgccagctt acatttaccc aaactgtcca 1500
ttactggaac ctatgatctg aagagcgtcc tgggtcaact gggcatcact aaggtcttca 1560
gcaatggggc tgacctctcc ggggtcacag aggaggcacc cctgaagctc tccaaggccg 1620
tgcataaggc tgtgctgacc atcgacgaga aagggactga agctgctggg gccatgtttt 1680
tagaggccat acccatgtct atccccccccg aggtcaagtt caacaaaccc tttgtcttct 1740
taatgattga acaaaatacc aagtctcccc tcttcatggg aaaagtggtg aatcccaccc 1800
aaaaataact gcctctcgct cctcaacccc tcccctccat ccctggcccc ctccctggat 1860
gacattaaag aagggttgag ctggtccctg cctgcatgtg actgtaaatc cctcccatgt 1920
tttctctgag tctccctttg cctgctgagg ctgtatgtgg gctccaggta acagtgctgt 1980
cttcgggccc cctgaactgt gttcatggag catctggctg ggtaggcaca tgctgggctt 2040
gaatccaggg gggactgaat cctcagctta cggacctggg cccatctgtt tctggagggc 2100
tccagtcttc cttgtcctgt cttggagtcc ccaagaagga atcacagggg aggaaccaga 2160
taccagccat gaccccaggc tccaccaagc atcttcatgt ccccctgctc atcccccact 2220
ccccccccacc cagagttgct catcctgcca gggctggctg tgcccacccc aaggctgccc 2280
tcctgggggc cccagaactg cctgatcgtg ccgtggccca gttttgtggc atctgcagca 2340
acacaagaga gaggacaatg tcctcctctt gacccgctgt cacctaacca gactcgggcc 2400
ctgcacctct caggcacttc tggaaaatga ctgaggcaga ttcttcctga agcccattct 2460
ccatggggca acaaggacac ctattctgtc cttgtccttc catcgctgcc ccagaaagcc 2520
tcacatatct ccgtttagaa tcaggtccct tctccccaga tgaagaggag ggtctctgct 2580
ttgttttctc tatctcctcc tcagacttga ccaggcccag caggccccag aagaccatta 2640
ccctatatcc cttctcctcc ctagtcacat ggccataggc ctgctgatgg ctcaggaagg 2700
ccattgcaag gactcctcag ctatgggaga ggaagcacat cacccattga ccccccgcaac 2760
ccctcccttt cctcctctga gtcccgactg gggccacatg cagcctgact tctttgtgcc 2820
tgttgctgtc cctgcagtct tcagagggcc accgcagctc cagtgccacg gcaggaggct 2880
gttcctgaat agcccctgtg gtaagggcca ggagagtcct tccatcctcc aaggccctgc 2940
taaaggacac agcagccagg aagtcccctg ggcccctagc tgaaggacag cctgctccct 3000
ccgtctctac caggaatggc cttgtcctat ggaaggcact gccccatccc aaactaatct 3060
aggaatcact gtctaaccac tcactgtcat gaatgtgtac ttaaaggatg aggttgagtc 3120
ataccaaata gtgatttcga tagttcaaaa tggtgaaatt agcaattcta catgattcag 3180
tctaatcaat ggataccgac tgtttcccac acaagtctcc tgttctctta agcttactca 3240
ctgacagcct ttcactctcc acaaatacat taaagatatg gccatcacca agccccctag 3300
gatgacacca gacctgagag tctgaagacc tggatccaag ttctgacttt tccccctgac 3360
agctgtgtga ccttcgtgaa gtcgccaaac ctctctgagc cccagtcatt gctagtaaga 3420
cctgcctttg agttggtatg atgttcaagt tagataacaa aatgtttata cccattagaa 3480
cagagaataa atagaactac atttcttgca 3510

<210> 10
<211> 3303
<212> ADN
<213> Homo sapiens
<400> 10

tgggcaggaa ctgggcactg tgcccagggc atgcactgcc tccacgcagc aaccctcaga 60
gtcctgagct gaaccaagaa ggaggagggg gtcgggcctc cgaggaaggc ctagccgctg 120
ctgctgccag gaattccagg ttggaggggc ggcaacctcc tgccagcctt caggccactc 180
tcctgtgcct gccagaagag acagagcttg aggagagctt gaggagagca ggaaagcagc 240
ctccccccgtt gcccctctgg atccactgct taaatacgga cgaggacagg gccctgtctc 300
ctcagcttca ggcaccacca ctgacctggg acagtgaatc gacaatgccg tcttctgtct 360
cgtggggcat cctcctgctg gcaggcctgt gctgcctggt ccctgtctcc ctggctgagg 420
atccccaggg agatgctgcc cagaagacag atacatccca ccatgatcag gatcacccaa 480
ccttcaacaa gatcaccccc aacctggctg agttcgcctt cagcctatac cgccagctgg 540
cacaccagtc caacagcacc aatatcttct tctccccagt gagcatcgct acagcctttg 600
caatgctctc cctggggacc aaggctgaca ctcacgatga aatcctggag ggcctgaatt 660
tcaacctcac ggagattccg gaggctcaga tccatgaagg cttccaggaa ctcctccgta 720
ccctcaacca gccagacagc cagctccagc tgaccaccgg caatggcctg ttcctcagcg 780
agggcctgaa gctagtggat aagtttttgg aggatgttaa aaagttgtac cactcagaag 840
ccttcactgt caacttcggg gacaccgaag aggccaagaa acagatcaac gattacgtgg 900
agaagggtac tcaagggaaa attgtggatt tggtcaagga gcttgacaga gacacagttt 960
ttgctctggt gaattacatc ttctttaaag gcaaatggga gagacccttt gaagtcaagg 1020
acaccgagga agaggacttc cacgtggacc aggtgaccac cgtgaaggtg cctatgatga 1080

agcgtttagg catgtttaac atccagcact gtaagaagct gtccagctgg gtgctgctga 1140
tgaaatacct gggcaatgcc accgccatct tcttcctgcc tgatgagggg aaactacagc 1200
acctggaaaa tgaactcacc cacgatatca tcaccaagtt cctggaaaat gaagacagaa 1260
ggtctgccag cttacattta cccaaactgt ccattactgg aacctatgat ctgaagagcg 1320
tcctgggtca actgggcatc actaaggtct tcagcaatgg ggctgacctc tccggggtca 1380
cagaggaggc acccctgaag ctctccaagg ccgtgcataa ggctgtgctg accatcgacg 1440
agaaagggac tgaagctgct ggggccatgt ttttagaggc catacccatg tctatccccc 1500
ccgaggtcaa gttcaacaaa ccctttgtct tcttaatgat tgaacaaaat accaagtctc 1560
ccctcttcat gggaaaagtg gtgaatccca cccaaaaata actgcctctc gctcctcaac 1620
ccctcccctc catccctggc cccctccctg gatgacatta aagaagggtt gagctggtcc 1680
ctgcctgcat gtgactgtaa atccctccca tgttttctct gagtctccct ttgcctgctg 1740
aggctgtatg tgggctccag gtaacagtgc tgtcttcggg ccccctgaac tgtgttcatg 1800
gagcatctgg ctgggtaggc acatgctggg cttgaatcca ggggggactg aatcctcagc 1860
ttacggacct gggcccatct gtttctggag ggctccagtc ttccttgtcc tgtcttggag 1920
tccccaagaa ggaatcacag gggaggaacc agataccagc catgacccca ggctccacca 1980
agcatcttca tgtccccctg ctcatccccc actccccccc acccagagtt gctcatcctg 2040
ccagggctgg ctgtgcccac cccaaggctg ccctcctggg ggccccagaa ctgcctgatc 2100
gtgccgtggc ccagttttgt ggcatctgca gcaacacaag agagaggaca atgtcctcct 2160
cttgacccgc tgtcacctaa ccagactcgg gccctgcacc tctcaggcac ttctggaaaa 2220
tgactgaggc agattcttcc tgaagcccat tctccatggg gcaacaagga cacctattct 2280
gtccttgtcc ttccatcgct gccccagaaa gcctcacata tctccgttta gaatcaggtc 2340
ccttctcccc agatgaagag gagggtctct gctttgtttt ctctatctcc tcctcagact 2400
tgaccaggcc cagcaggccc cagaagacca ttaccctata tcccttctcc tccctagtca 2460
catggccata ggcctgctga tggctcagga aggccattgc aaggactcct cagctatggg 2520
agaggaagca catcacccat tgacccccgc aacccctccc tttcctcctc tgagtcccga 2580
ctggggccac atgcagcctg acttctttgt gcctgttgct gtccctgcag tcttcagagg 2640
gccaccgcag ctccagtgcc acggcaggag gctgttcctg aatagcccct gtggtaaggg 2700
ccaggagagt ccttccatcc tccaaggccc tgctaaagga cacagcagcc aggaagtccc 2760
ctgggccccc agctgaagga cagcctgctc cctccgtctc taccaggaat ggccttgtcc 2820
tatggaaggc actgccccat cccaaactaa tctaggaatc actgtctaac cactcactgt 2880
catgaatgtg tacttaaagg atgaggttga gtcataccaa atagtgattt cgatagttca 2940
aaatggtgaa attagcaatt ctacatgatt cagtctaatc aatggatacc gactgtttcc 3000
cacacaagtc tcctgttctc ttaagcttac tcactgacag cctttcactc tccacaaata 3060
cattaaagat atggccatca ccaagccccc taggatgaca ccagacctga gagtctgaag 3120
acctggatcc aagttctgac ttttcccccc gacagctgtg tgaccttcgt gaagtcgcca 3180
aacctctctg agccccagtc attgctagta agacctgcct ttgagttggt atgatgttca 3240
agttagataa caaaatgttt atacccatta gaacagagaa taaatagaac tacatttctt 3300
gca 3303

<210> 11
<211> 3300
<212> ADN
<213> Homo sapiens
<400> 11

tgggcaggaa ctgggcactg tgcccagggc atgcactgcc tccacgcagc aaccctcaga 60
gtcctgagct gaaccaagaa ggaggagggg gtcgggcctc cgaggaaggc ctagccgctg 120
ctgctgccag gaattccagg ttggaggggc ggcaacctcc tgccagcctt caggccactc 180
tcctgtgcct gccagaagag acagagcttg aggagagctt gaggagagca ggaaagcctc 240
ccccgttgcc cctctggatc cactgcttaa atacggacga ggacagggcc ctgtctcctc 300
agcttcaggc accaccactg acctgggaca gtgaatcgac aatgccgtct tctgtctcgt 360
ggggcatcct cctgctggca ggcctgtgct gcctggtccc tgtctccctg gctgaggatc 420
cccagggaga tgctgcccag aagacagata catcccacca tgatcaggat cacccaacct 480
tcaacaagat cacccccaac ctggctgagt tcgccttcag cctataccgc cagctggcac 540
accagtccaa cagcaccaat atcttcttct ccccagtgag catcgctaca gcctttgcaa 600
tgctctccct ggggaccaag gctgacactc acgatgaaat cctggagggc ctgaatttca 660
acctcacgga gattccggag gctcagatcc atgaaggctt ccaggaactc ctccgtaccc 720
tcaaccagcc agacagccag ctccagctga ccaccggcaa tggcctgttc ctcagcgagg 780
gcctgaagct agtggataag tttttggagg atgttaaaaa gttgtaccac tcagaagcct 840
tcactgtcaa cttcggggac accgaagagg ccaagaaaca gatcaacgat tacgtggaga 900
agggtactca agggaaaatt gtggatttgg tcaaggagct tgacagagac acagtttttg 960
ctctggtgaa ttacatcttc tttaaaggca aatgggagag acccctttgaa gtcaaggaca 1020

ccgaggaaga ggacttccac gtggaccagg tgaccaccgt gaaggtgcct atgatgaagc 1080
gtttaggcat gtttaacatc cagcactgta agaagctgtc cagctgggtg ctgctgatga 1140
aatacctggg caatgccacc gccatcttct tcctgcctga tgaggggaaa ctacagcacc 1200
tggaaaatga actcacccac gatatcatca ccaagttcct ggaaaatgaa gacagaaggt 1260
ctgccagctt acatttaccc aaactgtcca ttactggaac ctatgatctg aagagcgtcc 1320
tgggtcaact gggcatcact aaggtcttca gcaatggggc tgacctctcc ggggtcacag 1380
aggaggcacc cctgaagctc tccaaggccg tgcataaggc tgtgctgacc atcgacgaga 1440
aagggactga agctgctggg gccatgtttt tagaggccat acccatgtct atccccccccg 1500
aggtcaagtt caacaaaccc tttgtcttct taatgattga acaaaatacc aagtctcccc 1560
tcttcatggg aaaagtggtg aatcccaccc aaaaataact gcctctcgct cctcaacccc 1620
tcccctccat ccctggcccc ctccctggat gacattaaag aagggttgag ctggtccctg 1680
cctgcatgtg actgtaaatc cctcccatgt tttctctgag tctccctttg cctgctgagg 1740
ctgtatgtgg gctccaggta acagtgctgt cttcgggccc cctgaactgt gttcatggag 1800
catctggctg ggtaggcaca tgctgggctt gaatccaggg gggactgaat cctcagctta 1860
cggacctggg cccatctgtt tctggagggc tccagtcttc cttgtcctgt cttggagtcc 1920
ccaagaagga atcacagggg aggaaccaga taccagccat gaccccaggc tccaccaagc 1980
atcttcatgt ccccctgctc atcccccact ccccccccacc cagagttgct catcctgcca 2040
gggctggctg tgcccacccc aaggctgccc tcctgggggc cccagaactg cctgatcgtg 2100
ccgtggccca gttttgtggc atctgcagca acacaagaga gaggacaatg tcctcctctt 2160
gacccgctgt cacctaacca gactcgggcc ctgcacctct caggcacttc tggaaaatga 2220
ctgaggcaga ttcttcctga agcccattct ccatggggca acaaggacac ctattctgtc 2280
cttgtccttc catcgctgcc ccagaaagcc tcacatatct ccgtttagaa tcaggtccct 2340
tctccccaga tgaagaggag ggtctctgct ttgttttctc tatctcctcc tcagacttga 2400
ccaggcccag caggccccag aagaccatta ccctatatcc cttctcctcc ctagtcacat 2460
ggccataggc ctgctgatgg ctcaggaagg ccattgcaag gactcctcag ctatgggaga 2520
ggaagcacat cacccattga ccccccgcaac ccctcccttt cctcctctga gtcccgactg 2580
gggccacatg cagcctgact tctttgtgcc tgttgctgtc cctgcagtct tcagagggcc 2640
accgcagctc cagtgccacg gcaggaggct gttcctgaat agcccctgtg gtaagggcca 2700
ggagagtcct tccatcctcc aaggccctgc taaaggacac agcagccagg aagtcccctg 2760
ggcccctagc tgaaggacag cctgctccct ccgtctctac caggaatggc cttgtcctat 2820
ggaaggcact gccccatccc aaactaatct aggaatcact gtctaaccac tcactgtcat 2880
gaatgtgtac ttaaaggatg aggttgagtc ataccaaata gtgatttcga tagttcaaaa 2940
tggtgaaatt agcaattcta catgattcag tctaatcaat ggataccgac tgtttcccac 3000
acaagtctcc tgttctctta agcttactca ctgacagcct ttcactctcc acaaatacat 3060
taaagatatg gccatcacca agcccccctag gatgacacca gacctgagag tctgaagacc 3120
tggatccaag ttctgacttt tccccctgac agctgtgtga ccttcgtgaa gtcgccaaac 3180
ctctctgagc cccagtcatt gctagtaaga cctgcctttg agttggtatg atgttcaagt 3240
tagataacaa aatgtttata cccattagaa cagagaataa atagaactac atttcttgca 3300

<210> 12
<211> 1321
<212> ADN
<213> Macaca mulatta
<400> 12

caggacaatg ccatcttctg tctcatgggg cgtcctcctg ctggcaggcc tgtgctgcct 60
gctccccggc tctctggctg aggatcccca gggagatgct gcccagaaga cggatacatc 120
ccaccatgat caggaccacc caaccctcaa caagatcacc cccagcctgg ctgagttcgg 180
cttcagccta taccgccagc tggcacacca gtccaacagc accaatatct tcttctcccc 240
agtgagcatc gctacagcct ttgcaatgct ctccctgggg accaaggctg acactcacag 300
tgaaatcctg gagggcctga atttcaacgt cacggagatt ccggaggctc aggtccatga 360
aggcttccag gaactcctcc ataccctcaa caagccagac agccagctcc agctgaccac 420
cggcaacggc ctgttcctca acaagagcct gaaggtagtg gataagtttt tggaggatgt 480
caaaaaactg taccactcag aagccttctc tgtcaacttt gaggacaccg aagaggccaa 540
gaaacagatc aacaattacg tggagaagga aactcaaggg aaaattgtgg atttggtcaa 600
ggagcttgac agagacacag tttttgctct ggtgaattac atcttcttta aaggcaaatg 660
ggagagaccc tttgacgttg aggccaccaa ggaagaggac ttccacgtgg accaggcgac 720
caccgtgaag gtgcccatga tgaggcgttt aggcatgttt aacatctacc actgtgagaa 780
gctgtccagc tgggtgctgc tgatgaaata cctgggcaat gccaccgcca tcttcttcct 840
gcctgatgag gggaaactgc agcacctgga aaatgaactc acccatgata tcatcaccaa 900
gttcctggaa aatgaaaaca gcaggtctgc caacttacat ttacccagac tggccattac 960
tggaacctat gatctgaaga cagtcctggg ccacctgggt atcactaagg tcttcagcaa 1020

tggggctgac ctctcgggga tcacggagga ggcacccctg aagctctcca aggccgtgca 1080
taaggctgtg ctgaccatcg atgagaaagg gactgaagct gctggggcca tgtttttaga 1140
ggccataccc atgtctattc cccccgaggt caagttcaac aaaccctttg tcttcttaat 1200
gattgaacaa aataccaagt ctcccctctt catgggaaaa gtggtgaatc ccacccagaa 1260
ataactgcct gtcactcctc agcccctccc ctccatccct ggcccccctcc ctgaatgaca 1320
t 1321

<210> 13
<211> 2064
<212> ADN
<213> Macaca mulatta
<400> 13

gcccagtctt gtgtctgcct ggcaatgggc aaggcccctt cctgcccaag ctccccgccc 60
ctccccaacc tattgcctcc gccacccgcc acccgaggcc aacttcctgg gtgggcagga 120
actgggccct gtgcccaggg cgtgcactgc ctccacgcag caaccctcag agtactgagc 180
tgagcaaagg aggaggaggg gatcagcact ctgaggaagg cctagccact gctgctgcca 240
ggaattccag ggcggcatca gtcttcagca tcaggcattt cggggtgaat tagtaaatgg 300
tagatcttgc taccagtgga acagccgcta aggattctgc agtgagagca gagggccagc 360
aaagtggtac tctcccagcg actggctgac tcacgccacc ccctccacct tggacgcagg 420
acactgtggt ttctgagcca ggtacaatga ctccttttgg tacgtgcagt ggaggctgta 480
tgctgctcag gcagagcgtc cggacagcgt gggcgggcga ctcagcgccc agcctgtgaa 540
cttagtccct gtttgctcct ccggtaactg gggtgatctt ggttaatatt caccagcagc 600
ctcccccgtt gcccctctgc acccactgct taaatacgga caaggacagg gctctgtctc 660
ctcagcctca ggcaccacca ctgacctggg acggtgaatc gacaatgcca tcttctgtct 720
catggggcgt cctcctgctg gcaggcctgt gctgcctgct ccccggctct ctggctgagg 780
atccccaggg agatgctgcc cagaagacgg atacatccca ccatgatcag gaccacccaa 840
ccctcaacaa gatcaccccc agcctggctg agttcggctt cagcctatac cgccagctgg 900
cacaccagtc caacagcacc aatatcttct tctccccagt gagcatcgct acagcctttg 960
caatgctctc cctggggacc aaggctgaca ctcacagtga aatcctggag ggcctgaatt 1020
tcaacgtcac ggagattccg gaggctcagg tccatgaagg cttccaggaa ctcctccata 1080
ccctcaacaa gccagacagc cagctccagc tgaccaccgg caacggcctg ttcctcaaca 1140
agagcctgaa ggtagtggat aagtttttgg aggatgtcaa aaaactgtac cactcagaag 1200
ccttctctgt caactttgag gacaccgaag aggccaagaa acagatcaac aattacgtgg 1260
agaaggaaac tcaagggaaa attgtggatt tggtcaagga gcttgacaga gacacagttt 1320
ttgctctggt gaattacatc ttctttaaag gcaaatggga gagacccttt gacgttgagg 1380
ccaccaagga agaggacttc cacgtggacc aggcgaccac cgtgaaggtg cccatgatga 1440
ggcgtttagg catgtttaac atctaccact gtgagaagct gtccagctgg gtgctgctga 1500
tgaaatacct gggcaatgcc accgccatct tcttcctgcc tgatgagggg aaactgcagc 1560
acctggaaaa tgaactcacc catgatatca tcaccaagtt cctggaaaat gaaaacagca 1620
ggtctgccaa cttacattta cccagactgg ccattactgg aacctatgat ctgaagacag 1680
tcctgggcca cctgggtatc actaaggtct tcagcaatgg ggctgacctc tcggggatca 1740
cggaggaggc acccctgaag ctctccaagg ccgtgcataa ggctgtgctg accatcgatg 1800
agaaagggac tgaagctgct ggggccatgt ttttagaggc catacccatg tctattcccc 1860
ccgaggtcaa gttcaacaaa ccctttgtct tcttaatgat tgaacaaaat accaagtctc 1920
ccctcttcat gggaaaagtg gtgaatccca cccagaaata actgcctgtc actcctcagc 1980
ccctcccctc catccctggc cccctccctg aatgacatta aagaagggtt gagctggtcc 2040
ctgcctgcgt gtgtgactgc aaac 2064

<210> 14
<211> 1608
<212> ADN
<213> Macaca mulatta
<400> 14

tcttgtgtct gcctggcaat gggcaaggcc ccttcctgcc caagctcccc gcccctcccc 60
aacctattgc ctccgccacc cgccacccga ggccaacttc ctgggtgggc aggaactggg 120
ccctgtgccc agggcgtgca ctgcctccac gcagcaaccc tcagagtact gagctgagca 180
aaggaggagg aggggatcag cactctgagg aaggcctagc cactgctgct gccaggaatt 240
ccaggacaat gccatcttct gtctcatggg gcgtcctcct gctggcaggc ctgtgctgcc 300
tgctccccgg ctctctggct gaggatcccc agggagatgc tgcccagaag acggatacat 360
cccaccatga tcaggaccac ccaaccctca acaagatcac ccccagcctg gctgagttcg 420
gcttcagcct ataccgccag ctggcacacc agtccaacag caccaatatc ttcttctccc 480
cagtgagcat cgctacagcc tttgcaatgc tctccctggg gaccaaggct gacactcaca 540

gtgaaatcct ggagggcctg aatttcaacg tcacggagat tccggaggct caggtccatg 600
aaggcttcca ggaactcctc cataccctca acaagccaga cagccagctc cagctgacca 660
ccggcaacgg cctgttcctc aacaagagcc tgaaggtagt ggataagttt ttggaggatg 720
tcaaaaaact gtaccactca gaagccttct ctgtcaactt tgaggacacc gaagaggcca 780
agaaacagat caacaattac gtggagaagg aaactcaagg gaaaattgtg gatttggtca 840
aggagcttga cagagacaca gtttttgctc tggtgaatta catcttcttt aaaggcaaat 900
gggagagacc ctttgacgtt gaggccacca aggaagagga cttccacgtg gaccaggcga 960
ccaccgtgaa ggtgcccatg atgaggcgtt taggcatgtt taacatctac cactgtgaga 1020
agctgtccag ctgggtgctg ctgatgaaat acctgggcaa tgccaccgcc atcttcttcc 1080
tgcctgatga ggggaaactg cagcacctgg aaaatgaact cacccatgat atcatcacca 1140
agttcctgga aaatgaaaac agcaggtctg ccaacttaca tttacccaga ctggccatta 1200
ctggaaccta tgatctgaag acagtcctgg gccacctggg tatcactaag gtcttcagca 1260
atggggctga cctctcgggg atcacggagg aggcacccct gaagctctcc aaggccgtgc 1320
ataaggctgt gctgaccatc gatgagaaag ggactgaagc tgctggggcc atgtttttag 1380
aggccatacc catgtctatt ccccccgagg tcaagttcaa caaacccttt gtcttcttaa 1440
tgattgaaca aaataccaag tctcccctct tcatgggaaa agtggtgaat cccacccaga 1500
aataactgcc tgtcactcct cagcccctcc cctccatccc tggccccctc cctgaatgac 1560
attaaagaag ggttgagctg gtccctgcct gcgtgtgtga ctgcaaac 1608

<210> 15
<211> 3220
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 15
tgcaagaaat gtagttctat ttattctctg ttctaatggg tataaacatt ttgttatcta 60

acttgaacat cataccaact caaaggcagg tcttactagc aatgactggg gctcagagag 120

gtttggcgac ttcacgaagg tcacacagct gtcaggggga aaagtcagaa cttggatcca 180

ggtcttcaga ctctcaggtc tggtgtcatc ctaggggggct tggtgatggc catatcttta 240

atgtatttgt ggagagtgaa aggctgtcag tgagtaagct taagagaaca ggagacttgt 300

gtgggaaaca gtcggtatcc attgattaga ctgaatcatg tagaattgct aatttcacca 360

ttttgaacta tcgaaatcac tatttggtat gactcaacct catcctttaa gtacacattc 420

atgacagtga gtggttagac agtgattcct agattagttt gggatggggc agtgccttcc 480

ataggacaag gccattcctg gtagagacgg agggagcagg ctgtccttca gctaggggcc 540

caggggactt cctggctgct gtgtccttta gcagggcctt ggaggatgga aggactctcc 600

tggcccttac cacaggggct attcaggaac agcctcctgc cgtggcactg gagctgcggt 660

ggccctctga agactgcagg gacagcaaca ggcacaaaga agtcaggctg catgtggccc 720

cagtcgggac tcagaggagg aaagggaggg gttgcggggg tcaatgggtg atgtgcttcc 780

tctcccatag ctgaggagtc cttgcaatgg ccttcctgag ccatcagcag gcctatggcc 840

atgtgactag ggaggagaag ggatataggg taatggtctt ctggggcctg ctgggcctgg 900

tcaagtctga ggaggagata gagaaaacaa agcagagacc ctcctcttca tctggggaga 960

agggacctga ttctaaacgg agatatgtga ggctttctgg ggcagcgatg gaaggacaag 1020

gacagaatag gtgtccttgt tgccccatgg agaatgggct tcaggaagaa tctgcctcag 1080

tcattttcca gaagtgcctg agaggtgcag ggcccgagtc tggttaggtg acagcgggtc 1140

aagaggagga cattgtcctc tctcttgtgt tgctgcagat gccacaaaac tgggccacgg 1200

cacgatcagg cagttctggg gcccccagga gggcagcctt ggggtgggca cagccagccc 1260

tggcaggatg agcaactctg ggtgggggg agtgggggat gagcaggggg acatgaagat 1320

gcttggtgga gcctggggtc atggctggta tctggttcct cccctgtgat tccttcttgg 1380

ggactccaag acaggacaag gaagactgga gccctccaga aacagatggg cccaggtccg 1440

taagctgagg attcagtccc ccctggattc aagcccagca tgtgcctacc cagccagatg 1500

ctccatgaac acagttcagg gggcccgaag acagcactgt tacctggagc ccacatacag 1560

cctcagcagg caaagggaga ctcagagaaa acatgggagg gatttacagt cacatgcagg 1620

cagggaccag ctcaaccctt ctttaatgtc atccagggag ggggccaggg atggagggga 1680

ggggttgagg agcgagaggc agttatttt gggtgggatt caccactttt cccatgaaga 1740

ggggagactt ggtattttgt tcaatcatta agaagacaaa gggtttgttg aacttgacct 1800

cgggggggat agacatgggt atggcctcta aaaacatggc cccagcagct tcagtccctt 1860

tctcgtcgat ggtcagcaca gccttatgca cggccttgga gagcttcagg ggtgcctcct 1920

ctgtgacccc ggagaggtca gccccattgc tgaagacctt agtgatgccc agttgaccca 1980

ggacgctctt cagatcatag gttccagtaa tggacagttt gggtaaatgt aagctggcag 2040

accttctgtc ttcattttcc aggaacttgg tgatgatatc gtgggtgagt tcattttcca 2100

ggtgctgtag tttcccctca tcaggcagga agaagatggc ggtggcattg cccaggtatt 2160

tcatcagcag cacccagctg gacagcttct tacagtgctg gatgttaaac atgcctaaac 2220

gcttcatcat aggcaccttc acggtggtca cctggtccac gtggaagtcc tcttcctcgg 2280

tgtccttgac ttcaaagggt ctctcccatt tgcctttaaa gaagatgtaa ttcaccagag 2340

caaaaactgt gtctctgtca agctccttga ccaaatccac aattttccct tgagtaccct 2400

tctccacgta atcgttgatc tgtttcttgg cctcttcggt gtccccgaag ttgacagtga 2460

aggcttctga gtggtacaac tttttaacat cctccaaaaa cttatccact agcttcaggc 2520

cctcgctgag gaacaggcca ttgccggtgg tcagctggag ctggctgtct ggctggttga 2580

gggtacggag gagttcctgg aagccttcat ggatctgagc ctccggaatc tccgtgaggt 2640

tgaaattcag gccctccagg atttcatcgt gagtgtcagc cttggtcccc agggagagca 2700

ttgcaaaggc tgtagcgatg ctcactgggg agaagaagat attggtgctg ttggactggt 2760

gtgccagctg gcggtatagg ctgaaggcga actcagccag gttgggggtg atcttgttga 2820

aggttgggtg atcctgatca tggtgggatg tatctgtctt ctgggcagca tctccctggg 2880

gatcctcagc cagggagaca gggaccaggc agcacaggcc tgccagcagg aggatgcccc 2940

acgagacaga agacggcatt gtcgattcac tgtcccaggt cagtggtggt gcctgaagct 3000

gaggagacag ggccctgtcc tcgtccgtat ttaagcagtg gatccagagg ggcaacgggg 3060

gaggctgctg gtgaatatta accaaggtca ccccagttat cggaggagca aacaggggct 3120

aagtccactg gctgggatct gagtcgcccg cctacgctgc ccggacgctt tgcctgggca 3180

gtgtacagct tccactgcac ttaccgaaag gagtcattgt 3220

<210> 16
<211> 3199
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 16
tgcaagaaat gtagttctat ttattctctg ttctaatggg tataaacatt ttgttatcta 60

acttgaacat cataccaact caaaggcagg tcttactagc aatgactggg gctcagagag 120

gtttggcgac ttcacgaagg tcacacagct gtcaggggga aaagtcagaa cttggatcca 180

ggtcttcaga ctctcaggtc tggtgtcatc ctaggggggct tggtgatggc catatcttta 240

atgtatttgt ggagagtgaa aggctgtcag tgagtaagct taagagaaca ggagacttgt 300

gtgggaaaca gtcggtatcc attgattaga ctgaatcatg tagaattgct aatttcacca 360

ttttgaacta tcgaaatcac tatttggtat gactcaacct catcctttaa gtacacattc 420

atgacagtga gtggttagac agtgattcct agattagttt gggatggggc agtgccttcc 480

ataggacaag gccattcctg gtagagacgg agggagcagg ctgtccttca gctaggggcc 540

caggggactt cctggctgct gtgtccttta gcagggcctt ggaggatgga aggactctcc 600

tggcccttac cacaggggct attcaggaac agcctcctgc cgtggcactg gagctgcggt 660

ggccctctga agactgcagg gacagcaaca ggcacaaaga agtcaggctg catgtggccc 720

cagtcgggac tcagaggagg aaagggaggg gttgcggggg tcaatgggtg atgtgcttcc 780

tctcccatag ctgaggagtc cttgcaatgg ccttcctgag ccatcagcag gcctatggcc 840

atgtgactag ggaggagaag ggatataggg taatggtctt ctggggcctg ctgggcctgg 900

tcaagtctga ggaggagata gagaaaacaa agcagagacc ctcctcttca tctggggaga 960

agggacctga ttctaaacgg agatatgtga ggctttctgg ggcagcgatg gaaggacaag 1020

gacagaatag gtgtccttgt tgccccatgg agaatgggct tcaggaagaa tctgcctcag 1080

tcattttcca gaagtgcctg agaggtgcag ggcccgagtc tggttaggtg acagcgggtc 1140

aagaggagga cattgtcctc tctcttgtgt tgctgcagat gccacaaaac tgggccacgg 1200

cacgatcagg cagttctggg gcccccagga gggcagcctt ggggtgggca cagccagccc 1260

tggcaggatg agcaactctg ggtgggggggg agtgggggat gagcaggggg acatgaagat 1320

gcttggtgga gcctggggtc atggctggta tctggttcct cccctgtgat tccttcttgg 1380

ggactccaag acaggacaag gaagactgga gccctccaga aacagatggg cccaggtccg 1440

taagctgagg attcagtccc ccctggattc aagcccagca tgtgcctacc cagccagatg 1500

ctccatgaac acagttcagg gggcccgaag acagcactgt tacctggagc ccacatacag 1560

cctcagcagg caaagggaga ctcagagaaa acatgggagg gatttacagt cacatgcagg 1620

cagggaccag ctcaaccctt ctttaatgtc atccagggag ggggccaggg atggagggga 1680

ggggttgagg agcgagaggc agttatttttt gggtgggatt caccactttt cccatgaaga 1740

ggggagactt ggtattttgt tcaatcatta agaagacaaa gggtttgttg aacttgacct 1800

cgggggggat agacatgggt atggcctcta aaaacatggc cccagcagct tcagtccctt 1860

tctcgtcgat ggtcagcaca gccttatgca cggccttgga gagcttcagg ggtgcctcct 1920

ctgtgacccc ggagaggtca gccccattgc tgaagacctt agtgatgccc agttgaccca 1980

ggacgctctt cagatcatag gttccagtaa tggacagttt gggtaaatgt aagctggcag 2040

accttctgtc ttcattttcc aggaacttgg tgatgatatc gtgggtgagt tcattttcca 2100

ggtgctgtag tttcccctca tcaggcagga agaagatggc ggtggcattg cccaggtatt 2160

tcatcagcag cacccagctg gacagcttct tacagtgctg gatgttaaac atgcctaaac 2220

gcttcatcat aggcaccttc acggtggtca cctggtccac gtggaagtcc tcttcctcgg 2280

tgtccttgac ttcaaagggt ctctcccatt tgcctttaaa gaagatgtaa ttcaccagag 2340

caaaaactgt gtctctgtca agctccttga ccaaatccac aattttccct tgagtaccct 2400

tctccacgta atcgttgatc tgtttcttgg cctcttcggt gtccccgaag ttgacagtga 2460

aggcttctga gtggtacaac tttttaacat cctccaaaaa cttatccact agcttcaggc 2520

cctcgctgag gaacaggcca ttgccggtgg tcagctggag ctggctgtct ggctggttga 2580

gggtacggag gagttcctgg aagccttcat ggatctgagc ctccggaatc tccgtgaggt 2640

tgaaattcag gccctccagg atttcatcgt gagtgtcagc cttggtcccc agggagagca 2700

ttgcaaaggc tgtagcgatg ctcactgggg agaagaagat attggtgctg ttggactggt 2760

gtgccagctg gcggtatagg ctgaaggcga actcagccag gttgggggtg atcttgttga 2820

aggttgggtg atcctgatca tggtgggatg tatctgtctt ctgggcagca tctccctggg 2880

gatcctcagc cagggagaca gggaccaggc agcacaggcc tgccagcagg aggatgcccc 2940

acgagacaga agacggcatt gtcctttcct gctctcctca agctctcctc aagctctgtc 3000

tcttctggca ggcacaggag agtggcctga aggctggcag gaggttgccg cccctccaac 3060

ctggaattcc tggcagcagc agcggctagg ccttcctcgg aggcccgacc ccctcctcct 3120

tcttggttca gctcaggact ctgagggttg ctgcgtggag gcagtgcatg ccctgggcac 3180

agtgcccagt tcctgccca 3199

<210> 17
<211> 3513
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 17
tgcaagaaat gtagttctat ttattctctg ttctaatggg tataaacatt ttgttatcta 60

acttgaacat cataccaact caaaggcagg tcttactagc aatgactggg gctcagagag 120

gtttggcgac ttcacgaagg tcacacagct gtcaggggga aaagtcagaa cttggatcca 180

ggtcttcaga ctctcaggtc tggtgtcatc ctaggggget tggtgatggc catatcttta 240

atgtatttgt ggagagtgaa aggctgtcag tgagtaagct taagagaaca ggagacttgt 300

gtgggaaaca gtcggtatcc attgattaga ctgaatcatg tagaattgct aatttcacca 360

ttttgaacta tcgaaatcac tatttggtat gactcaacct catcctttaa gtacacattc 420

atgacagtga gtggttagac agtgattcct agattagttt gggatggggc agtgccttcc 480

ataggacaag gccattcctg gtagagacgg agggagcagg ctgtccttca gctaggggcc 540

caggggactt cctggctgct gtgtccttta gcagggcctt ggaggatgga aggactctcc 600

tggcccttac cacaggggct attcaggaac agcctcctgc cgtggcactg gagctgcggt 660

ggccctctga agactgcagg gacagcaaca ggcacaaaga agtcaggctg catgtggccc 720

cagtcgggac tcagaggagg aaagggaggg gttgcggggg tcaatgggtg atgtgcttcc 780

tctcccatag ctgaggagtc cttgcaatgg ccttcctgag ccatcagcag gcctatggcc 840

atgtgactag ggaggagaag ggatataggg taatggtctt ctggggcctg ctgggcctgg 900

tcaagtctga ggaggagata gagaaaacaa agcagagacc ctcctcttca tctggggaga 960

agggacctga ttctaaacgg agatatgtga ggctttctgg ggcagcgatg gaaggacaag 1020

gacagaatag gtgtccttgt tgccccatgg agaatgggct tcaggaagaa tctgcctcag 1080

tcattttcca gaagtgcctg agaggtgcag ggcccgagtc tggttaggtg acagcgggtc 1140

aagaggagga cattgtcctc tctcttgtgt tgctgcagat gccacaaaac tgggccacgg 1200

cacgatcagg cagttctggg gcccccagga gggcagcctt ggggtgggca cagccagccc 1260

tggcaggatg agcaactctg ggtgggggggg agtgggggat gagcaggggg acatgaagat 1320

gcttggtgga gcctggggtc atggctggta tctggttcct cccctgtgat tccttcttgg 1380

ggactccaag acaggacaag gaagactgga gccctccaga aacagatggg cccaggtccg 1440

taagctgagg attcagtccc ccctggattc aagcccagca tgtgcctacc cagccagatg 1500

ctccatgaac acagttcagg gggcccgaag acagcactgt tacctggagc ccacatacag 1560

cctcagcagg caaagggaga ctcagagaaa acatgggagg gatttacagt cacatgcagg 1620

cagggaccag ctcaaccctt ctttaatgtc atccagggag ggggccaggg atggagggga 1680

ggggttgagg agcgagaggc agttattttt gggtgggatt caccactttt cccatgaaga 1740

ggggagactt ggtattttgt tcaatcatta agaagacaaa gggtttgttg aacttgacct 1800

cgggggggat agacatgggt atggcctcta aaaacatggc cccagcagct tcagtccctt 1860

tctcgtcgat ggtcagcaca gccttatgca cggccttgga gagcttcagg ggtgcctcct 1920

ctgtgacccc ggagaggtca gccccattgc tgaagacctt agtgatgccc agttgaccca 1980

ggacgctctt cagatcatag gttccagtaa tggacagttt gggtaaatgt aagctggcag 2040

accttctgtc ttcattttcc aggaacttgg tgatgatatc gtgggtgagt tcattttcca 2100

ggtgctgtag tttcccctca tcaggcagga agaagatggc ggtggcattg cccaggtatt 2160

tcatcagcag cacccagctg gacagcttct tacagtgctg gatgttaaac atgcctaaac 2220

gcttcatcat aggcaccttc acggtggtca cctggtccac gtggaagtcc tcttcctcgg 2280

tgtccttgac ttcaaagggt ctctcccatt tgcctttaaa gaagatgtaa ttcaccagag 2340

caaaaactgt gtctctgtca agctccttga ccaaatccac aattttccct tgagtaccct 2400

tctccacgta atcgttgatc tgtttcttgg cctcttcggt gtccccgaag ttgacagtga 2460

aggcttctga gtggtacaac tttttaacat cctccaaaaa cttatccact agcttcaggc 2520

cctcgctgag gaacaggcca ttgccggtgg tcagctggag ctggctgtct ggctggttga 2580

gggtacggag gagttcctgg aagccttcat ggatctgagc ctccggaatc tccgtgaggt 2640

tgaaattcag gccctccagg atttcatcgt gagtgtcagc cttggtcccc agggagagca 2700

ttgcaaaggc tgtagcgatg ctcactgggg agaagaagat attggtgctg ttggactggt 2760

gtgccagctg gcggtatagg ctgaaggcga actcagccag gttgggggtg atcttgttga 2820

aggttgggtg atcctgatca tggtgggatg tatctgtctt ctgggcagca tctccctggg 2880

gatcctcagc cagggagaca gggaccaggc agcacaggcc tgccagcagg aggatgcccc 2940

acgagacaga agacggcatt gtcgattcac tgtcccaggt cagtggtggt gcctgaagct 3000

gaggagacag ggccctgtcc tcgtccgtat ttaagcagtg gatccagagg ggcaacgggg 3060

gaggctgcga aaggagtcat tgtacctggc tcagaaacca cagcgtcctg tgtccaaggt 3120

ggaggggggtg gcgtgagtca gacagtctct gggagagtac cacttagctg gccctctgct 3180

ctcactgcag aatccttagt ggctgttcca ctggtagcaa gatctaccat ttactgagtc 3240

accccaaaat gcctgatgct gaagacttac tgccgccctt tcctgctctc ctcaagctct 3300

cctcaagctc tgtctcttct ggcaggcaca ggagagtggc ctgaaggctg gcaggaggtt 3360

gccgcccctc caacctggaa ttcctggcag cagcagcggc taggccttcc tcggaggccc 3420

gacccccctcc tccttcttgg ttcagctcag gactctgagg gttgctgcgt ggaggcagtg 3480

catgccctgg gcacagtgcc cagttcctgc cca 3513

<210> 18
<211> 3236
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 18
tgcaagaaat gtagttctat ttattctctg ttctaatggg tataaacatt ttgttatcta 60

acttgaacat cataccaact caaaggcagg tcttactagc aatgactggg gctcagagag 120

gtttggcgac ttcacgaagg tcacacagct gtcaggggga aaagtcagaa cttggatcca 180

ggtcttcaga ctctcaggtc tggtgtcatc ctaggggggct tggtgatggc catatcttta 240

atgtatttgt ggagagtgaa aggctgtcag tgagtaagct taagagaaca ggagacttgt 300

gtgggaaaca gtcggtatcc attgattaga ctgaatcatg tagaattgct aatttcacca 360

ttttgaacta tcgaaatcac tatttggtat gactcaacct catcctttaa gtacacattc 420

atgacagtga gtggttagac agtgattcct agattagttt gggatggggc agtgccttcc 480

ataggacaag gccattcctg gtagagacgg agggagcagg ctgtccttca gctaggggcc 540

caggggactt cctggctgct gtgtccttta gcagggcctt ggaggatgga aggactctcc 600

tggcccttac cacaggggct attcaggaac agcctcctgc cgtggcactg gagctgcggt 660

ggccctctga agactgcagg gacagcaaca ggcacaaaga agtcaggctg catgtggccc 720

cagtcgggac tcagaggagg aaagggaggg gttgcggggg tcaatgggtg atgtgcttcc 780

tctcccatag ctgaggagtc cttgcaatgg ccttcctgag ccatcagcag gcctatggcc 840

atgtgactag ggaggagaag ggatataggg taatggtctt ctggggcctg ctgggcctgg 900

tcaagtctga ggaggagata gagaaaacaa agcagagacc ctcctcttca tctggggaga 960

agggacctga ttctaaacgg agatatgtga ggctttctgg ggcagcgatg gaaggacaag 1020

gacagaatag gtgtccttgt tgccccatgg agaatgggct tcaggaagaa tctgcctcag 1080

tcattttcca gaagtgcctg agaggtgcag ggcccgagtc tggttaggtg acagcgggtc 1140

aagaggagga cattgtcctc tctcttgtgt tgctgcagat gccacaaaac tgggccacgg 1200

cacgatcagg cagttctggg gcccccagga gggcagcctt ggggtgggca cagccagccc 1260

tggcaggatg agcaactctg ggtgggggggg agtgggggat gagcaggggg acatgaagat 1320

gcttggtgga gcctggggtc atggctggta tctggttcct cccctgtgat tccttcttgg 1380

ggactccaag acaggacaag gaagactgga gccctccaga aacagatggg cccaggtccg 1440

taagctgagg attcagtccc ccctggattc aagcccagca tgtgcctacc cagccagatg 1500

ctccatgaac acagttcagg gggcccgaag acagcactgt tacctggagc ccacatacag 1560

cctcagcagg caaagggaga ctcagagaaa acatgggagg gatttacagt cacatgcagg 1620

cagggaccag ctcaaccctt ctttaatgtc atccagggag ggggccaggg atggagggga 1680

ggggttgagg agcgagaggc agttatttttt gggtgggatt caccactttt cccatgaaga 1740

ggggagactt ggtattttgt tcaatcatta agaagacaaa gggtttgttg aacttgacct 1800

cgggggggat agacatgggt atggcctcta aaaacatggc cccagcagct tcagtccctt 1860

tctcgtcgat ggtcagcaca gccttatgca cggccttgga gagcttcagg ggtgcctcct 1920

ctgtgacccc ggagaggtca gccccattgc tgaagacctt agtgatgccc agttgaccca 1980

ggacgctctt cagatcatag gttccagtaa tggacagttt gggtaaatgt aagctggcag 2040

accttctgtc ttcattttcc aggaacttgg tgatgatatc gtgggtgagt tcattttcca 2100

ggtgctgtag tttcccctca tcaggcagga agaagatggc ggtggcattg cccaggtatt 2160

tcatcagcag cacccagctg gacagcttct tacagtgctg gatgttaaac atgcctaaac 2220

gcttcatcat aggcaccttc acggtggtca cctggtccac gtggaagtcc tcttcctcgg 2280

tgtccttgac ttcaaagggt ctctcccatt tgcctttaaa gaagatgtaa ttcaccagag 2340

caaaaactgt gtctctgtca agctccttga ccaaatccac aattttccct tgagtaccct 2400

tctccacgta atcgttgatc tgtttcttgg cctcttcggt gtccccgaag ttgacagtga 2460

aggcttctga gtggtacaac tttttaacat cctccaaaaa cttatccact agcttcaggc 2520

cctcgctgag gaacaggcca ttgccggtgg tcagctggag ctggctgtct ggctggttga 2580

gggtacggag gagttcctgg aagccttcat ggatctgagc ctccggaatc tccgtgaggt 2640

tgaaattcag gccctccagg atttcatcgt gagtgtcagc cttggtcccc agggagagca 2700

ttgcaaaggc tgtagcgatg ctcactgggg agaagaagat attggtgctg ttggactggt 2760

gtgccagctg gcggtatagg ctgaaggcga actcagccag gttgggggtg atcttgttga 2820

aggttgggtg atcctgatca tggtgggatg tatctgtctt ctgggcagca tctccctggg 2880

gatcctcagc cagggagaca gggaccaggc agcacaggcc tgccagcagg aggatgcccc 2940

acgagacaga agacggcatt gtcctgtgga actgagtgag cagcagcagc aatgtcccac 3000

ctttcctgct ctcctcaagc tctcctcaag ctctgtctct tctggcaggc acaggagagt 3060

ggcctgaagg ctggcaggag gttgccgccc ctccaacctg gaattcctgg cagcagcagc 3120

ggctaggcct tcctcggagg cccgaccccc tcctccttct tggttcagct caggactctg 3180

agggttgctg cgtggaggca gtgcatgccc tgggcacagt gcccagttcc tgccca 3236

<210> 19
<211> 3532
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 19
tgcaagaaat gtagttctat ttattctctg ttctaatggg tataaacatt ttgttatcta 60

acttgaacat cataccaact caaaggcagg tcttactagc aatgactggg gctcagagag 120

gtttggcgac ttcacgaagg tcacacagct gtcaggggga aaagtcagaa cttggatcca 180

ggtcttcaga ctctcaggtc tggtgtcatc ctaggggget tggtgatggc catatcttta 240

atgtatttgt ggagagtgaa aggctgtcag tgagtaagct taagagaaca ggagacttgt 300

gtgggaaaca gtcggtatcc attgattaga ctgaatcatg tagaattgct aatttcacca 360

ttttgaacta tcgaaatcac tatttggtat gactcaacct catcctttaa gtacacattc 420

atgacagtga gtggttagac agtgattcct agattagttt gggatggggc agtgccttcc 480

ataggacaag gccattcctg gtagagacgg agggagcagg ctgtccttca gctaggggcc 540

caggggactt cctggctgct gtgtccttta gcagggcctt ggaggatgga aggactctcc 600

tggcccttac cacaggggct attcaggaac agcctcctgc cgtggcactg gagctgcggt 660

ggccctctga agactgcagg gacagcaaca ggcacaaaga agtcaggctg catgtggccc 720

cagtcgggac tcagaggagg aaagggaggg gttgcggggg tcaatgggtg atgtgcttcc 780

tctcccatag ctgaggagtc cttgcaatgg ccttcctgag ccatcagcag gcctatggcc 840

atgtgactag ggaggagaag ggatataggg taatggtctt ctggggcctg ctgggcctgg 900

tcaagtctga ggaggagata gagaaaacaa agcagagacc ctcctcttca tctggggaga 960

agggacctga ttctaaacgg agatatgtga ggctttctgg ggcagcgatg gaaggacaag 1020

gacagaatag gtgtccttgt tgccccatgg agaatgggct tcaggaagaa tctgcctcag 1080

tcattttcca gaagtgcctg agaggtgcag ggcccgagtc tggttaggtg acagcgggtc 1140

aagaggagga cattgtcctc tctcttgtgt tgctgcagat gccacaaaac tgggccacgg 1200

cacgatcagg cagttctggg gcccccagga gggcagcctt ggggtgggca cagccagccc 1260

tggcaggatg agcaactctg ggtgggggggg agtgggggat gagcaggggg acatgaagat 1320

gcttggtgga gcctggggtc atggctggta tctggttcct cccctgtgat tccttcttgg 1380

ggactccaag acaggacaag gaagactgga gccctccaga aacagatggg cccaggtccg 1440

taagctgagg attcagtccc ccctggattc aagcccagca tgtgcctacc cagccagatg 1500

ctccatgaac acagttcagg gggcccgaag acagcactgt tacctggagc ccacatacag 1560

cctcagcagg caaagggaga ctcagagaaa acatgggagg gatttacagt cacatgcagg 1620

cagggaccag ctcaaccctt ctttaatgtc atccagggag ggggccaggg atggagggga 1680

ggggttgagg agcgagaggc agttattttt gggtgggatt caccactttt cccatgaaga 1740

ggggagactt ggtattttgt tcaatcatta agaagacaaa gggtttgttg aacttgacct 1800

cgggggggat agacatgggt atggcctcta aaaacatggc cccagcagct tcagtccctt 1860

tctcgtcgat ggtcagcaca gccttatgca cggccttgga gagcttcagg ggtgcctcct 1920

ctgtgacccc ggagaggtca gccccattgc tgaagacctt agtgatgccc agttgaccca 1980

ggacgctctt cagatcatag gttccagtaa tggacagttt gggtaaatgt aagctggcag 2040

accttctgtc ttcattttcc aggaacttgg tgatgatatc gtgggtgagt tcattttcca 2100

ggtgctgtag tttcccctca tcaggcagga agaagatggc ggtggcattg cccaggtatt 2160

tcatcagcag cacccagctg gacagcttct tacagtgctg gatgttaaac atgcctaaac 2220

gcttcatcat aggcaccttc acggtggtca cctggtccac gtggaagtcc tcttcctcgg 2280

tgtccttgac ttcaaagggt ctctcccatt tgcctttaaa gaagatgtaa ttcaccagag 2340

caaaaactgt gtctctgtca agctccttga ccaaatccac aattttccct tgagtaccct 2400

tctccacgta atcgttgatc tgtttcttgg cctcttcggt gtccccgaag ttgacagtga 2460

aggcttctga gtggtacaac tttttaacat cctccaaaaa cttatccact agcttcaggc 2520

cctcgctgag gaacaggcca ttgccggtgg tcagctggag ctggctgtct ggctggttga 2580

gggtacggag gagttcctgg aagccttcat ggatctgagc ctccggaatc tccgtgaggt 2640

tgaaattcag gccctccagg atttcatcgt gagtgtcagc cttggtcccc agggagagca 2700

ttgcaaaggc tgtagcgatg ctcactgggg agaagaagat attggtgctg ttggactggt 2760

gtgccagctg gcggtatagg ctgaaggcga actcagccag gttgggggtg atcttgttga 2820

aggttgggtg atcctgatca tggtgggatg tatctgtctt ctgggcagca tctccctggg 2880

gatcctcagc cagggagaca gggaccaggc agcacaggcc tgccagcagg aggatgcccc 2940

acgagacaga agacggcatt gtcgattcac tgtcccaggt cagtggtggt gcctgaagct 3000

gaggagacag ggccctgtcc tcgtccgtat ttaagcagtg gatccagagg ggcaacgggg 3060

gaggctgctg gctcagaaac cacagcgtcc tgtgtccaag gtggaggggg tggcgtgagt 3120

cagacagtct ctgggagagt accacttagc tggccctctg ctctcactgc agaatcctta 3180

gtggctgttc cactggtagc aagatctacc atttactgag tcaccccaaa atgcctgatg 3240

ctgaagactt actgccgccc tgtggaactg agtgagcagc agcagcaatg tcccacctttt 3300

cctgctctcc tcaagctctc ctcaagctct gtctcttctg gcaggcacag gagagtggcc 3360

tgaaggctgg caggaggttg ccgcccctcc aacctggaat tcctggcagc agcagcggct 3420

aggccttcct cggaggcccg acccccctcct ccttcttggt tcagctcagg actctgaggg 3480

ttgctgcgtg gaggcagtgc atgccctggg cacagtgccc agttcctgcc ca 3532

<210> 20
<211> 3340
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 20
tgcaagaaat gtagttctat ttattctctg ttctaatggg tataaacatt ttgttatcta 60

acttgaacat cataccaact caaaggcagg tcttactagc aatgactggg gctcagagag 120

gtttggcgac ttcacgaagg tcacacagct gtcaggggga aaagtcagaa cttggatcca 180

ggtcttcaga ctctcaggtc tggtgtcatc ctaggggggct tggtgatggc catatcttta 240

atgtatttgt ggagagtgaa aggctgtcag tgagtaagct taagagaaca ggagacttgt 300

gtgggaaaca gtcggtatcc attgattaga ctgaatcatg tagaattgct aatttcacca 360

ttttgaacta tcgaaatcac tatttggtat gactcaacct catcctttaa gtacacattc 420

atgacagtga gtggttagac agtgattcct agattagttt gggatggggc agtgccttcc 480

ataggacaag gccattcctg gtagagacgg agggagcagg ctgtccttca gctaggggcc 540

caggggactt cctggctgct gtgtccttta gcagggcctt ggaggatgga aggactctcc 600

tggcccttac cacaggggct attcaggaac agcctcctgc cgtggcactg gagctgcggt 660

ggccctctga agactgcagg gacagcaaca ggcacaaaga agtcaggctg catgtggccc 720

cagtcgggac tcagaggagg aaagggaggg gttgcggggg tcaatgggtg atgtgcttcc 780

tctcccatag ctgaggagtc cttgcaatgg ccttcctgag ccatcagcag gcctatggcc 840

atgtgactag ggaggagaag ggatataggg taatggtctt ctggggcctg ctgggcctgg 900

tcaagtctga ggaggagata gagaaaacaa agcagagacc ctcctcttca tctggggaga 960

agggacctga ttctaaacgg agatatgtga ggctttctgg ggcagcgatg gaaggacaag 1020

gacagaatag gtgtccttgt tgccccatgg agaatgggct tcaggaagaa tctgcctcag 1080

tcattttcca gaagtgcctg agaggtgcag ggcccgagtc tggttaggtg acagcgggtc 1140

aagaggagga cattgtcctc tctcttgtgt tgctgcagat gccacaaaac tgggccacgg 1200

cacgatcagg cagttctggg gcccccagga gggcagcctt ggggtgggca cagccagccc 1260

tggcaggatg agcaactctg ggtgggggggg agtgggggat gagcaggggg acatgaagat 1320

gcttggtgga gcctggggtc atggctggta tctggttcct cccctgtgat tccttcttgg 1380

ggactccaag acaggacaag gaagactgga gccctccaga aacagatggg cccaggtccg 1440

taagctgagg attcagtccc ccctggattc aagcccagca tgtgcctacc cagccagatg 1500

ctccatgaac acagttcagg gggcccgaag acagcactgt tacctggagc ccacatacag 1560

cctcagcagg caaagggaga ctcagagaaa acatgggagg gatttacagt cacatgcagg 1620

cagggaccag ctcaaccctt ctttaatgtc atccagggag ggggccaggg atggagggga 1680

ggggttgagg agcgagaggc agttatttttt gggtgggatt caccactttt cccatgaaga 1740

ggggagactt ggtattttgt tcaatcatta agaagacaaa gggtttgttg aacttgacct 1800

cgggggggat agacatgggt atggcctcta aaaacatggc cccagcagct tcagtccctt 1860

tctcgtcgat ggtcagcaca gccttatgca cggccttgga gagcttcagg ggtgcctcct 1920

ctgtgacccc ggagaggtca gccccattgc tgaagacctt agtgatgccc agttgaccca 1980

ggacgctctt cagatcatag gttccagtaa tggacagttt gggtaaatgt aagctggcag 2040

accttctgtc ttcattttcc aggaacttgg tgatgatatc gtgggtgagt tcattttcca 2100

ggtgctgtag tttcccctca tcaggcagga agaagatggc ggtggcattg cccaggtatt 2160

tcatcagcag cacccagctg gacagcttct tacagtgctg gatgttaaac atgcctaaac 2220

gcttcatcat aggcaccttc acggtggtca cctggtccac gtggaagtcc tcttcctcgg 2280

tgtccttgac ttcaaagggt ctctcccatt tgcctttaaa gaagatgtaa ttcaccagag 2340

caaaaactgt gtctctgtca agctccttga ccaaatccac aattttccct tgagtaccct 2400

tctccacgta atcgttgatc tgtttcttgg cctcttcggt gtccccgaag ttgacagtga 2460

aggcttctga gtggtacaac tttttaacat cctccaaaaa cttatccact agcttcaggc 2520

cctcgctgag gaacaggcca ttgccggtgg tcagctggag ctggctgtct ggctggttga 2580

gggtacggag gagttcctgg aagccttcat ggatctgagc ctccggaatc tccgtgaggt 2640

tgaaattcag gccctccagg atttcatcgt gagtgtcagc cttggtcccc agggagagca 2700

ttgcaaaggc tgtagcgatg ctcactgggg agaagaagat attggtgctg ttggactggt 2760

gtgccagctg gcggtatagg ctgaaggcga actcagccag gttgggggtg atcttgttga 2820

aggttgggtg atcctgatca tggtgggatg tatctgtctt ctgggcagca tctccctggg 2880

gatcctcagc cagggagaca gggaccaggc agcacaggcc tgccagcagg aggatgcccc 2940

acgagacaga agacggcatt gtcgattcac tgtcccaggt cagtggtggt gcctgaagct 3000

gaggagacag ggccctgtcc tcgtccgtat ttaagcagtg gatccagagg ggcaacgggg 3060

gaggctgctg tggaactgag tgagcagcag cagcaatgtc ccacctttcc tgctctcctc 3120

aagctctcct caagctctgt ctcttctggc aggcacagga gagtggcctg aaggctggca 3180

ggaggttgcc gcccctccaa cctggaattc ctggcagcag cagcggctag gccttcctcg 3240

gaggcccgac cccctcctcc ttcttggttc agctcaggac tctgagggtt gctgcgtgga 3300

ggcagtgcat gccctgggca cagtgcccag ttcctgccca 3340

<210> 21
<211> 3495
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 21
tgcaagaaat gtagttctat ttattctctg ttctaatggg tataaacatt ttgttatcta 60

acttgaacat cataccaact caaaggcagg tcttactagc aatgactggg gctcagagag 120

gtttggcgac ttcacgaagg tcacacagct gtcaggggga aaagtcagaa cttggatcca 180

ggtcttcaga ctctcaggtc tggtgtcatc ctaggggget tggtgatggc catatcttta 240

atgtatttgt ggagagtgaa aggctgtcag tgagtaagct taagagaaca ggagacttgt 300

gtgggaaaca gtcggtatcc attgattaga ctgaatcatg tagaattgct aatttcacca 360

ttttgaacta tcgaaatcac tatttggtat gactcaacct catcctttaa gtacacattc 420

atgacagtga gtggttagac agtgattcct agattagttt gggatggggc agtgccttcc 480

ataggacaag gccattcctg gtagagacgg agggagcagg ctgtccttca gctaggggcc 540

caggggactt cctggctgct gtgtccttta gcagggcctt ggaggatgga aggactctcc 600

tggcccttac cacaggggct attcaggaac agcctcctgc cgtggcactg gagctgcggt 660

ggccctctga agactgcagg gacagcaaca ggcacaaaga agtcaggctg catgtggccc 720

cagtcgggac tcagaggagg aaagggaggg gttgcggggg tcaatgggtg atgtgcttcc 780

tctcccatag ctgaggagtc cttgcaatgg ccttcctgag ccatcagcag gcctatggcc 840

atgtgactag ggaggagaag ggatataggg taatggtctt ctggggcctg ctgggcctgg 900

tcaagtctga ggaggagata gagaaaacaa agcagagacc ctcctcttca tctggggaga 960

agggacctga ttctaaacgg agatatgtga ggctttctgg ggcagcgatg gaaggacaag 1020

gacagaatag gtgtccttgt tgccccatgg agaatgggct tcaggaagaa tctgcctcag 1080

tcattttcca gaagtgcctg agaggtgcag ggcccgagtc tggttaggtg acagcgggtc 1140

aagaggagga cattgtcctc tctcttgtgt tgctgcagat gccacaaaac tgggccacgg 1200

cacgatcagg cagttctggg gcccccagga gggcagcctt ggggtgggca cagccagccc 1260

tggcaggatg agcaactctg ggtgggggggg agtgggggat gagcaggggg acatgaagat 1320

gcttggtgga gcctggggtc atggctggta tctggttcct cccctgtgat tccttcttgg 1380

ggactccaag acaggacaag gaagactgga gccctccaga aacagatggg cccaggtccg 1440

taagctgagg attcagtccc ccctggattc aagcccagca tgtgcctacc cagccagatg 1500

ctccatgaac acagttcagg gggcccgaag acagcactgt tacctggagc ccacatacag 1560

cctcagcagg caaagggaga ctcagagaaa acatgggagg gatttacagt cacatgcagg 1620

cagggaccag ctcaaccctt ctttaatgtc atccagggag ggggccaggg atggagggga 1680

ggggttgagg agcgagaggc agttatttttt gggtgggatt caccactttt cccatgaaga 1740

ggggagactt ggtattttgt tcaatcatta agaagacaaa gggtttgttg aacttgacct 1800

cgggggggat agacatgggt atggcctcta aaaacatggc cccagcagct tcagtccctt 1860

tctcgtcgat ggtcagcaca gccttatgca cggccttgga gagcttcagg ggtgcctcct 1920

ctgtgacccc ggagaggtca gccccattgc tgaagacctt agtgatgccc agttgaccca 1980

ggacgctctt cagatcatag gttccagtaa tggacagttt gggtaaatgt aagctggcag 2040

accttctgtc ttcattttcc aggaacttgg tgatgatatc gtgggtgagt tcattttcca 2100

ggtgctgtag tttcccctca tcaggcagga agaagatggc ggtggcattg cccaggtatt 2160

tcatcagcag cacccagctg gacagcttct tacagtgctg gatgttaaac atgcctaaac 2220

gcttcatcat aggcaccttc acggtggtca cctggtccac gtggaagtcc tcttcctcgg 2280

tgtccttgac ttcaaagggt ctctcccatt tgcctttaaa gaagatgtaa ttcaccagag 2340

caaaaactgt gtctctgtca agctccttga ccaaatccac aattttccct tgagtaccct 2400

tctccacgta atcgttgatc tgtttcttgg cctcttcggt gtccccgaag ttgacagtga 2460

aggcttctga gtggtacaac tttttaacat cctccaaaaa cttatccact agcttcaggc 2520

cctcgctgag gaacaggcca ttgccggtgg tcagctggag ctggctgtct ggctggttga 2580

gggtacggag gagttcctgg aagccttcat ggatctgagc ctccggaatc tccgtgaggt 2640

tgaaattcag gccctccagg atttcatcgt gagtgtcagc cttggtcccc agggagagca 2700

ttgcaaaggc tgtagcgatg ctcactgggg agaagaagat attggtgctg ttggactggt 2760

gtgccagctg gcggtatagg ctgaaggcga actcagccag gttgggggtg atcttgttga 2820

aggttgggtg atcctgatca tggtgggatg tatctgtctt ctgggcagca tctccctggg 2880

gatcctcagc cagggagaca gggaccaggc agcacaggcc tgccagcagg aggatgcccc 2940

acgagacaga agacggcatt gtcgattcac tgtcccaggt cagtggtggt gcctgaagct 3000

gaggagacag ggccctgtcc tcgtccgtat ttaagcagtg gatccagagg ggcaacgggg 3060

gaggctgctg gctcagaaac cacagcgtcc tgtgtccaag gtggaggggg tggcgtgagt 3120

cagacagtct ctgggagagt accacttagc tggccctctg ctctcactgc agaatcctta 3180

gtggctgttc cactggtagc aagatctacc atttactgag tcaccccaaa atgcctgatg 3240

ctgaagactt actgccgccc tttcctgctc tcctcaagct ctcctcaagc tctgtctctt 3300

ctggcaggca caggagagtg gcctgaaggc tggcaggagg ttgccgcccc tccaacctgg 3360

aattcctggc agcagcagcg gctaggcctt cctcggaggc ccgacccccc cctccttctt 3420

ggttcagctc aggactctga gggttgctgc gtggaggcag tgcatgccct gggcacagtg 3480

cccagttcct gccca 3495

<210> 22
<211> 3492
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 22
tgcaagaaat gtagttctat ttattctctg ttctaatggg tataaacatt ttgttatcta 60

acttgaacat cataccaact caaaggcagg tcttactagc aatgactggg gctcagagag 120

gtttggcgac ttcacgaagg tcacacagct gtcaggggga aaagtcagaa cttggatcca 180

ggtcttcaga ctctcaggtc tggtgtcatc ctaggggggct tggtgatggc catatcttta 240

atgtatttgt ggagagtgaa aggctgtcag tgagtaagct taagagaaca ggagacttgt 300

gtgggaaaca gtcggtatcc attgattaga ctgaatcatg tagaattgct aatttcacca 360

ttttgaacta tcgaaatcac tatttggtat gactcaacct catcctttaa gtacacattc 420

atgacagtga gtggttagac agtgattcct agattagttt gggatggggc agtgccttcc 480

ataggacaag gccattcctg gtagagacgg agggagcagg ctgtccttca gctaggggcc 540

caggggactt cctggctgct gtgtccttta gcagggcctt ggaggatgga aggactctcc 600

tggcccttac cacaggggct attcaggaac agcctcctgc cgtggcactg gagctgcggt 660

ggccctctga agactgcagg gacagcaaca ggcacaaaga agtcaggctg catgtggccc 720

cagtcgggac tcagaggagg aaagggaggg gttgcggggg tcaatgggtg atgtgcttcc 780

tctcccatag ctgaggagtc cttgcaatgg ccttcctgag ccatcagcag gcctatggcc 840

atgtgactag ggaggagaag ggatataggg taatggtctt ctggggcctg ctgggcctgg 900

tcaagtctga ggaggagata gagaaaacaa agcagagacc ctcctcttca tctggggaga 960

agggacctga ttctaaacgg agatatgtga ggctttctgg ggcagcgatg gaaggacaag 1020

gacagaatag gtgtccttgt tgccccatgg agaatgggct tcaggaagaa tctgcctcag 1080

tcattttcca gaagtgcctg agaggtgcag ggcccgagtc tggttaggtg acagcgggtc 1140

aagaggagga cattgtcctc tctcttgtgt tgctgcagat gccacaaaac tgggccacgg 1200

cacgatcagg cagttctggg gcccccagga gggcagcctt ggggtgggca cagccagccc 1260

tggcaggatg agcaactctg ggtgggggg agtgggggat gagcaggggg acatgaagat 1320

gcttggtgga gcctggggtc atggctggta tctggttcct cccctgtgat tccttcttgg 1380

ggactccaag acaggacaag gaagactgga gccctccaga aacagatggg cccaggtccg 1440

taagctgagg attcagtccc ccctggattc aagcccagca tgtgcctacc cagccagatg 1500

ctccatgaac acagttcagg gggcccgaag acagcactgt tacctggagc ccacatacag 1560

cctcagcagg caaagggaga ctcagagaaa acatgggagg gatttacagt cacatgcagg 1620

cagggaccag ctcaaccctt ctttaatgtc atccagggag ggggccaggg atggagggga 1680

ggggttgagg agcgagaggc agttatttt gggtgggatt caccactttt cccatgaaga 1740

ggggagactt ggtattttgt tcaatcatta agaagacaaa gggtttgttg aacttgacct 1800

cgggggggat agacatgggt atggcctcta aaaacatggc cccagcagct tcagtccctt 1860

tctcgtcgat ggtcagcaca gccttatgca cggccttgga gagcttcagg ggtgcctcct 1920

ctgtgacccc ggagaggtca gccccattgc tgaagacctt agtgatgccc agttgaccca 1980

ggacgctctt cagatcatag gttccagtaa tggacagttt gggtaaatgt aagctggcag 2040

accttctgtc ttcattttcc aggaacttgg tgatgatatc gtgggtgagt tcattttcca 2100

ggtgctgtag tttcccctca tcaggcagga agaagatggc ggtggcattg cccaggtatt 2160

tcatcagcag cacccagctg gacagcttct tacagtgctg gatgttaaac atgcctaaac 2220

gcttcatcat aggcaccttc acggtggtca cctggtccac gtggaagtcc tcttcctcgg 2280

tgtccttgac ttcaaagggt ctctcccatt tgcctttaaa gaagatgtaa ttcaccagag 2340

caaaaactgt gtctctgtca agctccttga ccaaatccac aattttccct tgagtaccct 2400

tctccacgta atcgttgatc tgtttcttgg cctcttcggt gtccccgaag ttgacagtga 2460

aggcttctga gtggtacaac tttttaacat cctccaaaaa cttatccact agcttcaggc 2520

cctcgctgag gaacaggcca ttgccggtgg tcagctggag ctggctgtct ggctggttga 2580

gggtacggag gagttcctgg aagccttcat ggatctgagc ctccggaatc tccgtgaggt 2640

tgaaattcag gccctccagg atttcatcgt gagtgtcagc cttggtcccc agggagagca 2700

ttgcaaaggc tgtagcgatg ctcactgggg agaagaagat attggtgctg ttggactggt 2760

gtgccagctg gcggtatagg ctgaaggcga actcagccag gttgggggtg atcttgttga 2820

aggttgggtg atcctgatca tggtgggatg tatctgtctt ctgggcagca tctccctggg 2880

gatcctcagc cagggagaca gggaccaggc agcacaggcc tgccagcagg aggatgcccc 2940

acgagacaga agacggcatt gtcgattcac tgtcccaggt cagtggtggt gcctgaagct 3000

gaggagacag ggccctgtcc tcgtccgtat ttaagcagtg gatccagagg ggcaacgggg 3060

gaggctggct cagaaaccac agcgtcctgt gtccaaggtg gaggggggtgg cgtgagtcag 3120

acagtctctg ggagagtacc acttagctgg ccctctgctc tcactgcaga atccttagtg 3180

gctgttccac tggtagcaag atctaccatt tactgagtca ccccaaaatg cctgatgctg 3240

aagacttact gccgcccttt cctgctctcc tcaagctctc ctcaagctct gtctcttctg 3300

gcaggcacag gagagtggcc tgaaggctgg caggaggttg ccgcccctcc aacctggaat 3360

tcctggcagc agcagcggct aggccttcct cggaggcccg acccccctcct ccttcttggt 3420

tcagctcagg actctgaggg ttgctgcgtg gaggcagtgc atgccctggg cacagtgccc 3480

agttcctgcc ca 3492

<210> 23
<211> 3510
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 23
tgcaagaaat gtagttctat ttattctctg ttctaatggg tataaacatt ttgttatcta 60

acttgaacat cataccaact caaaggcagg tcttactagc aatgactggg gctcagagag 120

gtttggcgac ttcacgaagg tcacacagct gtcaggggga aaagtcagaa cttggatcca 180

ggtcttcaga ctctcaggtc tggtgtcatc ctaggggggct tggtgatggc catatcttta 240

atgtatttgt ggagagtgaa aggctgtcag tgagtaagct taagagaaca ggagacttgt 300

gtgggaaaca gtcggtatcc attgattaga ctgaatcatg tagaattgct aatttcacca 360

ttttgaacta tcgaaatcac tatttggtat gactcaacct catcctttaa gtacacattc 420

atgacagtga gtggttagac agtgattcct agattagttt gggatggggc agtgccttcc 480

ataggacaag gccattcctg gtagagacgg agggagcagg ctgtccttca gctaggggcc 540

caggggactt cctggctgct gtgtccttta gcagggcctt ggaggatgga aggactctcc 600

tggcccttac cacaggggct attcaggaac agcctcctgc cgtggcactg gagctgcggt 660

ggccctctga agactgcagg gacagcaaca ggcacaaaga agtcaggctg catgtggccc 720

cagtcgggac tcagaggagg aaagggaggg gttgcggggg tcaatgggtg atgtgcttcc 780

tctcccatag ctgaggagtc cttgcaatgg ccttcctgag ccatcagcag gcctatggcc 840

atgtgactag ggaggagaag ggatataggg taatggtctt ctggggcctg ctgggcctgg 900

tcaagtctga ggaggagata gagaaaacaa agcagagacc ctcctcttca tctggggaga 960

agggacctga ttctaaacgg agatatgtga ggctttctgg ggcagcgatg gaaggacaag 1020

gacagaatag gtgtccttgt tgccccatgg agaatgggct tcaggaagaa tctgcctcag 1080

tcattttcca gaagtgcctg agaggtgcag ggcccgagtc tggttaggtg acagcgggtc 1140

aagaggagga cattgtcctc tctcttgtgt tgctgcagat gccacaaaac tgggccacgg 1200

cacgatcagg cagttctggg gcccccagga gggcagcctt ggggtgggca cagccagccc 1260

tggcaggatg agcaactctg ggtgggggggg agtgggggat gagcaggggg acatgaagat 1320

gcttggtgga gcctggggtc atggctggta tctggttcct cccctgtgat tccttcttgg 1380

ggactccaag acaggacaag gaagactgga gccctccaga aacagatggg cccaggtccg 1440

taagctgagg attcagtccc ccctggattc aagcccagca tgtgcctacc cagccagatg 1500

ctccatgaac acagttcagg gggcccgaag acagcactgt tacctggagc ccacatacag 1560

cctcagcagg caaagggaga ctcagagaaa acatgggagg gatttacagt cacatgcagg 1620

cagggaccag ctcaaccctt ctttaatgtc atccagggag ggggccaggg atggagggga 1680

ggggttgagg agcgagaggc agttattttt gggtgggatt caccactttt cccatgaaga 1740

ggggagactt ggtattttgt tcaatcatta agaagacaaa gggtttgttg aacttgacct 1800

cgggggggat agacatgggt atggcctcta aaaacatggc cccagcagct tcagtccctt 1860

tctcgtcgat ggtcagcaca gccttatgca cggccttgga gagcttcagg ggtgcctcct 1920

ctgtgacccc ggagaggtca gccccattgc tgaagacctt agtgatgccc agttgaccca 1980

ggacgctctt cagatcatag gttccagtaa tggacagttt gggtaaatgt aagctggcag 2040

accttctgtc ttcattttcc aggaacttgg tgatgatatc gtgggtgagt tcattttcca 2100

ggtgctgtag tttcccctca tcaggcagga agaagatggc ggtggcattg cccaggtatt 2160

tcatcagcag cacccagctg gacagcttct tacagtgctg gatgttaaac atgcctaaac 2220

gcttcatcat aggcaccttc acggtggtca cctggtccac gtggaagtcc tcttcctcgg 2280

tgtccttgac ttcaaagggt ctctcccatt tgcctttaaa gaagatgtaa ttcaccagag 2340

caaaaactgt gtctctgtca agctccttga ccaaatccac aattttccct tgagtaccct 2400

tctccacgta atcgttgatc tgtttcttgg cctcttcggt gtccccgaag ttgacagtga 2460

aggcttctga gtggtacaac tttttaacat cctccaaaaa cttatccact agcttcaggc 2520

cctcgctgag gaacaggcca ttgccggtgg tcagctggag ctggctgtct ggctggttga 2580

gggtacggag gagttcctgg aagccttcat ggatctgagc ctccggaatc tccgtgaggt 2640

tgaaattcag gccctccagg atttcatcgt gagtgtcagc cttggtcccc agggagagca 2700

ttgcaaaggc tgtagcgatg ctcactgggg agaagaagat attggtgctg ttggactggt 2760

gtgccagctg gcggtatagg ctgaaggcga actcagccag gttgggggtg atcttgttga 2820

aggttgggtg atcctgatca tggtgggatg tatctgtctt ctgggcagca tctccctggg 2880

gatcctcagc cagggagaca gggaccaggc agcacaggcc tgccagcagg aggatgcccc 2940

acgagacaga agacggcatt gtcgattcac tgtcccaggt cagtggtggt gcctgaagct 3000

gaggagacag ggccctgtcc tcgtccgtat ttaagcagtg gatccagagg ggcaacgggg 3060

gaggcgaaag gagtcattgt acctggctca gaaaccacag cgtcctgtgt ccaaggtgga 3120

gggggtggcg tgagtcagac agtctctggg agagtaccac ttagctggcc ctctgctctc 3180

actgcagaat ccttagtggc tgttccactg gtagcaagat ctaccattta ctgagtcacc 3240

ccaaaatgcc tgatgctgaa gacttactgc cgccctttcc tgctctcctc aagctctcct 3300

caagctctgt ctcttctggc aggcacagga gagtggcctg aaggctggca ggaggttgcc 3360

gcccctccaa cctggaattc ctggcagcag cagcggctag gccttcctcg gaggcccgac 3420

cccctcctcc ttcttggttc agctcaggac tctgagggtt gctgcgtgga ggcagtgcat 3480

gccctgggca cagtgcccag ttcctgccca 3510

<210> 24
<211> 3303
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 24
tgcaagaaat gtagttctat ttattctctg ttctaatggg tataaacatt ttgttatcta 60

acttgaacat cataccaact caaaggcagg tcttactagc aatgactggg gctcagagag 120

gtttggcgac ttcacgaagg tcacacagct gtcaggggga aaagtcagaa cttggatcca 180

ggtcttcaga ctctcaggtc tggtgtcatc ctaggggget tggtgatggc catatcttta 240

atgtatttgt ggagagtgaa aggctgtcag tgagtaagct taagagaaca ggagacttgt 300

gtgggaaaca gtcggtatcc attgattaga ctgaatcatg tagaattgct aatttcacca 360

ttttgaacta tcgaaatcac tatttggtat gactcaacct catcctttaa gtacacattc 420

atgacagtga gtggttagac agtgattcct agattagttt gggatggggc agtgccttcc 480

ataggacaag gccattcctg gtagagacgg agggagcagg ctgtccttca gctaggggcc 540

caggggactt cctggctgct gtgtccttta gcagggcctt ggaggatgga aggactctcc 600

tggcccttac cacaggggct attcaggaac agcctcctgc cgtggcactg gagctgcggt 660

ggccctctga agactgcagg gacagcaaca ggcacaaaga agtcaggctg catgtggccc 720

cagtcgggac tcagaggagg aaagggaggg gttgcggggg tcaatgggtg atgtgcttcc 780

tctcccatag ctgaggagtc cttgcaatgg ccttcctgag ccatcagcag gcctatggcc 840

atgtgactag ggaggagaag ggatataggg taatggtctt ctggggcctg ctgggcctgg 900

tcaagtctga ggaggagata gagaaaacaa agcagagacc ctcctcttca tctggggaga 960

agggacctga ttctaaacgg agatatgtga ggctttctgg ggcagcgatg gaaggacaag 1020

gacagaatag gtgtccttgt tgccccatgg agaatgggct tcaggaagaa tctgcctcag 1080

tcattttcca gaagtgcctg agaggtgcag ggcccgagtc tggttaggtg acagcgggtc 1140

aagaggagga cattgtcctc tctcttgtgt tgctgcagat gccacaaaac tgggccacgg 1200

cacgatcagg cagttctggg gcccccagga gggcagcctt ggggtgggca cagccagccc 1260

tggcaggatg agcaactctg ggtgggggg agtgggggat gagcaggggg acatgaagat 1320

gcttggtgga gcctggggtc atggctggta tctggttcct cccctgtgat tccttcttgg 1380

ggactccaag acaggacaag gaagactgga gccctccaga aacagatggg cccaggtccg 1440

taagctgagg attcagtccc ccctggattc aagcccagca tgtgcctacc cagccagatg 1500

ctccatgaac acagttcagg gggcccgaag acagcactgt tacctggagc ccacatacag 1560

cctcagcagg caaagggaga ctcagagaaa acatgggagg gatttacagt cacatgcagg 1620

cagggaccag ctcaaccctt ctttaatgtc atccagggag ggggccaggg atggagggga 1680

ggggttgagg agcgagaggc agttatttttt gggtgggatt caccactttt cccatgaaga 1740

ggggagactt ggtatttgt tcaatcatta agaagacaaa gggtttgttg aacttgacct 1800

cgggggggat agacatgggt atggcctcta aaaacatggc cccagcagct tcagtccctt 1860

tctcgtcgat ggtcagcaca gccttatgca cggccttgga gagcttcagg ggtgcctcct 1920

ctgtgacccc ggagaggtca gccccattgc tgaagacctt agtgatgccc agttgaccca 1980

ggacgctctt cagatcatag gttccagtaa tggacagttt gggtaaatgt aagctggcag 2040

accttctgtc ttcattttcc aggaacttgg tgatgatatc gtgggtgagt tcattttcca 2100

ggtgctgtag tttcccctca tcaggcagga agaagatggc ggtggcattg cccaggtatt 2160

tcatcagcag cacccagctg gacagcttct tacagtgctg gatgttaaac atgcctaaac 2220

gcttcatcat aggcaccttc acggtggtca cctggtccac gtggaagtcc tcttcctcgg 2280

tgtccttgac ttcaaagggt ctctcccatt tgcctttaaa gaagatgtaa ttcaccagag 2340

caaaaactgt gtctctgtca agctccttga ccaaatccac aattttccct tgagtaccct 2400

tctccacgta atcgttgatc tgtttcttgg cctcttcggt gtccccgaag ttgacagtga 2460

aggcttctga gtggtacaac tttttaacat cctccaaaaa cttatccact agcttcaggc 2520

cctcgctgag gaacaggcca ttgccggtgg tcagctggag ctggctgtct ggctggttga 2580

gggtacggag gagttcctgg aagccttcat ggatctgagc ctccggaatc tccgtgaggt 2640

tgaaattcag gccctccagg atttcatcgt gagtgtcagc cttggtcccc agggagagca 2700

ttgcaaaggc tgtagcgatg ctcactgggg agaagaagat attggtgctg ttggactggt 2760

gtgccagctg gcggtatagg ctgaaggcga actcagccag gttgggggtg atcttgttga 2820

aggttgggtg atcctgatca tggtgggatg tatctgtctt ctgggcagca tctccctggg 2880

gatcctcagc cagggagaca gggaccaggc agcacaggcc tgccagcagg aggatgcccc 2940

acgagacaga agacggcatt gtcgattcac tgtcccaggt cagtggtggt gcctgaagct 3000

gaggagacag ggccctgtcc tcgtccgtat ttaagcagtg gatccagagg ggcaacgggg 3060

gaggctgctt tcctgctctc ctcaagctct cctcaagctc tgtctcttct ggcaggcaca 3120

ggagagtggc ctgaaggctg gcaggaggtt gccgcccctc caacctggaa ttcctggcag 3180

cagcagcggc taggccttcc tcggaggccc gacccccctcc tccttcttgg ttcagctcag 3240

gactctgagg gttgctgcgt ggaggcagtg catgccctgg gcacagtgcc cagttcctgc 3300

cca 3303

<210> 25
<211> 3300
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 25
tgcaagaaat gtagttctat ttattctctg ttctaatggg tataaacatt ttgttatcta 60

acttgaacat cataccaact caaaggcagg tcttactagc aatgactggg gctcagagag 120

gtttggcgac ttcacgaagg tcacacagct gtcaggggga aaagtcagaa cttggatcca 180

ggtcttcaga ctctcaggtc tggtgtcatc ctagggggct tggtgatggc catatcttta 240

atgtatttgt ggagagtgaa aggctgtcag tgagtaagct taagagaaca ggagacttgt 300

gtgggaaaca gtcggtatcc attgattaga ctgaatcatg tagaattgct aatttcacca 360

ttttgaacta tcgaaatcac tatttggtat gactcaacct catcctttaa gtacacattc 420

atgacagtga gtggttagac agtgattcct agattagttt gggatggggc agtgccttcc 480

ataggacaag gccattcctg gtagagacgg agggagcagg ctgtccttca gctaggggcc 540

caggggactt cctggctgct gtgtccttta gcagggcctt ggaggatgga aggactctcc 600

tggcccttac cacaggggct attcaggaac agcctcctgc cgtggcactg gagctgcggt 660

ggccctctga agactgcagg gacagcaaca ggcacaaaga agtcaggctg catgtggccc 720

cagtcgggac tcagaggagg aaagggaggg gttgcggggg tcaatgggtg atgtgcttcc 780

tctcccatag ctgaggagtc cttgcaatgg ccttcctgag ccatcagcag gcctatggcc 840

atgtgactag ggaggagaag ggatataggg taatggtctt ctggggcctg ctgggcctgg 900

tcaagtctga ggaggagata gagaaaacaa agcagagacc ctcctcttca tctggggaga 960

agggacctga ttctaaacgg agatatgtga ggctttctgg ggcagcgatg gaaggacaag 1020

gacagaatag gtgtccttgt tgccccatgg agaatgggct tcaggaagaa tctgcctcag 1080

tcattttcca gaagtgcctg agaggtgcag ggcccgagtc tggttaggtg acagcgggtc 1140

aagaggagga cattgtcctc tctcttgtgt tgctgcagat gccacaaaac tgggccacgg 1200

cacgatcagg cagttctggg gcccccagga gggcagcctt ggggtgggca cagccagccc 1260

tggcaggatg agcaactctg ggtgggggggg agtgggggat gagcaggggg acatgaagat 1320

gcttggtgga gcctggggtc atggctggta tctggttcct cccctgtgat tccttcttgg 1380

ggactccaag acaggacaag gaagactgga gccctccaga aacagatggg cccaggtccg 1440

taagctgagg attcagtccc ccctggattc aagcccagca tgtgcctacc cagccagatg 1500

ctccatgaac acagttcagg gggcccgaag acagcactgt tacctggagc ccacatacag 1560

cctcagcagg caaagggaga ctcagagaaa acatgggagg gatttacagt cacatgcagg 1620

cagggaccag ctcaaccctt ctttaatgtc atccagggag ggggccaggg atggagggga 1680

ggggttgagg agcgagaggc agttatttttt gggtgggatt caccactttt cccatgaaga 1740

ggggagactt ggtattttgt tcaatcatta agaagacaaa gggtttgttg aacttgacct 1800

cgggggggat agacatgggt atggcctcta aaaacatggc cccagcagct tcagtccctt 1860

tctcgtcgat ggtcagcaca gccttatgca cggccttgga gagcttcagg ggtgcctcct 1920

ctgtgacccc ggagaggtca gccccattgc tgaagacctt agtgatgccc agttgaccca 1980

ggacgctctt cagatcatag gttccagtaa tggacagttt gggtaaatgt aagctggcag 2040

accttctgtc ttcattttcc aggaacttgg tgatgatatc gtgggtgagt tcattttcca 2100

ggtgctgtag tttcccctca tcaggcagga agaagatggc ggtggcattg cccaggtatt 2160

tcatcagcag cacccagctg gacagcttct tacagtgctg gatgttaaac atgcctaaac 2220

gcttcatcat aggcaccttc acggtggtca cctggtccac gtggaagtcc tcttcctcgg 2280

tgtccttgac ttcaaagggt ctctcccatt tgcctttaaa gaagatgtaa ttcaccagag 2340

caaaaactgt gtctctgtca agctccttga ccaaatccac aattttccct tgagtaccct 2400

tctccacgta atcgttgatc tgtttcttgg cctcttcggt gtccccgaag ttgacagtga 2460

aggcttctga gtggtacaac tttttaacat cctccaaaaa cttatccact agcttcaggc 2520

cctcgctgag gaacaggcca ttgccggtgg tcagctggag ctggctgtct ggctggttga 2580

gggtacggag gagttcctgg aagccttcat ggatctgagc ctccggaatc tccgtgaggt 2640

tgaaattcag gccctccagg atttcatcgt gagtgtcagc cttggtcccc agggagagca 2700

ttgcaaaggc tgtagcgatg ctcactgggg agaagaagat attggtgctg ttggactggt 2760

gtgccagctg gcggtatagg ctgaaggcga actcagccag gttgggggtg atcttgttga 2820

aggttgggtg atcctgatca tggtgggatg tatctgtctt ctgggcagca tctccctggg 2880

gatcctcagc cagggagaca gggaccaggc agcacaggcc tgccagcagg aggatgcccc 2940

acgagacaga agacggcatt gtcgattcac tgtcccaggt cagtggtggt gcctgaagct 3000

gaggagacag ggccctgtcc tcgtccgtat ttaagcagtg gatccagagg ggcaacgggg 3060

gaggctttcc tgctctcctc aagctctcct caagctctgt ctcttctggc aggcacagga 3120

gagtggcctg aaggctggca ggaggttgcc gcccctccaa cctggaattc ctggcagcag 3180

cagcggctag gccttcctcg gaggcccgac cccctcctcc ttcttggttc agctcaggac 3240

tctgagggtt gctgcgtgga ggcagtgcat gccctgggca cagtgcccag ttcctgccca 3300

<210> 26
<211> 1321
<212> ADN
<213> Macaca mulatta

<400> 26
atgtcattca gggaggggggc cagggatgga ggggaggggc tgaggagtga caggcagtta 60

tttctgggtg ggattcacca cttttcccat gaagagggga gacttggtat tttgttcaat 120

cattaagaag acaaagggtt tgttgaactt gacctcgggg ggaatagaca tgggtatggc 180

ctctaaaaac atggccccag cagcttcagt ccctttctca tcgatggtca gcacagcctt 240

atgcacggcc ttggagagct tcaggggtgc ctcctccgtg atccccgaga ggtcagcccc 300

attgctgaag accttagtga tacccaggtg gcccaggact gtcttcagat cataggttcc 360

agtaatggcc agtctgggta aatgtaagtt ggcagacctg ctgttttcat tttccaggaa 420

cttggtgatg atatcatggg tgagttcatt ttccaggtgc tgcagtttcc cctcatcagg 480

caggaagaag atggcggtgg cattgcccag gtatttcatc agcagcaccc agctggacag 540

cttctcacag tggtagatgt taaacatgcc taaacgcctc atcatgggca ccttcacggt 600

ggtcgcctgg tccacgtgga agtcctcttc cttggtggcc tcaacgtcaa agggtctctc 660

ccatttgcct ttaaagaaga tgtaattcac cagagcaaaa actgtgtctc tgtcaagctc 720

cttgaccaaa tccacaattt tcccttgagt ttccttctcc acgtaattgt tgatctgttt 780

cttggcctct tcggtgtcct caaagttgac agagaaggct tctgagtggt acagtttttt 840

gacatcctcc aaaaacttat ccactacctt caggctcttg ttgaggaaca ggccgttgcc 900

ggtggtcagc tggagctggc tgtctggctt gttgagggta tggaggagtt cctggaagcc 960

ttcatggacc tgagcctccg gaatctccgt gacgttgaaa ttcaggccct ccaggatttc 1020

actgtgagtg tcagccttgg tccccaggga gagcattgca aaggctgtag cgatgctcac 1080

tggggagaag aagatattgg tgctgttgga ctggtgtgcc agctggcggt ataggctgaa 1140

gccgaactca gccaggctgg gggtgatctt gttgagggtt gggtggtcct gatcatggtg 1200

ggatgtatcc gtcttctggg cagcatctcc ctggggatcc tcagccagag agccggggag 1260

caggcagcac aggcctgcca gcaggaggac gccccatgag acagaagatg gcattgtcct 1320

g 1321

<210> 27
<211> 2064
<212> ADN
<213> Macaca mulatta

<400> 27
gtttgcagtc acacacgcag gcagggacca gctcaaccct tctttaatgt cattcaggga 60

gggggccagg gatggagggg aggggctgag gagtgacagg cagttatttc tgggtgggat 120

tcaccacttt tcccatgaag aggggagact tggtattttg ttcaatcatt aagaagacaa 180

agggtttgtt gaacttgacc tcgggggggaa tagacatggg tatggcctct aaaaacatgg 240

ccccagcagc ttcagtccct ttctcatcga tggtcagcac agccttatgc acggccttgg 300

agagcttcag gggtgcctcc tccgtgatcc ccgagaggtc agccccattg ctgaagacct 360

tagtgatacc caggtggccc aggactgtct tcagatcata ggttccagta atggccagtc 420

tgggtaaatg taagttggca gacctgctgt tttcattttc caggaacttg gtgatgatat 480

catgggtgag ttcattttcc aggtgctgca gtttcccctc atcaggcagg aagaagatgg 540

cggtggcatt gcccaggtat ttcatcagca gcacccagct ggacagcttc tcacagtggt 600

agatgttaaa catgcctaaa cgcctcatca tgggcacctt cacggtggtc gcctggtcca 660

cgtggaagtc ctcttccttg gtggcctcaa cgtcaaaggg tctctcccat ttgcctttaa 720

agaagatgta attcaccaga gcaaaaactg tgtctctgtc aagctccttg accaaatcca 780

caattttccc ttgagtttcc ttctccacgt aattgttgat ctgtttcttg gcctcttcgg 840

tgtcctcaaa gttgacagag aaggcttctg agtggtacag ttttttgaca tcctccaaaa 900

acttatccac taccttcagg ctcttgttga ggaacaggcc gttgccggtg gtcagctgga 960

gctggctgtc tggcttgttg agggtatgga ggagttcctg gaagccttca tggacctgag 1020

cctccggaat ctccgtgacg ttgaaattca ggccctccag gatttcactg tgagtgtcag 1080

ccttggtccc cagggagagc attgcaaagg ctgtagcgat gctcactggg gagaagaaga 1140

tattggtgct gttggactgg tgtgccagct ggcggtatag gctgaagccg aactcagcca 1200

ggctgggggt gatcttgttg agggttgggt ggtcctgatc atggtgggat gtatccgtct 1260

tctgggcagc atctccctgg ggatcctcag ccagagagcc ggggagcagg cagcacaggc 1320

ctgccagcag gaggacgccc catgagacag aagatggcat tgtcgattca ccgtcccagg 1380

tcagtggtgg tgcctgaggc tgaggagaca gagccctgtc cttgtccgta tttaagcagt 1440

gggtgcagag gggcaacggg ggaggctgct ggtgaatatt aaccaagatc accccagtta 1500

ccggaggagc aaacagggac taagttcaca ggctgggcgc tgagtcgccc gcccacgctg 1560

tccggacgct ctgcctgagc agcatacagc ctccactgca cgtaccaaaa ggagtcattg 1620

tacctggctc agaaaccaca gtgtcctgcg tccaaggtgg agggggtggc gtgagtcagc 1680

cagtcgctgg gagagtacca ctttgctggc cctctgctct cactgcagaa tccttagcgg 1740

ctgttccact ggtagcaaga tctaccattt actaattcac cccgaaatgc ctgatgctga 1800

agactgatgc cgccctggaa ttcctggcag cagcagtggc taggccttcc tcagagtgct 1860

gatcccctcc tcctcctttg ctcagctcag tactctgagg gttgctgcgt ggaggcagtg 1920

cacgccctgg gcacagggcc cagttcctgc ccacccagga agttggcctc gggtggcggg 1980

tggcggaggc aataggttgg ggaggggcgg ggagcttggg caggaagggg ccttgcccat 2040

tgccaggcag acacaagact gggc 2064

<210> 28
<211> 1608
<212> ADN
<213> Macaca mulatta

<400> 28
gtttgcagtc acacacgcag gcagggacca gctcaaccct tctttaatgt cattcaggga 60

gggggccagg gatggagggg aggggctgag gagtgacagg cagttatttc tgggtgggat 120

tcaccacttt tcccatgaag aggggagact tggtattttg ttcaatcatt aagaagacaa 180

agggtttgtt gaacttgacc tcgggggggaa tagacatggg tatggcctct aaaaacatgg 240

ccccagcagc ttcagtccct ttctcatcga tggtcagcac agccttatgc acggccttgg 300

agagcttcag gggtgcctcc tccgtgatcc ccgagaggtc agccccattg ctgaagacct 360

tagtgatacc caggtggccc aggactgtct tcagatcata ggttccagta atggccagtc 420

tgggtaaatg taagttggca gacctgctgt tttcattttc caggaacttg gtgatgatat 480

catgggtgag ttcattttcc aggtgctgca gtttcccctc atcaggcagg aagaagatgg 540

cggtggcatt gcccaggtat ttcatcagca gcacccagct ggacagcttc tcacagtggt 600

agatgttaaa catgcctaaa cgcctcatca tgggcacctt cacggtggtc gcctggtcca 660

cgtggaagtc ctcttccttg gtggcctcaa cgtcaaaggg tctctcccat ttgcctttaa 720

agaagatgta attcaccaga gcaaaaactg tgtctctgtc aagctccttg accaaatcca 780

caattttccc ttgagtttcc ttctccacgt aattgttgat ctgtttcttg gcctcttcgg 840

tgtcctcaaa gttgacagag aaggcttctg agtggtacag ttttttgaca tcctccaaaa 900

acttatccac taccttcagg ctcttgttga ggaacaggcc gttgccggtg gtcagctgga 960

gctggctgtc tggcttgttg agggtatgga ggagttcctg gaagccttca tggacctgag 1020

cctccggaat ctccgtgacg ttgaaattca ggccctccag gatttcactg tgagtgtcag 1080

ccttggtccc cagggagagc attgcaaagg ctgtagcgat gctcactggg gagaagaaga 1140

tattggtgct gttggactgg tgtgccagct ggcggtatag gctgaagccg aactcagcca 1200

ggctgggggt gatcttgttg agggttgggt ggtcctgatc atggtgggat gtatccgtct 1260

tctgggcagc atctccctgg ggatcctcag ccagagagcc ggggagcagg cagcacaggc 1320

ctgccagcag gaggacgccc catgagacag aagatggcat tgtcctggaa ttcctggcag 1380

cagcagtggc taggccttcc tcagagtgct gatcccctcc tcctcctttg ctcagctcag 1440

tactctgagg gttgctgcgt ggaggcagtg cacgccctgg gcacagggcc cagttcctgc 1500

ccacccagga agttggcctc gggtggcggg tggcggaggc aataggttgg ggaggggcgg 1560

ggagcttggg caggaagggg ccttgcccat tgccaggcag acacaaga 1608

<210> 29
<211> 16
<212> PRT
<213> Desconocida

<220>
<223> Descripción de desconocida: péptido RFGF

<400> 29
Ala Ala Val Ala Leu Leu Pro Ala Val Leu Leu Ala Leu Leu Ala Pro
1 5 10 15

<210> 30
<211> 11
<212> PRT
<213> Desconocida

<220>
<223> Descripción de desconocida: péptido análogo de RFGF

<400> 30
Ala Ala Leu Leu Pro Val Leu Leu Ala Ala Pro
1 5 10

<210> 31
<211> 13
<212> PRT
<213> Virus de inmunodeficiencia humana

<400> 31
Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Pro Pro Gln
1 5 10

<210> 32
<211> 16
<212> PRT
<213> Drosophila sp.

<400> 32
Arg Gln Ile Lys Ile Trp Phe Gln Asn Arg Arg Met Lys Trp Lys Lys
1 5 10 15

<210> 33
<211> 21
<212> ARN
<213> secuencia artificial

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

<400> 33
cuucuuaaug auugaacaaa a 21

<210> 34
<211> 23
<212> ADN
<213> secuencia artificial

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

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

<400> 34
uuuugutcaa ucauuaagaa gac 23

<210> 35
<211> 21
<212> ARN
<213> secuencia artificial

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

<400> 35
cuucuuaaug auugaacaaa a 21

<210> 36
<211> 21
<212> ARN
<213> secuencia artificial

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

<400> 36
cuucuuaaug auugaacaaa a 21

<210> 37
<211> 23
<212> ARN
<213> secuencia artificial

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

<400> 37
uuuuguucaa ucauuaagaa gac 23

<210> 38
<211> 23
<212> ADN
<213> secuencia artificial

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

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

<400> 38
uuuugtucaa ucauuaagaa gac 23

<210> 39
<211> 23
<212> ADN
<213> secuencia artificial

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

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

<400> 39
uuuugutcaa ucauuaagaa gac 23

<210> 40

<400> 40

000

<210> 41

<400> 41
000

<210> 42

<400> 42
000

<210> 43

<400> 43
000

<210> 44

<400> 44
000

<210> 45

<400> 45
000

<210> 46

<400> 46
000

<210> 47

<400> 47
000

<210> 48

<400> 48
000

<210> 49

<400> 49
000

<210> 50

<400> 50

000

<210> 51

<400> 51
000

<210> 52

<400> 52
000

<210> 53

<400> 53
000

<210> 54

<400> 54
000

<210> 55

<400> 55
000

<210> 56

<400> 56
000

<210> 57

<400> 57
000

<210> 58

<400> 58
000

<210> 59

<400> 59
000

<210> 60

<400> 60

000

<210> 61

<400> 61
000

<210> 62

<400> 62
000

<210> 63

<400> 63
000

<210> 64

<400> 64
000

<210> 65

<400> 65
000

<210> 66

<400> 66
000

<210> 67

<400> 67
000

<210> 68

<400> 68
000

<210> 69

<400> 69
000

<210> 70

<400> 70

000

<210> 71

<400> 71
000

<210> 72

<400> 72
000

<210> 73

<400> 73
000

<210> 74

<400> 74
000

<210> 75

<400> 75
000

<210> 76

<400> 76
000

<210> 77

<400> 77
000

<210> 78

<400> 78
000

<210> 79

<400> 79
000

<210> 80

<400> 80

000

<210> 81

<400> 81
000

<210> 82

<400> 82
000

<210> 83

<400> 83
000

<210> 84

<400> 84
000

<210> 85

<400> 85
000

<210> 86

<400> 86
000

<210> 87

<400> 87
000

<210> 88

<400> 88
000

<210> 89

<400> 89
000

<210> 90

<400> 90

000

<210> 91

<400> 91
000

<210> 92

<400> 92
000

<210> 93

<400> 93
000

<210> 94

<400> 94
000

<210> 95

<400> 95
000

<210> 96

<400> 96
000

<210> 97

<400> 97
000

<210> 98

<400> 98
000

<210> 99

<400> 99
000

<210> 100

<400> 100

000

<210> 101

<400> 101
000

<210> 102

<400> 102
000

<210> 103

<400> 103
000

<210> 104

<400> 104
000

<210> 105

<400> 105
000

<210> 106

<400> 106
000

<210> 107

<400> 107
000

<210> 108

<400> 108
000

<210> 109

<400> 109
000

<210> 110

<400> 110

000

<210> 111

<400> 111
000

<210> 112

<400> 112
000

<210> 113

<400> 113
000

<210> 114

<400> 114
000

<210> 115

<400> 115
000

<210> 116

<400> 116
000

<210> 117

<400> 117
000

<210> 118

<400> 118
000

<210> 119

<400> 119
000

<210> 120

<400> 120

000

<210> 121

<400> 121
000

<210> 122

<400> 122
000

<210> 123

<400> 123
000

<210> 124

<400> 124
000

<210> 125

<400> 125
000

<210> 126

<400> 126
000

<210> 127

<400> 127
000

<210> 128

<400> 128
000

<210> 129

<400> 129
000

<210> 130

<400> 130

000

<210> 131

<400> 131
000

<210> 132

<400> 132
000

<210> 133

<400> 133
000

<210> 134

<400> 134
000

<210> 135

<400> 135
000

<210> 136

<400> 136
000

<210> 137

<400> 137
000

<210> 138

<400> 138
000

<210> 139

<400> 139
000

<210> 140

<400> 140

000

<210> 141

<400> 141
000

<210> 142

<400> 142
000

<210> 143

<400> 143
000

<210> 144

<400> 144
000

<210> 145

<400> 145
000

<210> 146

<400> 146
000

<210> 147

<400> 147
000

<210> 148

<400> 148
000

<210> 149

<400> 149
000

<210> 150

<400> 150

000

<210> 151

<400> 151
000

<210> 152

<400> 152
000

<210> 153

<400> 153
000

<210> 154

<400> 154
000

<210> 155

<400> 155
000

<210> 156

<400> 156
000

<210> 157

<400> 157
000

<210> 158

<400> 158
000

<210> 159

<400> 159
000

<210> 160

<400> 160

000

<210> 161

<400> 161
000

<210> 162

<400> 162
000

<210> 163

<400> 163
000

<210> 164

<400> 164
000

<210> 165

<400> 165
000

<210> 166

<400> 166
000

<210> 167

<400> 167
000

<210> 168

<400> 168
000

<210> 169

<400> 169
000

<210> 170

<400> 170

000

<210> 171

<400> 171
000

<210> 172

<400> 172
000

<210> 173

<400> 173
000

<210> 174

<400> 174
000

<210> 175

<400> 175
000

<210> 176

<400> 176
000

<210> 177

<400> 177
000

<210> 178

<400> 178
000

<210> 179

<400> 179
000

<210> 180

<400> 180

000

<210> 181

<400> 181
000

<210> 182

<400> 182
000

<210> 183

<400> 183
000

<210> 184

<400> 184
000

<210> 185

<400> 185
000

<210> 186

<400> 186
000

<210> 187

<400> 187
000

<210> 188

<400> 188
000

<210> 189

<400> 189
000

<210> 190

<400> 190

000

<210> 191

<400> 191
000

<210> 192

<400> 192
000

<210> 193

<400> 193
000

<210> 194

<400> 194
000

<210> 195

<400> 195
000

<210> 196

<400> 196
000

<210> 197

<400> 197
000

<210> 198

<400> 198
000

<210> 199

<400> 199
000

<210> 200

<400> 200

000

<210> 201

<400> 201
000

<210> 202

<400> 202
000

<210> 203

<400> 203
000

<210> 204

<400> 204
000

<210> 205

<400> 205
000

<210> 206

<400> 206
000

<210> 207

<400> 207
000

<210> 208

<400> 208
000

<210> 209

<400> 209
000

<210> 210

<400> 210

000

<210> 211

<400> 211
000

<210> 212

<400> 212
000

<210> 213

<400> 213
000

<210> 214

<400> 214
000

<210> 215

<400> 215
000

<210> 216

<400> 216
000

<210> 217

<400> 217
000

<210> 218

<400> 218
000

<210> 219

<400> 219
000

<210> 220

<400> 220

000

<210> 221

<400> 221
000

<210> 222

<400> 222
000

<210> 223

<400> 223
000

<210> 224

<400> 224
000

<210> 225

<400> 225
000

<210> 226

<400> 226
000

<210> 227
<400> 227
000

<210> 228

<400> 228
000

<210> 229
<400> 229
000
<210> 230
<400> 230
000
<210> 231
<400> 231
000
<210> 232

<400> 232
000
<210> 233
<400> 233
000
<210> 234
<400> 234
000
<210> 235
<400> 235
000
<210> 236
<400> 236
000
<210> 237
<400> 237
000
<210> 238
<400> 238
000
<210> 239
<400> 239
000
<210> 240
<400> 240
000
<210> 241
<400> 241
000
<210> 242
<400> 242
000
<210> 243
<400> 243
000
<210> 244
<400> 244
000
<210> 245
<400> 245
000
<210> 246
<400> 246
000
<210> 247
<400> 247
000
<210> 248
<400> 248
000
<210> 249
<400> 249
000
<210> 250
<400> 250
000
<210> 251
<400> 251
000
<210> 252

<400> 252
000
<210> 253
<400> 253
000
<210> 254
<400> 254
000
<210> 255
<400> 255
000
<210> 256
<400> 256
000
<210> 257
<400> 257
000
<210> 258
<400> 258
000
<210> 259
<400> 259
000
<210> 260
<400> 260
000
<210> 261
<400> 261
000
<210> 262
<400> 262
000
<210> 263
<400> 263
000
<210> 264
<400> 264
000
<210> 265
<400> 265
000
<210> 266
<400> 266
000
<210> 267
<400> 267
000
<210> 268
<400> 268
000
<210> 269
<400> 269
000
<210> 270
<400> 270
000
<210> 271
<400> 271
000
<210> 272

<400> 272
000
<210> 273
<400> 273
000
<210> 274
<400> 274
000
<210> 275
<400> 275
000
<210> 276
<400> 276
000
<210> 277
<400> 277
000
<210> 278

<400> 278
000
<210> 279
<400> 279
000
<210> 280
<400> 280
000
<210> 281

<400> 281
000
<210> 282
<400> 282
000
<210> 283
<400> 283
000
<210> 284
<400> 284
000
<210> 285
<400> 285
000
<210> 286

<400> 286
000
<210> 287
<400> 287
000
<210> 288
<400> 288
000
<210> 289
<400> 289
000
<210> 290
<400> 290
000
<210> 291

<400> 291
000
<210> 292
<400> 292
000
<210> 293
<400> 293
000
<210> 294
<400> 294
000
<210> 295
<400> 295
000
<210> 296
<400> 296
000
<210> 297
<400> 297
000
<210> 298
<400> 298
000
<210> 299
<400> 299
000
<210> 300
<400> 300
000
<210> 301
<400> 301
000
<210> 302
<400> 302
000
<210> 303
<400> 303
000
<210> 304
<400> 304
000
<210> 305
<400> 305
000
<210> 306
<400> 306
000
<210> 307
<400> 307
000
<210> 308
<400> 308
000
<210> 309
<400> 309
000
<210> 310
<400> 310
000
<210> 311

<400> 311
000
<210> 312
<400> 312
000
<210> 313
<400> 313
000
<210> 314
<400> 314
000
<210> 315
<400> 315
000
<210> 316
<400> 316
000
<210> 317
<400> 317
000
<210> 318
<400> 318
000
<210> 319
<400> 319
000
<210> 320
<400> 320
000
<210> 321
<400> 321
000
<210> 322
<400> 322
000
<210> 323
<400> 323
000
<210> 324
<400> 324
000
<210> 325
<400> 325
000
<210> 326
<400> 326
000
<210> 327
<400> 327
000
<210> 328
<400> 328
000
<210> 329
<400> 329
000
<210> 330
<400> 330
000
<210> 331

<400> 331
000
<210> 332
<400> 332
000
<210> 333
<400> 333
000
<210> 334
<400> 334
000
<210> 335
<400> 335
000
<210> 336
<400> 336
000
<210> 337
<400> 337
000
<210> 338
<400> 338
000
<210> 339
<400> 339
000
<210> 340
<400> 340
000
<210> 341
<400> 341
000
<210> 342
<400> 342
000
<210> 343
<400> 343
000
<210> 344
<400> 344
000
<210> 345
<400> 345
000
<210> 346
<400> 346
000
<210> 347
<400> 347
000
<210> 348
<400> 348
000
<210> 349
<400> 349
000
<210> 350
<400> 350
000

<210> 351
<400> 351
000
<210> 352
<400> 352
000
<210> 353
<400> 353
000
<210> 354
<400> 354
000
<210> 355
<400> 355
000
<210> 356
<400> 356
000
<210> 357
<400> 357
000
<210> 358
<400> 358
000
<210> 359
<400> 359
000
<210> 360
<400> 360
000
<210> 361
<400> 361
000
<210> 362
<400> 362
000
<210> 363
<400> 363
000
<210> 364
<400> 364
000
<210> 365
<400> 365
000
<210> 366
<400> 366
000
<210> 367
<400> 367
000
<210> 368
<400> 368
000
<210> 369
<400> 369
000
<210> 370
<400> 370
000

<210> 371
<400> 371
000
<210> 372
<400> 372
000
<210> 373
<400> 373
000
<210> 374
<400> 374
000
<210> 375
<400> 375
000
<210> 376
<400> 376
000
<210> 377
<400> 377
000
<210> 378
<400> 378
000
<210> 379
<400> 379
000
<210> 380
<400> 380
000
<210> 381

<400> 381
000
<210> 382
<400> 382
000
<210> 383
<400> 383
000
<210> 384
<400> 384
000
<210> 385
<400> 385
000
<210> 386
<400> 386
000
<210> 387
<400> 387
000
<210> 388
<400> 388
000
<210> 389
<400> 389
000
<210> 390
<400> 390

000
<210> 391
<400> 391
000
<210> 392
<400> 392
000
<210> 393
<400> 393
000
<210> 394
<400> 394
000
<210> 395
<400> 395
000
<210> 396
<400> 396
000
<210> 397
<400> 397
000
<210> 398
<400> 398
000
<210> 399
<400> 399
000
<210> 400
<400> 400
000
<210> 401
<400> 401
000
<210> 402
<400> 402
000
<210> 403
<400> 403
000
<210> 404
<400> 404
000
<210> 405
<400> 405
000
<210> 406
<400> 406
000
<210> 407
<400> 407
000
<210> 408
<400> 408
000
<210> 409
<400> 409
000
<210> 410
<400> 410

000
<210> 411
<400> 411
000
<210> 412
<400> 412
000
<210> 413
<400> 413
000
<210> 414
<400> 414
000
<210> 415
<400> 415
000
<210> 416

<400> 416
000
<210> 417
<211> 21
<212> ARN
<213> secuencia artificial
<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético
<400> 417
cuucuuaaug auugaacaaa a 21
<210> 418
<211> 21
<212> ARN
<213> secuencia artificial
<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético
<400> 418
cuucuuaaug auugaacaaa a 21
<210> 419
<211> 23
<212> ARN
<213> secuencia artificial
<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético
<400> 419
uuuuguucaa ucauuaagaa gac 23
<210> 420
<211> 23
<212> ARN
<213> secuencia artificial
<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 420
uuuuguucaa ucauuaagaa gac 23