

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 804 510**

51 Int. Cl.:

C12N 15/113 (2010.01)

A61K 31/7088 (2006.01)

A61K 31/713 (2006.01)

A61P 3/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.10.2014 PCT/US2014/059160**

87 Fecha y número de publicación internacional: **09.04.2015 WO15051318**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.10.2014 E 14800179 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.02.2020 EP 3052628**

54 Título: **Composiciones y métodos para inhibir la expresión del gen ALAS1**

30 Prioridad:

04.10.2013 US 201361887288 P
24.04.2014 US 201461983720 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
08.02.2021

73 Titular/es:

ALNYLAM PHARMACEUTICALS, INC. (50.0%)
300 Third Street
Cambridge, MA 02142, US y
ICAHN SCHOOL OF MEDICINE AT MOUNT SINAI
(50.0%)

72 Inventor/es:

BETTENCOURT, BRIAN;
FITZGERALD, KEVIN;
QUERBES, WILLIAM;
DESNICK, ROBERT J. y
YASUDA, MAKIKO

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 804 510 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Composiciones y métodos para inhibir la expresión del gen ALAS1

Campo de la invención

La invención se refiere en general a la inhibición específica de la expresión del gen ALAS1.

5 Antecedentes

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

- 10 Entre las porfirias heredadas, la porfiria intermitente aguda (AIP, por sus siglas en inglés, p. ej., AIP dominante autosómica), la porfiria variegata (VP, por sus siglas en inglés, p. ej., VP dominante autosómica), coproporfiria hereditaria (coproporfiria o HCP, por sus siglas en inglés, p. ej., HCP dominante autosómica) y la porfiria por deficiencia de ácido 5'-aminolevulínico (también conocido como ácido δ -aminolevulínico o ALA) deshidratasa (ADP, por sus siglas en inglés, p. ej., ADP recesiva autosómica) se clasifican como porfirias hepáticas agudas y se
- 15 manifiestan mediante ataques neurológicos agudos que pueden resultar mortales. Los ataques agudos se caracterizan por síntomas del sistema nervioso central, autonómico y periférico, que incluyen dolor abdominal intenso, hipertensión, taquicardias, estreñimiento, debilidad motriz, parálisis y convulsiones. Si no se tratan debidamente, pueden provocar tetraplegia, deficiencia respiratoria y defunción. Varios factores, que incluyen los fármacos que inducen el citocromo P450, la dieta y los cambios hormonales, pueden precipitar los ataques agudos
- 20 mediante el incremento de la actividad del ácido 5'-aminolevulínico-sintasa 1 hepática (ALAS1), que es la primera enzima, y a la vez la enzima limitante de la velocidad, de la vía biosintética del grupo hemo. En las porfirias agudas, p. ej., AIP, VP, HCP y ADP, las deficiencias enzimáticas respectivas provocan la producción y la acumulación hepática de una o más sustancias (p. ej., porfirinas y/o precursores de porfirinas, p. ej., ALA y/o PBG) que pueden ser neurotóxicas y que pueden provocar la aparición de ataques agudos. Remítase, p. ej., a Balwani, M y Desnick, R.J., Blood, 120:4496-4504, 2012.
- 25

- La terapia actual para los ataques neurológicos agudos consiste en la administración intravenosa de hemina (Panhematin®, Lundbeck o Normosang®, Orphan Europe), que proporciona el grupo hemo exógeno para la inhibición por retroalimentación negativa de ALAS1 y, por consiguiente, reduce la producción de ALA y PBG. La hemina se utiliza para el tratamiento durante un ataque agudo y para la prevención de ataques, particularmente en
- 30 mujeres con porfirias agudas que experimentan ataques frecuentes con los cambios hormonales durante sus ciclos menstruales. Aunque generalmente los pacientes responden bien, su efecto es lento, normalmente lleva de dos a cuatro días o más normalizar las concentraciones de ALA y PBG en orina hasta niveles normales. Debido a que la hemina intravenosa se metaboliza rápidamente, normalmente son necesarias de tres a cuatro infusiones para tratar o prevenir eficazmente un ataque agudo. Además, las infusiones repetidas pueden provocar una sobrecarga de
- 35 hierro y flebitis, las cuales pueden dificultar el acceso venoso periférico. Aunque el trasplante de hígado ortotrófico es curativo, este procedimiento presenta una morbilidad y una mortalidad significativas y la disponibilidad de donantes de hígado es limitada. Por consiguiente, se necesita una estrategia terapéutica alternativa que sea más eficaz, que actúe rápido y que sea segura. Sería particularmente favorable si un tratamiento de este tipo se pudiera suministrar mediante una administración subcutánea, ya que esto eliminaría la necesidad de infusiones y de una hospitalización prolongada.
- 40

- La AIP, también denominada deficiencia de porfobilinógeno-desaminasa (PBGD) o deficiencia de hidroximetilbilano-sintasa (HMBS), es la porfiria hepática aguda más común. Se estima que la prevalencia de AIP es de 5-10 en 100 000, donde aproximadamente un 5-10% de los pacientes son sintomáticos. AIP es un trastorno dominante autosómico provocado por mutaciones en el gen *HMBS* que dan como resultado una actividad reducida, p. ej.,
- 45 seminormal de la enzima. Previamente, se ha generado por recombinación homóloga un modelo en ratones de AIP que presenta ~30% de actividad HMBS de origen natural. Del mismo modo que los pacientes humanos, estos ratones incrementan la actividad ALAS1 hepática y acumulan grandes cantidades de ALA y PBG urinarias y en plasma cuando se les administran fármacos porfirinogénicos tales como el fenobarbital. Por lo tanto, sirven como un modelo excelente para evaluar la eficacia de agentes terapéuticos novedosos para las porfirias hepáticas agudas.

50 Compendio

- La presente invención está definida por las reivindicaciones. En consecuencia, la presente invención se refiere a un ácido ribonucleico bicatenario (ARNbc) para inhibir la expresión de ALAS1, donde dicho ARNbc comprende una hebra sentido y una hebra antisentido, comprendiendo la hebra antisentido una región de complementariedad respecto a un transcrito de ARN de ALAS1 (p. ej., SEQ ID NO:1), cuya hebra antisentido comprende
- 55 usAfsAfGfaUfgAfgAfcAfcUfcUfuUfcUfgsgsu (SEQ ID NO: 4161), donde c, a, g, u = 2'-OMe ribonucleósidos; Af, Cf, Gf, Uf = 2'F ribonucleósidos; s = fosforotioato, o una secuencia que difiere en no más de 1, 2 o 3 nucleótidos de esta.

En la presente se describen métodos y composiciones de ARNi para modular la expresión de un gen ALAS1. La expresión de un gen ALAS1 se puede reducir o inhibir utilizando un ARNi específico para ALAS1. Tal inhibición puede ser útil en el tratamiento de trastornos relacionados con la expresión de ALAS1 tales como las porfirias.

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

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

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

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

El ARNi (p. ej., ARNbc) descrito en la presente puede comprender una hebra antisentido que tiene una región que es sustancialmente complementaria respecto a una región de un ALAS1 humano. El gen ALAS1 humano puede presentar la secuencia de NM_000688.4 (SEQ ID NO:1) o NM_000688.5 (SEQ ID NO:382). El ALAS1 humano puede tener la secuencia de NM_199166.1.

La secuencia antisentido del ARNi (p. ej., ARNbc) puede tener la diana dentro de la región de 871 a 895 (más o menos 5, 4, 3, 2 o 1 nucleótidos en cualquier o ambas direcciones en el extremo 5' y/o 3') en el transcrito de ALAS1 NM_000688.4. La secuencia antisentido puede tener como diana los nucleótidos 871 a 893, 871 a 892 u 873 a 895 en el transcrito de ALAS1 NM_000688.4. La secuencia antisentido puede comprender o estar constituida por una secuencia que es totalmente complementaria o sustancialmente complementaria a los nucleótidos 871 a 893, 871 a 892 u 873 a 895 en el transcrito de ALAS1 NM_000688.4.

En un aspecto, se proporciona un ácido ribonucleico bicatenario (ARNbc) para inhibir la expresión de ALAS1, donde dicho ARNbc comprende una hebra sentido y una hebra antisentido, comprendiendo la hebra antisentido una región de complementariedad respecto a un transcrito de ARN de ALAS1, cuya hebra antisentido comprende al menos 15 (p. ej., al menos 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 o 23) nucleótidos contiguos que difieren en no más de 3, 2 o 1 nucleótidos de la secuencia UAAGAUGAGACACUCUUUCUGGU (SEQ ID NO: 4153) o UAAGAUGAGACACUCUUUCUGGU (SEQ ID NO: 4154). La hebra antisentido puede comprender la secuencia de UAAGAUGAGACACUCUUUCUGGU (SEQ ID NO: 4153) o UAAGAUGAGACACUCUUUCUGGU (SEQ ID NO: 4154). La hebra sentido puede comprender la secuencia de CAGAAAGAGUGUCUCAUCUUA (SEQ ID NO: 4155). Uno o más nucleótidos de la hebra antisentido y/o hebra sentido están modificados como se describe en la presente. El ARNbc puede comprender (i) una hebra antisentido que comprende, o está constituida por, la secuencia antisentido de AD-60489, AD-60519, o AD-61193 y/o (ii) una hebra sentido que comprende, o está constituida por, la secuencia sentido de AD-60489, AD-60519, o AD-61193 (incluidas una o más (p. ej., la totalidad) de las modificaciones de la hebra antisentido y/o hebra antisentido de AD-60489, AD-60519 o AD-61193).

En un aspecto, se proporciona un ácido ribonucleico bicatenario (ARNbc) para inhibir la expresión de ALAS1, donde dicho ARNbc comprende una hebra sentido y una hebra antisentido, comprendiendo la hebra antisentido una región de complementariedad respecto a un transcrito de ARN de ALAS1, cuya hebra antisentido comprende al menos 15 (p. ej., al menos 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 o 23) nucleótidos contiguos que difieren en no más de 3 (p. ej., en no más

de 0, 1 o 2) nucleótidos de una secuencia antisentido enumerada en cualquiera de las Tablas 21 a 40, o una versión no modificada de una secuencia antisentido (p. ej., una versión que tiene la misma secuencia de nucleótidos excepto en que algunos o todos los nucleótidos no están modificados) enumerada en cualquiera de las Tablas 21 a 40. La secuencia antisentido puede comprender al menos 15 (p. ej., al menos 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 o 23) nucleótidos contiguos que difieren en no más de 3 (p. ej., no más de 0, 1 o 2) nucleótidos de (i) la secuencia antisentido de AD-60489, AD-60519 o AD-61193 o (ii) una versión no modificada de cualquiera de estas secuencias. La hebra antisentido puede comprender al menos 15 (p. ej., al menos 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 o 23) nucleótidos contiguos que difieren en no más de 3 (p. ej., en no más de 0, 1 o 2) nucleótidos de la secuencia de UAAGAUGAGACACUCUUUCUGGU (SEQ ID NO: 4153) o UAAGAUGAGACACUUCTUUCUGGU (SEQ ID NO: 4154). La secuencia antisentido puede tener como diana las posiciones 871-893 de NM_000688.4 (SEQ ID NO:1). La hebra sentido puede comprender la secuencia de CAGAAAGAGUGUCUCAUCUUA (SEQ ID NO: 4155). Uno o más nucleótidos de la hebra antisentido y/o hebra sentido están modificados como se describe en la presente.

El ARNbc puede no ser una secuencia sentido y/o antisentido enumerada en cualquiera de las Tablas 2, 3, 6, 7, 8, 9, 14, 15, 18 o 20.

También se proporciona en la presente un ácido ribonucleico bicatenario (ARNbc) para inhibir la expresión de ALAS1, donde dicho ARNbc comprende una hebra sentido y una hebra antisentido, comprendiendo la hebra antisentido una región de complementariedad respecto a un transcrito de ARN de ALAS1, cuya hebra antisentido comprende al menos 15 (p. ej., al menos 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 o 23) nucleótidos contiguos que difieren en no más de 3 nucleótidos, no más de 2 nucleótidos o no más de un nucleótido, de la secuencia antisentido de AD-60519. Uno o más nucleótidos pueden estar modificados como se describe en la presente.

Se proporciona un ácido ribonucleico bicatenario (ARNbc) para inhibir la expresión de ALAS1, donde dicho ARNbc comprende una hebra sentido y una hebra antisentido, comprendiendo la hebra antisentido una región de complementariedad respecto a un transcrito de ARN de ALAS1, cuya hebra antisentido comprende al menos 15 (p. ej., al menos 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, o 23) nucleótidos contiguos que difieren en no más de 3 (p. ej., en no más de 0, 1 o 2) nucleótidos de la secuencia antisentido de AD-60489, o un derivado de AD-60489 como se describe en la presente. Uno o más nucleótidos pueden estar modificados como se describe en la presente, p. ej., uno o más (o la totalidad) de los nucleótidos de AD-60489 están modificados como se describe en la presente. El derivado de AD-60489 puede ser AD-60501, AD-60519, AD-60901, AD-60495, AD-60900, AD-60935, AD-60879, AD-61190, AD-61191, AD-60865, AD-60861, AD-60876, AD-61193, AD-60519, AD-60519 o AD-60901. El derivado de AD-60489 puede ser AD-60519. El derivado de AD-60489 puede ser AD-61193.

Se puede proporcionar un ácido ribonucleico bicatenario (ARNbc) para inhibir la expresión de ALAS1, donde dicho ARNbc comprende una hebra sentido y una hebra antisentido, comprendiendo la hebra antisentido una región de complementariedad respecto a un transcrito de ARN de ALAS1, cuya hebra antisentido comprende al menos 15 (p. ej., al menos 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 o 23) nucleótidos contiguos que difieren en no más de 3 (p. ej., no más de 0, 1 o 2) nucleótidos de un derivado de AD-58632 descrito en la presente. Uno o más nucleótidos pueden estar modificados como se describe en la presente, p. ej., uno o más (o la totalidad) de los nucleótidos de AD-58632 están modificados como se describe en la presente. El derivado de AD-58632 puede ser AD-60405, AD-60887, AD-60923, AD-60434, AD-60892, AD-60419, AD-60924, AD-60445, AD-60925, y AD-60926, AD-60820, AD-60843, AD-60819, AD-61140, AD-61141, AD-61142, AD-60835, AD-60839, AD-61143, AD-61144, AD-61145, AD-61146, AD-60892, o AD-60419. El derivado de AD-58632 puede ser AD-60819.

El ARNbc puede tener una CI_{50} inferior a 1 nM. El ARNbc puede tener una CI_{50} en el intervalo de 0.01-1 nM. El ARNbc puede tener una CI_{50} inferior a 0.05 nM. El ARNbc puede tener una CI_{50} inferior a 0.02 nM. El ARNbc puede tener una CI_{50} inferior a 0.01 nM. La CI_{50} se puede determinar como se describe en la presente en los Ejemplos.

El ARNbc puede tener una DE_{50} de dosis única inferior a aproximadamente 10 mg/kg. El ARNbc puede tener una DE_{50} de dosis única inferior a aproximadamente 5 mg/kg. La CE_{50} se puede determinar como se describe en la presente en los Ejemplos.

El ARNbc puede mostrar una actividad mejorada en comparación con AD-58632. El ARNbc puede mostrar una actividad mejorada en comparación con AD-60489. El ARNbc puede mostrar una actividad mejorada en comparación con AD-58632 y AD-60489.

El ARNbc puede ser AD-60501, AD-60519, AD-60901, AD-60495, AD-60900, AD-60935, AD-60879, AD-61190, AD-61191, AD-60865, AD-60861, AD-60876, AD-61193, AD-60519, AD-60519, AD-60901, AD-60405, AD-60887, AD-60923, AD-60434, AD-60892, AD-60419, AD-60924, AD-60445, AD-60925, AD-60926, AD-60820, AD-60843, AD-60819, AD-61140, AD-61141, AD-61142, AD-60835, AD-60839, AD-61143, AD-61144, AD-61145, AD-61146, AD-60892 o AD-60419 (p. ej., incluida la secuencia de nucleótidos y/o uno o más (p. ej. la totalidad) de las modificaciones de los ARNbc mencionados anteriormente). El ARNbc puede comprender una hebra antisentido que comprende, o está constituida por, una secuencia antisentido (y/o una o más (p. ej., la totalidad) de las modificaciones)) seleccionada de AD-60501, AD-60519, AD-60901, AD-60495, AD-60900, AD-60935, AD-60879, AD-61190, AD-61191, AD-60865, AD-60861, AD-60876, AD-61193, AD-60519, AD-60519, AD-60901, AD-60405, AD-60887, AD-60923, AD-60434, AD-60892, AD-60419, AD-60924, AD-60445, AD-60925, AD-60926, AD-60820,

- AD-60843, AD-60819, AD-61140, AD-61141, AD-61142, AD-60835, AD-60839, AD-61143, AD-61144, AD-61145, AD-61146, AD-60892 o AD-60419. El ARNbc puede comprender una hebra sentido que comprende, o está constituida por, una secuencia sentido (y/o una o más (por ejemplo, la totalidad) de las modificaciones)) seleccionada de AD-60501, AD-60519, AD-60901, AD-60495, AD-60900, AD-60935, AD-60879, AD-61190, AD-61191, AD-60865, AD-60861, AD-60876, AD-61193, AD-60519, AD-60519, AD-60901, AD-60405, AD-60887, AD-60923, AD-60434, AD-60892, AD-60419, AD-60924, AD-60445, AD-60925, AD-60926, AD-60820, AD-60843, AD-60819, AD-61140, AD-61141, AD-61142, AD-60835, AD-60839, AD-61143, AD-61144, AD-61145, AD-61146, AD-60892 o AD-60419.
- 5 Se puede proporcionar un ácido ribonucleico bicatenario (ARNbc) para inhibir la expresión de ALAS1, donde el ARNbc comprende (i) una hebra antisentido que comprende, o está constituida por, la secuencia de UAAGAUGAGACACUCUUUCUGGU (SEQ ID NO: 4153) o UAAGAUGAGACACUCTUUCUGGU (SEQ ID NO: 4154) y/o (ii) una hebra sentido que comprende, o está constituida por, la secuencia de CAGAAAGAGUGUCUCAUCUUA (SEQ ID NO: 4155). Uno o más nucleótidos de la hebra antisentido y/o la hebra sentido pueden estar modificados como se describe en la presente.
- 10 Se puede proporcionar un ácido ribonucleico bicatenario (ARNbc) para inhibir la expresión de ALAS1, donde el ARNbc comprende (i) una hebra antisentido que comprende, o está constituida por, la secuencia antisentido de AD-60489 y/o (ii) una hebra sentido que comprende, o está constituida por, la secuencia sentido de AD-60489 (donde la secuencia sentido y/o antisentido incluye una o más (por ejemplo, la totalidad) de las modificaciones de la hebra sentido y/o hebra antisentido de AD-60489).
- 15 Se puede proporcionar un ácido ribonucleico bicatenario (ARNbc) para inhibir la expresión de ALAS1, donde el ARNbc comprende (i) una hebra antisentido que comprende, o está constituida por, la secuencia antisentido de AD-60519 y/o (ii) una hebra sentido que comprende, o está constituida por, la secuencia sentido de AD-60519 (donde la secuencia sentido y/o antisentido incluye una o más (por ejemplo, la totalidad) de las modificaciones de la hebra sentido y/o hebra antisentido de AD-60519).
- 20 Se puede proporcionar un ácido ribonucleico bicatenario (ARNbc) para inhibir la expresión de ALAS1, donde el ARNbc comprende (i) una hebra antisentido que comprende, o está constituida por, la secuencia antisentido de AD-61193 y/o (ii) una hebra sentido que comprende, o está constituida por, la secuencia sentido de AD-61193 (donde la secuencia sentido y/o antisentido incluye una o más (por ejemplo, la totalidad) de las modificaciones de la hebra sentido y/o hebra antisentido de AD-61193).
- 25 Se puede proporcionar un ácido ribonucleico bicatenario (ARNbc) para inhibir la expresión de ALAS1, donde el ARNbc comprende (i) una hebra antisentido que comprende, o está constituida por, la secuencia antisentido de AD-60819 y/o (ii) una secuencia sentido que comprende, o está constituida por, la secuencia sentido de AD-60819 (donde la secuencia sentido y/o antisentido incluye una o más (por ejemplo, la totalidad) de las modificaciones de la hebra sentido y/o hebra antisentido de AD-60819).
- 30 Se puede proporcionar un ácido ribonucleico bicatenario (ARNbc) para inhibir la expresión de ALAS1, donde el ARNbc comprende (i) una hebra antisentido que comprende, o está constituida por, la secuencia antisentido de AD-60489, AD-60519, AD-61193 o AD-60819 (o una secuencia antisentido no modificada correspondiente) y/o (ii) una hebra sentido que comprende, o está constituida por, la secuencia sentido de AD-60489, AD-60519, AD-61193 o AD-60819 (o una secuencia antisentido no modificada correspondiente). El ARNbc puede comprender (i) una hebra antisentido que está constituida por la secuencia antisentido de AD-60489, AD-60519, AD-61193 o AD-60819 y/o (ii) una hebra sentido que está constituida por la secuencia sentido de AD-60489, AD-60519, AD-61193 o AD-60819, excepto en que la hebra antisentido y/o hebra sentido del ARNbc difiere en 1, 2 o 3 nucleótidos de la correspondiente secuencia antisentido y/o sentido de AD-60489, AD-60519, AD-61193 o AD-60819.
- 35 Las secuencias y modificaciones de AD-60489, AD-60519, AD-61193 y AD-60819 se muestran en la Tabla 44 a continuación.
- 40
- 45

Tabla 44: Secuencias y modificaciones de AD-60489, AD-60519, AD-61193 y AD-60819

Sitios diana de la secuencia antisentido en NM_000688.4	Nombre dúplex	Secuencia sentido (5'-3')	Secuencia antisentido (5'-3')	Secuencia sentido no modificada correspondiente	Secuencia antisentido no modificada correspondiente
871-893	AD-60489	CfsaGfaAfaGfaGfuUfGfuCfuCfaUfcUfuAfl96 (SEQ ID NO: 4156)	usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcUfuUfcUfgsgsu (SEQ ID NO: 4157)	CAGAAAGAGUGUCUC AUCUUA (SEQ ID NO: 4158)	UAAGAUGAGACACUC UUCUGGU (SEQ ID NO: 4159)
871-893	AD-60519	csasgaaaGfaGfuGfuCfuCfaucuuL96 (SEQ ID NO: 4160)	usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcUfuUfcUfgsgsu (SEQ ID NO: 4161)	CAGAAAGAGUGUCUC AUCUUA (SEQ ID NO: 4162)	UAAGAUGAGACACUC UUCUGGU (SEQ ID NO: 4163)
871-893	AD-61193	csasgaaaGfaGfuGfuCfuCfaucuuL96 (SEQ ID NO: 4164)	usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcdTuuUfcUfgsgsu (SEQ ID NO: 4165)	CAGAAAGAGUGUCUC AUCUUA (SEQ ID NO: 4166)	UAAGAUGAGACACUC TUUCUGGU (SEQ ID NO: 4167)
873-895	AD-60819	GfsaAfaGfaGfuGfuCfuCfaucuuCfuL96 (SEQ ID NO: 4168)	asAfsaGfaGfaugAfgAfcacuuuucsuug (SEQ ID NO: 4169)	GAAAGAGUGUCUCAU CUUCUU (SEQ ID NO: 4170)	AAGAAGAGAGACAC UCUUCUG (SEQ ID NO: 4171)

donde c, a, g, u = 2'-OMe ribonucleósidos; Af, Cf, G, Uf = 2'F ribonucleósidos; S = fosforotioato; L96 tiene la estructura representada en la Tabla 1.

5 Se puede proporcionar un ácido ribonucleico bicatenario (ARNbc) para inhibir la expresión de ALAS1, donde el ARNbc comprende (i) una hebra antisentido que comprende, o está constituida por, la secuencia antisentido de AD-60489, AD-60519 o AD-61193 y/o (ii) una hebra sentido que comprende, o está constituida por, la secuencia sentido de AD-60489, AD-60519 o AD-61193 (incluida la secuencia de nucleótidos y una o más (por ejemplo, la totalidad) de las modificaciones de la hebra sentido y/o hebra antisentido de AD-60489, AD-60519 o AD-61193).

10 Se puede proporcionar un ácido ribonucleico bicatenario (ARNbc) para inhibir la expresión de ALAS1, donde el ARNbc es AD-60489, AD-60519, AD-61193 o AD-60819. Se puede proporcionar un ácido ribonucleico bicatenario (ARNbc) para inhibir la expresión de ALAS1, donde el ARNbc es AD-60489, AD-60519 o AD-61193 (por ejemplo, incluida la secuencia de nucleótidos y/o una o más (por ejemplo, la totalidad) de las modificaciones de AD-60489, AD-60519 o AD-61193).

El ARNbc es, puede comprender, o puede estar constituido por, AD-60489 (por ejemplo, incluida la secuencia de nucleótidos y/o una o más (por ejemplo, la totalidad) de las modificaciones de AD-60489).

15 El ARNbc es, puede comprender, o puede estar constituido por, AD-60519 (por ejemplo, incluida la secuencia de nucleótidos y/o una o más (por ejemplo, la totalidad) de las modificaciones de AD-60519).

El ARNbc es, puede comprender, o puede estar constituido por, AD-61193 (por ejemplo, incluida la secuencia de nucleótidos y/o una o más (por ejemplo, la totalidad) de las modificaciones de AD-61193).

20 El ARNbc es, puede comprender, o puede estar constituido por, AD-60819 (por ejemplo, incluida la secuencia de nucleótidos y/o una o más (por ejemplo, la totalidad) de las modificaciones de AD-60819).

25 El ARNbc (por ejemplo, AD-60489, AD-60519, AD-61193, AD-60819, u otro ARNbc descrito en la presente en cualquiera de las Tablas 21 a 40) puede ser eficaz para suprimir el nivel hepático del ARNm de ALAS1, p. ej., para lograr el silenciamiento de al menos un 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70% u 80% (p. ej., de modo que los niveles del ARNm de ALAS1 se reducen hasta un 90% o menos, 80% o menos, 70% o menos, 60% o menos, 50% o menos, 40% o menos, 30% o menos o 20% o menos de un nivel de control de ARNm de ALAS1 hepático, p. ej., el nivel de un individuo o grupo de individuos no tratados, p. ej., un individuo o grupo de individuos tratados solo con PBS). La eficacia del ARNbc en la supresión del nivel hepático del ARNm de ALAS1 se puede evaluar utilizando un modelo en primates no humanos, p. ej., como se describe en la presente en los Ejemplos.

30 El ARNbc (p. ej., AD-60489, AD-60519, AD-61193, AD-60819 u otro ARNbc descrito en la presente en cualquiera de las Tablas 21 a 40) puede ser eficaz para suprimir el nivel circulante del ARNm de ALAS1, p. ej., para lograr silenciar al menos un 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70% u 80% (p. ej., de modo que los niveles de ARNm de ALAS1 se reduzcan hasta un 90% o menos, 80% o menos, 70% o menos, 60% o menos, 50% o menos, 40% o menos, 30% o menos o 20% o menos de un nivel de control de ARNm de ALAS1 circulante, p. ej., el nivel anterior al tratamiento con el ARNbc, o el nivel en un individuo o grupo de individuos no tratados). La eficacia del ARNbc en la supresión del nivel circulante de ARNm de ALAS1 se puede evaluar utilizando un modelo en primates no humanos, p. ej., como se describe en la presente en los Ejemplos. El nivel circulante de ARNm de ALAS1 se puede evaluar utilizando un ensayo de detección de ARN extracelular circulante (cERD, por sus siglas en inglés), p. ej., como se describe en la presente o en Sehgal, A. *et al.* Quantitation of tissue-specific target gene modulation using circulating RNA (Póster presentado el 9 de febrero de 2012 en el simposio Keystone Gene Silencing by small RNAs (Vancouver, 7-12 de febrero de 2012) o Sehgal, A. *et al.* Tissue-specific gene silencing monitored in circulating RNA, *RNA*, 20: 1-7, con publicación electrónica el 19 de diciembre de 2013.

El método de cERD se puede aplicar a cualquier muestra biológica apropiada. El nivel circulante de ARNm de ALAS1 se puede evaluar utilizando una muestra de sangre, p. ej., una muestra de suero. El nivel circulante de ARNm de ALAS1 se puede evaluar utilizando una muestra de orina.

45 El ARNbc puede ser un derivado de AD-60489 que se describe en la presente, p. ej., en cualquiera de las tablas de la presente. El ARNbc puede mostrar una actividad mejorada en comparación con AD-60489. En algunos de tales aspectos, el ARNbc es AD-60519.

El ARNbc puede ser un derivado de AD-58632 que se describe en la presente, p. ej., en cualquiera de las tablas de la presente. El ARNbc puede mostrar una actividad mejorada en comparación con AD-58632.

50 La actividad mejorada puede estar indicada por una CI_{50} menor, p. ej., como se determina en función de ensayos *in vitro*, p. ej., como se describe en la presente, p. ej., en los Ejemplos.

La actividad mejorada puede estar indicada por una dosis eficaz menor. La dosis eficaz se puede determinar en función de la administración de una única dosis o de múltiples dosis repetidas. La dosis eficaz se puede determinar en función de la DE_{50} de dosis única. La dosis eficaz o la DE_{50} de dosis única se pueden determinar en función de un

ensayo *in vivo*. El ensayo *in vivo* se puede llevar a cabo en un animal no humano, p. ej., en una rata, en un primate no humano o en un ratón.

La dosis eficaz se puede determinar en función de la dosis requerida para obtener una reducción de un nivel del ARNm de ALAS1 (p. ej., un nivel hepático del ARNm de ALAS1 y/o un nivel circulante de ARNm de ALAS1), p. ej., como se describe en la presente en los Ejemplos. El ARNm circulante se puede evaluar utilizando el ensayo de cERD.

La dosis eficaz se puede determinar en función de la dosis requerida para obtener una reducción de un nivel (p. ej., un nivel en orina y/o plasma) de ALA y/o PBG.

La dosis eficaz se puede determinar en función de la dosis requerida para obtener un efecto de tratamiento particular descrito en la presente, p. ej., prevención o reducción de síntomas asociados con una porfiria.

La actividad mejorada puede estar indicada por el logro de un nivel hepático más elevado del ARNbc. Un nivel hepático más elevado se puede obtener después de una única dosis de ARNbc (p. ej., una dosis de 1, 2.5, 3, 5 o 10 mg/kg). Un nivel hepático más elevado se puede obtener después de que se hayan administrado múltiples dosis de ARNbc (p. ej., 2-10 dosis diarias o semanales de 1, 2.5, 3, 5 o 10 mg/kg).

El ARNi puede englobar un ARNbc que tiene una hebra de ARN (la hebra antisentido) que tiene una región que es sustancialmente complementaria respecto a una porción de un ARNm de ALAS1, p. ej., un ARNm de ALAS1 humano (p. ej., un ARNm de ALAS1 humano como el que se proporciona en la SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO:382).

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

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

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

Un ARNi (p. ej., un ARNbc) que se expone en la presente incluye una primera secuencia de un ARNbc que se selecciona a partir del grupo constituido por las secuencias sentido de las Tablas 21 a 40 y una segunda secuencia que se selecciona a partir del grupo constituido por las secuencias antisentido correspondientes de las Tablas 21 a 40.

Las moléculas de ARNi que se exponen en la presente pueden incluir nucleótidos de origen natural o pueden incluir al menos un nucleótido modificado. El al menos un nucleótido modificado puede incluir una o más de una modificación en el nucleótido elegido del grupo constituido por un ácido nucleico bloqueado (LNA, por sus siglas en inglés), un nucleótido acíclico, un hexitol o un ácido nucleico con hexosa (HNA, por sus siglas en inglés), un ácido nucleico con ciclohexeno (CeNA, por sus siglas en inglés), 2'-metoxietilo, 2'-O-alquilo, 2'-O-alilo, 2'-C-alilo, 2'-fluoro, 2'-desoxi, 2'-hidroxilo o cualquier combinación de estos. El al menos un nucleótido modificado puede incluir, sin carácter limitante, un nucleótido con una modificación de tipo 2'-O-metilo, nucleótido con modificación de tipo 2'-fluoro, un nucleótido que tiene un grupo 5'-fosforotioato y un nucleótido terminal ligado a un ligando, p. ej., una N-acetilgalactosamina (GalNAc) o un derivado de colesterol. Como alternativa, el nucleótido modificado se puede seleccionar a partir del grupo constituido por: un nucleótido con una modificación de tipo 2'-desoxi-2'-fluoro, un nucleótido con una modificación de tipo 2'-desoxi, un nucleótido bloqueado, un nucleótido acíclico, un nucleótido que no sea básico, un nucleótido con una modificación de tipo 2'-amino, un nucleótido con una modificación de tipo 2'-alquilo, un nucleótido de tipo morfolino, un fosforamidato y un nucleótido que comprende una base que no sea natural. Una secuencia modificada de este tipo se puede basar, p. ej., en una primera secuencia de dicho ARNi seleccionada a partir del grupo constituido por las secuencias sentido divulgadas en las Tablas 21 a 40 y una segunda secuencia seleccionada a partir del grupo constituido por las secuencias antisentido correspondientes divulgadas en las Tablas 21 a 40.

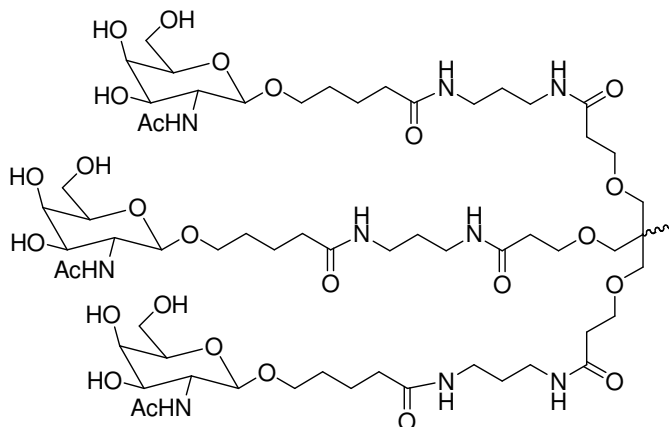
Un ARNi según se describe en la presente puede tener como diana una variante de un transcrito de ARN de ALAS1 de origen natural y el ARNi puede tener además como diana un transcrito mutado (p. ej., un ARN de ALAS1 portador de una variante alélica). Por ejemplo, un ARNi mencionado en la presente puede tener como diana una variante polimórfica tal como un polimorfismo de un único nucleótido (SNP, por sus siglas en inglés) de ALAS1. El ARNi puede tener como diana tanto un transcrito de ALAS1 mutado como uno de origen natural. El ARNi puede además tener como diana una variante de un transcrito particular de ALAS1 (p. ej., la variante 1 de ALAS1 humano). El

agente de ARNi puede además tener como diana múltiples variantes del transcrito (p. ej., tanto la variante 1 como la variante 2 de ALAS1 humano).

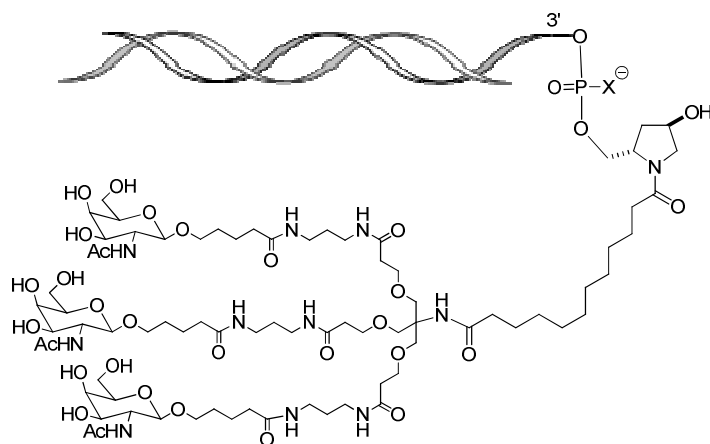
Un ARNi mencionado en la presente puede tener como diana una región no codificante de un transcrito de ARN de ALAS1 tal como la región no traducida 5' o 3' de un transcrito.

- 5 Un ARNi según se describe en la presente se puede encontrar en forma de conjugado, p. ej., un conjugado con un carbohidrato, el cual puede actuar como un resto y/o ligando de direccionamiento, según se describe en la presente. El conjugado puede estar unido al extremo 3' de la hebra sentido del ARNbc. El conjugado puede estar unido mediante un conector, p. ej., mediante un conector ramificado bivalente o trivalente.

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

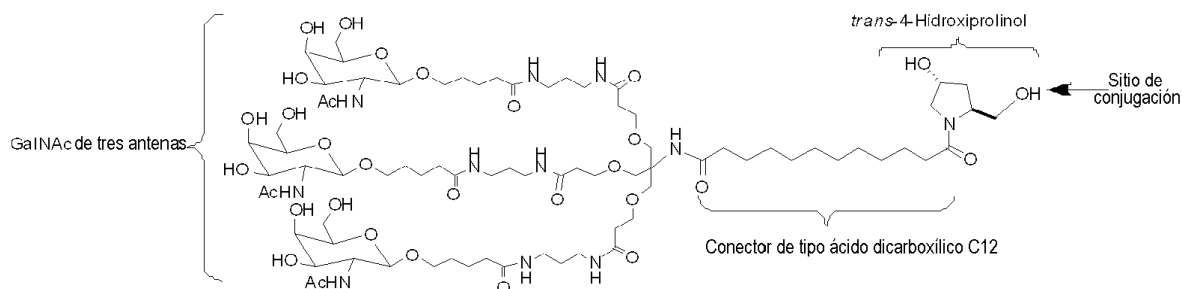


- 15 El agente de iARN puede estar unido al conjugado de tipo carbohidrato mediante un conector, p. ej., un conector como el que se muestra en la siguiente representación esquemática, donde X es O o S



X puede ser O. X puede ser S.

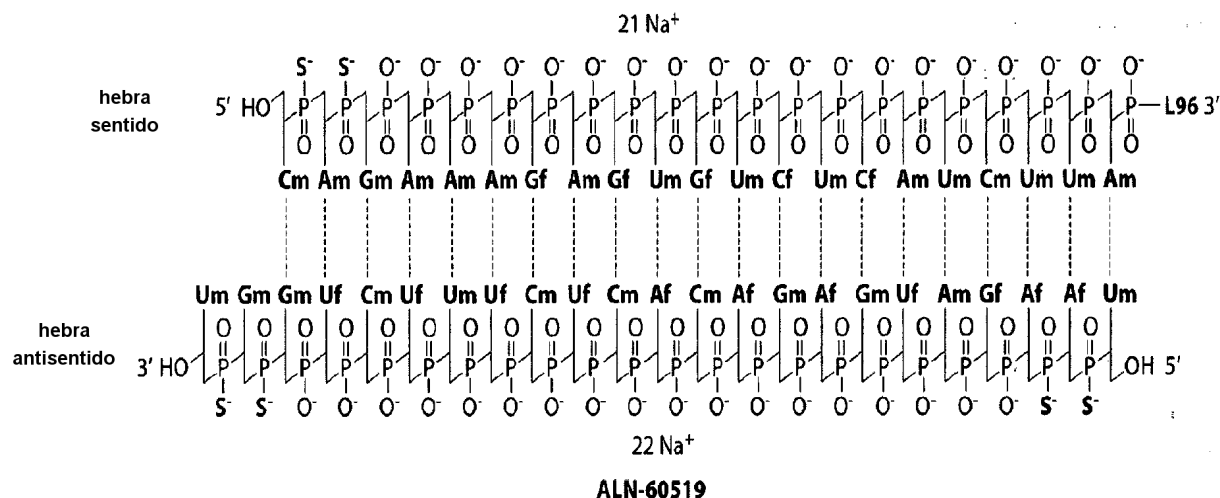
El agente de iARN se puede conjugar a L96 según se define en la Tabla 1 y se muestra a continuación



El ARNbc puede tener uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce, quince, dieciséis o la totalidad de los siguientes:

- (i) se sintetiza por medios químicos, p. ej., se sintetiza mediante síntesis de oligonucleótidos en fase sólida;
- 5 (ii) todos los nucleótidos en el ARNbc están modificados, por ejemplo, todos los nucleótidos tienen una modificación de tipo 2'-OMe o 2'-F, o una combinación de modificaciones de tipo 2'-OMe y 2'-F;
- (iii) todos los nucleótidos están conectados mediante uniones 3'-5'-fosfodiéster;
- (iv) la hebra sentido comprende o está constituida por 21 nucleótidos;
- (v) la hebra antisentido sentido comprende o está constituida por 23 nucleótidos;
- (vi) tiene un extremo romo en el extremo 3' de la hebra sentido;
- 10 (vii) tiene una protuberancia en 3', p. ej., tiene una protuberancia de 2 nucleótidos, en el extremo 3' de la hebra antisentido;
- (viii) está unido covalentemente a un ligando que contiene tres restos de N-acetilgalactosamina (GalNAc);
- 15 (ix) el extremo 3' de la hebra sentido está conjugado con el resto de GalNAc de tres antenas (p. ej., denominado en la presente L96 como se define en la Tabla 1). El extremo 3' puede estar unido al resto de GalNAc de tres antenas a través de una unión fosfodiéster;
- (x) tiene una hebra antisentido que comprende una o más (p. ej., cuatro) uniones fosforotioato. Las uniones fosforotioato pueden estar ubicadas en el extremo 3' y en el extremo 5' de la hebra antisentido. Dos uniones fosforotioato pueden estar ubicadas en el extremo 3' y dos uniones fosforotioato están ubicadas en el extremo 5' de la hebra antisentido;
- 20 (xi) tiene una hebra sentido que comprende una o más (p. ej., dos) uniones fosforotioato.
- La una o más (p. ej., dos) uniones fosforotioato pueden estar ubicadas en el extremo 5' de la hebra sentido;
- (xii) 21 nucleótidos de la hebra sentido se hibridan con los 21 nucleótidos complementarios de la hebra antisentido;
- 25 (xiii) forma 21 pares de bases de nucleótidos y una protuberancia de dos bases en el extremo 3' de la hebra antisentido;
- (xiv) comprende, o está constituido por, una hebra sentido y antisentido que tiene la secuencia de AD-60519;
- (xv) tiene una hebra sentido con 10, 12, 14, 16, 18, 19, 20 o la totalidad de las modificaciones de la hebra sentido de AD-60519;
- 30 (xvi) tiene una hebra antisentido con 10, 12, 14, 16, 18, 19, 20 o la totalidad de las modificaciones de la hebra antisentido de AD-60519; o
- (xvii) tiene la secuencia dúplex y todas las modificaciones de AD-60519.

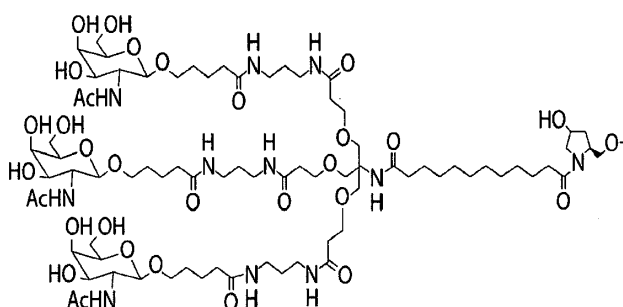
El ARNbc puede estar en forma de un conjugado que tiene la siguiente estructura (también denominada en la presente AD-60519 o ALN-60519) (SEQ ID NOS 5238-5239, respectivamente, en orden de aparición):



Af, Cf, Gf, Uf = 2'-F ribonucleósidos

Am, Cm, Gm, Um = 2'-OMe ribonucleósidos

S = fosforotioato

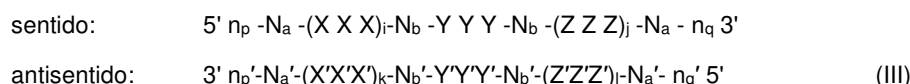


5 L96 =

Un aspecto proporcionado en la presente es una composición, p. ej., una composición farmacéutica, que incluye uno o más de los ARNi descritos en la presente y un portador o vehículo de suministro farmacéuticamente aceptable. La composición se puede utilizar para inhibir la expresión de un gen de ALAS1 en un organismo, por lo general, un sujeto humano. La composición se puede utilizar para tratar una porfiria, p. ej., AIP.

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

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



20 donde:

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

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

cada Na y Na' representa independientemente una secuencia oligonucleotídica que comprende 0-25 nucleótidos, los cuales están modificados o no modificados, o combinaciones de estos, comprendiendo cada secuencia al menos dos nucleótidos modificados de forma diferente;

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

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

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

las modificaciones en N_b difieren de la modificación en Y y las modificaciones en N_b' difieren de la modificación en Y' .

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

i puede ser 1; j puede ser 1; o tanto i como j pueden ser 1.

10 k puede ser 1; l puede ser 1; o tanto k como l pueden ser 1.

XXX es complementario respecto a $X'X'X'$, YYY puede ser complementario respecto a $Y'Y'Y'$ y ZZZ puede ser complementario respecto a $Z'Z'Z'$.

Y'Y'Y' se puede encontrar en las posiciones 11, 12 y 13 de la hebra antisentido del extremo 5'.

Y' puede ser 2'-O-metilo.

15 La región dúplex puede tener una longitud de 15-30 pares de nucleótidos.

La región dúplex puede tener una longitud de 17-23 pares de nucleótidos.

La región dúplex puede tener una longitud de 19-21 pares de nucleótidos.

La región dúplex puede tener una longitud de 21-23 pares de nucleótidos.

La modificación en el nucleótido se puede seleccionar del grupo constituido por un ácido nucleico bloqueado (LNA), un nucleótido acíclico, un hexitol o ácido nucleico con hexosa (HNA), un ácido nucleico con ciclohexeno (CeNA), 2'-metoxietilo, 2'-O-alquilo, 2'-O-alilo, 2'-C-alilo, 2'-C-alilo, 2'-fluoro, 2'-desoxi, 2'-hidroxilo y cualquier combinación de estos.

Las modificaciones de los nucleótidos se pueden seleccionar a partir del grupo constituido por LNA, HNA, CeNA, 2'-metoxietilo, 2'-O-alquilo, 2'-O-alilo, 2'-C-alilo, 2'-fluoro, 2'-desoxi, 2'-hidroxilo y combinaciones de estas.

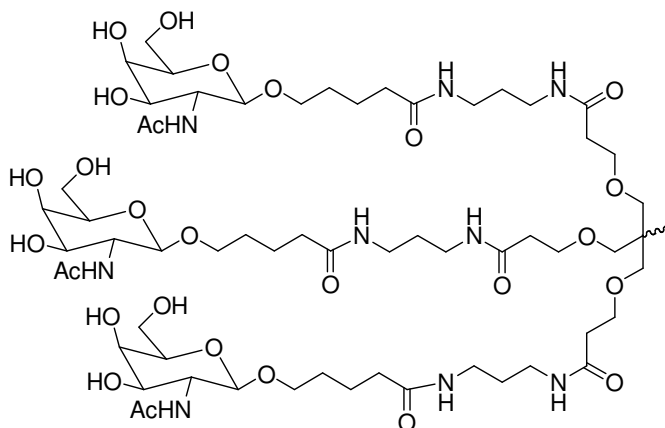
25 Las modificaciones de los nucleótidos son 2'-O-metilo, 2'-fluoro o ambas.

El ligando puede comprender un carbohidrato.

El ligando puede estar unido mediante un conector.

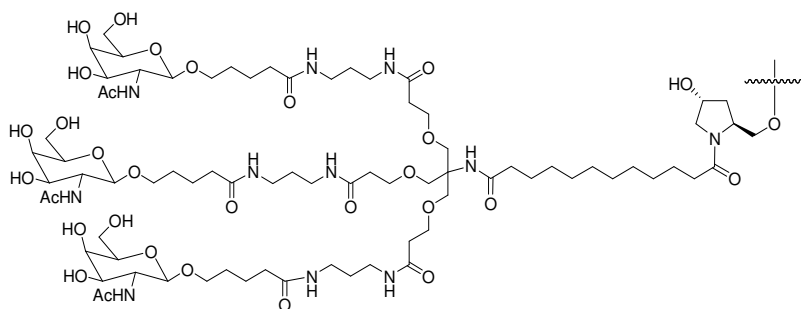
El conector puede ser un conector ramificado bivalente o trivalente.

El ligando puede ser



30

El ligando y el conector pueden ser como se muestran en la Fórmula XXIV:



El ligando puede estar unido al extremo 3' de la hebra sentido.

El ARNbc puede consistir en o comprender una secuencia de nucleótidos seleccionada a partir del grupo de secuencias proporcionadas en las Tablas 21-40.

- 5 En un aspecto adicional, un ARNi proporcionado en la presente es un ácido ribonucleico bicatenario (ARNbc) para inhibir la expresión de ALAS1, donde dicho ARNbc comprende una hebra sentido y una hebra antisentido, comprendiendo la hebra antisentido una región de complementariedad respecto a un transcrito de ARN de ALAS1, donde la hebra antisentido comprende al menos 15 nucleótidos contiguos que no difieren en más de 3 nucleótidos de una de las secuencias antisentido enumeradas en cualquiera de las Tablas 21-40. Los nucleótidos de la hebra antisentido pueden tener menos modificaciones, más modificaciones o modificaciones diferentes en comparación con las secuencias antisentido enumeradas en cualquiera de las Tablas 21-40.

Las secuencias sentido y antisentido pueden ser las de un dúplex descrito en la presente que suprime la expresión del ARNm de ALAS1 al menos un 50%, 60%, 70%, 80%, 85% o 90%, p. ej., según se evalúa utilizando un ensayo descrito en los Ejemplos que se proporcionan en la presente.

- 15 La expresión del ANRm de ALAS1 se puede evaluar en función de un nivel del ARNm de ALAS1 en el hígado, p. ej., como se evalúa utilizando una muestra de una biopsia hepática. La expresión del ARNm de ALAS1 se puede evaluar en función del nivel del ARNm de ALAS1 en un fluido biológico, p. ej., sangre, suero, plasma, líquido cefalorraquídeo u orina. La expresión del ARNm de ALAS1 se puede evaluar utilizando un ensayo de detección de ARN extracelular circulante (cERD), p. ej., un ensayo cERD como se describe en la presente o en Sehgal, A. *et al.*
- 20 Quantitation of tissue-specific target gene modulation using circulating RNA (Póster presentado el 9 de febrero de 2012 en el simposio Keystone Gene Silencing by small RNAs (Vancouver, 7-12 de febrero de 2012) o Sehgal, A. *et al.* Tissue-specific gene silencing monitored in circulating RNA, *RNA*, 20: 1-7, con publicación electrónica el 19 de diciembre de 2013.

El ARNbc puede comprender al menos un nucleótido modificado.

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

- 30 El nucleótido modificado se puede seleccionar a partir del grupo constituido por: un nucleótido con una modificación de tipo 2'-desoxi-2'-fluoro, un nucleótido con una modificación de tipo 2'-desoxi, un nucleótido bloqueado, un nucleótido acíclico, un nucleótido que no sea básico, un nucleótido con una modificación de tipo 2'-amino, un nucleótido con una modificación de tipo 2'-alquilo, un nucleótido de tipo morfolino, un fosforamidato y un nucleótido que comprende una base que no sea natural.

La región de complementariedad puede tener una longitud de al menos 17 nucleótidos.

La región de complementariedad puede tener una longitud comprendida entre 19 y 21 nucleótidos.

- 35 La región de complementariedad puede tener una longitud de 19 nucleótidos.

Cada hebra puede tener una longitud que no es superior a 30 nucleótidos.

Al menos una hebra puede comprender una protuberancia 3' de al menos 1 nucleótido. La hebra antisentido puede comprender una protuberancia 3' de al menos 1 nucleótido.

- 40 Al menos una hebra puede comprender una protuberancia 3' de al menos 2 nucleótidos. La hebra antisentido puede comprender una protuberancia 3' de al menos 2 nucleótidos. La hebra antisentido puede comprender una protuberancia 3' de 2 nucleótidos.

Un ARNbc descrito en la presente puede comprender además un ligando.

El ligando puede ser un ligando de tipo GalNAc.

El ligando puede dirigir el ARNbc hacia los hepatocitos.

El ligando puede estar conjugado con el extremo 3' de la hebra sentido del ARNbc.

5 La región de complementariedad puede estar constituida por una secuencia antisentido seleccionada de las secuencias antisentido enumeradas en las Tablas 21-40, o una secuencia antisentido correspondiente en la que algunos o la totalidad de los nucleótidos están modificados. La región de complementariedad puede estar constituida por la secuencia UAAGAUGAGACACUCUUUCUGGU (SEQ ID NO: 4153) o UAAGAUGAGACACUUCTUUCUGGU (SEQ ID NO: 4154). La región de complementariedad puede estar constituida por la secuencia antisentido del AD-60489 dúplex. La región de complementariedad puede estar constituida por la secuencia antisentido del AD-60519 dúplex.

10 La región de complementariedad puede estar constituida por una secuencia antisentido seleccionada de un dúplex descrito en la presente que suprime la expresión del ARNm de ALAS1 en al menos un 50%, 60%, 70%, 80%, 85% o 90%, p. ej., según se evalúa utilizando un ensayo descrito en los Ejemplos proporcionados en la presente.

15 El ARNbc puede comprender una hebra sentido que está constituida por una secuencia de la hebra sentido seleccionada de las Tablas 21-40, y una hebra antisentido que está constituida por una secuencia antisentido seleccionada de las Tablas 21-40. El ARNbc puede comprender un par de las correspondientes secuencias sentido y antisentido seleccionadas de los dúplex descritos en las Tablas 21-40.

20 También se proporciona en la presente una célula que contiene al menos uno de los ARNi (p. ej., ARNbc) mostrados en la presente. Por lo general, la célula es una célula de mamífero, tal como una célula humana. En algunas realizaciones, la célula es una célula eritroide. La célula también puede ser una célula hepática (p. ej., un hepatocito).

En un aspecto, se proporciona en la presente una composición farmacéutica para inhibir la expresión de un gen ALAS1, comprendiendo la composición un ARNi (p. ej. un ARNbc) descrito en la presente.

Las composiciones farmacéuticas descritas en la presente, el ARNi (p. ej., ARNbc) se puede administrar en una solución no tamponada. La solución no tamponada puede ser solución salina o agua, p. ej. Agua para inyección.

25 La composición farmacéutica puede comprender AD-60519 y agua para inyección. La composición puede comprender aproximadamente de 100 a 300 mg/mL, p. ej., 200 mg/mL, de AD-60519. La composición puede tener un pH de 6.0-7.5, p. ej., de aproximadamente 7.0. La composición puede ser para inyección subcutánea. La composición farmacéutica se puede empaquetar en un envase (p. ej., un vial de vidrio, p. ej., un vial de vidrio de 2 mL), en un volumen de aproximadamente 0.3 a 1 mL, p. ej., 0.55 mL. La composición farmacéutica puede ser ALN-AS1 como se describe en la presente en los ejemplos.

En un aspecto de las composiciones farmacéuticas descritas en la presente, el ARNi (p. ej., ARNbc) se administra con una solución tampón. La solución tampón puede comprender acetato, citrato, prolamina, carbonato o fosfato o cualquier combinación de estos. La solución tampón puede ser una solución salina tamponada con fosfato (PBS).

35 En un aspecto de las composiciones farmacéuticas descritas en la presente, el ARNi (p. ej., ARNbc) se dirige hacia los hepatocitos.

En un aspecto de las composiciones farmacéuticas descritas en la presente, la composición se administra por vía intravenosa.

En un aspecto de las composiciones farmacéuticas descritas en la presente, la composición se administra por vía subcutánea.

40 En un aspecto, una composición farmacéutica comprende un ARNi (p. ej., ARNbc) descrito en la presente que comprende un ligando (p. ej., un ligando de tipo GalNAc) que dirige el ARNi (p. ej., ARNbc) hacia los hepatocitos.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

eritropoyética (EPP) o eritroporfiria transitoria de la infancia. El trastorno puede ser una porfiria hepática aguda, p. ej., una porfiria debida a la deficiencia de ALA-deshidratasa (ADP), AIP, HCP o VP. El trastorno puede ser una porfiria debida a la deficiencia de ALA-deshidratasa (ADP) o AIP.

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

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

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

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

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

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

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

- 35 El sujeto puede ser un mamífero (p. ej., un ser humano) que corre el riesgo de parecer o al cual se le ha diagnosticado un trastorno relacionado con la expresión de ALAS1, p. ej., una porfiria, p. ej., anemia sideroblástica relacionada con X (XLSA), porfiria debida a la deficiencia de ALA-deshidratasa (porfiria de Doss), porfiria intermitente aguda (AIP), porfiria eritropoyética congénita (CEP), porfiria cutánea tardía (PCT), coproporfiria hereditaria (coproporfiria o HCP), porfiria variegata (VP), protoporfiria eritropoyética (EPP) o eritroporfiria transitoria de la infancia. Asimismo, la porfiria puede ser una porfiria hepática aguda, p. ej., una porfiria debida a la deficiencia de ALA-deshidratasa (ADP), AIP, HCP o VP. Aquí, el trastorno puede ser una porfiria debida a la deficiencia de ALA-deshidratasa (ADP) o AIP.
- 40

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

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

El ARNi (p. ej., ARNbc) o la composición que comprende el ARNi se puede administrar después de un ataque agudo de porfiria.

- 55 El ARNi (p. ej., ARNbc) o la composición que comprende el ARNi se puede administrar durante un ataque agudo de porfiria.

El ARNi (p. ej., ARNbc) o la composición que comprende el ARNi se puede administrar profilácticamente para prevenir un ataque agudo de porfiria.

El ARNi (p. ej., ARNbc) se puede formular como una formulación LNP.

El ARNi (p. ej., ARNbc) se puede encontrar en forma de un conjugado de tipo GalNAc.

5 El ARNi (p. ej., ARNbc) se puede administrar con una dosis de 0.05-50 mg/kg.

El ARNi (p. ej., ARNbc) se puede administrar con una concentración de 0.01 mg/kg-5 mg/kg de peso corporal del sujeto.

El ARNi (p. ej., ARNbc) se puede formular como una formulación LNP y se administra con una dosis de 0.05-5 mg/kg.

10 El ARNi (p. ej., ARNbc) se puede encontrar en forma de un conjugado de tipo GalNAc y se administra con una dosis de 0.5-50 mg/kg. El ARNi en el conjugado de GalNAc se puede administrar con una dosis inferior a 10 mg/kg (p. ej., 5 mg/kg o inferior), p. ej., una vez a la semana; p. ej., una dosis de 1 mg/kg o inferior, 2.5 mg/kg o inferior o 5 mg/kg o inferior, p. ej., una vez a la semana. El ARNi en el conjugado de GalNAc se puede administrar en una dosis de aproximadamente 2.5 mg/kg o inferior, p. ej., una vez a la semana. La administración del ARNi en el conjugado de GalNAc puede ser subcutánea.

15 El ARNi (p. ej., ARNbc) puede estar en forma de un conjugado de GalNAc y se administra, p. ej., por vía subcutánea, en una dosis de 0-5 mg/kg, p. ej., 0-2.5 mg/kg o 1-2.5 mg/kg. El ARNi se puede administrar semanalmente. El ARNi se puede administrar como una composición que comprende el ARNi y agua para inyección. El ARNi puede ser AD-60519. La composición puede comprender el ARNi, p. ej., AD-60519, en una concentración de aproximadamente 200 mg/mL.

El método reduce el nivel de una porfirina o de un precursor de una porfirina en el sujeto.

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

El precursor de porfirina es ácido δ -aminolevulínico (ALA) o porfobilinógeno (PBG).

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

Un método descrito en la presente

(i) puede mejorar un síntoma asociado con un trastorno relacionado con ALAS1 (p. ej., una porfiria),

(ii) puede inhibir la expresión de ALAS1 en el sujeto (p. ej., según se evalúa utilizando el ensayo cERD),

(iii) puede reducir el nivel de un precursor de porfirina (p. ej., ALA o PBG) o una porfirina en el sujeto,

30 (iv) puede reducir la frecuencia de ataques agudos de síntomas asociados con una porfiria en el sujeto, o

(v) puede reducir la incidencia de ataques agudos de síntomas asociados con una porfiria en el sujeto cuando el sujeto se expone a un factor precipitante (p. ej., la fase premenstrual o la fase luteínica).

El método puede mejorar el dolor y/o una neuropatía progresiva.

35 El ARNi (p. ej., ARNbc) o la composición que comprende el ARNi se puede administrar de acuerdo con una pauta posológica.

El ARNi (p. ej., ARNbc) o la composición que comprende el ARNi se puede administrar antes de un ataque agudo de porfiria o después de este. El ARNi se puede administrar antes de un ataque agudo de porfiria.

40 El ARNi (p. ej., ARNbc) o la composición que comprende el ARNi se puede administrar durante un pródromo. El pródromo se puede caracterizar por dolor abdominal, náusea, síntomas psicológicos (p. ej., ansiedad), inquietud y/o insomnio.

El ARNi (p. ej., ARNbc) o la composición que comprende el ARNi se puede administrar durante una fase particular del ciclo menstrual, p. ej., durante la fase luteínica.

45 El método puede mejorar o prevenir ataques cíclicos de porfiria, p. ej., reduciendo la intensidad, duración o frecuencia de los ataques. Los ataques cíclicos se asocian con un factor precipitante. El factor precipitante es el ciclo menstrual, p. ej., una fase particular del ciclo menstrual, p. ej., la fase luteínica.

El sujeto puede presentar un nivel elevado de ALA y/o PBG. El nivel de ALA y/o PBG puede estar elevado en el plasma u orina del sujeto. El sujeto puede padecer o correr el riesgo de desarrollar una porfiria, p. ej., una porfiria hepática. El sujeto puede no presentar síntomas. El sujeto puede ser portador de una alteración genética (p. ej., una mutación génica) asociada con una porfiria, según se describe en la presente.

5 El sujeto puede padecer o correr el riesgo de desarrollar una porfiria y sufre dolor (p. ej., dolor crónico, p. ej., dolor neuropático crónico) y/o una neuropatía (p. ej., una neuropatía progresiva). El sujeto puede no padecer ataques agudos pero puede sufrir dolor (p. ej., dolor crónico, p. ej., dolor neuropático crónico) y/o una neuropatía (p. ej., una neuropatía progresiva). El dolor puede ser dolor abdominal.

10 El sujeto (a) puede presentar un nivel elevado de ALA y/o PBG y (b) puede sufrir dolor (p. ej., dolor crónico, p. ej., dolor neuropático crónico) y/o una neuropatía (p. ej., una neuropatía progresiva). El dolor puede ser dolor abdominal.

15 El sujeto puede presentar un nivel en plasma y/o un nivel en orina de ALA y/o PBG que es elevado. El nivel elevado de ALA y/o PBG puede venir acompañado de otros síntomas, p. ej., dolor (p. ej., dolor crónico, p. ej., dolor neuropático crónico) y/o una neuropatía (p. ej., una neuropatía progresiva). El dolor puede ser dolor abdominal. El sujeto puede no presentar síntomas. El sujeto puede tener una mutación genética asociada con una porfiria, p. ej., una mutación según se describe en la presente.

20 El sujeto puede presentar un nivel (p. ej., un nivel en plasma o un nivel en orina) de un precursor de porfirina, p. ej., ALA y/o PBG, que es elevado, p. ej., el nivel es superior a un valor de referencia, o superior o igual a un valor de referencia. El nivel puede ser superior al valor de referencia. El valor de referencia se puede encontrar dos desviaciones estándar por encima del nivel medio de una muestra de individuos sanos. El valor de referencia puede ser un límite de referencia superior.

25 El sujeto puede presentar un nivel en plasma y/o un nivel en orina de ALA y/o PBG superior a, o superior o igual a, 2 veces, 3 veces, 4 veces o 5 veces el valor del límite de referencia superior. La expresión "límite de referencia superior", tal como se utiliza en la presente, se refiere a un nivel que representa el límite superior del intervalo de confianza del 95% para una muestra de referencia, p. ej., una muestra de individuos sanos o normales (p. ej., de origen natural), p. ej., individuos que no son portadores de ninguna mutación genética asociada con una porfiria y/o individuos que no padecen ninguna porfiria. El sujeto puede presentar un nivel en orina de ALA y/o PBG superior a 2-4 veces el valor del límite de referencia superior. El sujeto puede presentar un nivel en orina de ALA y/o PBG superior a 4 veces el valor del límite de referencia superior.

30 El valor de referencia para PBG en plasma puede ser de 0.12 $\mu\text{mol/L}$. El sujeto puede ser un ser humano y presenta un nivel de PBG en plasma superior a, o superior o igual a, 0.12 $\mu\text{mol/L}$, 0.24 $\mu\text{mol/L}$, 0.36 $\mu\text{mol/L}$, 0.48 $\mu\text{mol/L}$ o 0.60 $\mu\text{mol/L}$. El sujeto puede ser un ser humano y puede presentar un nivel de PBG en plasma superior a, o superior o igual a, 0.48 $\mu\text{mol/L}$.

35 El valor de referencia para PBG en orina puede ser de 1.2 mmol/mol de creatinina. El sujeto puede ser un ser humano y presenta un nivel de PBG en orina superior a, o superior o igual a, 1.2 mmol/mol de creatinina, 2.4 mmol/mol de creatinina, 3.6 mmol/mol de creatinina, 4.8 mmol/mol de creatinina o 6.0 mmol/mol de creatinina. El sujeto puede ser un ser humano y puede presentar un nivel de PBG en orina superior a, o superior o igual a, 4.8 mmol/mol de creatinina.

40 El valor de referencia para ALA en plasma puede ser de 0.12 $\mu\text{mol/L}$. El sujeto puede ser un ser humano y puede presentar un nivel de ALA en plasma superior a, o superior o igual a, 0.12 $\mu\text{mol/L}$, 0.24 $\mu\text{mol/L}$, 0.36 $\mu\text{mol/L}$, 0.48 $\mu\text{mol/L}$ o 0.60 $\mu\text{mol/L}$. El sujeto puede ser un ser humano y puede presentar un nivel de ALA en plasma superior a, o superior o igual a, 0.48 $\mu\text{mol/L}$.

El valor de referencia para ALA en orina puede ser de 3.1 mmol/mol de creatinina. El sujeto puede ser un ser humano y puede presentar un nivel de ALA en orina superior a, o superior o igual a, 3.1 mmol/mol de creatinina, 6.2 mmol/mol de creatinina, 9.3 mmol/mol de creatinina, 12.4 mmol/mol de creatinina o 15.5 mmol/mol de creatinina.

45 El método puede reducir uno o más signos o síntomas de porfiria. El método puede reducir un nivel elevado de ALA y/o PBG. El método puede reducir el dolor (p. ej., dolor crónico, p. ej., dolor neuropático crónico) y/o una neuropatía (p. ej., una neuropatía progresiva). El dolor puede ser dolor abdominal. El dolor puede ser dolor neuropático (p. ej., dolor asociado con la neuropatía progresiva de porfirias agudas). La reducción del dolor puede incluir, p. ej., la prevención del dolor, el retraso del inicio del dolor, la reducción de la frecuencia del dolor y/o la reducción de la intensidad del dolor. La reducción del dolor se puede evaluar en base al uso del sujeto de medicamentos contra el dolor.

50 El método puede mejorar o prevenir ataques agudos de porfiria, p. ej., reduciendo la intensidad, duración o frecuencia de los ataques.

El método puede reducir o prevenir lesiones nerviosas.

El método puede prevenir el deterioro (p. ej., previene el desarrollo de anomalías) de medidas clínicas o puede provocar una mejora de estas, p. ej., medidas clínicas de la función muscular y/o nerviosa, p. ej., EMG y/o velocidades de conducción nerviosa.

El método puede reducir el hemo utilizado por el sujeto.

- 5 El método puede reducir los medicamentos para el dolor utilizados por el sujeto.

El método puede reducir la hospitalización.

El método puede ser eficaz para reducir el nivel de ALA y/o PBG (p. ej., el nivel en plasma u orina de ALA y/o PBG). El método puede ser eficaz para producir una reducción predeterminada del nivel elevado de ALA y/o PBG.

- 10 La reducción predeterminada puede ser una reducción hasta un valor que es inferior o igual a un valor de referencia. El valor de referencia puede ser un límite de referencia superior. El valor de referencia puede ser el valor que corresponde a dos desviaciones estándar por encima del nivel medio de una muestra de referencia.

El método puede ser eficaz para reducir el nivel de ALA y/o PBG en un sujeto hasta un nivel que está por debajo de dos veces el límite de referencia superior. El método puede ser eficaz para reducir el nivel de ALA hasta por debajo de dos veces el límite de referencia superior. El método puede ser eficaz para reducir el nivel de PBG hasta por debajo de dos veces el límite de referencia superior.

- 15 El ARNi (p. ej., ARNbc) o la composición que comprende el ARNi se puede administrar como una dosis única o una dosis múltiple, p. ej., de acuerdo con una pauta posológica.

- 20 El ARNi (p. ej., ARNbc) o la composición que comprende el ARNi se puede administrar profilácticamente a un sujeto que corre el riesgo de desarrollar una porfiria. El ARNi (p. ej., ARNbc) o la composición que comprende el ARNi se administra profilácticamente empezando en la pubertad. El sujeto puede ser portador de una mutación genética asociada con una porfiria y/o presenta un nivel elevado de ALA y/o PBG (p. ej., un nivel elevado en plasma u orina de ALA y/o PBG). La mutación puede hacer que el individuo sea susceptible de padecer un ataque agudo (p. ej., tras la exposición a un factor precipitante, p. ej., un fármaco, el seguimiento de un régimen u otro factor precipitante, p. ej., un factor precipitante como los que se describen en la presente). La mutación se puede asociar con unos niveles elevados de una porfirina o un precursor de porfirina (p. ej., ALA y/o PBG). La mutación se asocia con dolor crónico (p. ej., dolor neuropático crónico) y/o una neuropatía (p. ej., una neuropatía progresiva).

- 25 La mutación es una mutación en el gen ALAS1. La mutación puede ser una mutación en el promotor del gen ALAS1 o en regiones en dirección 5' o dirección 3' del gen ALAS1. La mutación puede ser una mutación en factores de transcripción u otros genes que interaccionan con ALAS1. La mutación puede ser una mutación en un gen que codifica una enzima en la vía biosintética del grupo hemo.

- 30 El ARNi (p. ej., ARNbc o un conjugado de este) o la composición que comprende el ARNi se puede administrar por vía subcutánea. El ARNi se puede encontrar en forma de un conjugado de tipo GalNAc. El ARNi (p. ej., el ARNbc) se puede administrar con una dosis de 0.5-50 mg/kg. El ARNi se puede administrar en una dosis inferior a 10 mg/kg (p. ej., 5 mg/kg o inferior) una vez a la semana; p. ej., una dosis de 1 mg/kg o inferior, 2.5 mg/kg o inferior o 5 mg/kg o inferior, p. ej., una vez a la semana. El ARNi se puede administrar en una dosis de aproximadamente 2.5 mg/kg o inferior, p. ej., una vez a la semana.

El sujeto que se va a tratar puede estar asintomático y puede tener un nivel elevado de ALA y/o PBG. El sujeto puede tener una porfiria, p. ej., AIP. El paciente puede padecer ataques porfíricos recurrentes.

- 40 El ARNi (p. ej., AD-60519) se puede administrar en una dosis inferior a 5 mg/kg, p. ej., de 0.1, 0.35, 1.0 o 2.5 mg/kg. El ARNi (p. ej., AD-60519) se puede administrar en dosis repetidas, p. ej., dosis semanales.

El sujeto puede estar asintomático y tiene un nivel elevado de ALA y/o PBG, y el ARNi (p. ej., AD-60519) se puede administrar en dosis únicas, p. ej., de 0.1, 0.35, 1.0 o 2.5 mg/kg; o en dosificaciones semanales repetidas, p. ej., de 1 y 2.5 mg/kg durante varias semanas (p. ej., durante 4 semanas).

- 45 El sujeto puede tener AIP, p. ej., es un paciente con AIP, el ARNi (p. ej., AD-60519) se administra con una dosis de 1-2.5 mg/kg a la semana.

- 50 Se puede emplear una pauta de tratamiento en la que el ARNi se administra inicialmente con más frecuencia, seguido por una administración menos frecuente. El ARNi se puede administrar inicialmente una vez al día durante múltiples días (p. ej., durante 2-14 días, p. ej., durante 2, 3, 4, 5, 6 o 7 días). El ARNi se puede administrar posteriormente una vez a la semana. El ARNi se puede administrar posteriormente una vez cada dos semanas. El ARNi se puede administrar posteriormente con una frecuencia que puede ser eficaz para reducir uno o más signos o síntomas de una porfiria.

En un aspecto de la presente se proporciona además un método para tratar a un sujeto con un nivel elevado de ALA y/o PBG, comprendiendo el método administrar al sujeto un ácido ribonucleico bicatenario (ARNbc), donde dicho

ARNbc comprende una hebra sentido y una hebra antisentido con una longitud de 15-30 pares de bases y la hebra antisentido es complementaria respecto a al menos 15 nucleótidos contiguos de la SEQ ID NO:1 o la SEQ ID NO:382.

- 5 En un aspecto de la presente se proporciona además un método para tratar a un sujeto con un nivel elevado de ALA y/o PBG, comprendiendo el método administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un ARNbc o una composición que comprenda un ARNbc, según se describe la presente.

Los métodos descritos en la presente pueden ser eficaces para reducir el nivel de ALA y/o PBG. El nivel de ALA y/o PBG se puede reducir de modo tal que sea inferior a, o inferior o igual a, un valor de referencia, p. ej., un límite de referencia superior.

- 10 El sujeto que se va a tratar puede estar asintomático y tener un nivel elevado de ALA y/o PBG. El sujeto puede tener una porfiria, p. ej., AIP.

El ARNi se puede administrar en una dosis inferior a 5 mg/kg, p. ej., con 0.1, 0.35, 1.0 o 2.5 mg/kg. El ARNi se puede administrar en dosis repetidas, p. ej., dosis semanales.

- 15 En otro aspecto, en la presente se proporcionan además métodos para reducir el nivel de una porfirina o un precursor de porfirina en una célula (p. ej., una célula eritroide o una célula hepática tal como, p. ej., un hepatocito). La célula se puede tratar *ex vivo*, *in vitro* o *in vivo* (p. ej., la célula está presente en un sujeto (p. ej., un paciente que necesita tratar, prevenir y/o gestionar un trastorno relacionado con la expresión de ALAS1)). El método incluye poner en contacto la célula con una cantidad eficaz de uno o más de los ARNi que tienen ALAS1 como diana, p. ej., uno o más de los ARNi descritos en la presente, de este modo se reduce el nivel de una porfirina o un precursor de porfirina en la célula; o se reduce el nivel de una porfirina o un precursor de porfirina en otras células, tejidos o fluidos del sujeto en el cual se encuentra localizada la célula; con relación al nivel antes de la puesta en contacto. Tales métodos se pueden utilizar para tratar (p. ej., mejorar la gravedad) de trastornos relacionados con la expresión de ALAS1, tales como las porfirias, p. ej., AIP o una porfiria debida a la deficiencia de ALA-deshidratasa.
- 20

- 25 El paso de puesta en contacto se puede realizar *ex vivo*, *in vitro* o *in vivo*. Por ejemplo, la célula puede estar presente en un sujeto, p. ej., un mamífero (p. ej., un ser humano) que corre el riesgo de padecer o al cual se le ha diagnosticado una porfiria. La porfiria puede ser una porfiria hepática aguda. La porfiria puede ser una porfiria hepática, p. ej., una porfiria seleccionada entre porfiria intermitente aguda (AIP), coproporfiria hereditaria (HCP), porfiria variegata (VP), porfiria debida a la deficiencia de ALA-deshidratasa (ADP) y porfiria hepatoeritropoyética. La porfiria puede ser una porfiria hepática dominante homocigótica (p. ej., AIP, HCP o VP dominante homocigótica) o una porfiria hepatoeritropoyética. La porfiria puede ser una porfiria dual.
- 30

- En un aspecto de la presente se proporciona un método para reducir el nivel de una porfirina o un precursor de porfirina (p. ej., ALA o PBG) en una célula, que comprende poner en contacto la célula con un ARNi (p. ej., un ARNbc), según se describe en la presente, en una cantidad eficaz para reducir el nivel de la porfirina o el precursor de porfirina en la célula. La célula es un hepatocito. La porfirina o el precursor de porfirina es ácido δ -aminolevulínico (ALA), porfobilinógeno (PBG), hidroximetilbilano (HMB), uroporfirinógeno I o III, coproporfirinógeno I o III, protoporfirinógeno IX o protoporfirina IX. El precursor de porfirina es ALA o PBG.
- 35

La célula puede ser una célula eritroide. La célula puede ser una célula hepática (p. ej., un hepatocito).

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

- 40 En un aspecto de la presente se proporciona un vector que codifica al menos una hebra de un ARNbc, donde dicho ARNbc comprende una región de complementariedad respecto a al menos una parte de un ARNm que codifica ALAS1, donde dicho ARNbc tiene una longitud de 30 pares de bases o inferior y donde dicho ARNbc tiene como diana la escisión de dicho ARNm.

La región de complementariedad puede tener una longitud de al menos 15 nucleótidos.

- 45 La región de complementariedad puede tener una longitud de 19-21 nucleótidos. En un aspecto, en la presente se proporciona además un vector para inhibir la expresión de un gen ALAS1 en una célula. El vector puede comprender un ARNi según se describe en la presente. El vector puede incluir al menos una secuencia reguladora unida operablemente a una secuencia de nucleótidos que codifica al menos una hebra de un ARNi según se describe en la presente. El vector puede comprender al menos una hebra de un ARNi de ALAS1.

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

En otro aspecto, se proporciona un método para someter a ensayo el nivel de ARNm de ALAS1 extracelular circulante en un sujeto, comprendiendo dicho método detectar (p. ej., medir) el nivel de ARNm de ALAS1 en una muestra de fluido biológico (p. ej., una muestra de sangre (p. ej., una muestra de suero o plasma), una muestra de líquido cefalorraquídeo, o una orina del sujeto, comprendiendo dicha muestra de fluido biológico el ARNm de ALAS1, para someter a ensayo de esta manera el nivel de ARNm de ALAS1 extracelular circulante en el sujeto.

En otro aspecto, se proporciona un método para someter a ensayo el nivel de ARNm de ALAS1 extracelular circulante en un sujeto, comprendiendo dicho método (i) proporcionar ARN (p. ej., ARN extracelular) de una muestra de fluido biológico (p. ej., muestra de sangre o plasma) del sujeto, comprendiendo dicha muestra de fluido biológico el ARNm de ALAS1; (ii) obtener un ADNc de ALAS1 del ARNm de ALAS1; (iii) poner el contacto el ADNc de ALAS1 con un ácido nucleico complementario (p. ej., sonda y/o cebador) al ADNc de ALAS1 o una porción de este, para producir de esta manera una mezcla de reacción; y (iv) detectar (p. ej., medir) el nivel de ADNc de ALAS1 en la mezcla de reacción, donde el nivel de ADNc de ALAS1 es indicativo del nivel de ARN de ALAS1, para someter a ensayo de esta manera el nivel de ARNm de ALAS1 extracelular circulante en el sujeto.

Dicha muestra de fluido biológico puede ser una muestra de sangre. Dicha muestra de fluido biológico puede ser una muestra de suero. Dicha muestra de fluido biológico puede ser una muestra de orina.

El método puede comprender PCR, qPCR o 5'-RACE.

Dicho ácido nucleico puede ser una sonda o un cebador.

Dicho ácido nucleico puede comprender un resto detectable y el nivel de ARNm de ALAS1 se determina mediante la detección de la cantidad del resto detectable.

Dicho método puede comprender además obtener la muestra de fluido biológico del sujeto. La muestra de fluido biológico puede estar separada del tejido y contiene exosomas. En aspectos de estos métodos, la eficacia de un tratamiento de porfiria se puede someter a ensayo en función de una comparación con el nivel de ARNm de ALAS1 extracelular circulante en el sujeto respecto al valor de referencia.

Un descenso en el nivel de ARNm de ALAS1 extracelular circulante en el sujeto en respuesta al tratamiento de porfiria, respecto al valor de referencia, puede indicar que el tratamiento de la porfiria es eficaz. El valor de referencia puede ser el nivel de ARNm de ALAS1 extracelular circulante en el sujeto antes del tratamiento de la porfiria.

Descripción de los dibujos

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

Las FIG. 2A y FIG. 2B muestran una tabla que resume ciertas porfirias asociadas con errores genéticos en el metabolismo del grupo hemo.

Las FIG. 3A y FIG. 3B representan la variante 1 de un transcrito de la secuencia de ARNm de ALAS1 humano (Ref. Sec. NM_000688.4 (GI:40316942, registro con fecha de 19 de noviembre de 2011), SEQ ID NO: 1).

Las FIG. 4A y 4B representan el transcrito de la secuencia de ARNm de ALAS1 humano (Ref. Sec. NM_000688.5 (GI: 362999011, registro con fecha de 1 de abril de 2012), SEQ ID NO: 382).

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

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

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

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

La FIG. 9 muestra los niveles de ALA en plasma (en μM) de animales individuales en el punto de referencia y después del tratamiento con fenobarbital en animales que recibieron tratamiento con ARNip de ALAS1 y control (ARNip de LUC).

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

- La FIG. 11 muestra los niveles de PBG en plasma (en μM) de animales individuales en el punto de referencia y después del tratamiento con fenobarbital en animales que recibieron tratamiento con ARNip de ALAS1 y control (ARNip de LUC).
- 5 La FIG. 12 muestra el nivel de ARNm de ALAS1r relativo en el hígado en el punto de referencia y después de un tratamiento con fenobarbital en animales experimentales representativos seleccionados (ARNip de ALAS1) y de control (PBS).
- La FIG. 13 muestra los efectos de tres ARNip de ALAS1r conjugados con GalNAc sobre la expresión de ALAS1r (en comparación con un control de PBS) en tejido hepático de ratón.
- 10 La FIG. 14 muestra los niveles de ALA y PBG en plasma en función del tiempo después de la administración de fenobarbital y el tratamiento con ARNip de ALAS1 o ARNip de LUC como control.
- La FIG. 15 muestra los efectos de un ARNip de ALAS1 conjugado con GalNAc sobre los niveles de ALA en plasma y PBG en plasma en el modelo de inducción con fenobarbital de AIP en ratón.
- 15 La FIG. 16 muestra los efectos dependientes de la dosis de un ARNip de ALAS1 en los niveles en plasma de ALA y PBG en el modelo de inducción con fenobarbital de AIP en ratón. Para los animales que recibieron ARNip de ALAS1, la dosis de ARNip administrada (0.05 mg/kg, 0.1 mg/kg, 0.5 mg/kg o 1.0 mg/kg) se muestra en el eje horizontal.
- La FIG. 17, panel superior, muestra el diseño experimental utilizado para estudiar la supresión de ALA y PBG con ARNip de ALAS1. El panel inferior muestra los niveles en plasma de ALA y PBG en el punto de referencia, en la condición de control (Luc) y después del tratamiento con ARNip de ALAS1 en la semana 0, semana 2 y
20 semana 4.
- La FIG. 18 muestra el diseño experimental utilizado para comparar los efectos del tratamiento con ARNip de ALAS1 o hemina en un modelo en animales de AIP (parte superior) y los resultados para los niveles en plasma de ALA ($\mu\text{mol/L}$) (parte central) y niveles en plasma de PBG ($\mu\text{mol/L}$) (parte inferior).
- 25 La FIG. 19 muestra los niveles de ARNm relativos (ALAS1/GAPDH) en animales tratados con 30 mg/kg, 10 mg/kg o 3 mg/kg de AD-58632 en comparación con los animales tratados con control de PBS.
- La FIG. 20 muestra el diseño experimental utilizado para investigar el efecto de respuesta a la dosis del conjugado AD-58632-ALAS1-GalNAc en un modelo de AIP en rata.
- La FIG. 21 muestra los niveles relativos de ARNm de PBGD en el hígado (gráfico superior) y los niveles relativos de ARNm de ALAS1 en el hígado (gráfico inferior) en un modelo en rata de AIP. Los grupos de
30 animales se sometieron a uno de cuatro tratamientos: (1) tratamiento con fenobarbital (PB) solo, (2) tratamiento con fenobarbital y ARNip de porfobilinógeno-desaminasa (PBGD), (3) fenobarbital, ARNip de PBGD y 30 mg/kg de ARNip de ALAS1, (4) fenobarbital, ARNip de PBGD y 10 mg/kg de ARNip de ALAS1.
- La FIG. 22 muestra los niveles en orina de PBG (panel superior) y ALA (panel inferior) respecto a los niveles de creatinina en un modelo en rata de AIP. Los grupos de animales se sometieron a uno de cuatro tratamientos: (1) tratamiento con fenobarbital (PB) solo, (2) tratamiento con fenobarbital y ARNip de porfobilinógeno-desaminasa (PBGD), (3) fenobarbital, ARNip de PBGD y 30 mg/kg de ARNip de ALAS1, (4) fenobarbital, ARNip de PBGD y
35 10 mg/kg de ARNip de ALAS1.
- La FIG. 23 muestra la supresión de ARNm de ALAS-1 por AD-58632, en comparación con el control de PBS, en grupos de ratas que recibieron cinco dosis diarias de ARNip de 6 mg/kg, 2 mg/kg o 1 mg/kg frente a dosis en bolo único de ARNip de 30 mg/kg, 10 mg/kg o 5 mg/kg.
40
- La FIG. 24 muestra la supresión de ARNm de ALAS-1 por AD-58632, en comparación con control de PBS, en grupos de ratas que recibieron cuatro dosis semanales de ARNip de 10 mg/kg, 5 mg/kg o 2.5 mg/kg.
- La FIG. 25 muestra la supresión de ARNm de ALAS-1 por AD-58632 y por cinco dúplex de nonadecámero/nonadecámero.
- 45 La FIG. 26 muestra los resultados de una evaluación del efecto de la longitud de la hebra y en protuberancias en el mejor de los dos nonadecámeros.
- La FIG. 27 es un gráfico que muestra los niveles de ARNm de ALAS1 en el hígado (barras de la izquierda) y en suero (barras de la derecha) para cada grupo de tratamiento en el estudio NHP descrito en el Ejemplo 34.
- 50 La FIG. 28 muestra la supresión de ARNm de ALAS-1, en comparación con el control de PBS, en grupos de ratas que recibieron 3 mg/kg o 10 mg/kg de AD-58632 o AD-60489.

La FIG. 29 muestra el diseño experimental utilizado para investigar la eficacia de los ARNip de ALAS1 AD-58632 y AD-60489 en la supresión de ARNm hepático en primates no humanos.

La FIG. 30 muestra la supresión dependiente de la dosis de ARNm hepático en primates no humanos tras el tratamiento con 1.25 mg/kg, 2.5 mg/kg o 5 mg/kg de AD-58632 o AD-60489.

5 La FIG. 31 muestra una comparación de los resultados de supresión de ARNm obtenidos de biopsias hepáticas y del ensayo cERD en un estudio con primates no humanos.

La FIG. 32 muestra el transcurso temporal de la supresión de ARNm según se evalúa utilizando el ensayo cERD en un estudio con primates no humanos. El eje horizontal muestra el tiempo de acuerdo con el día de estudio.

10 La FIG. 33 muestra la supresión de ARNm de ALAS1 en ratas que recibieron PBS o una única dosis de 5 mg/kg de uno de los dúplex de ARNip indicados.

La FIG. 34 muestra las concentraciones hepáticas del ARNip en ratas que recibieron una única dosis de 5 mg/kg del ARNip indicado.

15 La FIG. 35 (parte superior) muestra el diseño experimental utilizado para investigar la eficacia terapéutica de AD-60925 y AD-60926. La FIG. 35 (parte inferior) muestra los niveles relativos de ARNm de ALAS1/GAPDH de rata en ratas tratadas con (1) AF11-PBGD, (2) AF11-PBGD y PB, (3) AF-11PBGD, PB, y 3 mg/kg de AD-60925, o (4) AF11-PBGD, PB, y AD-60926.

La FIG. 36 muestra los niveles relativos de PBG en orina (parte superior) y ALA en orina (parte inferior) en ratas tratadas con (1) AF11-PBGD, (2) AF11-PBGD y PB, (3) AF-11PBGD, PB, y 3 mg/kg de AD-60925, o (4) AF11-PBGD, PB, y AD-60926.

20 La FIG. 37 muestra los niveles relativos de PBG en orina (parte superior) y ALA en orina (parte inferior) en el tiempo en ratas tratadas con (1) AF11-PBGD, (2) AF11-PBGD y PB, (3) AF-11PBGD, PB, y 3 mg/kg de AD-60925, o (4) AF11-PBGD, PB, y AD-60926. Las flechas indican los puntos temporales en los que se administró PB.

25 La FIG. 38 muestra los niveles relativos de ARNm de ALAS1 de rata (rALAS1) en ratas que recibieron 4 dosis de PBS o 2.5 mg/kg de uno de los ARNip indicados.

La FIG. 39 muestra los niveles relativos de ARNm de ALAS1 de rata (rALAS1) en ratas que recibieron una única dosis de PBS o 2.5 mg/kg de uno de los ARNip indicados.

30 La FIG. 40 (parte superior) muestra los niveles relativos de ARNm de ALAS1 de rata (rALAS1) en ratas que recibieron una única dosis de PBS o 3 mg/kg de uno de los ARNip indicados. La FIG. 40 (parte inferior) muestra la concentración de ARNip en el hígado.

La FIG. 41 (parte superior) muestra la supresión de ARNm de ALAS1 de rata (rALAS1) por AD-60489, AD-60519 y AD-60901. La FIG. 41 (parte inferior) muestra la concentración de ARNip en el hígado.

La FIG. 42 muestra los niveles relativos de ARNm de ALAS1 de rata (rALAS1) en ratas que fueron tratadas con una única dosis de PBS o 2.5 mg/kg de uno de los ARNip indicados.

35 La FIG. 43 muestra los niveles relativos de ARNm de ALAS1 de rata (rALAS1) en ratas que fueron tratadas con PBS o uno de los ARNip indicados con una dosis de 2.5 mg/kg dos veces a la semana durante 2 semanas.

40 La FIG. 44 (parte superior) muestra una representación esquemática del diseño experimental utilizado para investigar la eficacia terapéutica de múltiples dosis bisemanales de AD-60519. La FIG. 44 (parte inferior) muestra gráficos que presentan la supresión de PBG en orina y ALA en orina en ratas que fueron tratadas con (i) ARNip de PBGD y seis dosis de PBS, (ii) ARNip de PBGD, PB y seis dosis de PBS, (iii) ARNip de PBGD, PB y seis dosis de 2.5 mg/kg de AD-60519 o (iv) ARNip de PBGD, PB y seis dosis de 5 mg/kg de AD-60519.

45 La FIG. 45 muestra gráficos que presentan la supresión de PBG en suero (gráfico superior) y ALA en suero (gráfico inferior) en un modelo de AIP en ratones que fueron tratados con (i) ARNip de PBGD y seis dosis de PBS (punto de referencia), (ii) ARNip de PBGD, PB y seis dosis de PBS (solución salina), (iii) ARNip de PBGD, PB y seis dosis de 2.5 mg/kg de AD-60519 o (iv) ARNip de PBGD, PB y seis dosis de 5 mg/kg de AD-60519.

50 La FIG. 46 (parte superior) muestra una representación esquemática del diseño experimental utilizado para investigar la eficacia terapéutica de múltiples dosis semanales de AD-60519. La FIG. 46 (parte inferior) muestra un gráfico que presenta los niveles relativos de ARNm de ALAS1 de rata (rALAS1/GAPDH) en ratas que fueron tratadas con (i) ARNip de PBGD y cuatro dosis de PBS, (ii) ARNip de PBGD, PB y cuatro dosis de PBS, (iii) ARNip de PBGD, PB y cuatro dosis de 3 mg/kg de AD-60519, (iv) ARNip de PBGD, PB y cuatro dosis de 1 mg/kg de AD-60519 o (v) ARNip de PBGD, PB y cuatro dosis de 0.3 mg/kg de AD-60519.

La FIG. 47 muestra gráficos que presentan los niveles de PBG en orina (gráfico superior) y ALA en orina (gráfico inferior) en ratas que fueron tratadas con (i) ARNi de PBGD y cuatro dosis de PBS, (ii) ARNi de PBGD, PB y cuatro dosis de PBS, (iii) ARNi de PBGD, PB y cuatro dosis de 3 mg/kg de AD-60519, (iv) ARNi de PBGD, PB y cuatro dosis de 1 mg/kg de AD-60519 o (v) ARNi de PBGD, PB y cuatro dosis de 0.3 mg/kg de AD-60519.

5 La FIG. 48 es una representación esquemática que muestra el diseño de un estudio en primates no humanos en el que se investigaron los efectos de los conjugados de ARNi de ALAS1-GalNAc en la supresión del ARNm de ALAS1 y ARNm de ALAS1 circulante.

La FIG. 49 es un gráfico que muestra la supresión de ARNm hepático en primates no humanos (NHP, por sus siglas en inglés) tras el tratamiento con conjugados de ARNi de ALAS1-GalNAc.

10 La FIG. 50 es un gráfico que muestra los niveles en suero normalizados de ARNm de ALAS1 en primates no humanos (NHP) en diversos momentos durante el transcurso de un estudio en el que se investigaron los efectos del tratamiento con conjugados de ARNi de ALAS1-GalNAc. Los días en el eje horizontal corresponden a los días en la representación esquemática en la FIG. 48.

15 La FIG. 51 muestra los niveles de ARNm de ALAS1 normalizados (mostrados como una fracción del nivel predosis) según se evalúa en un estudio de única dosis en ratas que utilizó cERD en orina para monitorizar la supresión de ALAS1.

La FIG. 52 es una representación esquemática que muestra el diseño de un estudio en primates no humanos en el que se investigaron los efectos de múltiples dosis y de una única dosis de AD-60519 en la supresión de ARNm de ALAS1 en hígado y ARNm de ALAS1 circulante.

20 La FIG. 53 es un gráfico de barras que muestra los niveles de ARNm de ALAS1 en hígado relativos promedio (% de control de PBS) en el día de estudio 24 (grupos de múltiples dosis) o en el día de estudio 4 (grupos de única dosis).

25 La FIG. 54 es un gráfico que muestra los niveles de ARNm de ALAS1 en suero normalizados (mostrados como una fracción del nivel predosis) según se evalúa utilizando cERD para los grupos de múltiples dosis (gráfico superior, que muestra los resultados hasta el día 24) y grupos de una única dosis (gráfico inferior, que muestra los resultados hasta el día 22).

La FIG. 55 es un gráfico que muestra los niveles de ARNm en hígado, ARNm en suero y ARNm en orina en el día de estudio 4 (en los grupos de una única dosis) o en el día de estudio 24 (en los grupos de múltiples dosis). Se muestran los datos para los animales individuales y los promedios para cada grupo.

30 La FIG. 56 es un gráfico que muestra los niveles normalizados de ARNm de ALAS1 en suero (mostrados como una fracción del nivel predosis) después de 8 semanas según se evaluó utilizando cERD para los grupos de múltiples dosis. Cada punto de datos del gráfico representa el ARNm de ALAS1 restante para el promedio del grupo de muestras de 3 animales \pm la desviación estándar del grupo.

35 La FIG. 57 es una representación esquemática de la estructura de ALN-60519 (también denominada en la presente AD-60519). La FIG. 57 describe las SEQ ID Nos 5238-5239, respectivamente, en orden de aparición.

40 La FIG. 58 muestra los niveles de ARNm de ALAS1 según se evalúan en muestras de suero o de orina coincidentes obtenidas de pacientes con AIP o voluntarios sanos normales (NHV, por sus siglas en inglés). Los niveles de ARNm de ALAS1 en suero u orina se midieron utilizando el método cERD. En los pacientes con AIP A y B, se recogió un segundo conjunto de muestras de suero y orina para evaluar la variabilidad de ARNm de ALAS1 en el tiempo.

Descripción detallada

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

50 Las porfirias son trastornos heredados o adquiridos que pueden ser provocados por una actividad reducida o potenciada de enzimas específicas de la vía biosintética del grupo hemo, que también se denomina en la presente vía de las porfirinas (remítase a la FIG. 1). Las porfirinas son los precursores principales del grupo hemo. Las porfirinas y los precursores de porfirinas incluyen ácido δ -aminolevulínico (ALA), porfobilinógeno (PBG), hidroximetilbilano (HMB), uroporfirinógeno I o III, coproporfirinógeno I o III, protoporfirinógeno IX y protoporfirina IX. El

grupo hemo es una parte esencial de la hemoglobina, mioglobina, catalasas, peroxidasas y citocromos, incluyendo estos últimos los citocromos hepáticos P450 y respiratorios. El grupo hemo se sintetiza en la mayoría de las células humanas o en todas ellas. Aproximadamente un 85% del grupo hemo se produce en células eritroides, principalmente para la hemoglobina. La mayor parte del grupo hemo remanente se produce en el hígado, un 80% del cual se utiliza para la síntesis de los citocromos. La deficiencia de enzimas específicas de la vía de las porfirinas conlleva una producción insuficiente del grupo hemo y también una acumulación de porfirinas y/o precursores de porfirinas, que son tóxicos para la función de células u órganos en concentraciones elevadas.

Las porfirias se pueden manifestar con complicaciones neurológicas ("agudas"), problemas de la piel ("cutáneos") o ambos. Las porfirias se pueden clasificar en función del sitio principal de la sobreproducción y acumulación de porfirinas o sus precursores. En las porfirias hepáticas, las porfirinas y los precursores de porfirinas se sobreproducen principalmente en el hígado, mientras que en las porfirias eritropoyéticas, las porfirinas se sobreproducen en las células eritroides en el hueso. Las porfirias agudas o hepáticas conllevan la disfunción del sistema nervioso y manifestaciones neurológicas que pueden afectar tanto al sistema nervioso central como al periférico, lo cual provoca síntomas tales como, por ejemplo, dolor (p. ej., dolor abdominal y/o dolor neuropático crónico), vómitos, neuropatía (p. ej., neuropatía aguda, neuropatía progresiva), debilidad muscular, convulsiones, problemas mentales (p. ej., alucinaciones, depresión-ansiedad, paranoia), arritmias cardíacas, taquicardia, estreñimiento y diarrea. Las porfirias cutáneas o eritropoyéticas afectan principalmente a la piel y provocan síntomas tales como fotosensibilidad, la cual puede ser dolorosa, ampollas, necrosis, picores, hinchazón y un mayor crecimiento del pelo en áreas tales como la frente. La infección posterior de las lesiones de la piel puede provocar la pérdida de tejidos y huesos, así como también cicatrices, desfiguración y pérdida de dedos (p. ej., de las manos y de los pies). La mayoría de las porfirias están provocadas por mutaciones que codifican enzimas de la vía biosintética del grupo hemo. En la FIG. 2 se proporciona un resumen de las porfirias asociadas con errores genéticos en el metabolismo del grupo hemo.

No todas las porfirias son genéticas. Por ejemplo, los pacientes con una enfermedad hepática pueden desarrollar una porfiria como resultado de la disfunción hepática y se ha descrito una forma transitoria de eritroporfiria (eritroporfiria transitoria de la infancia) en la infancia (remítase a Crawford, R.I. *et al.*, *J Am Acad Dermatol.* agosto de 1995; 33(2 Pt 2):333-6.) Los pacientes con PCT pueden adquirir una actividad deficiente de la uroporfirinógeno-descarboxilasa (URO-D), debido a la formación de una enzima ORO-D con una actividad enzimática inferior a la normal (remítase a Phillips *et al.* *Blood*, 98:3179-3185, 2001).

La porfiria intermitente aguda (AIP) (también denominada deficiencia de porfobilinógeno (PBG)-desaminasa o deficiencia de hidroximetilbilano-sintasa (HMBS)) es el tipo más común de porfiria hepática aguda. Otros tipos de porfirias hepáticas agudas incluyen la coproporfiria hereditaria (HCP), porfiria variegata (VP) y porfiria debida a la deficiencia de ALA-deshidratasa (ADP). Las porfirias hepáticas agudas se describen, p. ej., en Balwani, M y Desnick, R.J., *Blood*, 120:4496-4504, 2012.

Normalmente, AIP es una enfermedad dominante autosómica que se caracteriza por una deficiencia de la enzima porfobilinógeno-desaminasa (PBG-desaminasa); esta enzima también se conoce como hidroximetilbilano-sintasa (HMB-sintasa o HMBS). La PBG-desaminasa es la tercera enzima de la vía biosintética del grupo hemo (remítase a la FIG. 1) y cataliza la condensación cabeza con cola de cuatro moléculas de porfobilinógeno para obtener el tetrapirrol lineal hidroximetilbilano (HMB). Como alternativa, se han descrito variantes de transcritos de corte y empalme que codifican diferentes isoformas de la PBG-desaminasa. Las mutaciones en el gen de la PBG-desaminasa se asocian con la AIP. Tales mutaciones pueden provocar una reducción de las cantidades de PBG-desaminasa y/o una reducción de la actividad de la PBG-desaminasa (los individuos afectados normalmente presentan una reducción de ~50% en la actividad de la PBG-desaminasa).

Existen al menos dos modelos diferentes de la patofisiología de AIP y otras porfirias hepáticas agudas (remítase, por ejemplo, a Lin CS-Y *et al.*, *Clinical Neurophysiology*, 2011; 122:2336-44). De acuerdo con un modelo, la reducción de la producción del grupo hemo como resultado de la deficiencia de la PBG-desaminasa provoca una deficiencia energética y degeneración axónica. De acuerdo con el otro modelo, actualmente más favorecido, la acumulación de precursores de porfirinas (p. ej., ALA y PBG) provoca neurotoxicidad.

Se ha establecido que la AIP presenta una prevalencia de incluso 1 en 10 000 en ciertas poblaciones (p. ej., en el norte de Suecia; remítase a Floderus Y *et al.* *Clin Genet.* 2002;62:288-97). Se estima que la prevalencia en la población general en los Estados Unidos y Europa, excluido el Reino Unido, es desde aproximadamente 1 en 10 000 hasta 1 en 20 000. La enfermedad clínica se manifiesta en sí únicamente en aproximadamente un 10-15% de los individuos que son portadores de las mutaciones que se sabe que están asociadas con la AIP. Sin embargo, la penetrancia es de incluso un 40% en individuos con ciertas mutaciones (p. ej., la mutación W198X). Normalmente, la AIP es latente antes de la pubertad. Los síntomas son más comunes en mujeres que en hombres. Probablemente la prevalencia de la enfermedad se subestima debido a su penetrancia incompleta y a los periodos prolongados de latencia. En los Estados Unidos, se estima que existen aproximadamente 2000 pacientes que han sufrido al menos un ataque. Se estima que existen aproximadamente 150 casos recurrentes activos en Francia, Suecia, el Reino Unido y Polonia; estos pacientes son principalmente mujeres jóvenes, con una edad media de 30. Remítase, p. ej., a Elder *et al.*, *J Inherit Metab Dis.*, publicado en línea el 1 de noviembre de 2012.

La AIP afecta, por ejemplo, al sistema nervioso central, autonómico, periférico y visceral. Los síntomas de la AIP son variables e incluyen síntomas gastrointestinales (p. ej., dolor abdominal intenso y poco localizado, náusea/vómitos, estreñimiento, diarrea, íleo), síntomas urinarios (disuria, retención/incontinencia urinaria u orina oscura, p. ej., orina roja oscura), síntomas neurológicos (p. ej., neuropatía sensorial, neuropatía motriz (p. ej., que afecta a los nervios craneales y/o que provoca debilidad en los brazos o las piernas), convulsiones, dolor neuropático (p. ej., dolor asociado con una neuropatía progresiva, p. ej., dolor neuropático crónico), síntomas neuropsiquiátricos (p. ej., confusión mental, ansiedad, agitación, alucinación, histeria, delirio, apatía, depresión, fobias, psicosis, insomnio, somnolencia, coma), participación del sistema nervioso autonómico (que provoca, p. ej., síntomas cardiovasculares tales como taquicardia, hipertensión y/o arritmias, así como también otros síntomas tales como, p. ej., un incremento de los niveles de catecolamina en circulación, sudoración, inquietud y/o temblores), deshidratación y anomalías electrolíticas. Los síntomas más comunes son dolor abdominal y taquicardia. Manifestaciones neurológicas incluyend neuropatías motoras y autonómicas y convulsiones. Los pacientes presentan frecuentemente dolor neuropático crónico y desarrollan una neuropatía progresiva. Los pacientes con ataques recurrentes a menudo presentan un pródromo. Se puede producir una parálisis permanente después de un ataque grave. La recuperación de ataques graves que no se tratan inmediatamente puede llevar semanas o meses. Un ataque agudo puede resultar mortal, p. ej., debido a la parálisis de músculos respiratorios o a un paro cardiovascular provocado por el desequilibrio de los electrolitos (remítase, p. ej., a Thunell S. *Hydroxymethylbilane Synthase Deficiency*. 27 de septiembre de 2005 [actualizado el 1 de septiembre de 2011]. En: Pagon RA, Bird TD, Dolan CR *et al.*, editores. GeneReviews™ [Internet]. Seattle (WA): Universidad de Washington, Seattle; 1993- (en lo sucesivo en la presente Thunell (1993)). Antes de la existencia de tratamientos con hemina, hasta un 20% de los pacientes con AIP fallecían a causa de la enfermedad.

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

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

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

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

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

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

La gestión actual de ataques agudos de AIP incluye hospitalización, monitorización de síntomas y el cese de fármacos no seguros. Normalmente, el tratamiento de ataques agudos requiere hospitalización para controlar y tratar los síntomas agudos, que incluyen, p. ej., dolor abdominal, convulsiones, deshidratación/hiponatremia,

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

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

Los inconvenientes de los productos de tipo hemo (p. ej., hemina) incluyen un impacto retrasado en los síntomas clínicos e incapacidad para prevenir la recurrencia de los ataques. Las reacciones adversas asociadas con la administración de hemo (p. ej., hemina) pueden incluir flebitis (p. ej., tromboflebitis), dificultad con el acceso venoso, anticoagulación (o coagulopatías), trombocitopenia, insuficiencia renal o sobrecarga de hierro, la cual es particularmente probable en pacientes que requieren múltiples programas de tratamiento con hemina para ataques recurrentes. Para prevenir la flebitis, se necesita una sonda venosa permanente de acceso en pacientes con ataques recurrentes. Puede ocurrir daño renal con dosis altas. Los efectos secundarios que se registran de forma poco habitual incluyen fiebre, dolor, malestar, hemólisis, anafilaxis e insuficiencia circulatoria. Remítase a Anderson, K.E., *Approaches to Treatment and Prevention of Human Porphyrias*, en *The Porphyrin Handbook: Medical Aspects of Porphyrins*, editado por Karl M. Kadish, Kevin M. Smith, Roger Guilard (2003) (en lo sucesivo en la presente Anderson).

Resulta difícil preparar el grupo hemo en una forma estable para la administración intravenosa. Este es insoluble a un pH neutro pero se puede preparar como el hidróxido de hemo a un pH de 8 o superior. Anderson. Panhematin es un preparado de hemina liofilizada. Cuando la hemina liofilizada se solubiliza para la administración intravenosa, se forman rápidamente productos de degradación; estos productos de degradación son los responsables de que se produzca un efecto anticoagulante transitorio y flebitis en el punto de la infusión. Anderson. La albúmina que contiene hemo y el arginato de hemo (Normosang, la versión europea de la hemina) son más estables y, potencialmente, pueden provocar menos tromboflebitis. Sin embargo, el uso del arginato de hemo no está aprobado en los Estados Unidos. Panhematin se puede estabilizar solubilizándolo para infusión en albúmina humana al 30% en lugar de en agua estéril; sin embargo, la albúmina añade efectos de expansión del volumen intravascular e incrementa el costo del tratamiento, así como también el riesgo de patógenos ya que se aísla a partir de sangre humana. Remítase, p. ej., a Anderson *supra*.

El tratamiento con éxito de un ataque agudo no evita ni retrasa su reaparición. Existe la duda de si la hemina en sí puede desencadenar ataques recurrentes debido a la inducción de la hemo-oxigenasa. A pesar de ello, en algunas áreas (especialmente Francia), se está tratando a mujeres jóvenes con múltiples ataques recurrentes con hemina semanalmente con el objetivo de alcanzar la profilaxis.

La experiencia limitada con trasplantes de hígado sugiere que, cuando tienen éxito, suponen un tratamiento eficaz para la AIP. Se han producido aproximadamente 12 trasplantes en pacientes humanos en Europa, con efectos curativos o variados. El trasplante de hígado puede restablecer la excreción normal de ALA y PBG y evitar los ataques agudos. Remítase, p. ej., a Dar, F.S. *et al. Hepatobiliary Pancreat. Dis. Int.*, 9(1):93-96 (2010). Además, si el hígado de un paciente con AIP se trasplanta en otro paciente ("trasplante dominó"), el paciente que recibe el trasplante puede desarrollar AIP.

Entre los efectos clínicos a largo plazo de las porfirias agudas, se encuentra el dolor neuropático crónico que puede ser el resultado de una neuropatía progresiva debida a los efectos neurotóxicos, p. ej., de niveles elevados de precursores de porfirinas (p. ej., ALA y/o PBG). Los efectos neurotóxicos pueden estar asociados con la producción del intermedio hemo tóxico, por ejemplo, señalización de GABA alterada y/o producción de oxidación mediada por hierro y especies reactivas del oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés). Los pacientes pueden sufrir dolor neuropático

- antes de un ataque agudo o durante este. Los pacientes de edad más avanzada pueden experimentar un incremento del dolor neuropático con la edad, para el cual se recetan normalmente varios fármacos narcóticos. Se han registrado anomalías en el electromiograma y una reducción de los tiempos de conducción en pacientes con porfirias hepáticas agudas. Cabe destacar que ratones con AIP (deficiencia de PBG-desaminasa) no inducidos ni tratados desarrollan una neuropatía motriz progresiva que se ha demostrado que provoca la degeneración y la pérdida progresivas del axón del nervio de los cuádriceps debido a los niveles constitutivamente elevados de precursores de porfirinas (ALA y PBG), a la deficiencia del grupo hemo y/o porfirinas (Lindberg *et al.*, *J. Clin. Invest.*, 103(8): 1127–1134, 1999). En pacientes con porfiria aguda (p. ej., ADP, AIP, HCP o VP), los niveles de precursores de porfirinas (ALA y PBG) son a menudo elevados en pacientes sin síntomas y en pacientes con síntomas entre ataques. Por lo tanto, cabe esperar que la reducción de los precursores de porfirinas y el restablecimiento de la biosíntesis normal del grupo hemo mediante la reducción del nivel de actividad y/o expresión de ALAS1 evite y/o minimice el desarrollo de una neuropatía progresiva y crónica. Un tratamiento, p. ej., un tratamiento crónico (p. ej., un tratamiento periódico con ARNi según se describe en la presente, p. ej., un tratamiento de acuerdo con una pauta posológica según se describe en la presente, p. ej., un tratamiento semanal o cada dos semanas) puede reducir de forma continuada la expresión de ALAS1 en pacientes con porfiria aguda que presentan niveles elevados de precursores de porfirinas, porfirinas, productos de porfirinas o sus metabolitos. Tal tratamiento se puede proporcionar según convenga para prevenir o reducir la frecuencia o la gravedad de los síntomas de un paciente individual (p. ej., dolor y/o neuropatía) y/o para reducir el nivel de un precursor de porfirina, porfirina, producto o metabolito de porfirina.
- Es necesario identificar agentes terapéuticos novedosos que se puedan utilizar para el tratamiento de las porfirias. Según se ha discutido anteriormente, los tratamientos existentes tales como los productos de tipo hemo (p. ej., hemina) presentan numerosas desventajas. Por ejemplo, el impacto de la hemina sobre los síntomas clínicos presenta un retraso, la hemina es cara y puede presentar efectos secundarios (p. ej., tromboflebitis, anticoagulación, trombocitopenia, sobrecarga de hierro, insuficiencia renal). Los agentes terapéuticos novedosos, tales como los que se describen en la presente, pueden resolver estas desventajas y atender las necesidades no cubiertas de los pacientes actuando más rápidamente, no induciendo flebitis, proporcionando la comodidad de una administración subcutánea, evitando con éxito ataques recurrentes, evitando o mejorando el dolor (p. ej., dolor neuropático crónico) y/o una neuropatía progresiva, y/o no provocando ciertos efectos adversos asociados con la hemina (p. ej., sobrecarga de hierro, incremento del riesgo de padecer un cáncer hepatocelular).
- Los pacientes con AIA incluyen aquellos que padecen ataques recurrentes y aquellos que padecen ataques agudos esporádicos. En los pacientes que padecen ataques recurrentes, aproximadamente un 5-10% tienen ataques intermitentes recurrentes (2-3 ataques al año) o ataques recurrentes (>4 ataques al año). Estos pacientes son los que más probablemente consideren un trasplante de hígado o reciban infusiones de hemo (p. ej., hemina) profilácticas. Es probable que los pacientes con ataques recurrentes tengan una calidad de vida baja debido a largas estancias hospitalarias, adicción a opiáceos y/o toxicidad de la red venosa. La administración crónica de hemo puede inducir a la hemo-oxigenasa (HO-1). Por lo tanto, puede ser difícil que los pacientes dejen el hemo y algunos requieren un tratamiento más frecuente. Así pues, algunos facultativos restringen el uso de hemo a los ataques más serios. En consecuencia, hay una necesidad médica no cubierta de profilaxis y tratamientos convenientes y eficaces con una mejor tolerabilidad.
- Para los pacientes que padecen ataques agudos, las directrices clínicas sugieren la administración de hemo tan pronto como sea posible. Sin embargo, dados los problemas del diagnóstico y la falta de una disponibilidad inmediata del fármaco, la administración puede verse retrasada. El inicio lento de los efectos del hemo (p. ej., hemina) y su mala tolerabilidad retrasan el momento de mejora. La persistencia de dolor abdominal grave, incluso después de la administración de hemo, puede requerir que los pacientes reciban opiáceos durante varios días.
- El retraso en la administración del hemo o la exposición prolongada a factores desencadenantes puede conllevar complicaciones más serias, que incluyen neuropatía motora y síntomas concomitantes (p. ej., debilidad, paresia). En los casos graves pueden ocurrir insuficiencia respiratoria y parálisis. La recuperación de los síntomas neurológicos puede requerir mucho más tiempo hasta conseguir resolverlos. En consecuencia, en el contexto de ataques agudos, se necesitan tratamientos que tiene un inicio de acción más rápido y una mejor tolerabilidad.
- La validación farmacológica de ALAS1 como una diana del silenciamiento del ARNm está respaldada por al menos los siguientes hallazgos: ARNm de ALAS1 presenta un marcado aumento regulado durante un ataque; la panhematina provoca una reducción modulada de ALAS-1; y la adición de hemo a las células hepáticas en cultivo conlleva una reducción del ARNm de ALAS-1. Varios hallazgos también indican que la supresión del ARNm de ALAS1 se puede lograr teniendo como diana el hígado. Por ejemplo, se ha mostrado que el trasplante de hígado es curativo; y los metabolitos derivados del hígado impulsan los ataques (remítase, p. ej., a Dar *et al. Hepatobiliary Pancreat Dis Int.* 9:93-6 (2010); Dowman *et al. Ann Intern Med* 154:571-2 (2011); y Wu *et al. Genes Dev* 23:2201-2209 (2009). Por lo tanto, la reducción de la expresión de ALAS1, p. ej., en el hígado, utilizando composiciones de ARNi se puede utilizar para tratar una porfiria. Las composiciones de ARNi se pueden utilizar para la profilaxis y tratamiento agudo de porfirias. Por ejemplo, las composiciones de ARNi se pueden utilizar de manera profiláctica en un contexto de ataques recurrentes para inducir la supresión crónica o a largo plazo de la expresión de ALAS1 (que conlleva una supresión crónica o a largo plazo de ALA/PBG) y, de esta manera, atenuar el aumento regulado recurrente de ALAS1 que impulsa los ataques. Un tratamiento profiláctico de este tipo puede reducir el número y

gravedad de los ataques. En un contexto de ataque agudo, la administración de una composición de ARNi puede tratar un ataque agudo, p. ej., al reducir los niveles de ALA/PBG.

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

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

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

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

I. Definiciones

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

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

El término "ALAS1" (también conocido como ALAS-1; δ -aminolevulinato-sintasa 1; δ -ALA-sintasa 1; ácido 5'-aminolevulínico-sintasa 1; ALAS-H; ALASH; ALAS-N; ALAS3; EC2.3.1.37; 5-aminolevulinato-sintasa, no específica,

mitocondrial; ALAS; MIG4; OTTHUMP00000212619; OTTHUMP00000212620; OTTHUMP00000212621; OTTHUMP00000212622; proteína 4 inductora de migración; EC 2.3.1), tal como se utilizó en la presente, se refiere a una enzima mitocondrial codificada en el núcleo que es la primera enzima, y normalmente la enzima limitante de la velocidad, de la vía biosintética del grupo hemo en mamíferos. ALAS1 cataliza la condensación de la glicina con succinil-CoA para formar el ácido δ -aminolevulínico (ALA). El gen ALAS1 humano se expresa de forma ubicua, se encuentra en el cromosoma 3p21.1 y normalmente codifica una secuencia de 640 aminoácidos. Por el contrario, el gen ALAS-2, que codifica una isozima, se expresa solamente en los eritrocitos, se encuentra en el cromosoma Xp11.21 y normalmente codifica una secuencia de 550 aminoácidos. La expresión "proteína ALAS1", tal como se utiliza en la presente, se refiere a cualquier variante proteica de ALAS1 de cualquier especie (p. ej., de un ser humano, ratón, primate no humano), así como también a cualesquiera mutantes y fragmentos de esta que conserven actividad de ALAS1. De forma similar, la expresión "transcrito de ALAS1" se refiere a cualquier variante de un transcrito de ALAS1 de cualquier especie (p. ej., de un ser humano, ratón, primate no humano). Se puede consultar un transcrito de ARNm de la de ALAS1 humano en NM_000688.4 (FIG. 3A y FIG. 3B; SEQ ID NO:1). Se puede consultar otro transcrito de ARNm de ALAS1 humano, en NM_000688.5 (FIG. 4A y FIG. 4B; SEQ ID NO:382). El nivel de la proteína ALAS1 codificada madura está regulado por el grupo hemo: unos niveles elevados del grupo hemo reducen la expresión de la enzima madura en las mitocondrias, mientras que unos niveles bajos del grupo hemo incrementan su expresión. Se han identificado múltiples variantes de corte y empalme alternativas que codifican la misma proteína.

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

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

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

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

una longitud de 23 nucleótidos, donde el oligonucleótido más largo comprende una secuencia de 21 nucleótidos que es totalmente complementaria respecto al oligonucleótido más corto, es "totalmente complementario" a los efectos descritos en la presente.

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

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

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

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

55 El agente de ARNi puede ser además un "ARNip monocatenario" que se introduce en una célula u organismo para inhibir un ARNm diana. Los agentes que son ARNi monocatenarios se unen a la endonucleasa de RISC Argonauta 2, que a continuación escinde el ARNm diana. Los ARNip monocatenarios contienen generalmente 15-30 nucleótidos y están modificados químicamente. El diseño y la evaluación de ARNip monocatenarios se describe en la Patente de EE. UU. N.º 8.101.348 y en Lima *et al.*, (2012) *Cell* 150: 883-894. Cualquiera de las secuencias de nucleótidos antisentido descritas en la presente (p. ej., las secuencias proporcionadas en las Tablas 2, 3, 6, 7, 8, 9, 14, 15, 18 y 20 o en las Tablas 21-40) se pueden utilizar como un ARNip monocatenario según se describe en la presente o se pueden modificar químicamente mediante los métodos descritos en Lima *et al.*, (2012) *Cell* 150:883-894.

60 En otro aspecto, el agente de ARN es una "molécula de ARN antisentido monocatenaria". Una molécula de ARN antisentido monocatenaria es complementaria respecto a una secuencia dentro del ARNm diana. Las moléculas de

ARN antisentido monocatenarias pueden inhibir la traducción de un modo estequiométrico apareando sus bases con el ARNm y obstruyendo físicamente la maquinaria de traducción, remítase a Dias, N. *et al.*, (2002) *Mol Cancer Ther* 1:347-355. Como alternativa, las moléculas antisentido monocatenarias inhiben un ARNm diana hibridándose con la diana y escindiendo la diana a través de un evento de escisión de tipo RNasaH. La molécula de ARN antisentido monocatenaria puede tener una longitud comprendida entre aproximadamente 10 y aproximadamente 30 nucleótidos y puede tener una secuencia que sea complementaria respecto a una secuencia diana. Por ejemplo, la molécula de ARN antisentido monocatenaria puede comprender una secuencia que tenga al menos aproximadamente 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más nucleótidos contiguos de cualquiera de las secuencias de nucleótidos antisentido descritas en la presente, p. ej., las secuencias proporcionadas en cualquiera de las Tablas 2, 3, 6, 7, 8, 9, 14, 15, 18 y 20 o en las Tablas 21-40.

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

En un aspecto, un ribonucleósido modificado incluye un desoxirribonucleósido. En un caso de este tipo, un agente de ARNi puede comprender uno o más desoxinucleósidos, que incluyen, por ejemplo, una o más protuberancias de desoxinucleósidos, o uno o más desoxinucleósidos dentro de la porción bicatenaria del ARNbc. La molécula de ARN puede comprender un porcentaje de desoxirribonucleosidas de al menos un 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95% o superior (pero no un 100%) de desoxirribonucleósidos, p. ej., en una o ambas hebras. El término "ARNi" puede que no englobe una molécula de ADN bicatenario (p. ej., una molécula de ADN bicatenario de origen natural o una molécula de ADN que contiene un 100% de desoxinucleósidos). En un aspecto, un agente de interferencia por ARN incluye un ARN monocatenario que interacciona con una secuencia de ARN diana para dirigir la escisión del ARN diana. Sin pretender vincularse a ninguna teoría, el ARN bicatenario largo que es introducido en células es fragmentado para obtener ARNip por una endonucleasa de Tipo III conocida como Dicer (Sharp *et al.*, *Genes Dev.* 2001, 15:485). Dicer, una enzima similar a la ribonucleasa III, procesa el ARNbc para obtener ARN interferentes pequeños de 19-23 pares de bases con protuberancias 3' de dos bases características (Bernstein *et al.*, (2001) *Nature* 409:363). A continuación, los ARNip se incorporan en un complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC), donde una o más helicasas deshacen el dúplex de ARNip, lo cual permite que la hebra antisentido complementaria guíe el reconocimiento de la diana (Nykanen *et al.*, (2001) *Cell* 107:309). Tras la unión al ARNm diana adecuado, una o más endonucleasas del RISC escinden la diana para inducir el silenciamiento (Elbashir *et al.*, (2001) *Genes Dev.* 15:188). Por lo tanto, en un aspecto, la divulgación se refiere a un ARN monocatenario que propicia la formación de un complejo RISC para ejercer el silenciamiento del gen diana.

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

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

Las expresiones "romo" o "de extremos romos", tal como se utilizan en la presente para hacer referencia a un ARNbc, se refieren a que no hay nucleótidos ni análogos de nucleótidos no apareados en un extremo terminal determinado de un ARNbc, es decir, no hay protuberancias de nucleótidos. Uno o ambos extremos de un ARNbc pueden ser romos. Cuando ambos extremos de un ARNbc son romos, se dice que el ARNbc es de extremos romos. Para que no haya lugar a dudas, un ARNbc "de extremos romos" es un ARNbc que es romo en ambos extremos, es decir, que no tiene protuberancia de nucleótidos en ninguno de los extremos de la molécula. En la mayoría de los casos, una molécula de este tipo será bicatenaria en toda su longitud.

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

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

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

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

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

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

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

Las expresiones "silenciar", "inhibir la expresión de", "reducir la expresión de", "suprimir la expresión de" y similares, siempre que hagan referencia a un gen ALAS1, se refieren en la presente a la supresión al menos parcial de la expresión de un gen ALAS1, según se evalúa, p. ej., en función de la expresión del ARNm de ALAS1, la expresión de la proteína ALAS1 u otro parámetro relacionado funcionalmente con la expresión del gen ALAS1 (p. ej., las concentraciones de ALA o PBG en plasma u orina). Por ejemplo, la inhibición de la expresión de ALAS1 se puede manifestar por una reducción de la cantidad de ARNm de ALAS1 que se puede aislar o detectar a partir de una primera célula o grupo de células en las que se transcriba un gen ALAS1 y que se han o hayan tratado de un modo tal que se inhiba la expresión de un gen ALAS1, en comparación con un control. El control puede ser una segunda célula o grupo de células sustancialmente idénticas a la primera célula o grupo de células, con la excepción de que la segunda célula o grupo de células no se han tratado del mismo modo (células de control). El grado de inhibición se expresa normalmente como un porcentaje de un nivel de control, p. ej.,

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

II. Agentes de ARNi

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

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

Un experto en la técnica también reconocerá que la región dúplex es una porción funcional principal de un ARNbc, p. ej., una región dúplex de 9 a 36, p. ej., de 15-30 pares de bases. De este modo, siempre que se procese hasta obtener un dúplex funcional de, p. ej., 15-30 pares de bases que tenga como diana un ARN deseado para escindirlo, una molécula de ARN o un complejo de moléculas de ARN que tengan una región dúplex con un tamaño superior a 30 pares de bases puede ser un ARNbc. De este modo, un experto reconocerá que, en un aspecto, un miARN será entonces un ARNbc. Un ARNbc puede no ser un miARN de origen natural. Un agente de ARNi útil para actuar sobre la expresión de ALAS1 puede no generarse en la célula diana mediante la escisión de un ARNbc más largo.

Un ARNbc según se describe en la presente puede incluir además una o más protuberancias de nucleótidos monocatenarias. El ARNbc se puede sintetizar mediante métodos estándar conocidos en la técnica, según se describe adicionalmente más adelante, p. ej., mediante el uso de un sintetizador de ADN automatizado tal como los comercializados por, por ejemplo, Biosearch, Applied Biosystems, Inc. Un gen de ALAS1 puede ser un gen de ALAS1 humano. El gen de ALAS1 puede ser un gen de ALAS1 de rata o ratón. La primera secuencia puede ser una hebra sentido de un ARNbc que incluye una secuencia sentido expuesta en la presente, p. ej., en las Tablas 21-40, y la segunda secuencia puede ser una hebra antisentido de un ARNbc que incluye una secuencia antisentido expuesta en la presente, p. ej., en las Tablas 21-40.

Específicamente, la primera secuencia puede ser una hebra sentido de un ARNbc que incluye una secuencia sentido de la Tabla 2 o la Tabla 3, y la segunda secuencia puede ser una hebra antisentido de un ARNbc que incluye una secuencia antisentido de la Tabla 2 o la Tabla 3. La primera secuencia puede ser una hebra sentido de un ARNbc que incluye una secuencia sentido de la Tabla 2, 3, 6, 7, 8, 9, 14 o 15, y la segunda secuencia es una hebra antisentido de un ARNbc que incluye una secuencia antisentido de la Tabla 2, 3, 6, 7, 8, 9, 14 o 15. La primera secuencia puede ser una hebra sentido de un ARNbc que incluye una secuencia sentido de la Tabla 2, 3, 6, 7, 8, 9, 14, 15, 18 o 20, y la segunda secuencia puede ser una hebra antisentido de un ARNbc que incluye una secuencia antisentido de la Tabla 2, 3, 6, 7, 8, 9, 14, 15, 18 o 20.

En un aspecto, un ARNbc puede incluir al menos secuencias de nucleótidos sentido y antisentido, donde la hebra sentido se selecciona a partir de las secuencias sentido que se proporcionan en la presente, p. ej., en las Tablas 21-40, y la hebra antisentido correspondiente de la hebra sentido se selecciona a partir de las secuencias antisentido que se proporcionan en la presente, p. ej., en las Tablas 21-40.

En un aspecto, un ARNbc puede incluir al menos secuencias de nucleótidos sentido y antisentido, donde la hebra sentido se selecciona a partir de los grupos de secuencias que se proporcionan en las Tablas 2 y 3, y la hebra antisentido correspondiente de la hebra sentido se selecciona a partir de las Tablas 2 y 3. En un aspecto adicional, un ARNbc puede incluir al menos secuencias de nucleótidos sentido y antisentido, donde la hebra sentido se selecciona a partir de los grupos de secuencias que se proporcionan en las Tablas 2, 3, 6, 7, 8, 9, 14 y 15, y la hebra antisentido correspondiente de la hebra sentido se selecciona a partir de las Tablas 2, 3, 6, 7, 8, 9, 14 y 15. En un aspecto adicional, el ARNbc puede incluir al menos secuencias de nucleótidos sentido y antisentido, en las cuales la hebra sentido se selecciona de los grupos de secuencias proporcionadas en las Tablas 2, 3, 6, 7, 8, 9, 14, 15, 18 y 20, y la hebra antisentido correspondiente de la hebra sentido se selecciona de las Tablas 2, 3, 6, 7, 8, 9, 14, 15, 18 y 20.

El ARNi puede ser AD-60501, AD-60519, AD-60901, AD-60495, AD-60900, AD-60935, AD-60879, AD-61190, AD-61191, AD-60865, AD-60861, AD-60876, AD-61193, AD-60519, AD-60519, AD-60901, AD-60405, AD-60887, AD-60923, AD-60434, AD-60892, AD-60419, AD-60924, AD-60445, AD-60925, AD-60926, AD-60820, AD-60843, AD-60819, AD-61140, AD-61141, AD-61142, AD-60835, AD-60839, AD-61143, AD-61144, AD-61145, AD-61146, AD-60892, o AD-60419 (p. ej., incluidas la secuencia de nucleótidos y/o una o más (p. ej., la totalidad) de las modificaciones de los ARNbc mencionados anteriormente). El ARNi puede comprender una hebra antisentido que comprende, o está constituida por, una secuencia antisentido (incluidas una o más (p. ej., la totalidad de las modificaciones)) seleccionada entre la secuencia antisentido de AD-60501, AD-60519, AD-60901, AD-60495, AD-60900, AD-60935, AD-60879, AD-61190, AD-61191, AD-60865, AD-60861, AD-60876, AD-61193, AD-60519, AD-60519, AD-60901, AD-60405, AD-60887, AD-60923, AD-60434, AD-60892, AD-60419, AD-60924, AD-60445, AD-60925, AD-60926, AD-60820, AD-60843, AD-60819, AD-61140, AD-61141, AD-61142, AD-60835, AD-60839, AD-61143, AD-61144, AD-61145, AD-61146, AD-60892, o AD-60419. El ARNi puede comprender una hebra sentido que comprende, o está constituida por, una secuencia sentido (y/o una o más (p. ej., la totalidad) de las modificaciones)) seleccionada entre AD-60501, AD-60519, AD-60901, AD-60495, AD-60900, AD-60935, AD-60879, AD-61190, AD-61191, AD-60865, AD-60861, AD-60876, AD-61193, AD-60519, AD-60519, AD-60901, AD-60405, AD-60887, AD-60923, AD-60434, AD-60892, AD-60419, AD-60924, AD-60445, AD-60925, AD-60926, AD-60820, AD-60843, AD-60819, AD-61140, AD-61141, AD-61142, AD-60835, AD-60839, AD-61143, AD-61144, AD-61145, AD-61146, AD-60892, o AD-60419.

El ARNi puede comprender (i) una hebra antisentido que comprende, o está constituida por, la secuencia de UAAGAUGAGACACUCUUUCUGGU o UAAGAUGAGACACUUCUGGU y/o (ii) una hebra sentido que comprende, o está constituida por, la secuencia de CAGAAAGAGUGUCUCAUCUUA. Uno o más nucleótidos de la hebra antisentido y/o hebra sentido pueden estar modificados como se describe en la presente.

El ARNi puede comprender (i) una hebra antisentido que comprende, o está constituida por, la secuencia antisentido de AD-60489 y/o (ii) una hebra sentido que comprende, o está constituida por, la secuencia sentido de AD-60489 (y/o una o más (p. ej., la totalidad) de las modificaciones de la hebra sentido y/o hebra antisentido de AD-60489).

5 El ARNi puede comprender (i) una hebra antisentido que comprende, o está constituida por, la secuencia antisentido de AD-60519 y/o (ii) una hebra sentido que comprende, o está constituida por, la secuencia sentido de AD-60519 (y/o una o más (p. ej., la totalidad) de las modificaciones de la hebra sentido y/o hebra antisentido de AD-60489).

El ARNi puede comprender (i) una hebra antisentido que comprende, o está constituida por, la secuencia antisentido de AD-61193 y/o (ii) una hebra sentido que comprende, o está constituida por, la secuencia sentido de AD-61193 (y/o una o más (p. ej., la totalidad) de las modificaciones de la hebra sentido y/o hebra antisentido de AD-60489).

10 El ARNi puede comprender (i) una hebra antisentido que comprende, o está constituida por, la secuencia antisentido de AD-60819 y/o (ii) una secuencia sentido que comprende, o está constituida por, la secuencia sentido de AD-60819 (y/o una o más (p. ej., la totalidad) de las modificaciones de la hebra sentido y/o hebra antisentido de AD-60489).

15 Se puede proporcionar el ARNi para inhibir la expresión de ALAS1, donde el ARNbc comprende (i) una hebra antisentido que comprende, o está constituida por, la secuencia antisentido de AD-60489, AD-60519, AD-61193, o AD-60819 (o una secuencia antisentido no modificada correspondiente) y/o (ii) una hebra sentido que comprende, o está constituida por, la secuencia sentido de AD-60489, AD-60519, AD-61193, o AD-60819 (o una secuencia antisentido no modificada correspondiente). El ARNi puede comprender (i) una hebra antisentido que está constituida por la secuencia antisentido de AD-60489, AD-60519, AD-61193 o AD-60819 y/o (ii) una hebra sentido que está constituida por la secuencia sentido de AD-60489, AD-60519, AD-61193 o AD-60819, excepto en que la hebra antisentido y/o hebra sentido del ARNbc difieren en 1, 2 o 3 nucleótidos de la correspondiente secuencia antisentido y/o sentido de AD-60489, AD-60519, AD-61193 o AD-60819.

Las secuencias y modificaciones de AD-60489, AD-60519, AD-61193 y AD-60819 se muestran en la Tabla 44 descrita en la presente.

25 El ARNi puede ser ALN-60519. ALN-60519 puede ser un oligonucleótido bicatenario sintetizado por medios químicos ligado covalentemente a un ligando que contiene tres residuos de N-acetilgalactosamina (GalNAc) (mostrado en la FIG. 57). Todos los nucleótidos de ALN-60519 pueden tener modificaciones de tipo 2'-OMe o 2'-F y pueden estar conectados mediante uniones fosfodiéster 3'-5', y formar de esta manera el esqueleto azúcar-fosfato del oligonucleótido. La hebra sentido y la hebra antisentido de ALN-60519 contienen 21 y 23 nucleótidos, respectivamente. El extremo 3' de la hebra sentido de ALN-60519 está conjugado con el resto de GalNAc triantenario (denominado L96) mediante una unión fosfodiéster. La hebra antisentido contiene cuatro uniones fosforotioato, dos en el extremo 3' y dos en el extremo 5'. La hebra sentido de ALN-60519 contiene dos uniones fosforotioato en el extremo 5'. Los 21 nucleótidos de la hebra sentido de ALN-60519 se hibridan con los 21 nucleótidos complementarios de la hebra antisentido, y forman de esta manera 21 pares de bases nucleotídicas y una protuberancia de dos bases en el extremo 3' de la hebra antisentido. Las dos hebras sencillas, la hebra sentido y la hebra antisentido, de ALN-60519 se pueden sintetizar mediante síntesis de oligonucleótidos en fase sólida convencional, empleando química de fosforamiditos estándar con el grupo 5'-hidroxilo protegido como un éter de dimetoxitriphenilmetilo (DMT). Cada hebra se puede ensamblar desde el extremo 3' al 5' mediante la adición secuencial de nucleósidos fosforamiditos protegidos.

40 En estos aspectos, una de las dos secuencias es complementaria respecto a la otra de las dos secuencias, siendo una de las secuencias sustancialmente complementaria respecto a una secuencia de un ARNm generado mediante la expresión de un gen ALAS1. En este sentido, un ARNbc incluirá dos oligonucleótidos, donde un oligonucleótido se describe en la presente como la hebra sentido y el segundo oligonucleótido se describe como la hebra antisentido correspondiente de la hebra sentido. Según se describe en otras partes de la presente y se sabe en la técnica, las secuencias complementarias de un ARNbc también pueden estar contenidas como regiones autocomplementarias de una única molécula de ácido nucleico, en lugar de estar en oligonucleótidos separados.

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

Además, los ARN proporcionados en las tablas de la presente identifican un sitio en un transcrito de ALAS1 que es susceptible de sufrir una escisión mediada por RISC. En este sentido, la presente divulgación expone además ARNi que actúan dentro de una de estas secuencias. Según se utiliza en la presente, se dice que un ARNi actúa dentro de un sitio particular de un transcrito de ARN si el ARNi fomenta la escisión del transcrito en cualquier lugar dentro de ese sitio particular. Un ARNi de este tipo incluye generalmente al menos 15 nucleótidos contiguos de una de las secuencias proporcionadas en la presente, p. ej., en las Tablas 2, 3, 6, 7, 8, 9, 14, 15, 18, 20 y en las Tablas 21-40 acoplados a secuencias de nucleótidos adicionales procedentes de la región contigua a la secuencia seleccionada en un gen ALAS1.

Aunque una secuencia diana tiene generalmente una longitud de 15-30 nucleótidos, existe una gran variación en la idoneidad de secuencias particulares en este intervalo para dirigir la escisión de cualquier ARN diana determinado. Varios paquetes de software y las directrices que se exponen en la presente proporcionan una guía para la identificación de secuencias diana óptimas para cualquier diana génica determinada, pero también se puede adoptar una estrategia empírica en la cual se coloca una "ventana" o "máscara" de un tamaño determinado (a modo de ejemplo no limitante, 21 nucleótidos) de forma literal o figurada (que incluye, p. ej., *in silico*) sobre la secuencia de ARN diana para identificar secuencias en el intervalo de tamaños que puedan servir como secuencias diana. Moviendo la "ventana" de la secuencia progresivamente un nucleótido hacia adelante o hacia atrás respecto a una localización de la secuencia diana inicial, se puede identificar la siguiente secuencia diana potencial, hasta que se identifica el conjunto completo de posibles secuencias para cualquier tamaño seleccionado de la diana determinada. Este proceso, acoplado con la síntesis y la evaluación sistemáticas de las secuencias identificadas (utilizando ensayos como los que se describen en la presente o se conocen en la técnica) para identificar las secuencias que presentan un comportamiento óptimo, permite identificar las secuencias de ARN que, cuando actúan como diana de un agente de ARNi, median la mejor inhibición de la expresión del gen diana. De este modo, aunque las secuencias identificadas, por ejemplo, en las de la presente, representan secuencias diana eficaces, se contempla que se puede conseguir una optimización adicional de la eficiencia de la inhibición "desplazando la ventana" progresivamente un nucleótido hacia adelante o hacia atrás en las secuencias determinadas para identificar secuencias con unas características de inhibición iguales o mejores.

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

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

Al menos un extremo de un ARNbc puede tener una protuberancia de nucleótidos monocatenaria de 1 a 4, generalmente 1 o 2, nucleótidos. Los ARNbc que tienen al menos una protuberancia de nucleótidos presentan, inesperadamente, unas propiedades inhibitorias superiores con relación a sus homólogos de extremos romos. Aún más, el ARN de un ARNi, p. ej., un ARNbc, se puede modificar químicamente para mejorar su estabilidad u otras características beneficiosas. Los ácidos nucleicos que se exponen en la presente se pueden sintetizar y/o modificar mediante métodos muy establecidos en la técnica tales como los que se describen en "Current protocols in nucleic acid chemistry," Beaucage, S.L. *et al.* (Eds.), John Wiley & Sons, Inc., Nueva York, NY, EE. UU. Las modificaciones incluyen, por ejemplo, (a) modificaciones de los extremos, p. ej., modificaciones del extremo 5' (fosforilación,

conjugación, uniones invertidas, etc.), modificaciones del extremo 3' (conjugación, nucleótidos de ADN, uniones invertidas, etc.) (b) modificaciones de las bases, p. ej., reemplazo por bases estabilizantes, bases desestabilizantes o bases que se aparean con bases con un mayor repertorio de parejas, eliminación de bases (nucleótidos sin bases), o bases conjugadas, (c) modificaciones del azúcar (p. ej., en la posición 2' o en la posición 4', o que tengan un azúcar acíclico) o reemplazo del azúcar, así como también (d) modificaciones del esqueleto, que incluyen la modificación o el reemplazo de las uniones de tipo fosfodiéster. Los ejemplos específicos de compuestos de ARN útiles en esta divulgación incluyen, sin carácter limitante, ARN que contienen esqueletos modificados o uniones entre nucleósidos no naturales. Los ARN que tienen esqueletos modificados incluyen, entre otros, aquellos que no contienen un átomo de fósforo en el esqueleto. A los efectos de esta memoria descriptiva y según se los denomina en ocasiones en la técnica, los ARN modificados que no contienen un átomo de fósforo en su esqueleto entre los nucleósidos también se pueden considerar oligonucleósidos. En particular, el ARN modificado puede contener un átomo de fósforo en su esqueleto entre los nucleósidos.

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

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

Los esqueletos de ARN modificados que no incluyen ningún átomo de fósforo en ellos tienen esqueletos que se forman mediante uniones entre nucleósidos de tipo alquilo o cicloalquilo de cadena corta, uniones entre nucleósidos de tipo alquilo o cicloalquilo y heteroátomos mixtas, o una o más uniones entre nucleósidos heteroaromáticas o heterocíclicas de cadena corta. Estos incluyen los que tienen uniones de tipo morfolino (formadas en parte a partir de la porción del azúcar de un nucleósido); esqueletos de tipo siloxano; esqueletos de tipo sulfuro, sulfóxido y sulfona; esqueletos de tipo formacetilo y tioformacetilo; esqueletos de tipo metilenformacetilo y tioformacetilo; esqueletos que contienen alquenos; esqueletos de tipo sulfamato; esqueletos de tipo metilenimino y metilenhidrazino; esqueletos de tipo sulfonato y sulfonamida; esqueletos de tipo amida; y otros que tienen partes de componentes N, O, S y CH₂ mixtas.

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

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

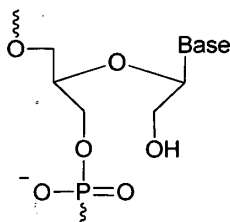
Algunos aspectos expuestos en la presente incluyen ARN con esqueletos de tipo fosforotioato y oligonucleósidos con esqueletos que contienen heteroátomos, y en particular --CH₂--NH--CH₂--, --CH₂--N(CH₃)--O--CH₂--[que se conoce como un esqueleto de tipo metilen(metilimino) o MMI], --CH₂--O--N(CH₃)--CH₂--, --CH₂--N(CH₃)--N(CH₃)--CH₂-- y --N(CH₃)--CH₂--CH₂--[donde el esqueleto de tipo fosfodiéster nativo se representa como --O--P--O--CH₂--] de la Pat. de EE. UU. N.^º 5.489.677 a la que se ha hecho referencia anteriormente y los esqueletos de tipo amida de la Pat. de EE. UU. N.^º 5.602.240 a la que se ha hecho referencia anteriormente. Los ARN que se exponen en la presente pueden tener las estructuras del esqueleto de tipo morfolino de la Pat. de EE. UU. N.^º 5.036.506 a la que se ha hecho referencia anteriormente.

Los ARN modificados también pueden contener uno o más restos de azúcar sustituidos. Los ARNi, p. ej., ARNbc que se exponen en la presente pueden incluir uno de los siguientes grupos en la posición 2': OH; F; O-, S- o N-

alquilo; O-, S- o N-alquenilo; O-, S- o N-alquinilo; o O-alquil-O-alquilo, donde el alquilo, alquenilo y alquinilo pueden ser un alquilo C₁-C₁₀, alquenilo y alquinilo C₂-C₁₀ sustituido o no sustituido. Las modificaciones adecuadas ilustrativas incluyen O[(CH₂)_nO]_mCH₃, O(CH₂)_nOCH₃, O(CH₂)_nNH₂, O(CH₂)_nCH₃, O(CH₂)_nONH₂ y O(CH₂)_nON[(CH₂)_nCH₃]₂, donde n y m están comprendidos entre 1 y aproximadamente 10. En otros aspectos, los ARNbc pueden incluir uno de los siguientes grupos en la posición 2': alquilo inferior C₁-C₁₀, alquilo inferior sustituido, alcarilo, aralquilo, O-alcarilo u O-aralquilo, SH, SCH₃, OCN, Cl, Br, CN, CF₃, OCF₃, SOCH₃, SO₂CH₃, ONO₂, NO₂, N₃, NH₂, heterocicloalquilo, heterocicloalcarilo, aminoalquilamino, polialquilamino, sililo sustituido, un grupo que escinde ARN, un grupo marcador, un intercalador, un grupo para mejorar las propiedades farmacocinéticas de un ARNi o un grupo para mejorar las propiedades farmacodinámicas de un ARNi, y otros sustituyentes con propiedades similares. La modificación puede incluir un 2'-metoxietoxi (2'-O--CH₂CH₂OCH₃, también conocido como 2'-O-(2-metoxietilo) o 2'-MOE) (Martin *et al.*, *Helv. Chim. Acta*, 1995, 78:486-504), es decir, un grupo alcoxi-alcoxi. Otra modificación ilustrativa es 2'-dimetilaminoetoxietoxi, es decir, un grupo O(CH₂)₂ON(CH₃)₂, también conocido como 2'-DMAOE, según se describe en los ejemplos de la presente más adelante, y 2'-dimetilaminoetoxietoxi (que también se conoce en la técnica como 2'-O-dimetilaminoetoxietilo o 2'-DMAEOE), es decir, 2'-O--CH₂--O--CH₂--N(CH₂)₂, que también se describe en los ejemplos de la presente más adelante.

Un agente de ARNi puede comprender uno o más nucleótidos (o nucleósidos) acíclicos (p. ej., aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más). La hebra sentido o la hebra antisentido, o la hebra sentido y la hebra antisentido, pueden incluir menos de cinco nucleótidos acíclicos por hebra (p. ej., cuatro, tres, dos o un nucleótido acíclico por hebra). El uno o más nucleótidos acíclicos se puede encontrar, por ejemplo, en la región bicatenaria de la hebra sentido o antisentido o de ambas hebras; en el extremo 5', el extremo 3', ambos extremos 5' y 3' de la hebra sentido o antisentido, o ambas hebras, del agente de ARNi. Uno o más nucleótidos acíclicos pueden estar presentes en las posiciones 1 a 8 de la hebra sentido o antisentido, o ambas. Uno o más nucleótidos acíclicos se pueden encontrar en la hebra antisentido en las posiciones 4 a 10 (p. ej., posiciones 6-8) desde el extremo 5' de la hebra antisentido. El uno o más nucleótidos acíclicos se pueden encontrar en una o ambas protuberancias terminales 3' del agente de ARNi.

La expresión "nucleótido acíclico" o "nucleósido acíclico", tal como se utiliza en la presente se refiere a cualquier nucleótido o nucleósido que tiene un azúcar acíclico, p. ej., una ribosa acíclica. Un nucleótido o nucleósido acíclico ejemplar puede incluir una base nucleotídica, p. ej., una base nucleotídica modificada o de origen natural (p. ej., una base nucleotídica como se describe en la presente). Un enlace entre cualquiera de los carbonos de la ribosa (C1, C2, C3, C4 o C5) puede estar independientemente o en combinación ausente del nucleótido. El enlace entre los carbonos C2-C3 del anillo de ribosa puede estar ausente, p. ej., un monómero de 2'-3'-seco-nucleótido acíclico). Se describen nucleótidos acíclicos ejemplares en el documento US 8.314.227. Por ejemplo, un nucleótido acíclico puede incluir cualquiera de los monómeros D-J en las Figuras 1-2 del documento US 8.314.227. El nucleótido acíclico puede incluir el siguiente monómero:



donde Base es una nucleobase, p. ej., una nucleobase modificada o de origen natural (p. ej., una nucleobase como se describe en la presente).

El nucleótido acíclico puede estar modificado o derivatizado, p. ej., acoplado el nucleótido acíclico a otro resto, p. ej., un ligando (p. ej., un GalNAc, un ligando de colesterol), un alquilo, una poliamina, un azúcar, un polipéptido, entre otros.

El agente de ARNi puede incluir uno o más nucleótidos acíclicos y uno o más LNA (p. ej., un LNA como se describe en la presente). Por ejemplo, uno o más nucleótidos acíclicos y/o uno o más LNA pueden estar presentes en la hebra sentido, la hebra antisentido o ambas. El número de nucleótidos acíclicos en una hebra puede ser idéntico o diferente del número de LNA en la hebra opuesta. La hebra sentido y/o la hebra antisentido pueden comprender menos de cinco LNA (p. ej., cuatro, tres, dos o un LNA) ubicados en la región bicatenaria o una protuberancia 3'. Uno o dos LNA pueden estar ubicados en la región bicatenaria o la protuberancia 3' de la hebra sentido. Como alternativa, o en combinación, la hebra sentido y/o la hebra antisentido comprende menos de cinco nucleótidos acíclicos (p. ej., cuatro, tres, dos o un nucleótido acíclico) en la región bicatenaria o protuberancia 3'. La hebra sentido del agente de ARNi puede comprender uno o dos LNA en la protuberancia 3' de la hebra sentido y uno o dos nucleótidos acíclicos en la región bicatenaria de la hebra antisentido (p. ej., en las posiciones 4 a 10 (p. ej., posiciones 6-8) desde el extremo 5' de la hebra antisentido) del agente de ARNi.

La inclusión de uno o más nucleótidos acíclicos (solos o además del uno o más LNA) en el agente de ARNi puede dar como resultado uno o más (o la totalidad) de: (i) una reducción en un efecto inespecífico; (ii) una reducción en la

participación de hebra pasajera en la iARN; (iii) un incremento en la especificidad de la hebra guía por su ARNm diana; (iv) una reducción en un efecto inespecífico del microARN; (v) un incremento en la estabilidad; o (vi) un incremento en la resistencia a la degradación, de la molécula de ARNi.

Otras modificaciones incluyen 2'-metoxi (2'-OCH₃), 2'-aminopropoxi (2'-OCH₂CH₂CH₂NH₂) y 2'-fluoro (2'-F). También se pueden realizar modificaciones similares en otras posiciones del ARN de un ARNi, particularmente la posición 3' del azúcar en el nucleótido terminal 3' o en ARNbc con uniones 2'-5' y la posición 5' del nucleótido terminal 5'. Los ARNi también pueden tener miméticos de azúcares tales como restos de tipo ciclobutilo en lugar del azúcar de tipo pentofuranosilo. Las patentes de EE. UU. representativas que describen la preparación de tales estructuras de azúcares modificadas incluyen, sin carácter limitante, las Pat. de EE. UU. N.^{es} 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 propiedad en general de la presente solicitud..

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

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

El ARN de un ARNi también se puede modificar para que incluya uno o más (p. ej., aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más) ácidos nucleicos bloqueados (LNA, por sus siglas en inglés)(también denominados en la presente como "nucleótidos bloqueados"). Un ácido nucleico bloqueado puede ser un nucleótido que tiene un resto de ribosa modificado en el cual el resto de ribosa comprende un puente adicional que conecta, p. ej., los carbonos 2' y 4'. Esta estructura "bloquea" de forma eficaz la ribosa en la conformación estructural 3'-endo. Se ha demostrado que la adición de ácidos nucleicos bloqueados a los ARNip incrementa la estabilidad del ARNip en suero, incrementa la estabilidad térmica y reduce los efectos laterales (Elmen, J. *et al.*, (2005) *Nucleic Acids Research* 33(1):439-447; Mook, OR. *et al.*, (2007) *Mol Canc Ther* 6(3):833-843; Grunweller, A. *et al.*, (2003) *Nucleic Acids Research* 31(12):3185-3193).

Las Patentes de EE. UU. representativas que describen la preparación de nucleótidos de ácidos nucleicos bloqueados incluyen, sin carácter limitante, las siguientes: Pat. de EE. UU. N.^{es} 6.268.490, 6.670.461, 6.794.499, 6.998.484, 7.053.207, 7.084.125, 7.399.845 y 8.314.227. Los LNA ejemplares incluyen, sin carácter limitante, un nucleótido 2',4'-C-metileno biciclo (remítase, por ejemplo, a Wengel *et al.*, Publicación Internacional PCT N.^o WO 00/66604 y WO 99/14226).

Los agentes de ARNi pueden incluir uno o más (p. ej., aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más) nucleótidos con fijación de G (G-clamp). Un nucleótido con fijación de G es un análogo de citosina modificado donde las modificaciones confieren la capacidad de formar enlaces de hidrógeno tanto entre las caras de Watson-Crick

como las de Hoogsteen de una guanina complementaria dentro de un dúplex, remítase, por ejemplo, a Lin y Matteucci, 1998, *J. Am. Chem. Soc.*, 120, 8531-8532. Una única sustitución de un análogo con fijación de G dentro de un oligonucleótido puede dar como resultado una mejora sustancial de estabilidad térmica helicoidal y discriminación de apareamientos erróneos cuando se hibrida con oligonucleótidos complementarios. La inclusión de

tales nucleótidos en las moléculas de ARNi puede dar como resultado una mejora de la afinidad y especificidad por las dianas de ácido nucleico, secuencias complementarias o hebras molde.

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

Motivos del ARNi

La secuencia de la hebra sentido se puede representar mediante la fórmula (I):



donde:

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

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

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

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

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

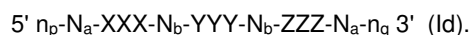
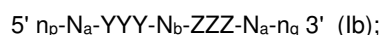
donde *N_b* e *Y* no tienen la misma modificación; y

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

N_a y/o *N_b* pueden comprender modificaciones de patrón alterno.

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

i puede ser 1 y *j* puede ser 0, o *i* puede ser 0 y *j* puede ser 1, o tanto *i* como *j* pueden ser 1. Por consiguiente, la hebra sentido se puede representar mediante las siguientes fórmulas:



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

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

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

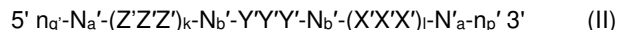
Cada uno de los grupos X, Y y Z puede ser igual o diferente de los demás.

i puede ser 0 y j puede ser 0, y la hebra sentido se puede representar mediante la fórmula:



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

5 La secuencia de la hebra antisentido del ARNi se puede representar mediante la fórmula (II):



donde:

k y l son cada uno independientemente 0 o 1;

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

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

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

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

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

y

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

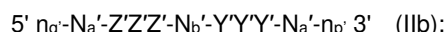
N_a' y/o N_b' pueden comprender modificaciones de patrón alterno.

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

El motivo $Y'Y'Y'$ puede consistir en que todos los nucleótidos presentan la modificación 2'-OMe.

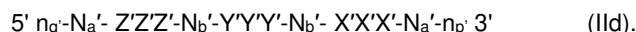
k puede ser 1 y l puede ser 0, o k puede ser 0 y l puede ser 1, o tanto k como l pueden ser 1.

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



30 $5' n_q-N_a'-Y'Y'Y'-N_b'-X'X'X'-n_p' 3' \text{ (IIc);}$

o

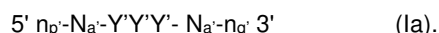


35 Cuando la hebra antisentido se representa mediante la fórmula (IIb), N_b' representa una secuencia oligonucleotídica que comprende 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 o 0 nucleótidos modificados. Cada N_a' representa independientemente una secuencia oligonucleotídica que comprende 2-20, 2-15 o 2-10 nucleótidos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

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

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

k puede ser 0 y l puede ser 0, y la hebra antisentido se puede representar mediante la fórmula:



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

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

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

10 La hebra sentido del agente de iARN puede contener un motivo YYY que se encuentre en las posiciones 9, 10 y 11 de la hebra cuando la región dúplex tiene 21 nt, empezando a contar a partir del primer nucleótido del extremo 5' u, opcionalmente, empezando a contar en el primer nucleótido apareado dentro de la región dúplex, a partir del extremo 5'; e Y representa una modificación de tipo 2'-F. La hebra sentido puede contener adicionalmente un motivo XXX o motivos ZZZ como modificaciones laterales en el extremo opuesto de la región dúplex; y cada motivo XXX y ZZZ representa independientemente una modificación de tipo 2'-OMe o una modificación de tipo 2'-F.

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

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

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

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

donde:

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

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

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

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

donde

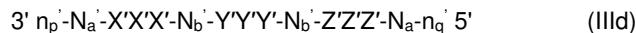
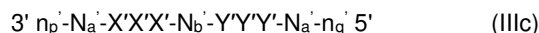
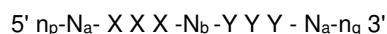
35 cada n_p , n_p , n_q y n_q , cada uno de los cuales puede estar presente o no, representa independientemente un nucleótido protuberante; y

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

40 i puede ser 0 y j puede ser 0; o i puede ser 1 y j puede ser 0; o i puede ser 0 y j puede ser 1; o tanto i como j pueden ser 0; o tanto i como j pueden ser 1. k puede ser 0 y l puede ser 0; o k puede ser 1 y l puede ser 0; o k puede ser 0 y l puede ser 1; o tanto k como l pueden ser 0; o tanto k como l pueden ser 1.

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

45 $5' n_p - N_a - Y Y Y - N_a - n_q 3'$
 $3' n_p' - N_a' - Y'Y'Y' - N_a' n_q' 5'$ (IIIa)
 $5' n_p - N_a - Y Y Y - N_b - Z Z Z - N_a - n_q 3'$
 $3' n_p' - N_a' - Y'Y'Y' - N_b' - Z'Z'Z' - N_a' n_q' 5'$ (IIIb)



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

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

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

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

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

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

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

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

La modificación en el nucleótido Y puede ser diferente de la modificación en el nucleótido Y', la modificación en el nucleótido Z puede ser diferente de la modificación en el nucleótido Z' y/o la modificación en el nucleótido X puede ser diferente de la modificación en el nucleótido X'.

- 35 Cuando el agente de iARN se representa mediante la fórmula (IIId), las modificaciones en N_a pueden ser modificaciones de tipo 2'-O-metilo o 2'-fluoro. Asimismo, cuando el agente de iARN se representa mediante la fórmula (IIId), las modificaciones en N_a pueden ser modificaciones de tipo 2'-O-metilo o 2'-fluoro, $n_p' > 0$ y al menos un n_p' puede estar unido a un nucleótido contiguo mediante una unión de tipo fosforotioato. Aun más, cuando el agente de iARN se representa mediante la fórmula (IIId), las modificaciones en N_a pueden ser modificaciones de tipo 2'-O-metilo o 2'-fluoro, $n_p' > 0$ y al menos un n_p' puede estar unido a un nucleótido contiguo mediante una unión de tipo fosforotioato, y la hebra sentido puede estar conjugada con uno o más derivados de tipo GalNAc unidos mediante un conector ramificado bivalente o trivalente. Asimismo, cuando el agente de iARN se representa mediante la fórmula (IIId), las modificaciones en N_a pueden ser modificaciones de tipo 2'-O-metilo o 2'-fluoro, $n_p' > 0$ y al menos un n_p' está unido a un nucleótido contiguo mediante una unión de tipo fosforotioato, la hebra sentido puede comprender al menos una unión de tipo fosforotioato y la hebra sentido puede estar conjugada con uno o más derivados de tipo GalNAc unidos mediante un conector ramificado bivalente o trivalente.

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

El agente de iARN puede ser un multímero que contiene al menos dos dúplex representados mediante la fórmula (III), (IIIa), (IIIb), (IIIc) y (IIId), donde los dúplex están conectados mediante un conector. El conector puede ser

escindible o no escindible. Opcionalmente, el multímero comprende además un ligando. Cada uno de los dúplex puede tener como diana el mismo gen o dos genes diferentes, o cada uno de los dúplex puede tener como diana el mismo gen en dos sitios diana diferentes.

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

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

Conjugados de ARNi

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

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

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

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

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

55 El ligando puede ser un ligando de tipo GalNAc que comprende uno o más derivados de tipo N-acetilgalactosamina (GalNAc). En la sección titulada "Conjugados de carbohidratos" se proporciona una descripción adicional de los ligandos de tipo GalNAc.

Otros ejemplos de ligandos incluyen tintes (p. ej., acridinas), agentes reticulantes (p. ej., psoraleno, mitomicina C), porfirinas (TPPC4, texafirina, Saffirina), hidrocarburos aromáticos policíclicos (p. ej., fenazina, dihidrofenazina),

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

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

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

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

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

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

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

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

Conjugados de lípidos

- El ligando puede ser un lípido o una molécula basada en un lípido. Este lípido o esta molécula basada en un lípido se puede unir normalmente a una proteína del suero tal como la albúmina de suero humano (HSA). Un ligando de unión a HSA permite distribuir el conjugado en un tejido diana, p. ej., un tejido diana no renal del cuerpo. Por ejemplo, el tejido diana puede ser el hígado, incluidas las células parenquimales del hígado. También se pueden utilizar como ligandos otras moléculas que se puedan unir a HSA. Por ejemplo, se puede utilizar la neproxina o la aspirina. Un lípido o un ligando basado en un lípido puede (a) incrementar la resistencia a la degradación del conjugado, (b) incrementar el direccionamiento o el transporte hacia una célula o membrana celular diana y/o (c) se puede utilizar para ajustar la unión a una proteína del suero, p. ej., HSA.
- Un ligando basado en un lípido se puede utilizar para modular, p. ej., controlar (p. ej., inhibir) la unión del conjugado a un tejido diana. Por ejemplo, un lípido o un ligando basado en un lípido que se una a HSA con una unión más fuerte presentará una menor probabilidad de ser dirigido hacia el riñón y, por consiguiente, presentará una menor probabilidad de ser expulsado del cuerpo. Un lípido o un ligando basado en un lípido que se una a HSA con una unión menos fuerte se puede utilizar para dirigir el conjugado hacia el riñón.
- El ligando basado en un lípido puede unirse a HSA. Por ejemplo, el ligando se puede unir a HSA con una afinidad suficiente de manera que la distribución del conjugado en un tejido no renal se vea potenciada. Sin embargo, normalmente la afinidad no es tan fuerte como para que la unión ligando-HSA no se pueda revertir.
- El ligando basado en un lípido puede unirse a HSA débilmente o no se une en absoluto, de manera que la distribución del conjugado en el riñón se vea potenciada. También se pueden utilizar otros restos que ejerzan un direccionamiento hacia las células renales, en lugar o además del ligando basado en un lípido.
- El ligando puede ser un resto, p. ej., una vitamina, que es absorbido por una célula diana, p. ej., una célula proliferante. Estos son particularmente útiles para tratar trastornos caracterizados por la proliferación de células no deseadas, p. ej., células cancerosas, p. ej., de tipo maligno o no maligno. Las vitaminas ilustrativas incluyen la vitamina A, E y K. Otras vitaminas ilustrativas incluyen la vitamina B, p. ej., ácido fólico, B12, riboflavina, biotina, piridoxal u otras vitaminas o nutrientes absorbidos por las células cancerosas. También se incluyen HSA y lipoproteínas de baja densidad (LDL).

Agentes de permeación celular

- En otro aspecto, el ligando es un ligando de permeación celular tal como un ligando de permeación celular helicoidal. El agente puede ser anfifático. Un agente ilustrativo es un péptido tal como tat o antenopedia. Si el agente es un péptido, este puede ser un péptido modificado, que incluye un peptidomimético, invertómeros, conectores no peptídicos o pseudopeptídicos y el uso de aminoácidos D. El agente helicoidal es normalmente un agente de hélice α y puede tener una fase lipófila y lipófoba.
- El ligando puede ser un péptido o peptidomimético. Un peptidomimético (también denominado en la presente como oligopeptidomimético) es una molécula capaz de plegarse en una estructura tridimensional definida similar a la de un péptido natural. La unión de péptidos y peptidomiméticos a agentes de ARNi puede afectar a la distribución farmacocinética del ARNi, por ejemplo, potenciando el reconocimiento y la absorción celular. El resto peptídico o peptidomimético puede tener una longitud de aproximadamente 5-50 aminoácidos, p. ej., una longitud de aproximadamente 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50 aminoácidos.
- Un péptido o peptidomimético puede ser, por ejemplo, un péptido de permeación celular, un péptido catiónico, un péptido anfifático o un péptido hidrófobo (p. ej., constituido principalmente por Tyr, Trp o Phe). El resto peptídico puede ser un péptido dendrímérico, un péptido de movimiento restringido o un péptido reticulado. En otra alternativa, el resto peptídico puede incluir una secuencia de translocación de membrana hidrófoba (MTS, por sus siglas en inglés). Un péptido que contiene una MTS hidrófoba a modo de ejemplo es RFGF, que tiene la secuencia de aminoácidos AAVALLPAVLLALLAP (SEQ ID NO:3367). Un análogo de RFGF (p. ej., la secuencia de aminoácidos AALLPVLLAAP (SEQ ID NO:3368)) que contenga una MTS hidrófoba también puede ser un resto de direccionamiento. El resto peptídico puede ser un péptido de "suministro", el cual puede transportar moléculas polares grandes, incluidos péptidos, oligonucleótidos y proteínas, a través de las membranas celulares. Por ejemplo, se ha demostrado que la proteína Tat del VIH (GRKKRRQRRPPQ (SEQ ID NO:3369)) y una proteína de Drosophila Antennapedia (RQIKWFAQNRMKWKK (SEQ ID NO: 3370)) son capaces de actuar como péptidos de suministro. Un péptido o peptidomimético puede ser codificado por una secuencia aleatoria de ADN, tal como un péptido identificado a partir de una colección de presentación en pagos o una colección combinatoria de una-microesfera-un-compuesto (OBOC, por sus siglas en inglés) (Lam et al., Nature, 354:82-84, 1991). Normalmente, el péptido o peptidomimético unido a un agente de ARNbc mediante una unidad monomérica incorporada es un péptido de direccionamiento hacia una célula tal como el péptido arginina-glicina-ácido aspártico (RGD) o un mimético de RGD. Un resto peptídico puede tener una longitud comprendida entre aproximadamente 5 aminoácidos y aproximadamente 40 aminoácidos. Los restos peptídicos pueden presentar una modificación estructural, por ejemplo, para incrementar la estabilidad o dirigir propiedades conformacionales. Se puede utilizar cualquiera de las modificaciones estructurales que se describen más adelante.

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

5 conjugados preferidos de este ligando tienen como diana PECAM-1 o VEGF.

Se puede utilizar un resto peptídico RGD para que actúe sobre un tipo celular particular, p. ej., una célula tumoral tal como una célula tumoral endotelial o una célula tumoral de cáncer de mama (Zitzmann et al., Cancer Res., 62:5139-43, 2002). Un péptido RGD puede facilitar el direccionamiento de un agente de ARN^{bc} hacia tumores de varios tejidos diferentes, que incluyen el pulmón, el riñón, el bazo o el hígado (Aoki et al., Cancer Gene Therapy 8:783-787, 10 2001). Normalmente, el péptido RGD facilitará el direccionamiento de un agente de ARNⁱ hacia el riñón. El péptido RGD puede ser lineal o cíclico y puede estar modificado, p. ej., glicosilado o metilado, para facilitar el direccionamiento hacia tejidos específicos. Por ejemplo, un péptido RGD glicosilado puede suministrar un agente de ARNⁱ a una célula tumoral que exprese α V β 3 (Haubner et al., Jour. Nucl. Med., 42:326-336, 2001).

15 Un "péptido de permeación celular" es capaz de penetrar en una célula, p. ej., una célula microbiana, tal como una célula bacteriana o fúngica, o una célula de mamífero tal como una célula humana. Un péptido de permeación en células microbianas puede ser, por ejemplo, un péptido lineal de hélice α (p. ej., LL-37 o Ceropina P1), un péptido que contenga un enlace de tipo disulfuro (p. ej., α -defensina, β -defensina o batenecina) o un péptido que contenga únicamente uno o dos aminoácidos dominantes (p. ej., PR-39 o indolicidina). Un péptido de permeación celular también puede incluir una señal de localización nuclear (NLS, por sus siglas en inglés). Por ejemplo, un péptido de 20 permeación celular puede ser un péptido anfipático bipartito tal como MPG, el cual deriva del dominio del péptido de fusión de gp41 del VIH-1 y NLS del antígeno T grande SV40 (Simeoni et al., Nucl. Acids Res. 31:2717-2724, 2003).

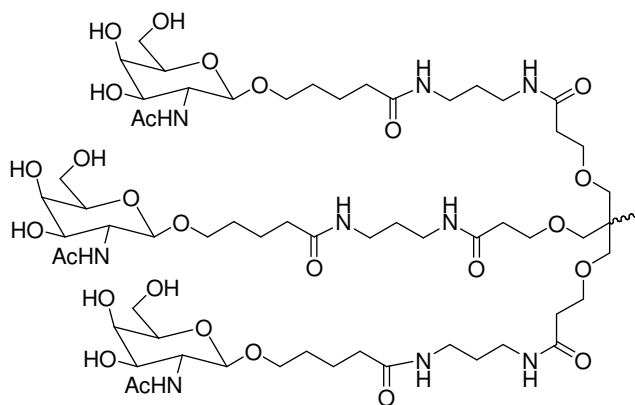
Conjugados de carbohidratos

En las composiciones y los métodos de la divulgación, un oligonucleótido de tipo ARNⁱ puede comprender además un carbohidrato. Los ARNⁱ conjugados con carbohidratos son convenientes para el suministro *in vivo* de ácidos 25 nucleicos, así como también para composiciones adecuadas para el uso terapéutico *in vivo*, según se describe en la presente. El término "carbohidrato", tal como se utiliza en la presente, se refiere a un compuesto que o bien es un carbohidrato de por sí constituido por una o más unidades de monosacáridos que contienen al menos 6 átomos de carbono (que pueden ser lineales, ramificados o cíclicos) con un átomo de oxígeno, nitrógeno o azufre unido a cada 30 átomo de carbono; o un compuesto que tiene como parte de este un resto de carbohidrato constituido por una o más unidades de monosacáridos, teniendo cada una de ellas al menos seis átomos de carbono (que pueden ser lineales, ramificados o cíclicos), con un átomo de oxígeno, nitrógeno o azufre unido a cada átomo de carbono. Los carbohidratos representativos incluyen los azúcares (mono-, di-, tri- y oligosacáridos que contienen desde aproximadamente 4, 5, 6, 7, 8 o 9 unidades de monosacáridos) y polisacáridos tales como almidones, glicógeno, 35 celulosa y gomas de polisacáridos. Los monosacáridos específicos incluyen azúcares C5 y los azúcares anteriores (p. ej., C5, C6, C7 o C8); los di- y trisacáridos incluyen azúcares que tienen dos o más unidades de monosacáridos (p. ej., C5, C6, C7 o C8).

Un conjugado de carbohidrato puede comprender un monosacárido. El monosacárido es una N-acetilgalactosamina (GalNAc). Los conjugados de tipo GalNAc se describen, por ejemplo, en la Patente de EE. UU. N.º 8.106.022. El 40 conjugado de tipo GalNAc puede servir como ligando que dirige el ARNⁱ hacia células particulares. El conjugado de tipo GalNAc dirige el ARNⁱ hacia células hepáticas, p. ej., actuando como un ligando para el receptor de la asialoglicoproteína de las células hepáticas (p. ej., los hepatocitos).

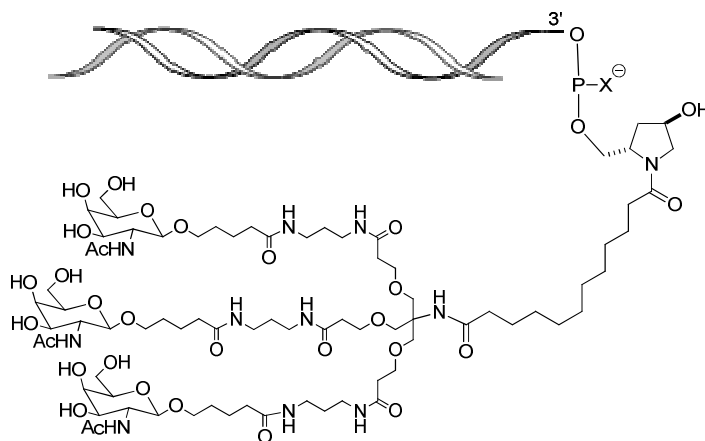
El conjugado de carbohidrato puede comprender uno o más derivados de tipo GalNAc. Los derivados de tipo GalNAc se pueden unir mediante un conector, p. ej., un conector ramificado bivalente o trivalente. El conjugado de 45 tipo GalNAc puede estar conjugado con el extremo 3' de la hebra sentido. El conjugado de tipo GalNAc puede estar conjugado con el agente de ARNⁱ (p. ej., con el extremo 3' de la hebra sentido) mediante un conector, p. ej., un conector según se describe en la presente.

El conjugado de tipo GalNAc puede ser

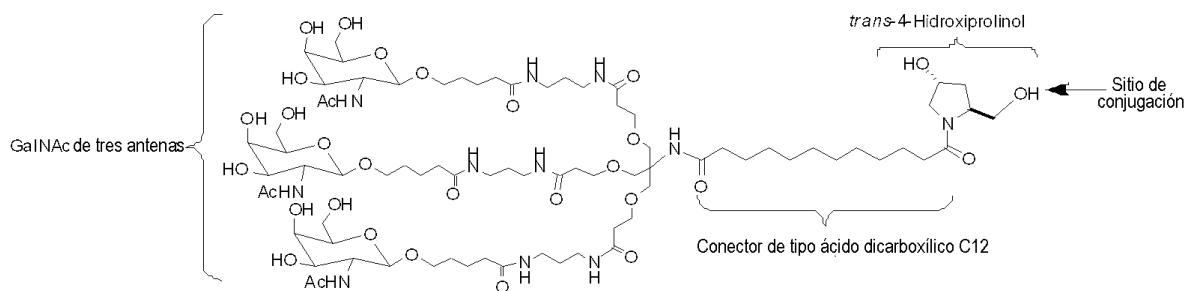


Fórmula II.

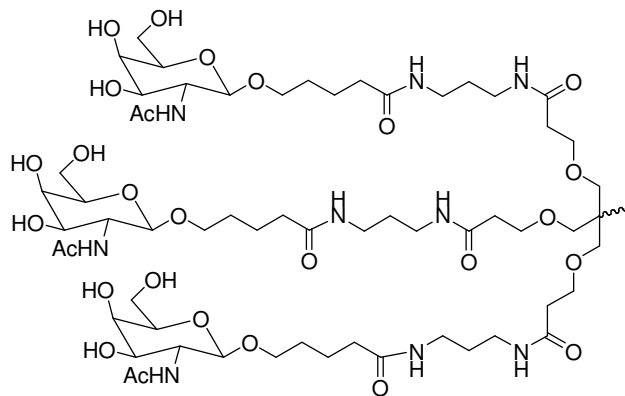
El agente de iARN puede estar unido al conjugado de carbohidrato mediante un conector, según se muestra en la siguiente representación esquemática, donde X es O o S



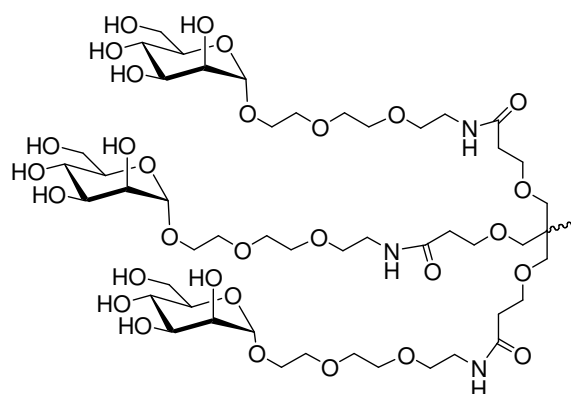
5 El agente de iARN se puede conjugar a L96 según se define en la Tabla 1 y se muestra a continuación



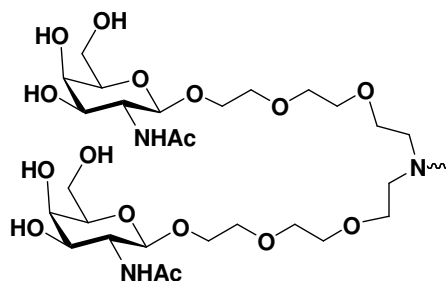
Un conjugado de carbohidrato para su uso en las composiciones y los métodos de la divulgación se puede seleccionar del grupo constituido por:



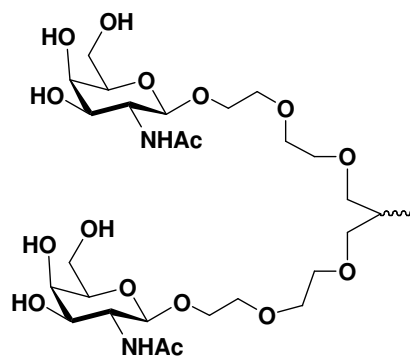
Fórmula II,



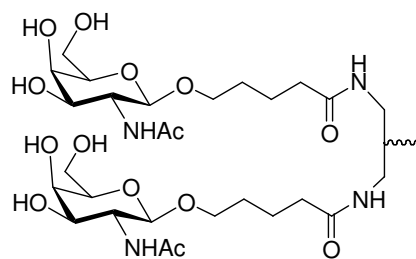
Fórmula III,



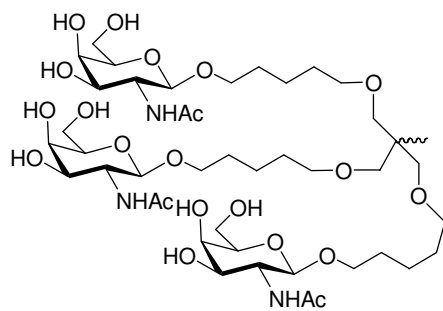
Fórmula IV,



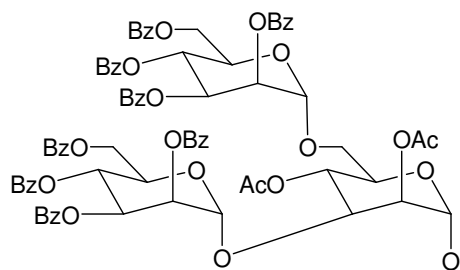
Fórmula V,



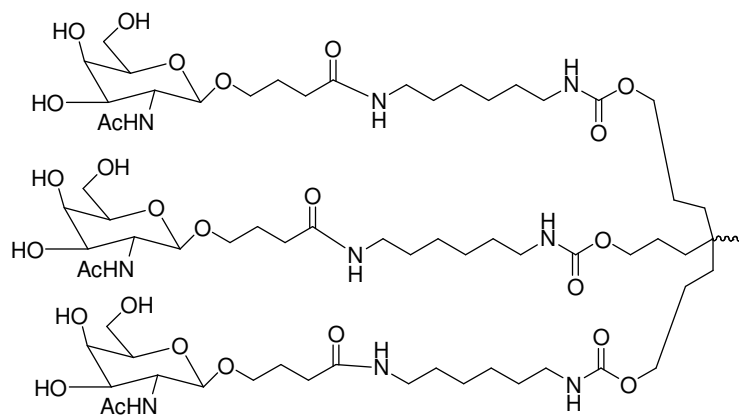
Fórmula VI,



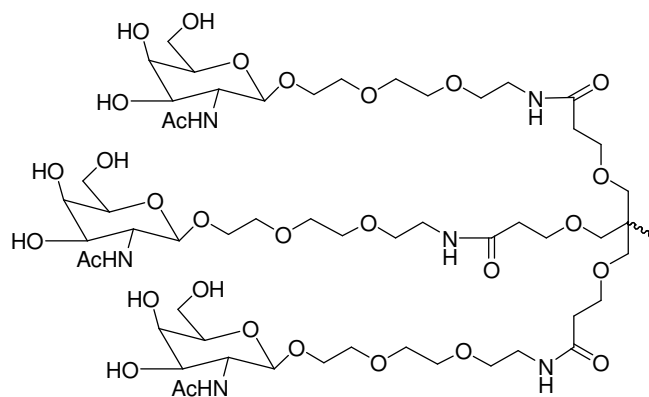
Fórmula VII,



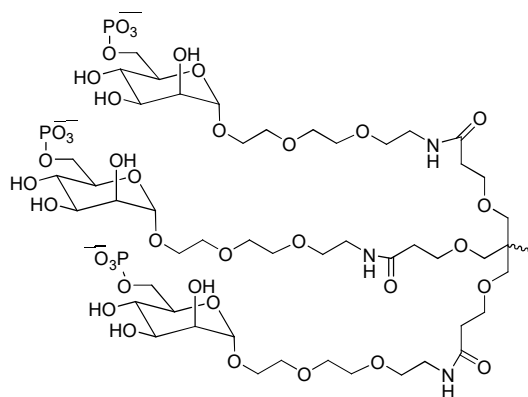
Fórmula VIII,



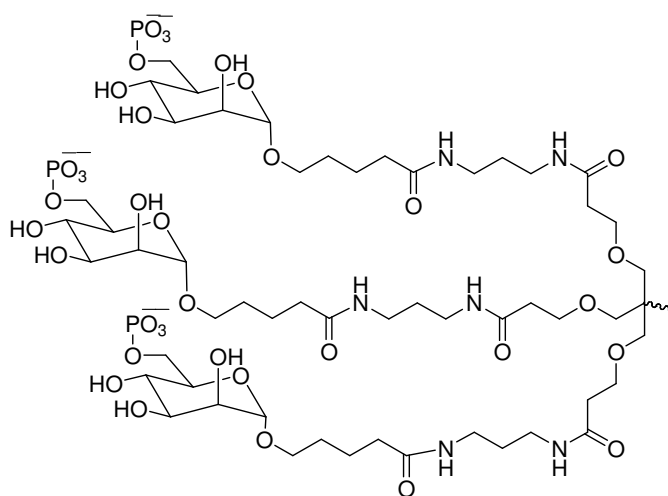
Fórmula IX,



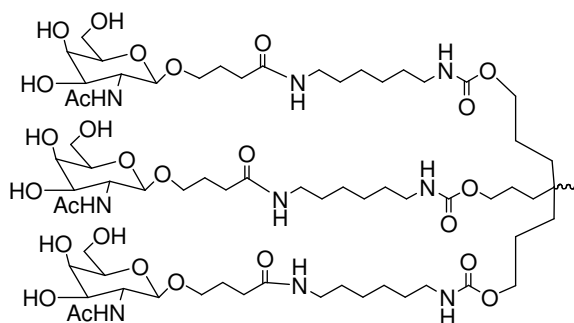
Fórmula X,



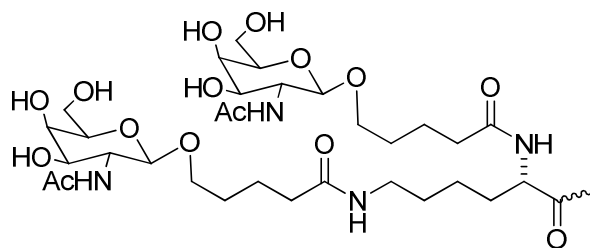
Fórmula XI,



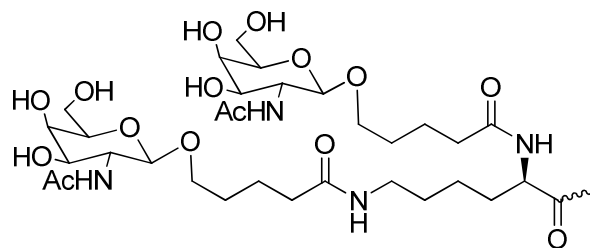
Fórmula XII,



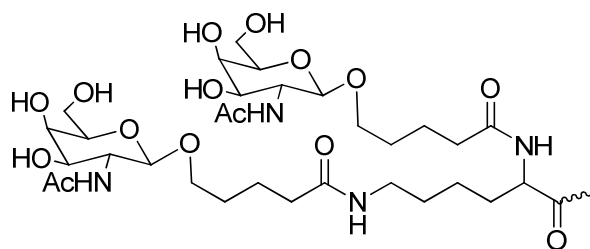
Fórmula XIII,



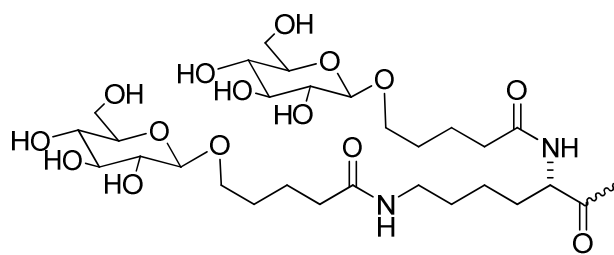
Fórmula XIV,



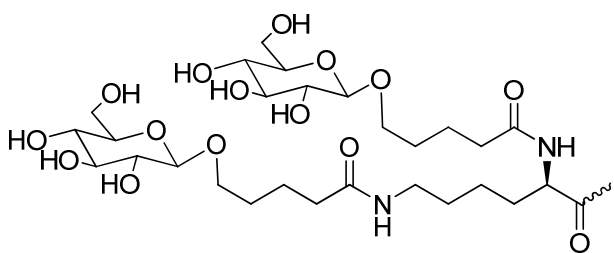
Fórmula XV,



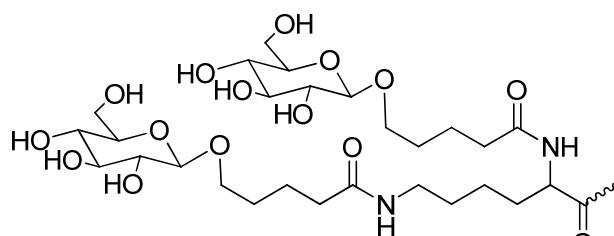
Fórmula XVI,



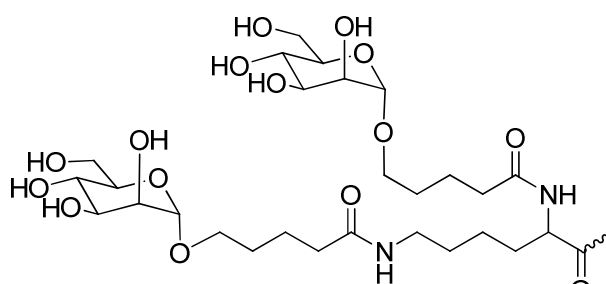
Fórmula XVII,



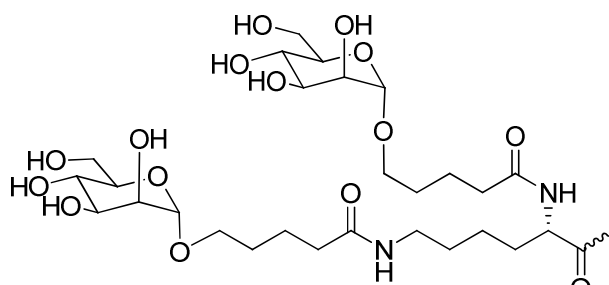
Fórmula XVIII,



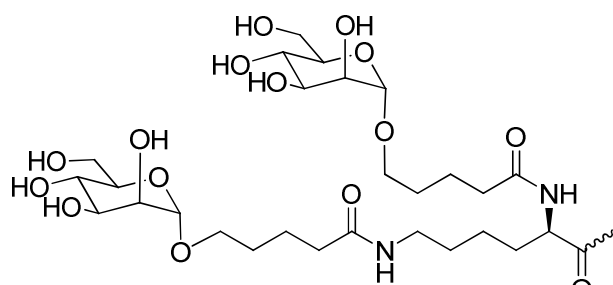
Fórmula XIX,



Fórmula XX,

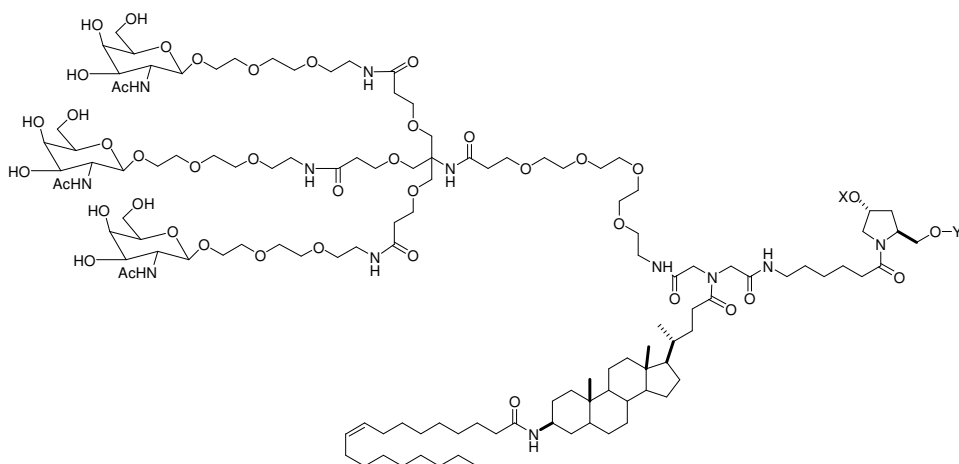


Fórmula XXI,



Fórmula XXII.

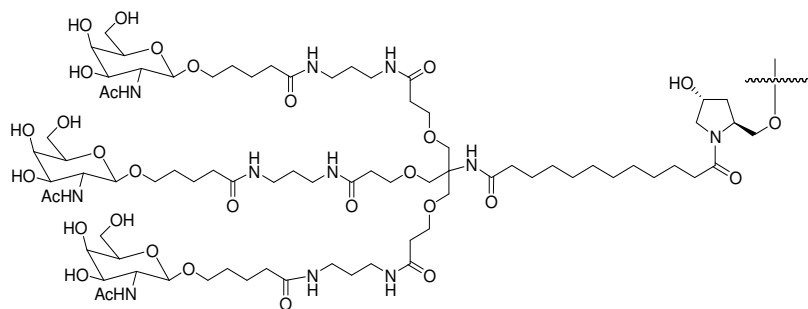
Otro conjugado de carbohidrato representativo para su uso en los aspectos descritos en la presente incluye, sin carácter limitante,



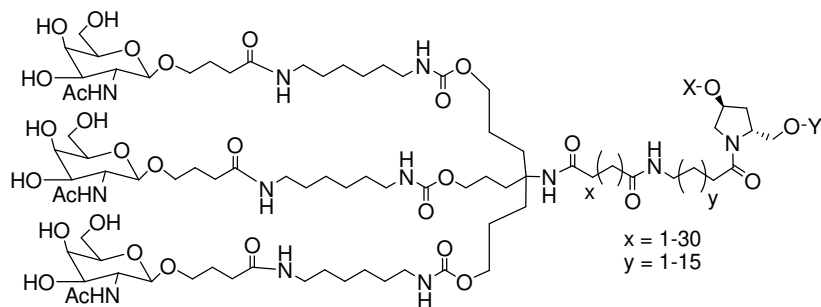
(Fórmula XXIII), donde uno de los grupos X o Y es un oligonucleótido y el otro es un hidrógeno.

- 5 El conjugado de carbohidrato puede comprender además uno o más ligandos adicionales como los que se describen en la presente, tales como, sin carácter limitante, un modulador PK y/o un péptido de permeación celular.

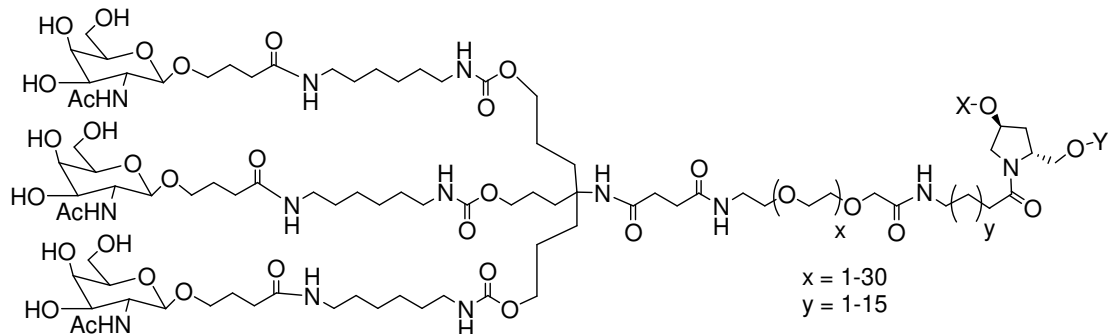
Un ARNi de la divulgación puede estar conjugado con un carbohidrato a través de un conector. Los ejemplos no limitantes de conjugados de carbohidrato y ARNi con conectores de las composiciones y los métodos de la divulgación incluyen, sin carácter limitante,



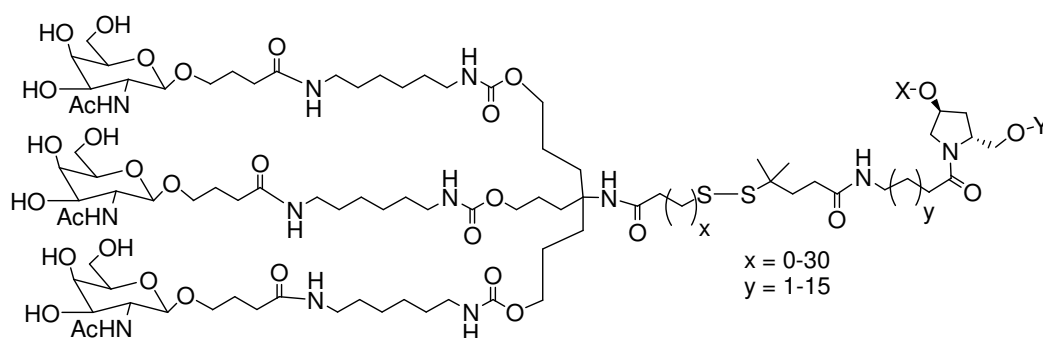
(Fórmula XXIV),



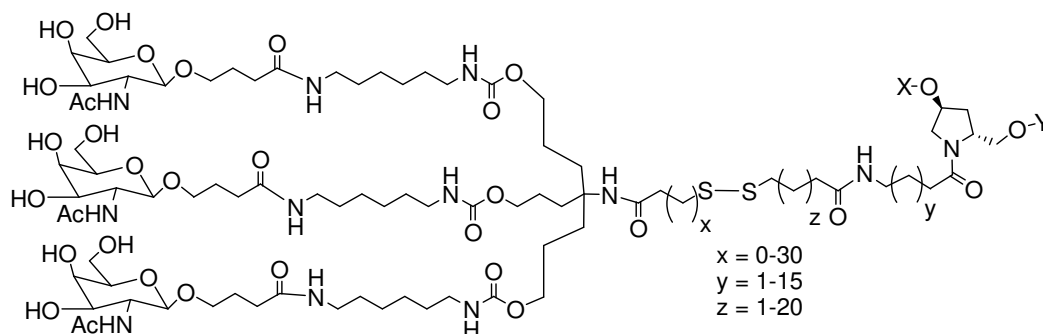
(Fórmula XXV),



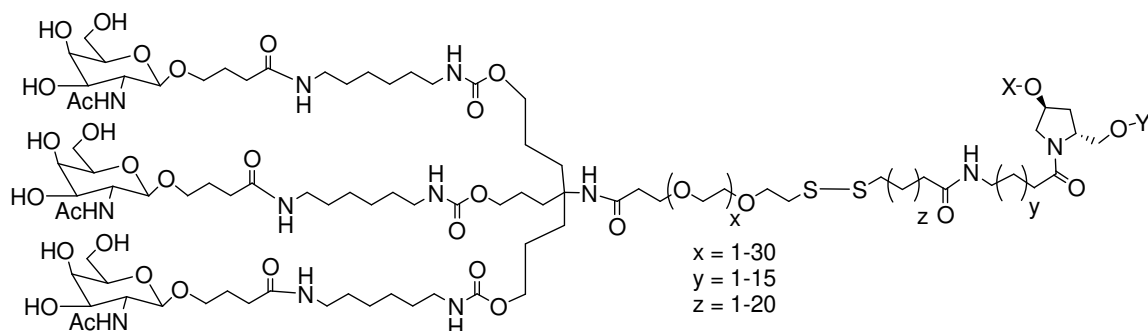
(Fórmula XXVI),



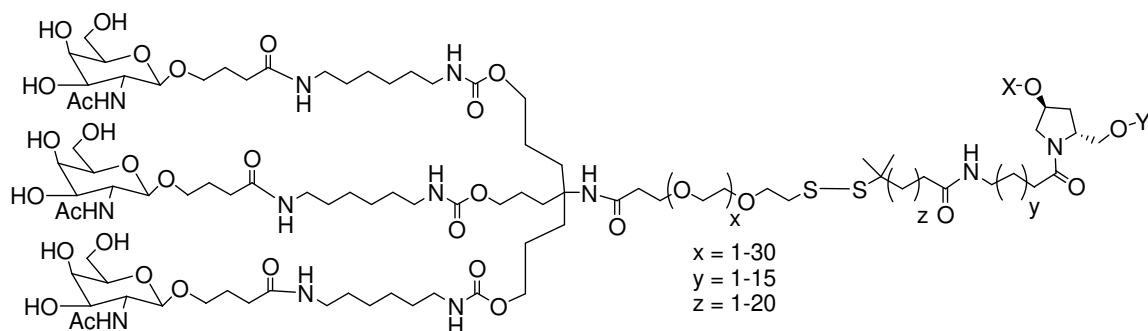
(Fórmula XXVII),



(Fórmula XXVIII),



(Fórmula XXIX) y



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

Conectores

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

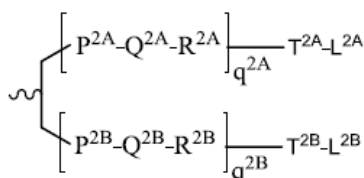
El término "conector" o "grupo conector" se refiere a un resto orgánico que conecta dos partes de un compuesto, p. ej., une covalentemente dos partes de un compuesto. Los conectores comprenden normalmente un enlace directo o un átomo tal como oxígeno o azufre, una unidad tal como NR8, C(O), C(O)NH, SO, SO2, SO2NH o una cadena de átomos tal como, sin carácter limitante, alquilo sustituido o no sustituido, alquienilo sustituido o no sustituido, alquinilo

- 15

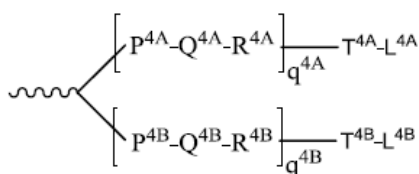
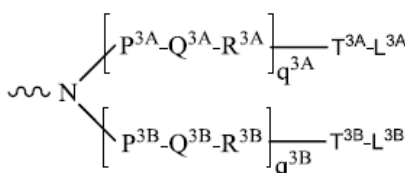
sustituido o no sustituido, arilalquilo, arilalquenilo, arilalquinilo, heteroarilalquilo, heteroarilalquenilo, heteroarilalquinilo, heterociclilalquilo, heterociclilalquenilo, heterociclilalquinilo, arilo, heteroarilo, heterociclilo, cicloalquilo, cicloalquenilo, alquilarilalquilo, alquilarilalquenilo, 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 se pueden interrumpir o terminar con O, S, S(O), SO₂, N(R₈), C(O), arilo sustituido o no sustituido, heteroarilo sustituido o no sustituido, heterociclilo sustituido o no sustituido; donde R₈ es hidrógeno, acilo, un resto alifático o un resto alifático sustituido. El conector puede tener aproximadamente 1-24 átomos, 2-24, 3-24, 4-24, 5-24, 6-24, 6-18, 7-18, 8-18 átomos, 7-17, 8-17, 6-16, 7-16 o 8-16 átomos.

Un ARNbc de la divulgación puede estar conjugado con un conector ramificado bivalente o trivalente seleccionado a partir del grupo de estructuras que se muestran en cualquiera de las fórmulas (XXXI)–(XXXIV):

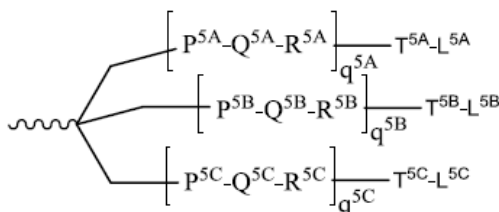
Fórmula XXXI



Fórmula XXXII



Fórmula XXXIII



Fórmula XXXIV

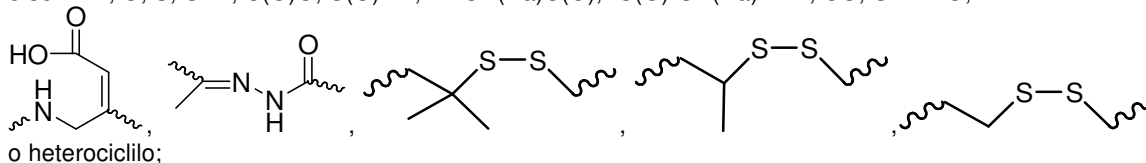
donde:

q_{2A}, q_{2B}, q_{3A}, q_{3B}, q_{4A}, q_{4B}, q_{5A}, q_{5B} y q_{5C} representan independientemente en cada caso 0-20 y donde la unidad de repetición 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 independientemente en cada caso, están ausentes o son CO, NH, O, S, OC(O), NHC(O), CH₂, CH₂NH, CH₂O;

Q_{2A}, Q_{2B}, Q_{3A}, Q_{3B}, Q_{4A}, Q_{4B}, Q_{5A}, Q_{5B}, Q_{5C}, cada uno independientemente en cada caso, están ausentes o son alquileo, alquileo sustituido, donde uno o más metilenos pueden estar interrumpidos o terminados con uno o más O, S, S(O), SO₂, N(RN), C(R')=C(R''), C≡C o C(O);

R_{2A}, R_{2B}, R_{3A}, R_{3B}, R_{4A}, R_{4B}, R_{5A}, R_{5B}, R_{5C}, cada uno independientemente en cada caso, están ausentes o son NH, O, S, CH₂, C(O)O, C(O)NH, NHCH(Ra)C(O), -C(O)-CH(Ra)-NH-, CO, CH=N-O,

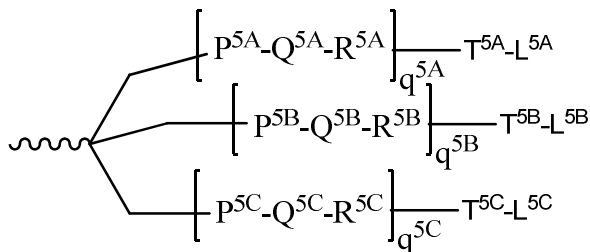


o heterociclilo;

L_{2A}, L_{2B}, L_{3A}, L_{3B}, L_{4A}, L_{4B}, L_{5A}, L_{5B} y L_{5C} representan el ligando, es decir, cada uno independientemente en cada caso representa un monosacárido (tal como GalNAc), disacárido, trisacárido, tetrasacárido, oligosacárido o polisacárido; y Ra es H o una cadena lateral aminoácida. Los derivados de tipo GalNAc de

conjugación trivalente son particularmente útiles para ser utilizados con los agentes de iARN para inhibir la expresión de un gen diana, tales como los de fórmula (XXXV):

Fórmula XXXV



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

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

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

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

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

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

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

40 En general, la idoneidad de un grupo conector escindible candidato se puede evaluar estudiando la capacidad de un
agente (o condición) de degradación para escindir el grupo conector candidato. También será deseable estudiar
además el grupo conector escindible candidato con el fin de determinar su capacidad para resistir la escisión en
sangre o cuando entre en contacto con otro tejido que no sea la diana. Por lo tanto, se puede determinar la
susceptibilidad relativa a la escisión entre una primera y una segunda condición, donde la primera se selecciona
45 para que sea indicativa de la escisión en una célula diana y la segunda se selecciona para que sea indicativa de la
escisión en otros tejidos o fluidos biológicos, p. ej., en sangre o suero. Las evaluaciones se pueden llevar a cabo en
sistemas exentos de células, en células, en cultivos celulares, en cultivos tisulares o de órganos, o en animales
enteros. Puede resultar útil realizar evaluaciones iniciales en condiciones de cultivo o exentas de células y
confirmarlas mediante evaluaciones adicionales en animales enteros. Preferiblemente, los compuestos candidatos

útiles se pueden escindir al menos aproximadamente 2, 4, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o aproximadamente 100 veces más rápido en la célula (o en condiciones *in vitro* seleccionadas para imitar las condiciones intracelulares) en comparación con la sangre o el suero (o en condiciones *in vitro* seleccionadas para imitar las condiciones extracelulares).

5 Grupos conectores escindibles redox

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

Grupos conectores escindibles basados en fosfatos

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

Grupos conectores escindibles con ácido

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

Grupos conectores escindibles basados en ésteres

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

Grupos conectores escindibles basados en péptidos

Un conector escindible puede comprender un grupo conector escindible basado en péptidos. Un grupo conector escindible basado en péptidos es escindido por enzimas tales como peptidasas y proteasas en las células. Los grupos conectores escindibles basados en péptidos son enlaces peptídicos formados entre aminoácidos para proporcionar oligopéptidos (p. ej., dipéptidos, tripéptidos, etc.) y polipéptidos. Los grupos escindibles basados en péptidos no incluyen el grupo amida (-C(O)NH-). El grupo amida se puede formar entre cualquier alquilenos, alquilenos o alquilenos. Un enlace peptídico es un tipo especial de enlace de tipo amida formado entre aminoácidos para proporcionar péptidos y proteínas. El grupo escindible basado en un péptido se limita en general

al enlace peptídico (es decir, el enlace de tipo amida) formado entre aminoácidos para proporcionar péptidos y proteínas y no incluye el grupo funcional amida entero. Los grupos conectores escindibles basados en péptidos presentan la fórmula general $\text{--NHCHRAC(O)NHCHRBC(O)--}$, donde RA y RB son los grupos R de los dos aminoácidos adyacentes. Estos candidatos se pueden evaluar utilizando métodos análogos a los descritos anteriormente.

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

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

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

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

Suministro de ARNi

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

Suministro directo

En general, cualquier método para suministrar una molécula de ácido nucleico se puede adaptar para ser utilizado con un ARNi (remítase, p. ej., a Akhtar S. y Julian RL. (1992) Trends Cell. Biol. 2(5):139-144 y WO94/02595. Sin embargo, existen tres factores importantes que se deben tener en cuenta para suministrar con éxito una molécula de ARNi *in vivo*: (a) la estabilidad biológica de la molécula suministrada, (2) la prevención de efectos no específicos y (3) la acumulación de la molécula suministrada en el tejido diana. Los efectos no específicos de un ARNi se pueden minimizar mediante una administración local, por ejemplo, mediante una inyección directa o un implante en un tejido (a modo de ejemplo no limitante, un tumor) o administrando el preparado por vía tópica. La administración local a un sitio de tratamiento maximiza la concentración local del agente, limita la exposición del agente a tejidos sistémicos que de otro modo podrían ser dañados por el agente o que podrían degradar el agente, y permite administrar una dosis total más baja de la molécula de ARNi. Varios estudios han mostrado una supresión con éxito de productos génicos cuando se administra un ARNi de forma local. Por ejemplo, se ha demostrado que el suministro intraocular de un ARNbc VEGF mediante una inyección intravítrea en monos cinomólogos (Tolentino, MJ., et al. (2004) Retina 24:132-138) e inyecciones subretinales en ratones (Reich, SJ., et al. (2003) Mol. Vis. 9:210-216) previenen en ambos casos la neovascularización en un modelo experimental de degeneración macular relacionada con la edad. Además, la inyección intratumoral directa de un ARNbc en ratones reduce el volumen tumoral (Pille, J. et al. (2005) Mol. Ther. 11:267-274) y puede prolongar la supervivencia de ratones portadores de tumores (Kim, WJ. et al. (2006) Mol. Ther. 14:343-350; Li, S. et al. (2007) Mol. Ther. 15:515-523). La interferencia por ARN también ha tenido éxito con el suministro local al SNC mediante inyección directa (Dorn, G. et al. (2004) Nucleic Acids 32:e49; Tan, PH., et al. (2005) Gene Ther. 12:59-66; Makimura, H. et al. (2002) BMC Neurosci. 3:18; Shishkina, GT., et al. (2004) Neuroscience 129:521-528; Thakker, ER. et al. (2004) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 101:17270-17275; Akaneya, Y. et al. (2005) J. Neurophysiol. 93:594-602) y a los pulmones mediante una administración intranasal (Howard, KA. et al. (2006) Mol. Ther. 14:476-484; Zhang, X. et al. (2004) J. Biol. Chem. 279:10677-10684; Bitko, V. et al. (2005) Nat. Med. 11:50-55). Con el fin de administrar un ARNi por vía sistémica para el tratamiento de una enfermedad, el ARN se puede modificar o suministrar de forma alternativa utilizando un sistema de suministro farmacológico; ambos métodos actúan para prevenir la degradación rápida del ARNbc por parte de endo- y exonucleasas *in vivo*.

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

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

ARNi codificados en vectores

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

del tejido o tipo celular diana. Estos transgenes se pueden introducir como un constructo lineal, un plásmido circular o un vector vírico, el cual puede ser un vector integrador o no integrador. El transgén también se puede construir de modo que se permita que sea heredado como un plásmido extracromosómico (Gassmann et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1995) 92:1292).

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

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

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

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

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

La expresión del ARNi se puede regular de forma exacta, por ejemplo, utilizando una secuencia reguladora inducible que sea sensible a ciertos reguladores fisiológicos, p. ej., los niveles de glucosa en circulación u hormonas (Docherty et al., 1994, FASEB J. 8:20-24). Tales sistemas de expresión inducible adecuados para el control de la expresión de ARNbc en células o en mamíferos incluyen, por ejemplo, la regulación por parte de ecdisona, por parte de un estrógeno, progesterona, tetraciclina, inductores químicos de dimerización e isopropil- β -D1-tiogalactopiranosido (IPTG). Un experto en la técnica sería capaz de seleccionar la secuencia promotora/reguladora adecuada en función del uso deseado del transgén de ARNi.

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

vectores retrovéricos en la terapia génica son: Clowes et al., J. Clin. Invest. 93:644-651 (1994); Kiem et al., Blood 83:1467-1473 (1994); Salmons y Gunzberg, Human Gene Therapy 4:129-141 (1993); y Grossman y Wilson, Curr. Opin. in Genetics and Devel. 3:110-114 (1993). Los vectores lentivéricos contemplados para ser utilizados incluyen, por ejemplo, los vectores basados en el VIH que se describen en las Patentes de EE. UU. N.ºs 6.143.520, 5.665.557 y 5.981.276.

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

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

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

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

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

III. Composiciones farmacéuticas que contienen ARNi

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Formulaciones de liposomas

Existen muchas estructuras de surfactantes organizadas, además de las microemulsiones, que han sido estudiadas y utilizadas para la formulación de fármacos. Estas incluyen monocapas, micelas, bicapas y vesículas. Las vesículas, tales como los liposomas, han despertado mucho interés debido a su especificidad y duración de la

acción que ofrecen desde el punto de vista del suministro farmacológico. El término "liposoma", tal como se utiliza en la presente, se refiere a una vesícula compuesta por lípidos anfifílicos dispuestos en una bicapa o bicapas esféricas.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Partículas de ácido nucleico-lípido

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

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

El lípido catiónico puede ser, por ejemplo, cloruro de N,N-dioleil-N,N-dimetilamonio (DODAC), bromuro de N,N-diestearil-N,N-dimetilamonio (DDAB), cloruro de N-(1-(2,3-dioleiloiloxi)propil)-N,N,N-trimetilamonio (DOTAP), cloruro de N-(1-(2,3-dioleiloiloxi)propil)-N,N,N-trimetilamonio (DOTMA), N,N-dimetil-2,3-dioleiloiloxi)propilamina (DODMA), 1,2-dilinoileiloxi-N,N-dimetilaminopropano (DLinDMA), 1,2-dilinoileiloxi-N,N-dimetilaminopropano (DLinDMA), 1,2-dilinoileilcarbamoiloxi-3-dimetilaminopropano (DLin-C-DAP), 1,2-dilinoileiloxi-3-(dimetilamino)acetoxipropano (DLin-DAC), 1,2-dilinoileiloxi-3-morfolinopropano (DLin-MA), 1,2-dilinoileiloxi-3-dimetilaminopropano (DLinDAP), 1,2-dilinoileiloxi-3-dimetilaminopropano (DLin-S-DMA), 1-linoileil-2-linoileiloxi-3-dimetilaminopropano (DLin-2-DMA), sal

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

Se puede utilizar el compuesto 2,2-dilinoileil-4-dimetilaminoetil-[1,3]-dioxolano para preparar nanopartículas de lípido-ARNip.

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

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

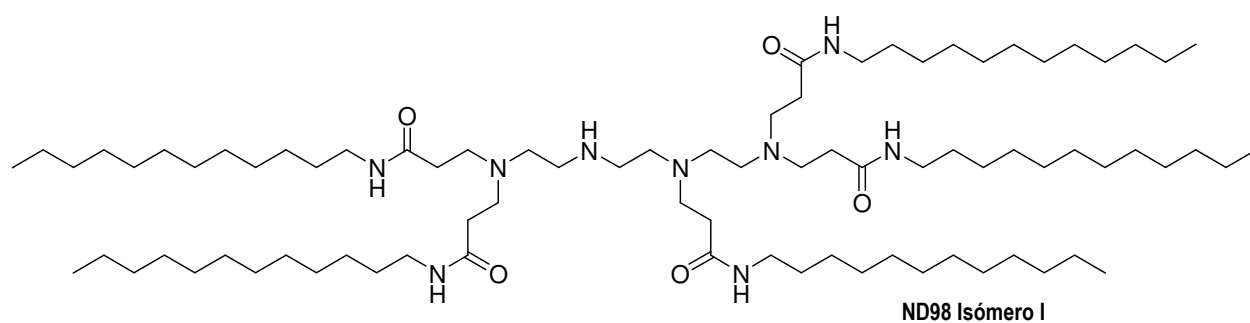
El conjugado de lípido que inhibe la agregación de partículas puede ser, por ejemplo, un polietilenglicol (PEG)-lípido, que incluye, sin carácter limitante, un PEG-diacylglicerol (DAG), un PEG-dialquioxipropilo (DAA), un PEG-fosfolípido, un PEG-ceramida (Cer) o una mezcla de estos. El conjugado de PEG-DAA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

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

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

LNP01

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



Fórmula 1

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

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

Tabla 10: Formulaciones lipídicas ilustrativas

	Lípido catiónico	Conjugado de lípido catiónico/lípido no catiónico/colesterol/PEG-lípido Proporción de lípido:ARNip
SNALP	1,2-Dilineniloxi- <i>N,N</i> -dimetilaminopropano (DLinDMA)	DLinDMA/DPPC/Colesterol/PEG-cDMA (57.1/7.1/34.4/1.4) lípido:ARNip ~ 7:1
S-XTC	2,2-Dilinoil-4-dimetilaminoetil-[1,3]-dioxolano (XTC)	XTC/DPPC/Colesterol/PEG-cDMA 57.1/7.1/34.4/1.4 lípido:ARNip ~ 7:1
LNP05	2,2-Dilinoil-4-dimetilaminoetil-[1,3]-dioxolano (XTC)	XTC/DSPC/Colesterol/PEG-DMG 57.5/7.5/31.5/3.5 lípido:ARNip ~ 6:1
LNP06	2,2-Dilinoil-4-dimetilaminoetil-[1,3]-dioxolano (XTC)	XTC/DSPC/Colesterol/PEG-DMG 57.5/7.5/31.5/3.5 lípido:ARNip ~ 11:1
LNP07	2,2-Dilinoil-4-dimetilaminoetil-[1,3]-dioxolano (XTC)	XTC/DSPC/Colesterol/PEG-DMG 60/7.5/31/1.5 lípido:ARNip ~ 6:1
LNP08	2,2-Dilinoil-4-dimetilaminoetil-[1,3]-dioxolano (XTC)	XTC/DSPC/Colesterol/PEG-DMG 60/7.5/31/1.5 lípido:ARNip ~ 11:1
LNP09	2,2-Dilinoil-4-dimetilaminoetil-[1,3]-dioxolano (XTC)	XTC/DSPC/Colesterol/PEG-DMG 50/10/38.5/1.5 lípido:ARNip 10:1
LNP10	(3 <i>aR</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>aS</i>)- <i>N,N</i> -dimetil-2,2-di((9 <i>Z</i> ,12 <i>Z</i>)-octadeca-9,12-dienil)tetrahydro-3 <i>aH</i> -ciclopenta[<i>d</i>][1,3]dioxol-5-amina (ALN100)	ALN100/DSPC/Colesterol/PEG-DMG 50/10/38.5/1.5 lípido:ARNip 10:1
LNP11	4-(Dimetilamino)butanoato de (6 <i>Z</i> ,9 <i>Z</i> ,28 <i>Z</i> ,31 <i>Z</i>)-heptatriaconta-6,9,28,31-tetraen-19-ilo (MC3)	MC-3/DSPC/Colesterol/PEG-DMG 50/10/38.5/1.5 lípido:ARNip 10:1
LNP12	1,1'-(2-(4-(2-((2-(bis(2-hidroxidodecil)amino)etil)(2-hidroxidodecil)amino)etil)piperazin-1-il)etilazanodiiil)didodecan-2-ol (C12-200)	C12-200/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

(continuación)

LNP18	MC3	MC3/DSPC/Col/PEG-DMG 50/10/38.5/1.5 lípidos:ARNip 12:1
LNP19	MC3	MC3/DSPC/Col/PEG-DMG 50/10/35/5 lípidos:ARNip 8:1
LNP20	MC3	MC3/DSPC/Col/PEG-DPG 50/10/38.5/1.5 lípidos:ARNip 10:1
LNP21	C12-200	C12-200/DSPC/Col/PEG-DSG 50/10/38.5/1.5 lípidos:ARNip 7:1
LNP22	XTC	XTC/DSPC/Col/PEG-DSG 50/10/38.5/1.5 lípidos:ARNip 10:1

DSPC: diestearoilfosfatidilcolina
 DPPC: dipalmitoilfosfatidilcolina
 PEG-DMG: PEG-didimistilglicerol (C14-PEG o PEG-C14) (PEG con un peso molecular medio de 2000)
 PEG-DSG: PEG-diestirilglicerol (C18-PEG o PEG-C18) (PEG con un peso molecular medio de 2000)
 PEG-cDMA: PEG-carbamoil-1,2-dimistiloxipropilamina (PEG con un peso molecular medio de 2000)

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

Se describen formulaciones que comprenden XTC, p. ej., en la Solicitud Internacional N.º PCT/US2010/022614, presentado el 29 de enero de 2010.

Se describen formulaciones que comprenden MC3, p. ej., en la Solicitud Internacional N.º PCT/US10/28224, presentada el 10 de junio de 2010.

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

Se describen formulaciones que comprenden C12-200, p. ej., en la Solicitud Internacional N.º PCT/US10/33777, presentada el 5 de mayo de 2010.

Síntesis de lípidos catiónicos

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

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

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

El término "alquino" se refiere a cualquier alquilo o alqueno, como se han definido anteriormente, que contiene adicionalmente al menos un triple enlace entre átomos de carbono adyacentes. Los alquinos de cadena lineal y

ramificada representativos incluyen acetilenilo, propinilo, 1-butinilo, 2-butinilo, 1-pentinilo, 2-pentinilo, 3-metil-1 butinilo y similares.

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

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

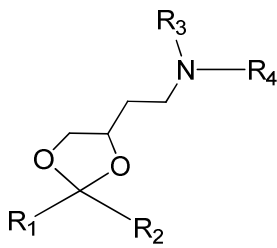
Las expresiones "alquilo opcionalmente sustituido", "alquenilo opcionalmente sustituido", "alquinilo opcionalmente sustituido", "acilo opcionalmente sustituido" y "heterociclo opcionalmente sustituido" se refieren a que, cuando están sustituidos, al menos un átomo de hidrógeno se ha reemplazado por un sustituyente. En el caso de un sustituyente oxo ($=\text{O}$), se han reemplazado dos átomos de hidrógeno. En este sentido, los sustituyentes incluyen oxo, halógeno, heterociclo, -CN , -ORx , -NRxRy , -NRxC(=O)Ry , $\text{-NRxSO}_2\text{Ry}$, -C(=O)Rx , -C(=O)ORx , -C(=O)NRxRy , -SONRx y -SONNRxRy , donde n es 0, 1 o 2, Rx y Ry son iguales o diferentes y son independientemente hidrógeno, alquilo o heterociclo, y cada uno de dichos sustituyentes alquilo y heterociclo puede estar sustituido adicionalmente con uno o más de los siguientes: oxo, halógeno, -OH , -CN , alquilo, -ORx , heterociclo, -NRxRy , -NRxC(=O)Ry , $\text{-NRxSO}_2\text{Ry}$, -C(=O)Rx , -C(=O)ORx , -C(=O)NRxRy , -SONRx y -SONNRxRy .

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

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

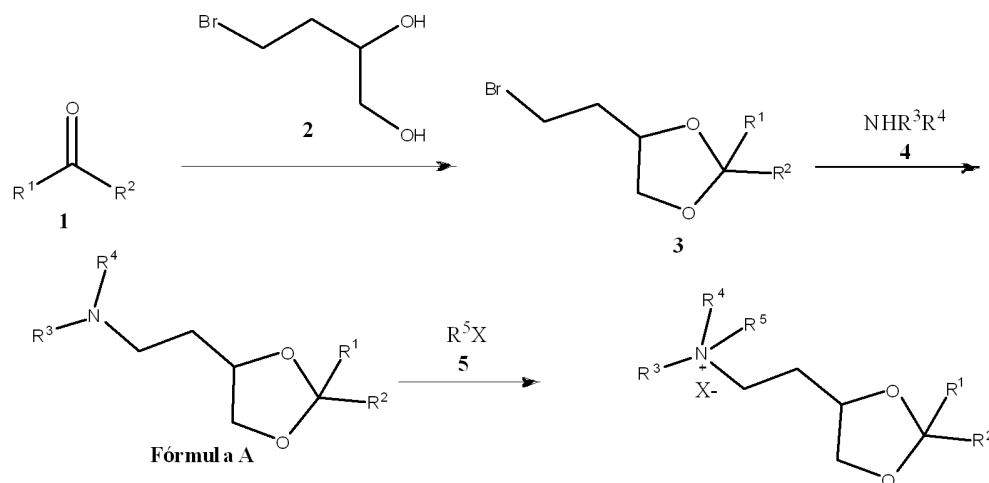
Síntesis de la Fórmula A

Las partículas de ácido nucleico-lípido que se exponen en la presente se formulan utilizando un líquido catiónico de fórmula A:



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

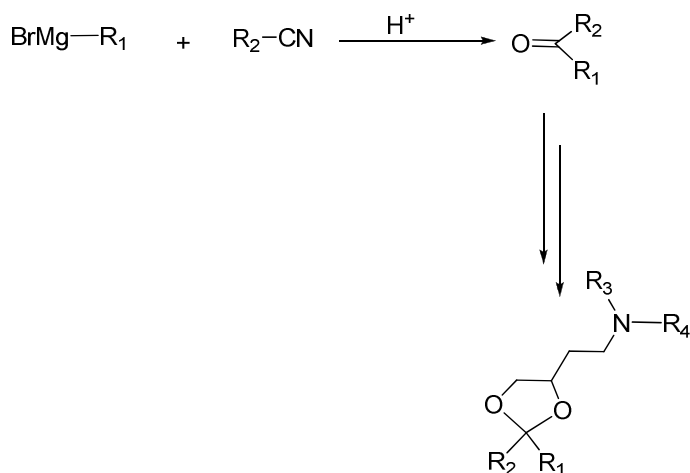
Esquema 1



Esquema 1

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

Esquema 2



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

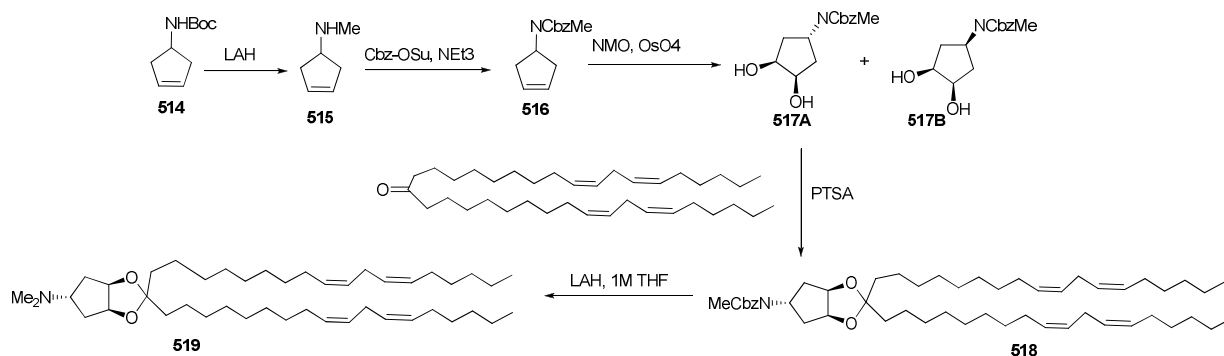
Síntesis de MC3

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

contenían el producto purificado se combinaron y se eliminó el disolvente, para proporcionar un aceite incoloro (0.54 g).

Síntesis de ALNY-100

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



Síntesis de 515:

A una suspensión agitada de LiAlH₄ (3.74 g, 0.09852 mol) en 200 mL de THF anhidro en un matraz de fondo redondo de dos bocas (1 L), se añadió una solución de 514 (10 g, 0.04926 mol) en 70 mL de THF lentamente a 0 °C en atmósfera de nitrógeno. Tras completar la adición, la mezcla de reacción se calentó hasta temperatura ambiente y a continuación se calentó a reflujo durante 4 h. La evolución de la reacción se monitorizó mediante TLC. Después de que se completara la reacción (mediante TLC), la mezcla se enfrió hasta 0 °C y se desactivó añadiendo cuidadosamente una solución saturada de Na₂SO₄. La mezcla de reacción se agitó durante 4 h a temperatura ambiente y se separó por filtración. El residuo se lavó bien con THF. El filtrado y los lavados se mezclaron, se diluyeron con 400 mL de dioxano y 26 mL de HCl conc. y se agitaron durante 20 minutos a temperatura ambiente. Los componentes volátiles se eliminaron al vacío para proporcionar la sal clorhídrica de 515 como un sólido blanco. Rendimiento: 7.12 g. ¹H-RMN (DMSO, 400MHz): δ = 9.34 (ancho, 2H), 5.68 (s, 2H), 3.74 (m, 1H), 2.66-2.60 (m, 2H), 2.50-2.45 (m, 5H).

Síntesis de 516:

A una solución agitada del compuesto 515 en 100 mL de DCM anhidro en un matraz de fondo redondo de dos bocas de 250 mL, se añadió NEt₃ (37.2 mL, 0.2669 mol) y se enfrió hasta 0 °C en atmósfera de nitrógeno. Después de una adición lenta de N-(benciloxicarbonilo)succinimida (20 g, 0.08007 mol) en 50 mL de DCM anhidro, se permitió que la mezcla de reacción se calentara hasta temperatura ambiente. Después de que se completara la reacción (2-3 h mediante TLC), la mezcla se lavó sucesivamente con una solución de HCl 1 N (1 x 100 mL) y una solución saturada de NaHCO₃ (1 x 50 mL). A continuación, la fase orgánica se secó con Na₂SO₄ anhidro y se evaporó el disolvente para obtener un material crudo, el cual se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice para obtener 516 como una masa pegajosa. Rendimiento: 11 g (89%). ¹H-RMN (CDCl₃, 400 MHz): δ = 7.36-7.27 (m, 5H), 5.69 (s, 2H), 5.12 (s, 2H), 4.96 (a, 1H), 2.74 (s, 3H), 2.60 (m, 2H), 2.30-2.25 (m, 2H). LC-MS [M+H]⁺ -232.3 (96.94%).

Síntesis de 517A y 517B:

El ciclopenteno 516 (5 g, 0.02164 mol) se disolvió en una solución de 220 mL de acetona y agua (10:1) en un matraz de fondo redondo de 500 mL de una boca y a esto se le añadió N-óxido de N-metilmorfolina (7.6 g, 0.06492 mol) y a continuación 4.2 mL de una solución al 7.6% de OsO₄ (0.275 g, 0.00108 mol) en tert-butanol a temperatura ambiente. Después de que se completara la reacción (~ 3 h), la mezcla se desactivó con la adición de Na₂SO₃ sólido y la mezcla resultante se agitó durante 1.5 h a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se diluyó con DCM (300 mL) y se lavó con agua (2 x 100 mL), a continuación con una solución saturada de NaHCO₃ (1 x 50 mL), agua (1 x 30 mL) y finalmente con salmuera (1x 50 mL). La fase orgánica se secó con Na₂SO₄ anhidro y se eliminó el disolvente al vacío. La purificación del material crudo mediante cromatografía en columna de gel de sílice proporcionó una mezcla de diastereómeros, los cuales se separaron mediante HPLC prep. Rendimiento: - 6 g de crudo

517A - Pico 1 (sólido blanco), 5.13 g (96%). ¹H-RMN (DMSO, 400 MHz): δ = 7.39-7.31 (m, 5H), 5.04 (s, 2H), 4.78-4.73 (m, 1H), 4.48-4.47 (d, 2H), 3.94-3.93 (m, 2H), 2.71 (s, 3H), 1.72- 1.67 (m, 4H). LC-MS - [M+H]⁺-266.3, [M+NH₄]⁺-283.5 presente, HPLC-97.86%. Estereoquímica confirmada mediante rayos X.

Síntesis de 518:

Utilizando un procedimiento análogo al descrito para la síntesis del compuesto 505, se obtuvo el compuesto 518 (1.2 g, 41%) como un aceite incoloro. ¹H-RMN (CDCl₃, 400 MHz): δ = 7.35-7.33 (m, 4H), 7.30-7.27 (m, 1H), 5.37-5.27 (m, 8H), 5.12 (s, 2H), 4.75 (m, 1H), 4.58-4.57 (m, 2H), 2.78-2.74 (m, 7H), 2.06-2.00 (m, 8H), 1.96-1.91 (m, 2H), 1.62 (m, 4H), 1.48 (m, 2H), 1.37-1.25 (m a, 36 H), 0.87 (m, 6H). HPLC-98.65%.

5 Procedimiento general para la síntesis del compuesto 519:

Una solución del compuesto 518 (1 eq) en hexano (15 mL) se añadió gota a gota a una solución enfriada con hielo de LAH en THF (1 M, 2 eq). Tras completar la adición, la mezcla se calentó a 40 °C durante 0.5 h y a continuación se enfrió de nuevo en un baño de hielo. La mezcla se hidrolizó cuidadosamente con Na₂SO₄ acuoso saturado, a continuación se filtró a través de celite y se redujo hasta obtener un aceite. La cromatografía en columna proporcionó 519 puro (1.3 g, 68%), que se obtuvo como un aceite incoloro. ¹³C RMN = 130.2, 130.1 (x2), 127.9 (x3), 112.3, 79.3, 64.4, 44.7, 38.3, 35.4, 31.5, 29.9 (x2), 29.7, 29.6 (x2), 29.5 (x3), 29.3 (x2), 27.2 (x3), 25.6, 24.5, 23.3, 22.6, 14.1; MS por electronebulización (modo positivo): Peso molecular para C₄₄H₈₀NO₂ (M + H)⁺ Calc. 654.6, Experimental 654.6.

Las formulaciones preparadas mediante el método estándar o un método exento de extrusión se pueden caracterizar de maneras similares. Por ejemplo, las formulaciones se caracterizan normalmente mediante una inspección visual. Deberían ser soluciones translúcidas blanquecinas exentas de agregados o sedimento. El tamaño de partícula y la distribución de tamaños de partícula de las nanopartículas lipídicas se pueden medir mediante dispersión de la luz utilizando, por ejemplo, un instrumento Malvern Zetasizer Nano ZS (Malvern, EE. UU.). Las partículas deberían de tener un tamaño de aproximadamente 20-300 nm, tal como de 40-100 nm. La distribución de tamaños de partícula debería ser unimodal. La concentración total de ARNbc en la formulación, así como también la fracción atrapada, se estima utilizando un ensayo de exclusión de tinte. Una muestra del ARNbc formulado se puede incubar con un tinte de unión a ARN, tal como Ribogreen (Molecular Probes), en presencia o ausencia de un surfactante que altere la formulación, p. ej., Triton-X100 al 0.5%. El ARNbc total de la formulación se puede determinar mediante la señal procedente de la muestra que contiene el surfactante, en relación con una curva patrón. La fracción atrapada se determina restando el contenido de ARNbc "libre" (que se mide mediante la señal en ausencia de surfactante) del contenido de ARNbc total. El porcentaje de ARNbc atrapado es normalmente > 85%. Para una formulación SNALP, el tamaño de partícula es de al menos 30 nm, al menos 40 nm, al menos 50 nm, al menos 60 nm, al menos 70 nm, al menos 80 nm, al menos 90 nm, al menos 100 nm, al menos 110 nm y al menos 120 nm. En el intervalo adecuado es normalmente de aproximadamente al menos 50 nm a aproximadamente al menos 110 nm, de aproximadamente al menos 60 nm a aproximadamente al menos 100 nm o de aproximadamente al menos 80 nm a aproximadamente al menos 90 nm.

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

Las composiciones y formulaciones para administración parenteral, intraparenquimal (en el cerebro), intratecal, intraventricular o intrahepática pueden incluir soluciones acuosas estériles, las cuales también pueden contener

tampones, diluyentes y otros aditivos adecuados tales como, sin carácter limitante, potenciadores de la penetración, compuestos portadores y otros excipientes o portadores farmacéuticamente aceptables.

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

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

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

Formulaciones adicionales

Emulsiones

Las composiciones descritas en la presente se pueden preparar y formular como emulsiones. Las emulsiones son normalmente sistemas heterogéneos de un líquido dispersado en otro en forma de gotículas con un diámetro normalmente superior a 0.1µm (remítase, p. ej., a Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG. y Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8.a ed.), Nueva York, NY; Idson, en Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger y Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y., volumen 1, pág. 199; Rosoff, en Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger y Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y., Volumen 1, pág. 245; Block en Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger y Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y., volumen 2, pág. 335; Higuchi et al., en Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1985, pág. 301). Las emulsiones suelen ser sistemas bifásicos que comprenden dos fases líquidas inmiscibles mezcladas de forma íntima y dispersadas una en la otra. En general, las emulsiones pueden ser de la variedad agua en aceite (a/ac) o aceite en agua (ac/a). Cuando una fase acuosa se divide finalmente y se dispersa en forma de gotículas minúsculas en una masa de fase oleosa, la composición resultante se denomina emulsión de agua en aceite (a/ac). Como alternativa, cuando una fase oleosa se divide finalmente y se dispersa en forma de gotículas minúsculas en una masa de fase acuosa, la composición resultante se denomina emulsión de aceite en agua (ac/a). Las emulsiones pueden contener componentes adicionales además de las fases dispersadas y del fármaco activo, el cual puede estar presente como una solución tanto en la fase acuosa, la fase oleosa o por sí mismo como una fase separada. Cuando proceda, en las emulsiones también puede haber excipientes farmacéuticos presentes tales como emulsionantes, estabilizantes, tintes y antioxidantes. Las emulsiones farmacéuticas también pueden ser emulsiones múltiples que comprendan más de dos fases tales como, por ejemplo, en el caso de emulsiones de aceite en agua en aceite (ac/a/ac) y de agua en aceite en agua (a/ac/a). Tales formulaciones complejas suelen proporcionar ciertas ventajas que las emulsiones binarias simples no proporcionan. Las emulsiones múltiples en las cuales gotículas de aceite individuales de una emulsión de ac/a encierran pequeñas gotículas de agua constituyen una emulsión de a/ac/a. De modo similar, un sistema de gotículas de aceite encerradas en glóbulos de agua estabilizados en una fase continua oleosa proporcionan una emulsión de ac/a/ac.

Las emulsiones se caracterizan por tener una estabilidad dinámica escasa o nula. A menudo, la fase dispersada o discontinua de la emulsión está bien dispersada en la fase externa o continua y se mantiene en esta forma a través de los medios de emulsionantes o la viscosidad de la formulación. Cualquiera de las fases de la emulsión puede ser un semisólido o un sólido, como es el caso de las cremas y bases de ungüentos de tipo emulsión. Otros medios para estabilizar emulsiones implican el uso de emulsionantes que se pueden incorporar en cualquier fase de la emulsión. Los emulsionantes se pueden clasificar a grandes rasgos en cuatro categorías: surfactantes sintéticos, emulsionantes de origen natural, bases de absorción y sólidos finamente dispersados (remítase, p. ej., a Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG. y Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8.a ed.), Nueva York, NY; Idson, en Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger y Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y., volumen 1, pág. 199).

Los surfactantes sintéticos, también conocidos como agentes tensioactivos, se aplican de forma generalizada en la formulación de emulsiones y han sido objeto de artículos de revisión en la bibliografía (remítase, p. ej., a Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG. y Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8.a ed.), Nueva York, NY; Rieger, en Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger y

Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y., volumen 1, pág. 285; Idson, en *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger y Banker (Eds.), Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y., 1988, volumen 1, pág. 199). Los surfactantes son normalmente anfífilos y comprenden una porción hidrófila y una hidrófoba. La proporción de la naturaleza hidrófila frente a la hidrófoba del surfactante se ha denominado equilibrio hidrófilo/lipófilo (HLB) y es una herramienta valiosa para clasificar y seleccionar surfactantes en la preparación de formulaciones. Los surfactantes se pueden clasificar en diferentes clases en función de la naturaleza del grupo hidrófilo: no iónicos, aniónicos, catiónicos y anfóteros (remítase, p. ej., a Ansel's *Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems*, Allen, LV., Popovich NG. y Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8.a ed.), Nueva York, NY; Rieger, en *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger y Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y., volumen 1, pág. 285).

Los emulsionantes de origen natural utilizados en las formulaciones de emulsiones incluyen lanolina, cera de abejas, fosfatidos, lecitina y acacia. Las bases de absorción poseen propiedades hidrófilas, por ejemplo, pueden empaparse de agua para formar emulsiones de a/ac a la vez que conservan sus consistencias semisólidas, por ejemplo, lanolina anhidra y vaselina hidrófila. También se han utilizado sólidos finamente divididos como emulsionantes satisfactorios, especialmente combinados con surfactantes y en preparados viscosos. Estos incluyen sólidos inorgánicos polares, tales como hidróxidos de metales pesados, arcillas que no se expanden tales como bentonita, atapulgita, hectorita, caolín, montmorillonita, silicato de aluminio coloidal y silicato de aluminio y magnesio coloidal, pigmentos y sólidos no polares tales como carbón o triestearato de glicerilo.

En las formulaciones de emulsiones también se incluye una gran variedad de materiales no emulsionantes, los cuales contribuyen a definir las propiedades de las emulsiones. Estos incluyen grasas, aceites, ceras, ácidos grasos, alcoholes grasos, ésteres grasos, humectantes, coloides hidrófilos, conservantes y antioxidantes (Block, en *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger y Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y., volumen 1, pág. 335; Idson, en *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger y Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y., volumen 1, pág. 199).

Los coloides o hidrocoloides hidrófilos incluyen gomas de origen natural y polímeros sintéticos tales como polisacáridos (por ejemplo, acacia, agar, ácido alginico, carragenano, goma guar, goma karaya y tragacanto), derivados de la celulosa (por ejemplo, carboximetilcelulosa y carboxipropilcelulosa) y polímeros sintéticos (por ejemplo, carbómeros, éteres de celulosa y polímeros de carboxivinilo). Estos se dispersan o expanden en agua para formar soluciones coloidales que estabilizan las emulsiones formando películas interfaciales resistentes alrededor de las gotículas de la fase dispersadas e incrementando la viscosidad de la fase externa.

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

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

Las composiciones de ARNi y los ácidos nucleicos se pueden formular como microemulsiones. Una microemulsión se puede definir como un sistema de agua, aceite y un material anfífilo que es una solución líquida termodinámicamente estable y ópticamente isotrópica estable (remítase, p. ej., a Ansel's *Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems*, Allen, LV., Popovich NG. y Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8.a ed.), Nueva York, NY; Rosoff, en *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger y Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y., volumen 1, pág. 245). Normalmente, las microemulsiones son sistemas que se preparan dispersando en primer lugar un aceite en una solución acuosa de surfactante y a continuación añadiendo una cantidad suficiente de un cuarto componente, generalmente un alcohol con una longitud de cadena intermedia para formar un sistema transparente. Por consiguiente, las microemulsiones también se han descrito como

dispersiones termodinámicamente estables e isotrópicamente transparentes de dos líquidos inmiscibles que se estabilizan mediante películas interfaciales de moléculas tensioactivas (Leung y Shah, en: *Controlled Release of Drugs: Polymers and Aggregate Systems*, Rosoff, M., Ed., 1989, VCH Publishers, Nueva York, páginas 185-215). Las microemulsiones se preparan normalmente mediante una combinación de tres a cinco componentes que incluyen aceite, agua, surfactante, cosurfactante y electrolito. El hecho de que la microemulsión sea del tipo agua en aceite (a/ac) o aceite en agua (ac/a) depende de las propiedades del aceite y el surfactante utilizados y de la estructura y la geometría del empaquetamiento de las cabezas polares y las colas hidrocarbonadas de las moléculas de surfactante (Schott, en *Remington's Pharmaceutical Sciences*, Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1985, pág. 271).

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

Los surfactantes utilizados en la preparación de microemulsiones incluyen, sin carácter limitante, surfactantes iónicos, surfactantes no iónicos, Brij 96, éteres oleílicos de polioxietileno, ésteres de poliglicerol y ácidos grasos, monolaurato de tetraglicerol (ML310), monooleato de tetraglicerol (MO310), monooleato de hexaglicerol (PO310), pentaoleato de hexaglicerol (PO500), monocaprato de decaglicerol (MCA750), monooleato de decaglicerol (MO750), sequioleato de decaglicerol (SO750), decaoleato de decaglicerol (DAO750), solos o combinados con cosurfactantes. El cosurfactante, normalmente un alcohol de cadena corta tal como etanol, 1-propanol y 1-butanol, sirve para incrementar la fluidez interfacial penetrando en la película surfactante y consecuentemente creando una película desordenada debido al espacio hueco generado entre las moléculas de surfactante. A pesar de ello, las microemulsiones se pueden preparar sin el uso de cosurfactantes y en la técnica se conocen sistemas de microemulsiones autoemulsionantes exentos de alcoholes. Normalmente, la fase acuosa es, sin carácter limitante, agua, una solución acuosa del fármaco, glicerol, PEG300, PEG400, poligliceroles, propilenglicoles y derivados del etilenglicol. La fase oleosa puede incluir, sin carácter limitante, materiales tales como Captex 300, Captex 355, Capmul MCM, ésteres de ácidos grasos, mono-, di- y triglicéridos de cadena media (C8-C12), ésteres de ácidos grasos glicélicos polioxietilados, alcoholes grasos, glicéridos poliglicolizados, glicéridos C8-C10 poliglicolizados saturados, aceites vegetales y aceite de silicona.

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

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

Potenciadores de la penetración

La presente divulgación puede emplear varios potenciadores de la penetración para ejercer un suministro eficaz de los ácidos nucleicos, particularmente los ARNi, en la piel de animales. La mayoría de los fármacos están presentes

en solución tanto en forma ionizada como no ionizada. Sin embargo, normalmente solo los fármacos lipófilos o solubles en lípidos atraviesan fácilmente las membranas celulares. Se ha descubierto que incluso los fármacos no lipófilos pueden atravesar las membranas celulares si la membrana que se ha de atravesar se trata con un potenciador de la penetración. Además de propiciar la difusión de los fármacos no lipófilos a través de las membranas celulares, los potenciadores de la penetración también potencian la permeabilidad de los fármacos lipófilos.

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

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

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

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

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

Agentes no surfactantes ni quelantes: Los compuestos potenciadores de la penetración no surfactantes ni quelantes, tal como se utilizan en la presente, se pueden definir como compuestos que presentan una actividad insignificante como agentes quelantes o como surfactantes pero que, a pesar de ello, potencian la absorción de los ARNi a través

de la mucosa alimentaria (remítase, p. ej., a Muranishi, Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1990, 7, 1-33). Esta clase de potenciadores de la penetración incluyen, por ejemplo, ureas cíclicas insaturadas, derivados de tipo 1-alkil- y 1-alquenilazacicloalcanona (Lee et al., Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1991, page 92) y agentes antiinflamatorios no esteroideos tales como diclofenac sódico, indometacina y fenilbutazona (Yamashita et al., J. Pharm. Pharmacol., 1987, 39, 621-626).

También se pueden añadir agentes que potencian la captación de ARNi a nivel celular a las composiciones farmacéuticas u otras composiciones de la divulgación. Por ejemplo, también existe constancia de que lípidos catiónicos, tales como la lipofectina (Junichi et al, Pat. de EE. UU. N.º 5.705.188), derivados catiónicos del glicerol y moléculas policationicas tales como la polilisina (Lollo et al., Solicitud de PCT WO 97/30731) potencian la captación celular de ARNbc. Los ejemplos de reactivos de transfección que se pueden adquirir de proveedores comerciales incluyen, por ejemplo, Lipofectamine™ (Invitrogen; Carlsbad, CA), Lipofectamine 2000™ (Invitrogen; Carlsbad, CA), 293fectin™ (Invitrogen; Carlsbad, CA), Cellfectin™ (Invitrogen; Carlsbad, CA), DMR1E-C™ (Invitrogen; Carlsbad, CA), FreeStyle™ MAX (Invitrogen; Carlsbad, CA), Lipofectamine™ 2000 CD (Invitrogen; Carlsbad, CA), Lipofectamine™ (Invitrogen; Carlsbad, CA), RNAiMAX (Invitrogen; Carlsbad, CA), Oligofectamine™ (Invitrogen; Carlsbad, CA), Optifect™ (Invitrogen; Carlsbad, CA), el reactivo de transfección X-tremeGENE Q2 (Roche; Grenzacherstrasse, Suiza), el reactivo de transfección liposomal DOTAP (Grenzacherstrasse, Suiza), el reactivo de transfección liposomal DOSPER (Grenzacherstrasse, Suiza) o Eugene (Grenzacherstrasse, Suiza), el reactivo Transfectam® (Promega; Madison, WI), el reactivo de transfección TransFast™ (Promega; Madison, WI), el reactivo Tfx™-20 (Promega; Madison, WI), el reactivo Tfx™-50 (Promega; Madison, WI), DreamFect™ (OZ Biosciences; Marsella, Francia), EcoTransfect (OZ Biosciences; Marsella, Francia), el reactivo de transfección TransPass® D1 (New England Biolabs; Ipswich, MA, EE. UU.), LyoVec™/LipoGen™ (Invivogen; San Diego, CA, EE. UU.), el reactivo de transfección PerFectin (Genlantis; San Diego, CA, EE. UU.), el reactivo de transfección NeuroPORTER (Genlantis; San Diego, CA, EE. UU.), el reactivo de transfección GenePORTER (Genlantis; San Diego, CA, EE. UU.), el reactivo de transfección GenePORTER 2 (Genlantis; San Diego, CA, EE. UU.), el reactivo de transfección Cytofectin (Genlantis; San Diego, CA, EE. UU.), el reactivo de transfección BaculoPORTER (Genlantis; San Diego, CA, EE. UU.), el reactivo de transfección TroganPORTER™ (Genlantis; San Diego, CA, EE. UU.), RiboFect (Bioline; Taunton, MA, EE. UU.), PlasFect (Bioline; Taunton, MA, EE. UU.), UniFECTOR (B-Bridge International; Mountain View, CA, EE. UU.), SureFECTOR (B-Bridge International; Mountain View, CA, EE. UU.) o HiFect™ (B-Bridge International; Mountain View, CA, EE. UU.), entre otros.

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

Portadores

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

Excipientes

A diferencia de un compuesto portador, un "excipiente" o "portador farmacéutico" es un agente de suspensión o un disolvente farmacéuticamente aceptable o cualquier otro vehículo farmacológicamente inerte para suministrar uno o más ácidos nucleicos a un animal. El excipiente puede ser líquido o sólido y se selecciona, teniendo en cuenta la vía de administración planeada, de modo que proporcione la masa, consistencia, etc. deseadas, cuando se combina con un ácido nucleico y los demás componentes de una composición farmacéutica determinada. Los portadores farmacéuticos habituales incluyen, sin carácter limitante, agentes aglutinantes (p. ej., almidón de maíz pregelatinizado, polivinilpirrolidona o hidroxipropilmetilcelulosa, etc.); rellenos (p. ej., lactosa u otros azúcares, celulosa microcristalina, pectina, gelatina, sulfato de calcio, etilcelulosa, poliacrilatos o hidrogenofosfato de calcio, etc.); lubricantes (p. ej., estearato de magnesio, talco, sílice, dióxido de sílice coloidal, ácido esteárico, estearatos metálicos, aceites vegetales hidrogenados, almidón de maíz, polietilenglicoles, benzoato de sodio, acetato de sodio, etc.); desintegrantes (p. ej., almidón, glicolato de almidón sódico, etc.) y agentes humectantes (p. ej., laurilsulfato de sodio, etc.).

Para formular las composiciones de la presente divulgación, también se pueden utilizar excipientes orgánicos o inorgánicos farmacéuticamente aceptables adecuados para la administración no parenteral que no reaccionen de

forma perjudicial con los ácidos nucleicos. Los portadores farmacéuticamente aceptables adecuados incluyen, sin carácter limitante, agua, soluciones salinas, alcoholes, polietilenglicoles, gelatina, lactosa, amilosa, estearato de magnesio, talco, ácido silícico, parafina viscosa, hidroximetilcelulosa, polivinilpirrolidona y similares.

5 Las formulaciones para la administración tópica de los ácidos nucleicos pueden incluir soluciones acuosas estériles y no estériles, soluciones no acuosas en disolventes habituales tales como alcoholes, o soluciones de los ácidos nucleicos en bases oleosas sólidas o líquidas. Las soluciones también pueden contener tampones, diluyentes u otros aditivos adecuados. Se pueden utilizar excipientes orgánicos o inorgánicos farmacéuticamente aceptables adecuados para la administración no parenteral que no reaccionen de forma perjudicial con los ácidos nucleicos.

10 Los excipientes farmacéuticamente aceptables adecuados incluyen, sin carácter limitante, agua, soluciones salinas, alcohol, polietilenglicoles, gelatina, lactosa, amilosa, estearato de magnesio, talco, ácido silícico, parafina viscosa, hidroximetilcelulosa, polivinilpirrolidona y similares.

Otros componentes

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

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

30 Las composiciones farmacéuticas que se exponen en la presente pueden incluir (a) uno o más compuestos de ARNi y (b) uno o más agentes biológicos que actúan mediante un mecanismo que no es de iARN. Los ejemplos de tales agentes biológicos incluyen agentes que interfieren con una interacción de ALAS1 y al menos una pareja de unión a ALAS1.

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

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

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

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

En la presente se describe además el uso de un ARNi que tiene ALAS1 como diana para inhibir la expresión de ALAS1 y/o tratar una enfermedad, trastorno o proceso patológico que se relacione con la expresión de ALAS1.

- La expresión "un trastorno relacionado con la expresión de ALAS1", un "trastorno relacionado con la expresión de ALAS1", un "proceso patológico relacionado con la expresión de ALAS1" o similares, tal como se utilizan en la presente, incluyen cualquier afección, trastorno o enfermedad en la cual se altera (p. ej., se incrementa) la expresión de ALAS1, se altera (p. ej., se incrementa) el nivel de una o más porfirinas, se altera el nivel o la actividad de una o más enzimas de la vía biosintética del grupo hemo (vía de las porfirinas) u otros mecanismos que produzcan cambios patológicos en la vía biosintética del grupo hemo. Por ejemplo, un ARNi que tenga un gen ALAS1 como diana, o una combinación de estos, se puede utilizar para el tratamiento de afecciones en las cuales los niveles de una porfirina o un precursor de una porfirina (p. ej., ALA o PBG) sean elevados (p. ej. ciertas porfirias) o afecciones en las que existan defectos en las enzimas de la vía biosintética del grupo hemo (p. ej., ciertas porfirias). Los trastornos relacionados con la expresión de ALAS1 incluyen, por ejemplo, anemia sideroblástica relacionada con X (XLSA), porfiria debida a la deficiencia de ALA-deshidratasa (porfiria de Doss), porfiria intermitente aguda (AIP), porfiria eritropoyética congénita, porfiria cutánea tardía, coproporfiria hereditaria (coproporfiria), porfiria variegata, protoporfiria eritropoyética (EPP) y eritroporfiria transitoria de la infancia.
- Un "sujeto", tal como se utiliza en la presente, que se ha de tratar de acuerdo con los métodos descritos en la presente incluye un ser humano o un animal no humano, p. ej., un mamífero. El mamífero puede ser, por ejemplo, un roedor (p. ej., una rata o un ratón) o un primate (p. ej., un mono). El sujeto puede ser un ser humano.
- El sujeto puede padecer un trastorno relacionado con la expresión de ALAS1 (p. ej., se le ha diagnosticado una porfiria o ha sufrido uno o más síntomas de porfiria y es portador de una mutación asociada con la porfiria) o corre el riesgo de desarrollar un trastorno relacionado con la expresión de ALAS1 (p. ej., un sujeto con un historial familiar de porfiria o un sujeto que es portador de una mutación genética asociada con la porfiria).
- Las clasificaciones de las porfirias, incluidas las porfirias hepáticas agudas, se describen, p. ej., en Balwani, M. y Desnick, R.J., Blood, 120(23), publicado en línea como un artículo de la primera edición de Blood, 12 de julio, 102; DOI 10.1182/blood-2012-05-423186. Según describen Balwain y Desnick, la porfiria intermitente aguda, (AIP) la coproporfiria hereditaria (HCP) y la porfiria variegata (VP) son porfirias dominantes autosómicas y la porfiria debida a la deficiencia de ALA- deshidratasa (ADP) es recesiva autosómica. En raras ocasiones, AIP, HCP y VP aparecen como formas dominantes homocigóticas. Además, existe una forma recesiva homocigótica rara de la porfiria cutánea tardía (PCT), que es la única porfiria cutánea hepática, y también se conoce como porfiria hepatopoyética. Las características clínicas y de laboratorio de estas porfirias se describen en la Tabla 11 a continuación.

Porfiria	Enzima deficiente	Herencia	Síntomas NV o CP	Síntomas principales,	Actividad enzimática, % de la normal	Eritrocitos	Orina	Heces
Porfirias hepáticas agudas								
ADP	ALA-deshidratasa	AR	NV		~5		ALA, coproporfirina III	
AIP	HMB-sintasa	AD	NV		~50		ALA, PBG, uroporfirina	
HCP	COPRO-oxidasa	AD	NV y CP		~50		ALA, PBG, coproporfirina III	coproporfirina III
VP	PROTO-oxidasa	AD	NV y CP		~50		ALA, PBG, coproporfirina III	coproporfirina III, protoporfirina
Porfirias cutáneas hepáticas								
PCT	URO-descarboxilasa	Esporádica AD	o CP		<20	–	uroporfirina, carboxilato porfirina	7- uroporfirina, carboxilato porfirina
AR se refiere a autosómica recesiva; AD, autosómica dominante; NV, neurovisceral; CP (por sus siglas en inglés), fotosensibilidad cutánea; y –, no procede.								

*Incrementos que pueden ser importantes para el diagnóstico.

*Incrementos que pueden ser importantes para el diagnóstico.

- El sujeto puede padecer o correr el riesgo de desarrollar una porfiria, p. ej., una porfiria hepática, p. ej., AIP, HCP, VP, ADP o una porfiria hepatoeritropoyética.
- 5 La porfiria puede ser una porfiria hepática aguda, p. ej., una porfiria hepática aguda seleccionada entre porfiria intermitente aguda (AIP), coproporfiria hereditaria (HCP), porfiria variegata (VP) y porfiria debida a la deficiencia de ALA-deshidratasa (ADP).
- La porfiria puede ser una porfiria dual, p. ej., al menos dos porfirias. La porfiria dual puede comprender dos o más porfirias seleccionadas entre una porfiria intermitente aguda (AIP), coproporfiria hereditaria (HCP), porfiria variegata (VP) y porfiria debida a la deficiencia de ALA-deshidratasa (ADP).
- 10 La porfiria puede ser una porfiria hepática dominante homocigótica (p. ej., AIP, HCP o VP dominante homocigótica) o una porfiria hepatoeritropoyética. La porfiria puede ser AIP, HCP, VP o una porfiria hepatoeritropoyética, o una combinación de estas (p. ej., una porfiria dual). La AIP, HCP o VP es o bien dominante heterocigótica o dominante homocigótica.
- 15 El sujeto puede padecer o correr el riesgo de desarrollar una porfiria, p. ej., ADP y puede presentar un nivel elevado (p. ej., un nivel elevado en orina) de ALA y/o coproporfirina III. El sujeto puede padecer o correr el riesgo de desarrollar una porfiria, p. ej., ADP y puede presentar un nivel elevado del eritrocito Zn-protoporfirina.
- El sujeto puede padecer o correr el riesgo de desarrollar una porfiria, p. ej., AIP y puede presentar un nivel elevado (p. ej., un nivel elevado en orina) de ALA, PBG y/o uroporfirina.
- 20 El sujeto puede padecer o correr el riesgo de desarrollar una porfiria, p. ej., HCP y presenta un nivel elevado (p. ej., un nivel elevado en orina) de ALA, PBG, y/o coproporfirina III. El sujeto puede padecer o correr el riesgo de desarrollar una porfiria, p. ej., HCP y puede presentar un nivel elevado (p. ej., un nivel elevado en las heces) de coproporfirina III.
- El sujeto puede padecer o correr el riesgo de desarrollar una porfiria, p. ej., VP y puede presentar un nivel elevado (p. ej., un nivel elevado en orina) de ALA, PBG, y/o coproporfirina III.
- 25 El sujeto puede padecer o correr el riesgo de desarrollar una porfiria, p. ej., HCP y puede presentar un nivel elevado (p. ej., un nivel elevado en las heces) de coproporfirina III y/o protoporfirina.
- El sujeto puede padecer o correr el riesgo de desarrollar una porfiria, p. ej., PCT (p. ej., porfiria hepatoeritropoyética) y puede presentar un nivel elevado (p. ej., un nivel elevado en orina) de uroporfirina y/o 7-carboxilatorporfirina. El sujeto puede padecer o correr el riesgo de desarrollar una porfiria, p. ej., PCT (p. ej., porfiria hepatoeritropoyética) y puede presentar un nivel elevado (p. ej., un nivel elevado en las heces) de uroporfirina y/o 7-carboxilatorporfirina.
- 30 Una mutación asociada con la porfiria incluye cualquier mutación en un gen que codifique una enzima de la vía biosintética del grupo hemo (vía de las porfirinas) o un gen que altere la expresión de un gen de la vía biosintética del grupo hemo. El sujeto puede ser portador de una o más mutaciones en una enzima de la vía de las porfirinas (p. ej., una mutación en ALA-deshidratasa o PBG-desaminasa). El sujeto puede padecer una porfiria aguda (p. ej., AIP, porfiria debida a la deficiencia de ALA-deshidratasa).
- 35 En algunos casos, los pacientes con una porfiria hepática aguda (p. ej., AIP) o pacientes que son portadores de mutaciones asociadas con una porfiria hepática aguda (p. ej., AIP) pero los cuales no presentan síntomas, tienen unos niveles elevados de ALA y/o PBG en comparación con individuos sanos. Remítase, p. ej., a Floderus, Y. et al., Clinical Chemistry, 52(4): 701-707, 2006; Sardh et al., Clinical Pharmacokinetics, 46(4): 335-349, 2007. En tales casos, el nivel de ALA y/o PBG se puede incrementar incluso cuando el paciente no padece o nunca ha padecido un ataque. En algunos casos de este tipo, el paciente es por lo demás completamente asintomático. En algunos casos de este tipo, el paciente sufre dolor, p. ej., dolor neuropático, el cual puede ser un dolor crónico (p. ej., dolor neuropático crónico). En algunos casos, el paciente padece una neuropatía. En algunos casos, el paciente padece una neuropatía progresiva.
- 40 El sujeto que se ha de tratar de acuerdo con los métodos descritos en la presente puede tener un nivel elevado de una porfirina o un precursor de una porfirina, p. ej., ALA y/o PBG. Los niveles de una porfirina o un precursor de una porfirina se pueden evaluar utilizando métodos conocidos en la técnica o métodos que se describen en la presente. Por ejemplo, los métodos para evaluar los niveles de ALA y PBG en orina y en plasma, así como también los niveles de porfirinas en orina y en plasma, se describen en Floderus, Y. et al., Clinical Chemistry, 52(4): 701-707, 2006; y Sardh et al., Clinical Pharmacokinetics, 46(4): 335-349, 2007.
- 45 El sujeto puede ser un modelo animal de una porfiria, p. ej., un modelo de ratón de una porfiria (p. ej., un ratón mutado según se describe en Lindberg et al. Nature Genetics, 12: 195-199, 1996). El sujeto puede ser un ser humano, p. ej., un ser humano que padece o corre el riesgo de desarrollar una porfiria, según se describe en la presente. El sujeto puede no estar sufriendo un ataque agudo de porfiria. El sujeto puede que nunca haya sufrido un ataque. El paciente puede sufrir dolor crónico. El paciente puede presentar daños nerviosos. El sujeto puede presentar cambios en el EMG y/o cambios en la velocidad de conducción nerviosa. El sujeto puede no presentar
- 50
- 55

síntomas. El sujeto puede correr el riesgo de desarrollar una porfiria (p. ej., es portador de una mutación génica asociada con una porfiria) y no presenta síntomas. El sujeto puede haber sufrido previamente un ataque agudo pero no presentar síntomas en el momento del tratamiento.

El sujeto puede correr el riesgo de desarrollar una porfiria y se trata profilácticamente para prevenir el desarrollo de la porfiria. El sujeto puede presentar un nivel elevado de una porfirina o un precursor de una porfirina, p. ej., ALA y/o PBG. El tratamiento profiláctico puede empezar en la pubertad. El tratamiento puede reducir el nivel (p. ej., el nivel en plasma o el nivel en orina) de una porfirina o un precursor de una porfirina, p. ej., ALA y/o PBG. El tratamiento puede prevenir el desarrollo de un nivel elevado de una porfirina o un precursor de una porfirina, p. ej., ALA y/o PBG. El tratamiento puede prevenir el desarrollo, o reduce la frecuencia o la gravedad, de un síntoma asociado con una porfiria, p. ej., dolor o daños nerviosos.

El nivel de una porfirina o un precursor de una porfirina, p. ej., ALA o PBG, puede ser elevado, p. ej., en una muestra de plasma u orina del sujeto. El nivel de una porfirina o un precursor de una porfirina, p. ej., ALA o PBG, en el sujeto se puede evaluar en función del nivel absoluto de la porfirina o el precursor de la porfirina, p. ej., ALA o PBG en una muestra del sujeto. El nivel de una porfirina o un precursor de una porfirina, p. ej., ALA o PBG, en el sujeto se puede evaluar en función del nivel relativo de la porfirina o el precursor de la porfirina, p. ej., ALA o PBG, en una muestra del sujeto. El nivel relativo puede ser relativo respecto al nivel de otra proteína o compuesto, p. ej., el nivel de creatinina, en una muestra del sujeto. La muestra puede ser una muestra de orina. La muestra puede ser una muestra de plasma. La muestra puede ser una muestra de las heces.

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

La expresión "valor de referencia", tal como se utiliza en la presente, se refiere a un valor del sujeto cuando el sujeto no padece un estado patológico, o un valor de un sujeto normal o sano, o un valor de una muestra o población de referencia, p. ej., un grupo de sujetos normales o sanos (p. ej., un grupo de sujetos que no son portadores de ninguna mutación asociada con una porfiria y/o un grupo de sujetos que no padecen los síntomas asociados con una porfiria).

El valor de referencia puede ser un nivel previo a la enfermedad en el mismo individuo. El valor de referencia puede ser un nivel en una muestra o población de referencia. El valor de referencia puede ser el valor medio o mediano en una muestra o población de referencia. El valor de referencia puede ser el valor que corresponde a dos desviaciones estándar por encima de la media en una muestra o población de referencia. El valor de referencia puede ser el valor que corresponde a 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5 o 5 desviaciones estándar por encima de la media en una muestra o población de referencia.

En algunos aspectos, donde el sujeto presenta un nivel elevado de una porfirina o un precursor de una porfirina, p. ej., ALA y/o PBG, el sujeto presenta un nivel de ALA y/o PBG que es al menos un 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% o 90% superior respecto a un valor de referencia. El sujeto puede presentar un nivel de una porfirina o un precursor de una porfirina, p. ej., ALA y/o PBG, que es al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 veces superior respecto a un valor de referencia.

El valor de referencia puede ser un límite de referencia superior. La expresión "límite de referencia superior", tal como se utiliza en la presente, se refiere a un nivel que representa el límite superior del intervalo de confianza del 95% para una muestra o población de referencia, p. ej., un grupo de individuos sanos o normales (p. ej., de origen natural), p. ej., individuos que no son portadores de ninguna mutación genética asociada con una porfiria y/o individuos que no padecen ninguna porfiria. Por consiguiente, un límite de referencia inferior se refiere a un nivel que representa el límite inferior del mismo intervalo de confianza del 95%.

En algunos aspectos, cuando el sujeto presenta un nivel elevado, p. ej., un nivel en plasma o un nivel en orina, de una porfirina o un precursor de una porfirina, p. ej., ALA o PBG, el nivel es superior o igual a 2 veces, 3 veces, 4 veces o 5 veces el de un valor de referencia, p. ej., un valor de referencia superior. El sujeto puede presentar un nivel en orina de una porfirina o un precursor de una porfirina, p. ej., ALA o PBG que es superior a 4 veces el de un límite de referencia superior.

El valor de referencia puede ser un valor proporcionado en Floderus, Y. et al., Clinical Chemistry, 52(4): 701-707, 2006 o Sardh et al., Clinical Pharmacokinetics, 46(4): 335-349, 2007. El valor de referencia puede ser un valor proporcionado en la Tabla 1 de Sardh et al.

El sujeto puede ser un ser humano y presenta un nivel de PBG en orina superior o igual a 4.8 mmol/mol de creatinina. El sujeto puede ser un ser humano y presenta un nivel de PBG en orina superior a, o superior o igual a, aproximadamente 3, 4, 5, 6, 7 u 8 mmol/mol de creatinina.

5 El valor de referencia para PBG en plasma puede ser de 0.12 $\mu\text{mol/L}$. El sujeto puede ser un ser humano y presenta un nivel de PBG en plasma superior a, o superior o igual a, 0.10 $\mu\text{mol/L}$, 0.12 $\mu\text{mol/L}$, 0.24 $\mu\text{mol/L}$, 0.36 $\mu\text{mol/L}$, 0.48 $\mu\text{mol/L}$ o 0.60 $\mu\text{mol/L}$. El sujeto puede ser un ser humano y presenta un nivel de PBG en plasma superior a, o superior o igual a, 0.48 $\mu\text{mol/L}$.

10 El valor de referencia para PBG en orina puede ser de 1.2 mmol/mol de creatinina. El sujeto puede ser un ser humano y puede presentar un nivel de PBG en orina superior a, o superior o igual a, 1.0 mmol/mol de creatinina, 1.2 mmol/mol de creatinina, 2.4 mmol/mol de creatinina, 3.6 mmol/mol de creatinina, 4.8 mmol/mol de creatinina o 6.0 mmol/mol de creatinina. El sujeto puede ser un ser humano y puede presentar un nivel de PBG en orina superior a, o superior o igual a, 4.8 mmol/mol de creatinina.

15 El valor de referencia para ALA en plasma puede ser de 0.12 $\mu\text{mol/L}$. El sujeto puede ser un ser humano y puede presentar un nivel de ALA en plasma superior a, o superior o igual a, 0.10 $\mu\text{mol/L}$, 0.12 $\mu\text{mol/L}$, 0.24 $\mu\text{mol/L}$, 0.36 $\mu\text{mol/L}$, 0.48 $\mu\text{mol/L}$ o 0.60 $\mu\text{mol/L}$. El sujeto puede ser un ser humano y puede presentar un nivel de ALA en plasma superior a, o superior o igual a, 0.48 $\mu\text{mol/L}$.

20 El valor de referencia para ALA en orina puede ser de 3.1 mmol/mol de creatinina. El sujeto puede ser un ser humano y puede presentar un nivel de ALA en orina superior a, o superior o igual a, 2.5 mmol/mol de creatinina, 3.1 mmol/mol de creatinina, 6.2 mmol/mol de creatinina, 9.3 mmol/mol de creatinina, 12.4 mmol/mol de creatinina o 15.5 mmol/mol de creatinina.

25 El valor de referencia para la porfirina en plasma puede ser de 10 nmol/L. El sujeto puede ser un ser humano y puede presentar un nivel de porfirina en plasma superior a, o superior o igual a, 10 nmol/L. El sujeto puede ser un ser humano y puede presentar un nivel de porfirina en plasma superior a, o superior o igual a 8, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50 nmol/L. El sujeto puede ser un ser humano y puede presentar un nivel de porfirina en plasma superior a, o superior o igual a, 40 nmol/L. El valor de referencia para la porfirina en orina puede ser de 25 $\mu\text{mol/mol}$ de creatinina. El sujeto es un ser humano y presenta un nivel de porfirina en orina superior a, o superior o igual a, 25 $\mu\text{mol/mol}$ de creatinina. El sujeto puede ser un ser humano y puede presentar un nivel de porfirina en orina superior a, o superior o igual a, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75 u 80 $\mu\text{mol/mol}$ de creatinina.

30 El sujeto puede presentar un nivel, p. ej., un nivel en plasma o un nivel en orina, de una porfirina o un precursor de una porfirina, p. ej., ALA o PBG, que es superior al de un 99% de los individuos en una muestra de individuos sanos.

El sujeto puede presentar un nivel, p. ej., un nivel en plasma o un nivel en orina, de ALA o PBG que es superior a dos desviaciones estándar por encima del nivel medio en una muestra de individuos sanos.

35 El sujeto puede presentar un nivel de ALA en orina que es 1.6 o más veces el nivel medio en un sujeto normal (p. ej., un sujeto que no es portador de ninguna mutación asociada con una porfiria). El sujeto puede presentar un nivel de ALA en plasma que es 2 o 3 veces el nivel medio en un sujeto normal. El sujeto puede presentar un nivel de PBG en orina que es cuatro o más veces el nivel medio en un sujeto normal. El sujeto puede presentar un nivel de PBG en plasma que es cuatro o más veces el nivel medio en un sujeto normal.

40 El método puede ser eficaz para reducir el nivel de una porfirina o un precursor de una porfirina, p. ej., ALA y/o PBG. El método puede ser eficaz para producir una reducción predeterminada en el nivel elevado de la porfirina o el precursor de la porfirina, p. ej., ALA o PBG. La reducción predeterminada puede ser una reducción de al menos un 10%, 20%, 30%, 40% o 50%. La reducción predeterminada puede ser una reducción que es eficaz para prevenir o mejorar los síntomas, p. ej., el dolor o ataques recurrentes.

45 La reducción predeterminada puede ser una reducción que corresponde a 1, 2, 3 o más desviaciones estándar, donde la desviación estándar se determina en función de los valores de una muestra de referencia, p. ej., una muestra de referencia según se describe en la presente.

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

50 El sujeto que se ha de tratar de acuerdo con los métodos descritos puede sufrir dolor, p. ej., dolor crónico. El sujeto puede padecer o correr el riesgo de desarrollar una porfiria, p. ej., una porfiria hepática aguda, p. ej., AIP. El método puede ser eficaz para tratar el dolor, p. ej., mediante la reducción de la intensidad del dolor o curando el dolor. El método puede ser eficaz para reducir o prevenir daños nerviosos.

El sujeto que se ha de tratar de acuerdo con los métodos descritos en la presente (a) puede presentar un nivel elevado de ALA y/o PBG y (b) puede sufrir dolor, p. ej., dolor crónico. El método puede ser eficaz para reducir un

nivel elevado de ALA y/o PBG y/o para tratar el dolor, p. ej., mediante la reducción de la intensidad del dolor o curando el dolor.

El sujeto puede ser un mamífero que sirve como modelo para un trastorno relacionado con la expresión de ALAS1.

El sujeto puede ser un animal que sirve como modelo para una porfiria (p. ej., un animal modificado genéticamente con una o más mutaciones). La porfiria es AIP y el sujeto puede ser un modelo animal de AIP. El sujeto puede ser un ratón modificado genéticamente que es deficiente en porfobilinógeno-desaminasa tal como, por ejemplo, el ratón descrito en Lindberg *et al.*, *Nature Genetics*, 12:195-199, 1996, o el ratón R167Q homocigótico descrito en Yasuda, M., Yu, C. Zhang, J., Clavero, S., Edelmann, W., Gan, L., Phillips, J.D. y Desnick, R.J. *Acute intermittent porphyria: A severely affected knock-in mouse that mimics the human homozygous dominant phenotype* (resumen de la presentación del 14 de octubre de 2011 en el Congreso *American Society of Human Genetics*; Programa N.º 1308F; al cual se accedió en línea el 4 de abril de 2012 en ichg2011.org/cgi-bin/showdetail.pl?absno=21167). Se han generado varios modelos de activación para mutaciones que provocan AIP dominante homocigótica en seres humanos. Las mutaciones empleadas incluyen, p. ej., R167Q, R173Q y R173W en la PBG-desaminasa. Los casos homocigóticos viables incluyeron R167Q/R176Q y R167Q/R173Q, los cuales presentan niveles de ALA y PBG constitutivamente elevados análogos a los del genotipo en AIP dominante homocigótica en seres humanos; p. ej., un modelo de ratón de AIP homocigótica variable de este tipo puede ser el sujeto.

Un sujeto que se ha de tratar de acuerdo con los métodos descritos en la presente (p. ej., un paciente o sujeto humano) puede correr el riesgo de desarrollar, o puede que se le haya diagnosticado, un trastorno relacionado con la expresión de ALAS1, p. ej., una porfiria. El sujeto puede ser un sujeto que ha padecido uno o más ataques agudos de uno o más síntomas porfíricos. El sujeto puede ser un sujeto que ha padecido crónicamente uno o más síntomas de porfiria (p. ej., dolor, p. ej., dolor neuropático y/o una neuropatía, p. ej., una neuropatía progresiva). El sujeto puede ser portador de una alteración genética (p. ej., una mutación) según se describe en la presente, pero por lo demás no presenta síntomas. El sujeto puede haber sido tratado previamente con un producto de tipo hemo (p. ej., hemina, arginato de hemo o albúmina que contiene hemo), según se describe en la presente.

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

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

El ARNi se puede administrar combinado con un producto de tipo hemo (p. ej., hemina, arginato de hemo o albúmina que contiene hemo). Asimismo, el ARNi se puede administrar combinado con un producto de tipo hemo y glucosa, un producto de tipo hemo y dextrosa o un producto de tipo hemo y nutrición parenteral total.

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

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

La administración de un ARNi de ALAS1 puede provocar una reducción del nivel de una o más porfirinas o precursores de porfirinas, según se describe en la presente (p. ej., ALA y/o PBG). La reducción se puede medir con relación a cualquier valor de referencia o control adecuado. Por ejemplo, la reducción del nivel de una o más porfirinas o precursores de porfirinas se puede establecer en un sujeto individual, p. ej., como una reducción de al menos un 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50% o más en comparación con el nivel previo al tratamiento (p. ej., inmediatamente antes del tratamiento). La reducción del nivel de un precursor de una porfirina, una porfirina o un metabolito de una porfirina se puede medir utilizando cualquier método conocido en la técnica. Por

ejemplo, el nivel de PBG y/o ALA en orina o plasma se puede evaluar utilizando la prueba de Watson-Schwartz, cromatografía de intercambio iónico o cromatografía líquida de alta resolución-espectrometría de masas. Remítase, p. ej., a Thunell (1993).

5 La administración de un ARNi de ALAS1 puede ser eficaz para reducir el nivel de ALA y/o PBG en el sujeto. El nivel de ALA o PBG en el sujeto se puede evaluar, p. ej., basándose en el nivel absoluto de ALA o PBG, o basándose en el nivel relativo de ALA o PBG (p. ej., relativo respecto al nivel de otra proteína o compuesto, p. ej., el nivel de creatinina) en una muestra del sujeto. La muestra puede ser una muestra de orina. La muestra puede ser una muestra de plasma.

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

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

20 La administración de ARNi o la administración de ARNi combinado con uno o más tratamientos adicionales (p. ej., glucosa, dextrosa o similares) puede reducir la frecuencia de ataques agudos (p. ej., mediante la prevención de los ataques agudos de modo que ya no se produzcan, o puede reducir el número de ataques que se producen en un cierto periodo de tiempo, p. ej., se producen menos ataques por año). El ARNi se puede administrar de acuerdo con una pauta posológica regular, p. ej., diariamente, semanalmente, cada dos semanas o mensualmente.

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

25 El ARNi se puede administrar durante un ataque agudo de porfiria. El ARNi se puede encontrar en una composición, p. ej., una composición que comprende una formulación lipídica (p. ej., una formulación LNP) o una composición que comprende un conjugado de tipo GalNAc.

30 La administración de un ARNi de ALAS1 puede ser eficaz para reducir la gravedad del ataque (p. ej., mejora uno o más signos o síntomas asociados con el ataque). La administración de un ARNi de ALAS1 puede ser eficaz para reducir la duración de un ataque. La administración de un ARNi de ALAS1 es eficaz para detener un ataque. El ARNi se puede administrar profilácticamente para prevenir un ataque agudo de porfiria. El ARNi se puede encontrar en la forma de un conjugado de tipo GalNAc, p. ej., en una composición que comprende un conjugado de tipo GalNAc. La administración profiláctica se puede llevar a cabo antes, durante o después de la exposición a un factor precipitante o la aparición de este. El sujeto puede correr el riesgo de desarrollar una porfiria.

35 El ARNi se puede administrar durante un pródromo. El pródromo se puede caracterizar por dolor (p. ej., cefalea y/o dolor abdominal), náusea, síntomas psicológicos (p. ej., ansiedad), inquietud y/o insomnio.

El ARNi se puede administrar durante una fase particular del ciclo menstrual, p. ej., durante la fase luteínica.

40 La administración de un ARNi de ALAS1 puede ser eficaz para prevenir ataques (p. ej., ataques recurrentes que se asocian con un pródromo y/o con un factor precipitante, p. ej., con una fase particular del ciclo menstrual, p. ej., la fase luteínica). La administración de un ARNi de ALAS1 puede ser eficaz para reducir la frecuencia de los ataques. La administración de un ARNi de ALAS1 puede ser eficaz para reducir la gravedad del ataque (p. ej., mejora uno o más signos o síntomas asociados con el ataque). La administración de un ARNi de ALAS1 puede ser eficaz para reducir la duración de un ataque. La administración de un ARNi de ALAS1 puede ser eficaz para detener un ataque.

45 La administración de un ARNi de ALAS1 puede ser eficaz para prevenir o reducir la frecuencia o la intensidad del dolor, p. ej., el dolor neuropático.

La administración de un ARNi de ALAS1 puede ser eficaz para prevenir o reducir la frecuencia o la intensidad de una neuropatía.

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

55

una población que ha sido tratada con placebo o un ARNi sin diana, opcionalmente combinado con uno o más tratamientos convencionales para la porfiria (p. ej., glucosa, p. ej., glucosa IV) y similares.

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

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

15 La alteración puede ser una mutación en el gen ALAS1. La alteración puede ser una mutación en el promotor del gen ALAS1 o en regiones en dirección 5' o dirección 3' del gen ALAS1. La alteración puede ser una mutación en factores de transcripción u otros genes que interaccionan con ALAS1. La alteración puede ser una alteración, p. ej., una mutación, en un gen que codifica una enzima en la vía biosintética del grupo hemo.

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

25 El sujeto puede tener una mutación asociada con AIP, HCP, VP o ADP.

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

La porfiria puede ser HCP. En algunos de tales aspectos, el sujeto puede tener una alteración, p. ej., al menos una mutación, en el gen que codifica la enzima coproporfirinógeno III-oxidasa.

35 La porfiria puede ser VP. En algunos de tales aspectos, el sujeto puede tener una alteración, p. ej., al menos una mutación, en el gen que codifica la protoporfirinógeno-oxidasa.

La porfiria puede ser ADP, p. ej., ADP recesiva autosómica. El sujeto puede tener una alteración, p. ej., al menos una mutación, en el gen que codifica la ALA-deshidratasa.

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

55 Los métodos descritos en la presente también pueden servir para reducir niveles crónicamente elevados de precursores de porfirinas (p. ej. ALA y/o PBG) en sujetos que padecen una porfiria (p. ej., una porfiria hepática aguda, p. ej., AIP) o que corren el riesgo de desarrollar una porfiria. Los métodos para evaluar los niveles en plasma y orina (p. ej., niveles crónicamente elevados) de precursores de porfirinas incluyen, p. ej., HPLC-espectrometría de masas y cromatografía de intercambio iónico. Los niveles de precursores de porfirinas se pueden expresar como el

nivel relativo respecto a otra proteína o compuesto, p. ej., la creatinina. Remítase, p. ej., a Floderus, Y. et al., *Clinical Chemistry*, 52(4): 701-707, 2006; Sardh et al., *Clinical Pharmacokinetics*, 46(4): 335-349, 2007.

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

Los síntomas asociados con una porfiria pueden incluir dolor o calambres abdominales, cefaleas, efectos provocados por anomalías del sistema nervioso y sensibilidad a la luz, que provoca sarpullidos, ampollas y aparición de cicatrices en la piel (fotodermatitis). La porfiria puede ser AIP. Los síntomas de la AIP incluyen síntomas gastrointestinales (p. ej., dolor abdominal intenso y poco localizado, náusea/vómitos, estreñimiento, diarrea, íleo), síntomas urinarios (disuria, retención/incontinencia urinaria u orina oscura), síntomas neurológicos (p. ej., neuropatía sensorial, neuropatía motriz (p. ej., que afecta a los nervios craneales y/o que provoca debilidad en los brazos o las piernas), convulsiones, dolor neuropático, neuropatía progresiva, cefaleas, síntomas neuropsiquiátricos (p. ej., confusión mental, ansiedad, agitación, alucinación, histeria, delirio, apatía, depresión, fobias, psicosis, insomnio, somnolencia, coma), participación del sistema nervioso autónomo (que provoca, p. ej., síntomas cardiovasculares tales como taquicardia, hipertensión y/o arritmias, así como también otros síntomas tales como, p. ej., un incremento de los niveles de catecolamina en circulación, sudoración, inquietud y/o temblores), deshidratación y anomalías electrolíticas.

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

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

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

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

una porfirina (p. ej., ALA y/o PBG) u otro efecto que sea reconocido en general como positivo por los doctores médicos familiares con el tratamiento del tipo particular de trastorno.

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

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

El ARNi se puede formular como una formulación lipídica, p. ej., una formulación LNP según se describe en la presente. La cantidad terapéutica puede ser de 0.05-5 mg/kg, p. ej., de 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5 o 5.0 mg/kg de ARNbc. La formulación lipídica, p. ej., una formulación LNP, se puede administrar por vía intravenosa.

El ARNi se puede administrar mediante una infusión intravenosa durante un periodo de tiempo tal como durante un periodo de 5 minutos, 10 minutos, 15 minutos, 20 minutos o 25 minutos.

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

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

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

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

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

- El agente de ARNi se puede administrar para prevenir o reducir la gravedad o la frecuencia de ataques recurrentes, p. ej., ataques cíclicos asociados con un factor precipitante. El factor precipitante puede ser el ciclo menstrual. El ARNi se puede administrar de forma repetida, p. ej., en intervalos regulares para prevenir o reducir la gravedad o la frecuencia de ataques recurrentes, p. ej., ataques cíclicos asociados con un factor precipitante, p. ej., el ciclo menstrual, p. ej., una fase particular del ciclo menstrual, p. ej., la fase luteínica. El ARNi se puede administrar durante una fase particular del ciclo menstrual o en función de los niveles hormonales del paciente que se esté tratando (p. ej., en función de los niveles hormonales que se asocian con una fase particular del ciclo menstrual). El ARNi se puede administrar en uno o más días particulares del ciclo menstrual, p. ej., en el día 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 o en el día 28 (o en un día posterior para sujetos que tienen un ciclo menstrual más prolongado). El ARNi se puede administrar durante la fase luteínica, p. ej., en uno o más días entre los días 14-28 del ciclo menstrual (o posteriormente en sujetos que tienen un ciclo menstrual de más de 28 días). Se puede evaluar la ovulación del sujeto (p. ej., utilizando una prueba en sangre u orina que detecta una hormona asociada con la ovulación, p. ej., LH) y el ARNi se administra en un intervalo predeterminado después de la ovulación. El ARNi se puede administrar inmediatamente después de la ovulación. El ARNi se puede administrar 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 o 18 días después de la ovulación. Cualquiera de estos programas se puede repetir opcionalmente durante una o más iteraciones. El número de iteraciones puede depender de la obtención del efecto deseado, p. ej., la supresión de un gen ALAS1 y/o la obtención de un efecto terapéutico o profiláctico, p. ej., reducir o prevenir uno o más síntomas asociados con una porfiria, para reducir la frecuencia de los ataques asociados con una porfiria.
- Se describe que se puede administrar una dosis inicial del agente de ARNi y se puede evaluar el nivel de ALA o PBG, p. ej., 1-48 horas, p. ej., 2, 4, 8, 12 o 24 horas después de la administración de la dosis inicial. Si el nivel de ALA y/o PBG se ha reducido (p. ej. hasta conseguir una reducción predeterminada, p. ej., una normalización) y/o si los síntomas asociados con una porfiria (p. ej., dolor) han mejorado (p. ej., de manera que el paciente no presente síntomas), no se puede administrar ninguna dosis adicional, mientras que si el nivel de ALA y/o PBG no se ha reducido (p. ej., no ha alcanzado una reducción predeterminada, p. ej., no se ha normalizado), se administra una dosis adicional de ALA o PBG. La dosis adicional se puede administrar 12, 24, 36, 48, 60 o 72 horas después de la dosis inicial. Si la dosis inicial no es eficaz para reducir el nivel de ALA y/o PBG, la dosis adicional se puede modificar, p. ej., se incrementa para alcanzar una reducción deseada (p. ej., una reducción predeterminada, p. ej., una normalización) de los niveles de ALA o PBG.
- La reducción predeterminada puede ser una reducción de al menos un 10%, 20%, 30%, 40% o 50%. La reducción predeterminada puede ser una reducción que es eficaz para prevenir o mejorar los síntomas, p. ej., el dolor, síntomas prodrómicos o ataques recurrentes.
- La reducción predeterminada puede ser una reducción que corresponde a al menos 1, 2, 3 o más desviaciones estándar, donde la desviación estándar se determina en función de los valores de una muestra de referencia, p. ej., una muestra de referencia según se describe en la presente.
- La reducción predeterminada puede ser una reducción que modifica el nivel de la porfirina o el precursor de la porfirina hasta un nivel que es inferior a, o hasta un nivel que es inferior o igual a, un valor de referencia (p. ej., un valor de referencia según se describe en la presente).
- Una "normalización" de los niveles de ALA o PBG (o un nivel "normal" o "normalizado"), tal como se utiliza en la presente, se refiere a un nivel (p. ej., un nivel en orina y/o plasma) de ALA o PBG, o de ambos, que se encuentra dentro del intervalo esperado para un individuo sano, un individuo que no presenta síntomas (p. ej., un individuo que no experimenta dolor y/o no sufre ninguna neuropatía) o un individuo que no es portador de ninguna mutación asociada con una porfiria. Por ejemplo, un nivel normalizado se puede encontrar dentro de dos desviaciones estándar de la media normal. Un nivel normalizado se encuentra dentro de los límites de referencia normales, p. ej., dentro del intervalo de confianza del 95% para una muestra de control adecuada, p. ej., una muestra de individuos sanos o individuos que no son portadores de ninguna mutación génica asociada con una porfiria. El nivel de ALA y/o PBG del sujeto (p. ej., el nivel de ALA y/o PBG en orina y/o plasma) se puede monitorizar por intervalos y se puede administrar una dosis adicional del agente de ARNi cuando el nivel aumenta por encima del valor de referencia.
- La administración del ARNi puede reducir los niveles proteicos o de ARNm de ALAS1, p. ej., en una célula, tejido, sangre, orina u otro compartimento del paciente al menos un 10%, al menos un 15%, al menos un 20%, al menos un 25%, al menos un 30%, al menos un 40%, al menos un 50%, al menos un 60%, al menos un 70%, al menos un 80% o al menos un 90% o más. La administración del ARNi puede reducir los niveles de productos asociados con la expresión del gen ALAS1, p. ej., los niveles de una o más porfirinas o precursores de porfirinas (p. ej., el nivel de ALA y/o PBG). La administración del agente de ARNi también puede inhibir o prevenir el aumento de los niveles proteicos o de ARNm de ALAS1 durante un ataque agudo de AIP.
- Antes de la administración de una dosis completa del ARNi, se puede administrar a los pacientes una dosis más pequeña, tal como una dosis de infusión de un 5%, y monitorizar a los pacientes en busca de efectos adversos, tales como una reacción alérgica, o de una presión sanguínea o niveles lipídicos elevados. En otro ejemplo, se puede monitorizar al paciente en busca de efectos no deseados.

Métodos para modular la expresión de un gen ALAS1

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

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

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

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

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

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

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

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

Las composiciones se pueden administrar mediante una infusión o inyección intravenosa. Las composiciones comprenden un ARNi formulado en un líquido (p. ej., una formulación LNP tal como una formulación LNP11) para una infusión intravenosa. En particular, tales composiciones se pueden utilizar para tratar ataques agudos de porfiria y/o para la profilaxis (p. ej., para reducir la gravedad o la frecuencia de los ataques).

Las composiciones se pueden administrar además por vía subcutánea. En algunos aspectos de este tipo, las composiciones pueden comprender un ARNi conjugado con un ligando de tipo GalNAc. En particular, tales composiciones se pueden utilizar para tratar ataques agudos de porfiria o para la profilaxis (p. ej., para reducir la gravedad o la frecuencia de los ataques).

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

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

La célula se puede encontrar *ex vivo*, *in vitro* o *in vivo*. La célula puede ser una célula eritroide o un hepatocito. La célula puede ser un hepatocito. La célula se puede encontrar en un sujeto (p. ej., un mamífero tal como, por ejemplo, un ser humano).

El sujeto (p. ej., el ser humano) puede correr el riesgo de padecer o ha sido diagnosticado con una porfiria, según se describe en la presente. El método puede ser eficaz para tratar una porfiria según se describe en la presente (p. ej., mejorando uno o más síntomas asociados con una porfiria, reduciendo la frecuencia de los ataques asociados con una porfiria, reduciendo la probabilidad de que se produzca un ataque de uno o más síntomas asociados con una porfiria tras la exposición a un factor precipitante o reduciendo el riesgo de desarrollar afecciones asociadas con una porfiria (p. ej., una neuropatía (p. ej., una neuropatía progresiva), un cáncer hepatocelular). El método puede incluir poner en contacto la célula con un ARNi, según se describe en la presente, en una cantidad suficiente para reducir el nivel de la porfirina o del precursor de la porfirina (p. ej., ALA o PBG) en la célula, o en otra célula o grupo de células relacionadas, o en el sujeto. La expresión "poner en contacto", tal como se utiliza en la presente, incluye poner en contacto directamente una célula, así como también poner en contacto indirectamente una célula. Por ejemplo, una célula de un sujeto (p. ej., una célula eritroide o una célula hepática tal como un hepatocito) se puede poner en contacto cuando se administra una composición que comprende un ARNi (p. ej., por vía intravenosa o por vía subcutánea) al sujeto. La expresión "otra célula o grupo de células relacionadas", tal como se utiliza en la presente, incluye cualquier célula o grupo de células en las que el nivel de la porfirina o el precursor de la porfirina se reduce como resultado de la puesta en contacto. Por ejemplo, la célula puede formar parte de un tejido presente en un sujeto (p. ej., una célula hepática presente en un sujeto) y el hecho de poner en contacto la célula del sujeto (p. ej., poner en contacto una o más células hepáticas presentes en un sujeto) con el ARNi puede provocar una reducción del nivel de la porfirina o del precursor de la porfirina en otra célula o grupo de células relacionadas (p. ej., células nerviosas del sujeto) o en un tejido o fluido del sujeto (p. ej., en la orina, sangre, plasma o fluido cerebroespinal del sujeto).

La porfirina o el precursor de porfirina se puede seleccionar del grupo constituido por ácido δ -aminolevulínico (ALA), porfopilinógeno (PBG), hidroximetilbilano (HMB), uroporfirinógeno III, coproporfirinógeno III, protoporfirinógeno IX y protoporfirina IX. El precursor de porfirina puede ser ALA. El precursor de porfirina puede ser PBG. El método puede reducir el nivel de ALA y PBG. El nivel de una porfirina o un precursor de una porfirina se puede medir según se describe en la presente y se conoce en la técnica.

Ensayos y métodos para monitorizar la actividad de iARN

En otro aspecto, también se proporcionan en la presente ensayos y métodos para monitorizar los niveles de ARNm de ALAS1. La actividad de iARN en el hígado se puede monitorizar detectando los niveles de ARNm o el producto 5'RACE en el tejido, o detectando el nivel de la proteína secretada circulante.

Como alternativa, o en combinación, los niveles extracelulares circulantes de ARNm de ALAS1 se pueden detectar, p. ej., mediante ensayos cERD (siglas en inglés de detección de ARN extracelular circulante, *Circulating Extracellular RNA Detection*). El nivel de ARNm de ALAS1 se puede detectar en una muestra de fluido corporal, p. ej., una muestra de suero u orina. Diferentes tipos de células pueden verter exosomas, que contienen ARNm y ARNm derivados de un tejido de origen, en los fluidos corporales. Tales exosomas se pueden utilizar para monitorizar el nivel de iARN en circulación. Una muestra, p. ej., una muestra de suero u orina de un sujeto tratado con una ARNi descrita en la presente se puede purificar con una centrifugación a baja velocidad, seguido por una centrifugación a aproximadamente 160 000g durante aproximadamente 2 horas para formar un sedimento. El ARN se puede extraer y analizar para medir los niveles de ARNm de ALAS1. Se describen métodos y ensayos ejemplares en el documento PCT/US2012/043584, publicado como WO 2012/177906.

En consecuencia, se proporciona un ensayo, o método, para detectar el nivel de ARNm de ALAS1 extracelular circulante en un sujeto. El ensayo, o método, incluye proporcionar ARN (p. ej., ARN extracelular) de una muestra de fluido biológico (p. ej., muestra de orina, sangre o plasma) del sujeto, comprendiendo dicha muestra de fluido biológico el ARNm de ALAS1; y detectar el nivel de ARNm de ALAS1 extracelular circulante en la muestra.

El ensayo o método puede incluir el paso de obtener un ADNc de ALAS1 a partir del ARNm de ALAS1; y poner en contacto el ADNc de ALAS1 con un ácido nucleico complementario (p. ej., sonda y/o cebador) con el ADNc de ALAS1 o una porción de este, para producir de esta manera una mezcla de reacción; y detectar (p. ej., medir) el nivel de ADNc de ALAS1 en la mezcla de reacción, donde el nivel de ADNc de ALAS1 es indicativo del nivel de ARNm de ALAS1, para analizar de esta manera el nivel de ARNm de ALAS1 extracelular circulante en el sujeto.

El ensayo o método puede incluir adquirir una muestra de fluido biológico de un sujeto, donde la muestra biológica se separa del tejido, y donde la muestra biológica contiene exosomas. El ensayo o método puede incluir además detectar los niveles de ARN en la muestra biológica, donde el ARN se expresa a partir del gen en el tejido del sujeto, donde los exosomas no se purifican a partir de la muestra biológica antes de detectar los niveles de ARN en la muestra biológica.

Dicha muestra de fluido biológico puede ser una muestra de sangre. Dicha muestra de fluido biológico puede ser una muestra de suero. La muestra de fluido biológico puede ser una muestra de orina.

El método puede comprender PCR, qPCR o 5'-RACE.

Dicho ácido nucleico puede ser una sonda o cebador.

- 5 Dicho ácido nucleico puede comprender un resto detectable y el nivel de ARNm de ALAS1 se determina mediante la detección de la cantidad del resto detectable.

Dicho método puede comprender además obtener la muestra de fluido biológico del sujeto.

En algunos de estos métodos, se evalúa la eficacia de un tratamiento de la porfiria en función de una comparación del nivel de ARNm de ALAS1 extracelular circulante en el sujeto respecto a un valor de referencia.

- 10 Una reducción en el nivel de ARNm de ALAS1 extracelular circulante en el sujeto en respuesta al tratamiento de la porfiria, respecto al valor de referencia, puede indicar que el tratamiento de la porfiria es eficaz. El valor de referencia puede ser el nivel de ARNm de ALAS1 extracelular circulante en el sujeto antes del tratamiento de la porfiria.

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

- 15 Asimismo, los materiales, métodos y ejemplos son únicamente ilustrativos y no pretenden ser limitantes.

EJEMPLOS

Ejemplo 1. Síntesis de ARNip

Origen de los reactivos

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

Síntesis de oligonucleótidos

- 25 Todos los oligonucleótidos se sintetizan en un sintetizador AKTAoligopilot. Para la síntesis de los oligonucleótidos, se utilizaron soportes sólidos de vidrio con poros controlados que se pueden adquirir de proveedores comerciales (dT-CPG, 500 Å, Prime Synthesis) y fosforamiditos de ARN con grupos protectores estándar, 5'-O-dimetoxitritil-N6-benzoyl-2'-t-butildimetilsililadenosin-3'-O-N,N'-diisopropil-2-cianoetilfosforamidito, 5'-O-dimetoxitritil-N4-acetil-2'-t-butildimetilsililcitidin-3'-O-N,N'-diisopropil-2-cianoetilfosforamidito, 5'-O-dimetoxitritil-N2-isobutil-2'-t-butildimetilsililguanosen-3'-O-N,N'-diisopropil-2-cianoetilfosforamidito y 5'-O-dimetoxitritil-2'-t-butildimetilsililuridin-3'-O-N,N'-diisopropil-2-cianoetilfosforamidito (Pierce Nucleic Acids Technologies). Los fosforamiditos con la sustitución 2'-F, 5'-O-dimetoxitritil-N4-acetil-2'-flurcitidin-3'-O-N,N'-diisopropil-2-cianoetilfosforamidito y 5'-O-dimetoxitritil-2'-flurouridin-3'-O-N,N'-diisopropil-2-cianoetilfosforamidito, se adquieren de Promega. Todos los fosforamiditos se utilizan con una concentración de 0.2 M en acetonitrilo (CH₃CN) excepto para la guanosina, que se utiliza con una concentración de 0.2 M en THF al 10%/ACN (v/v). Se utiliza un tiempo de acoplamiento/reciclaje de 16 minutos. El activador es 5-etiltiotetrazol (0.75 M, American International Chemicals); para la oxidación de PO se utiliza yodo/agua/piridina y para la oxidación de PS se utiliza PADS (2%) en 2,6-lutidina/ACN (1:1 v/v).
- 35

- Las hebras conjugadas con el ligando 3' se sintetizan utilizando un soporte sólido que contiene el ligando correspondiente. Por ejemplo, la introducción de una unidad de colesterol en la secuencia se lleva a cabo partiendo de un fosforamidito de hidroxiprolinol-colesterol. El colesterol se une a trans-4-hidroxiprolinol mediante un conector de tipo 6-aminoxihexanoato para obtener un resto de hidroxiprolinol-colesterol. Los ARNi marcados con Cy-3 y Cy-5.5 (fluoróforo) en el extremo 5' se sintetizan a partir del fosforamidito Quasar-570 (Cy-3) correspondiente, que se adquiere de Biosearch Technologies. La conjugación de los ligandos en el extremo 5' y/o en una posición interna se consigue utilizando bloques estructurales de fosforamidito-ligando protegidos adecuadamente. Un acoplamiento prolongado de 15 min de una solución de fosforamidito 0.1 M en CH₃CN anhidro en presencia del activador 5-(etiltio)-1H-tetrazol a un oligonucleótido unido a un soporte sólido. La oxidación del fosfito entre nucleótidos para obtener el fosfato se lleva a cabo utilizando yodo-agua estándar según se ha descrito (1) o mediante el tratamiento con hidróperóxido de tert-butilo/acetonitrilo/agua (10: 87: 3) con un tiempo de espera para la oxidación de 10 min para el oligonucleótido conjugado. El fosforotioato se introduce mediante la oxidación del fosfito para obtener el fosforotioato utilizando un reactivo de transferencia de azufre tal como DDTT (se adquiere de AM Chemicals), PADS y/o el reactivo de Beaucage. El fosforamidito de colesterol se sintetiza dentro de la empresa y se utiliza con una concentración de 0.1 M en diclorometano. El tiempo de acoplamiento para el fosforamidito de colesterol es de 16 minutos.
- 50

Desprotección I (desprotección de bases nucleotídicas)

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

Desprotección II (eliminación del grupo 2'-TBDMS)

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

Análisis

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

Purificación por HPLC

Los oligonucleótidos conjugados con ligandos se purifican mediante HPLC preparativa de fase inversa. Los oligonucleótidos no conjugados se purifican mediante HPLC de intercambio aniónico o en una columna de gel TSK empaquetada dentro de la empresa. Los tampones son fosfato de sodio 20 mM (pH 8.5) en CH₃CN al 10% (tampón A) y fosfato de sodio 20 mM (pH 8.5) en CH₃CN al 10%, NaBr 1 M (tampón B). Las fracciones que contienen los oligonucleótidos de longitud completa se agrupan, se eliminan las sales y se liofilizan. Aproximadamente 0.15 DO de los oligonucleótidos, una vez que se han eliminado las sales, se diluyen en agua hasta obtener 150 µL y a continuación se pipetea en viales especiales para el análisis de CGE y LC/MS. A continuación, los compuestos se analizan mediante LC-ESMS y CGE.

Preparación de los ARNip

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

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

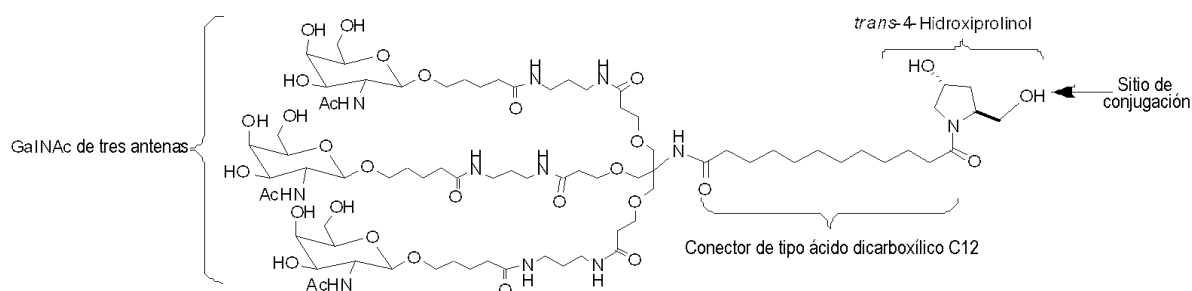
Tabla 1: Abreviaciones de los monómeros nucleotídicos que se utilizan en la representación de las secuencias de los ácidos nucleicos. Se sobreentenderá que estos monómeros, cuando estén presentes en un oligonucleótido, estarán unidos mutuamente mediante enlaces 5'-3'-fosfodiéster.

Abreviación	Nucleótido(s)/Nucleósidos
A	Adenosin-3'-fosfato, 2'-desoxi-2'-fluorouridin-5'-fosfato o adenosina
Ab	beta-L-adenosin-3'-fosfato, beta-L-adenosin-5'-fosfato o beta-L-adenosina
Abs	beta-L-adenosin-3'-fosforotioato
Af	2'-desoxi-2'-fluoroadenosin-3'-fosfato, 2'-desoxi-2'-fluoroadenosin-5'-fosfato o 2'-desoxi-2'-fluoroadenosina
Afs	2'-desoxi-2'-fluoroadenosin-3'-fosforotioato
As	adenosin-3'-fosforotioato
C	citidin-3'-fosfato, citidin-5'-fosfato o citidina
Cb	beta-L-citidin-3'-fosfato o beta-L-citidina
Cbs	beta-L-citidin-3'-fosforotioato
Cf	2'-desoxi-2'-fluorocitidin-3'-fosfato, 2'-desoxi-2'-fluorocitidin-5'-fosfato o 2'-desoxi-2'-fluorocitidina
Cfs	2'-desoxi-2'-fluorocitidin-3'-fosforotioato
(Chd)	2'-O-hexadecilcitidin-3'-fosfato o 2'-O-hexadecilcitidina
(Chds)	2'-O-hexadecilcitidin-3'-fosforotioato
Cs	citidin-3'-fosforotioato
G	guanosin-3'-fosfato, guanosin-5'-fosfato o guanosina
Gb	beta-L-guanosin-3'-fosfato, beta-L-guanosina-5'-fosfato o beta-L-guanosina
Gbs	beta-L-guanosin-3'-fosforotioato
Gf	2'-desoxi-2'-fluoroguanosin-3'-fosfato, 2'-desoxi-2'-fluoroguanosin-5'-fosfato o 2'-desoxi-2'-fluoroguanosina
Gfs	2'-desoxi-2'-fluoroguanosin-3'-fosforotioato
Gs	guanosin-3'-fosforotioato

T	5'-metiluridin-3'-fosfato, 5'-metiluridin-5'-fosfato o 5'-metiluridina
Tb	beta-L-timidin-3'-fosfato, beta-L-timidin-5'-fosfato o beta-L-timidina
Tbs	beta-L-timidin-3'-fosforotioato
Tf	2'-desoxi-2'-fluoro-5-metiluridin-3'-fosfato, 2'-desoxi-2'-fluoro-5-metiluridin-3'-fosfato o 2'-desoxi-2'-fluoro-5-metiluridina
Tfs	2'-desoxi-2'-fluoro-5-metiluridin-3'-fosforotioato
Ts	5-metiluridin-3'-fosforotioato
U	uridin-3'-fosfato, uridin-5'-fosfato o uridina
Ub	beta-L-uridin-3'-fosfato, beta-L-uridin-5'-fosfato o beta-L-uridina
Ubs	beta-L-uridin-3'-fosforotioato
Uf	2'-desoxi-2'-fluorouridin-3'-fosfato, 2'-desoxi-2'-fluorouridina o 2'-desoxi-2'-fluorouridin-3'-fosfato
Ufs	2'-desoxi-2'-fluorouridin-3'-fosforotioato
(Uhd)	2'-O-hexadeciluridin-3'-fosfato, 2'-O-hexadeciluridin-6'-fosfato o 2'-O-hexadeciluridina
(Uhds)	2'-O-hexadeciluridin-3'-fosforotioato
Us	uridin-3'-fosforotioato
N	cualquier nucleótido (G, A, C, T o U)
a	2'-O-metiladenosin-3'-fosfato, 2'-O-metiladenosin-5'-fosfato o 2'-O-metiladenosina
as	2'-O-metiladenosin-3'-fosforotioato
c	2'-O-metilcitidin-3'-fosfato, 2'-O-metilcitidin-5'-fosfato o 2'-O-metilcitidina
cs	2'-O-metilcitidin-3'-fosforotioato
g	2'-O-metilguanosin-3'-fosfato, 2'-O-metilguanosin-5'-fosfato o 2'-O-metilguanosina

(continuación)

Abreviación	Nucleótido(s)/Nucleósidos
gs	2'-O-metilguanosin-3'-fosforotioato
t	2'-O-metil-5-metiluridin-3'-fosfato, 2'-O-metil-5-metiluridin-5'-fosfato o 2'-O-metil-5-metiluridina
ts	2'-O-metil-5-metiluridin-3'-fosforotioato
u	2'-O-metiluridin-3'-fosfato, 2'-O-metiluridin-5'-fosfato o 2'-O-metiluridina
us	2'-O-metiluridin-3'-fosforotioato
dA	2'-desoxiadenosin-3'-fosfato, 2'-desoxiadenosin-5'-fosfato o 2'-desoxiadenosina
dAs	2'-desoxiadenosin-3'-fosforotioato
dC	2'-desoxicitidin-3'-fosfato, 2'-desoxicitidin-5'-fosfato o 2'-desoxicitidina
dCs	2'-desoxicitidin-3'-fosforotioato
dG	2'-desoxiguanosin-3'-fosfato, 2'-desoxiguanosin-5'-fosfato o 2'-desoxiguanosina
dGs	2'-desoxiguanosin-3'-fosforotioato o 2'-desoxiguanosina
dT	2'-desoxitimidin-3'-fosfato, 2'-desoxitimidin-5'-fosfato o 2'-desoxitimidina
dTs	2'-desoxitimidin-3'-fosforotioato
dU	2'-desoxiuridin-3'-fosfato, 2'-desoxiuridin-5'-fosfato o 2'-desoxiuridina
s	conector de tipo fosforotioato
L96 ¹	<i>N</i> -[tris(GalNAc-alkil)amidodecanoil]-4-hidroxirolinol Hyp(GalNAc-quilo) ₃
(Aeo)	2'-O-metoxietiladenosin-3'-fosfato, 2'-O-metoxietiladenosin-5'-fosfato o 2'-O-metoxietiladenosina
(Aeos)	2'-O-metoxietiladenosin-3'-fosforotioato
(Ceo)	2'-O-metoxietilcitidin-3'-fosfato, 2'-O-metoxietilcitidin-5'-fosfato o 2'-O-metoxietilcitidina
(Ceos)	2'-O-metoxietilcitidin-3'-fosforotioato
(Geo)	2'-O-metoxietilguanosin-3'-fosfato, 2'-O-metoxietilguanosin-5'-fosfato o 2'-O-metoxietilguanosina
(Geos)	2'-O-metoxietilguanosin-3'-fosforotioato
(Teo)	2'-O-metoxietil-5-metiluridin-3'-fosfato, 2'-O-metoxietil-5'-metiluridin-5'-fosfato o 2'-O-metoxietil-5-metiluridina
(Teos)	2'-O-metoxietil-5-metiluridin-3'-fosforotioato
(m5Ceo)	2'-O-metoxietil-5-metilcitidin-3'-fosfato, 2'-O-metoxietil-5-metilcitidin-5'-fosfato o 2'-O-metoxietil-5-metilcitidina
(m5Ceos)	2'-O-metoxietil-5-metilcitidin-3'-fosforotioato
(Agn)	1-(2,3-dihidroxiopropil)adenin-2-fosfato, 1-(2,3-dihidroxiopropil)adenin-3-fosfato o 1-(2,3-dihidroxiopropil)adenina
(Agns)	1-(2,3-dihidroxiopropil)adenin-2-fosforotioato
(Cgn)	1-(2,3-dihidroxiopropil)citosin-2-fosfato, 1-(2,3-dihidroxiopropil)citosin-3-fosfato o 1-(2,3-dihidroxiopropil)citosina
(Cgns)	1-(2,3-dihidroxiopropil)citosin-2-fosforotioato
(Ggn)	1-(2,3-dihidroxiopropil)guanin-2-fosfato, 1-(2,3-dihidroxiopropil)guanin-3-fosfato o 1-(2,3-dihidroxiopropil)guanina
(Ggns)	1-(2,3-dihidroxiopropil)guanin-2-fosforotioato
(Tgn)	1-(2,3-dihidroxiopropil)timin-2-fosfato, 1-(2,3-dihidroxiopropil)timin-3-fosfato o 1-(2,3-dihidroxiopropil)timina
(Tgns)	1-(2,3-dihidroxiopropil)timin-2-fosforotioato
(Ugn)	1-(2,3-dihidroxiopropil)uracil-2-fosfato, 1-(2,3-dihidroxiopropil)uracil-3-fosfato o 1-(2,3-dihidroxiopropil)timina
(Ugns)	1-(2,3-dihidroxiopropil)uracil-2-fosforotioato
¹ La estructura química de L96 es la siguiente:	



Ejemplo 2. Diseño y síntesis de ARNip de ALAS1

Métodos experimentales

Bioinformática

5 Transcritos

Se llevó a cabo un diseño de ARNip para identificar ARNip que tuvieran como diana transcritos de ALAS1 humanos, de rhesus (*Macaca mulatta*), ratón y rata registrados en la base de datos de genes del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>). El diseño utilizó los siguientes transcritos de la colección de RefSeq del NCBI: Humano - NM_000688.4 (remítase a la FIG.3), NM_199166.1; de rhesus - XM_001090440.2, XM_001090675.2; de ratón - NM_020559.2; de rata - NM_024484.2. Debido a la elevada divergencia de las secuencias de primate/roedor, los dúplex de ARNip se diseñaron en varios lotes separados, que incluyeron, sin carácter limitante, lotes que contenían dúplex que coincidían con transcritos humanos y de rhesus únicamente; transcritos humanos, de rhesus, ratón y rata únicamente; y transcritos de ratón y rata únicamente. La mayoría de los dúplex de ARNip se diseñaron de modo que compartieran una identidad del 100% con el transcrito humano enumerado y los transcritos de otras especies considerados en cada lote de diseño (anterior). En algunos casos (remítase a la Tabla 8), se permitieron apareamientos erróneos entre el dúplex y la diana de ARNm en la primera posición antisentido (la última posición sentido) cuando el par de bases complementario de la hebra antisentido:ARNm diana era un par GC o CG. En estos casos, los dúplex se designaron con pares UA o AU en el primer par antisentido:último par sentido. De este modo, los dúplex conservaron la complementariedad pero tenían apareamientos erróneos respecto a la diana (U:C, U:G, A:C o A:G). Dieciocho de estos dúplex de "intercambio de UA" fueron designados como parte del conjunto humano/rhesus/ratón/rata (remítase a los dúplex en la Tabla 8 con las marcas "C19U", "G19U", "C19A" o "G19A" en la columna de la Posición).

Diseño, especificidad y predicción de la eficacia de los ARNip

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

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

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

Selección de las secuencias de ARNip

Se sintetizaron oligos nonadecaméricos de ARNip humanos/de rhesus derivados de un total de 90 hebras sentido y 90 hebras antisentido, humanos/de rhesus/ratón/ratón/rata derivados de 40 hebras sentido y 40 hebras antisentido, y de ratón/rata derivados de 40 hebras sentido y 40 hebras antisentido y se utilizaron para formar los dúplex. Se sintetizaron oligos henicosaméricos/tricosaméricos humanos/de rhesus derivados de un total de 45 hebras sentido y 45 hebras antisentido para proporcionar 45 dúplex conjugados con GalNAc.

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

Síntesis de secuencias de ALAS1

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

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

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

Síntesis, escisión y desprotección:

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

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

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

Purificación y eliminación de las sales:

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

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

SEQ ID NO: (sentido)	SEQ NO: (anti-sentido)	Posición en el transcritto NM_000688.4	Nombre del dúplex	Secuencia sentido (5'-3')	Secuencia antisentido (5'-3')
2	3	522-540	AD-55078.2	cuccGGccAGuGAGAAAGAdTsdT	UCUUUCUcACUGGCCCGGAGdTsdT
4	5	669-687	AD-55084.2	uGGcAGcAcAGAuGAAuAdTsdT	UGAUUcAUCUGUGUCGcAcAdTsdT
6	7	790-808	AD-55090.2	cAGuGuGGuuAGuGuGAAAdTsdT	UUUcAcACuAAcAcACUGdTsdT
8	9	853-871	AD-55096.2	cAucAuGcAAAAAGcAAAGAdTsdT	UCUUUGCUUUUGcAUGAUgAdTsdT
10	11	876-894	AD-55102.2	AAAGAGuGucucAucucudTsdT	AGAAGAUgAGAcACUCUUUdTsdT
12	13	877-895	AD-55106.2	AAGAGuGucucAucucudTsdT	AAGAAGAUgAGAcACUCUUdTsdT
14	15	914-932	AD-55111.2	ucuGuuuccAuuuucAGdTsdT	ACUGAAAAAGUGGAAAcAGAdTsdT
16	17	923-941	AD-55073.2	AuuuucAGuAuGAGucGuudTsdT	AACGAUcAuACUGAAAAAGUdTsdT
18	19	926-944	AD-55079.2	uuucAGuAuGAGucGuuucudTsdT	AGAAACGAUcAuACUGAAAAdTsdT
20	21	927-945	AD-55085.2	uucAGuAuGAGucGuuucudTsdT	AAGAAACGAUcAuACUGAAAdTsdT
22	23	928-946	AD-55091.2	ucAGuAuGAGucGuuucudTsdT	AAAGAAACGAUcAuACUGAdTsdT
24	25	932-950	AD-55097.2	uAuGAGucGuuucuuGAGAdTsdT	UCUcAAAAAGAAACGAUcAuAdTsdT
26	27	973-991	AD-55103.2	uGAccAcAccuAucGAGGuudTsdT	AACUCGAuAGGUGUGGUCAdTsdT
28	29	975-993	AD-55107.2	AccAcAccuAucGAGGuuudTsdT	AAAACUCGAuAGGUGUGGUCdTsdT
30	31	1029-1047	AD-55112.2	uGGcAGAuGAGuAuucAGAdTsdT	UCUGAAuAGUcAuUCUGCcAdTsdT
32	33	1077-1095	AD-55074.2	ucuGGuGcAGuAAuGAcuAdTsdT	uAGUcAUuACUGcAcCAGAdTsdT
34	35	1124-1142	AD-55080.2	uGuGGGcAGuuAuGGAcAdTsdT	UGUCcAuAAACUGCCCCcAcAdTsdT
36	37	1137-1155	AD-55086.2	uGGAcAcuuuGAAAcAAcAdTsdT	UGUUUGUUUcAAAAAGUGUCAdTsdT
38	39	1182-1200	AD-55098.2	AuAuuucuGGAAcuAGuAAAdTsdT	UuAcuAGUUCcAGAAAUAdTsdT
40	41	1184-1202	AD-55104.2	AuuucuGGAAcuAGuAAAdTsdT	AUUuACuAGUUCcAGAAAUdTsdT
42	43	1185-1203	AD-55108.2	uuucuGGAAcuAGuAAAdTsdT	AAUUuACuAGUUCcAGAAAUdTsdT
44	45	1188-1206	AD-55113.2	cuGGAAcuAGuAAAUucAdTsdT	UGGAAUUuCuAGUUCcAGdTsdT
46	47	1325-1343	AD-55075.2	uGuGAGAuuuAucucGAAuudTsdT	AAUcAGAGuAAAUCUcAcAdTsdT
48	49	1364-1382	AD-55081.2	AuccAAGGGAAuucGAAAcAdTsdT	UGUUUCGAAUCCCUUGGAUdTsdT
50	51	1382-1400	AD-55087.2	AGccGAGuGccAAAGuAcAdTsdT	UGuACUUUGGcAcUCGCGCUdTsdT

(continuación)

SEQ ID NO: (sentido)	SEQ NO: (anti-sentido)	ID Posición en el transcrito NM_000688.4	Nombre del dúplex	Secuencia sentido (5'-3')	Secuencia antisentido (5'-3')
52	53	1478-1496	AD-55093.2	uuuGAAAcuGuccAuucAAAdTsdT	UUGAAUGGAcAGUUUcAAAAdTsdT
54	55	1531-1549	AD-55099.2	uGAuGuGGccAuGAGuuudTsdT	AAACUcAUGGGGcAcAUcAdTsdT
56	57	1631-1649	AD-53573.3	GucAuGccAAAAAuGGAcAdTsdT	UGUCCaUUUUUGGcAUGAcAdTsdT
58	59	1637-1655	AD-55109.2	ccAAAAAuGGAcAucAuuuudTsdT	AAAUgAUGUcCAUUUUUGGdTsdT
60	61	1706-1724	AD-55114.2	AcGAGuuucucuGAuuGAcAdTsdT	UGUcAAUcAGAGAAcUCUGdTsdT
62	63	1962-1980	AD-55076.2	AAGucuGuGAuGAAcuAAAdTsdT	AUuAGUuUcAUcAcAGACUuUdTsdT
64	65	1967-1985	AD-55082.2	uGuGAuGAAcuAAuGAGcAdTsdT	UGCUcAUuAGUUcAUcAcAdTsdT
66	67	1977-1995	AD-55088.2	uAAuGAGcAGAcAuAAcAdTsdT	AUGUuAUUGUCUGCUcAUuAdTsdT
68	69	2189-2207	AD-55094.2	uuuGAAAGuGAuGAGuGAAAdTsdT	UUUcACUcAUcACUUcAAAAdTsdT
70	71	2227-2245	AD-55100.2	AGGcuuGAGcAAGuuGUuAdTsdT	uACCcAAUUGCUcAAAGCCUdTsdT
72	73	2313-2331	AD-55105.2	ucuuAcGAGuuGucuuuAuAdTsdT	AuAAAAcAAcUCUCUGAAAGAdTsdT
74	75	2317-2335	AD-55110.2	cAGAGuuGucuuuAuAuGudTsdT	AcAuAuAAAAcAAcUCUCUGdTsdT
76	77	2319-2337	AD-55115.2	GAGuuGucuuuAuAuGuGAdTsdT	UcAcAuAuAAAGAcAAcUCUCdTsdT
78	79	2320-2338	AD-55077.2	AGuuGucuuuAuAuGuGAAAdTsdT	UUcAcAuAuAAAAcAAcUCUdTsdT
80	81	2344-2362	AD-55083.2	uuAuAuuuAAAAuuuuAAucudTsdT	AGAUuAAAAUuAuAAuAuAdTsdT
82	83	2352-2370	AD-55089.2	AAuuuuAAucuuAuAGuAAAAdTsdT	UUuACuAuAGAUuAAAAUuUdTsdT
84	85	2353-2371	AD-55095.2	AuuuuAAucuuAuAGuAAAAAdTsdT	UUUuACuAuAGAUuAAAAUuUdTsdT
86	87	2376-2394	AD-55101.2	AGuccuGGAAAuAAAAuucudTsdT	AGAAUuUuAUUUUcCAGGACUdTsdT
88	89	358-376	AD-53511.1	cuGcccAuucuuAucccGAdTsdT	UCGGGAuAAGAAUGGGcAGdTsdT
90	91	789-807	AD-53512.1	ccAGuGuGGuuAGuGuGAAdTsdT	UUcAcACuAAcCacACUGGdTsdT
92	93	1076-1094	AD-53513.1	GucuGGuGcAGuAAuAGacudTsdT	AGUcAUuACUGcAcCAGACdTsdT
94	95	1253-1271	AD-53514.1	GcAcucuuGuuuuccucGudTsdT	ACGAGGAAAAcAAGAGUGCdTsdT
96	97	1544-1562	AD-53515.1	GAGuuuGGAGcAAuAcAccudTsdT	AGGUGAUUGCUCcAAACUCdTsdT
98	99	2228-2246	AD-53516.1	GGcuuGAGcAAGuuGGuAuAdTsdT	AuACcAAcUUGCUcAAAGCCdTsdT
100	101	404-422	AD-53517.1	GGcAAAAucucuGuuGuuucudTsdT	AGAAcAAcAGAGAUUUUGCCdTsdT

(continuación)

SEQ ID NO: (sentido)	SEQ NO: (anti-sentido)	ID Posición en el transcrito NM_000688.4	Nombre del dúplex	Secuencia sentido (5'-3')	Secuencia antisentido (5'-3')
102	103	404-422	AD-53517.1	GGcAAAucucuGuuGuucudTsdT	AGAAcAAcAGAGAUUUGCCcdTsdT
104	105	866-884	AD-53518.1	cAAAGAccAGAAAAGAGuGudTsdT	AcACUCUUUCUGUCUUUGdTsdT
106	107	1080-1098	AD-53519.1	GGuGcAGuAAuAGAcuAccudTsdT	AGGuAGUcAUuACUGcACcdTsdT
108	109	1258-1276	AD-53520.1	cuuGuuuuccucGuGcuudTsdT	AAAGcACGAGGAAAcAAgdTsdT
110	111	1616-1634	AD-53521.1	GGGAucGGGAuGGAGucAdTsdT	UGACUCcAUCCCGAUCCCCcdTsdT
112	113	2230-2248	AD-53522.1	cuuGAGcAAGuuGGuAuGudTsdT	AGAuACcAAcUUGCUcAAgdTsdT
114	115	436-454	AD-53523.1	ccccAAGAuGAGuGGAAGuudTsdT	AACUUCcAUcAUcUUGGGGdTsdT
116	117	436-454	AD-53523.1	ccccAAGAuGAGuGGAAGuudTsdT	AACUUCcAUcAUcUUGGGGdTsdT
118	119	885-903	AD-53524.1	cucAucuuucucAAGAuAAdTsdT	UuAUcUUGAAGAAGAUAGAGdTsdT
120	121	1127-1145	AD-53525.1	GGGcAGuuAuGGAcAcuudTsdT	AAGUGUcAuAACUGCCCCcdTsdT
122	123	1315-1333	AD-53526.1	GAuGccAGGcuGuGAGAuudTsdT	AAUCUcAcAGCCUGGcAUcdTsdT
124	125	1870-1888	AD-53527.1	GAGAcAGAuGcuAAuGGAudTsdT	AUCcAUuAGcAUcUGUCUcdTsdT
126	127	2286-2304	AD-53528.1	ccccAGGccAuAuAucAuAudTsdT	AuAUGAuAAUUGGCCUGGGGdTsdT
128	129	489-507	AD-53529.1	cAGcAGuAcAcuAccAAcAdTsdT	UGUUGGuAGUGuACUGCUGdTsdT
130	131	489-507	AD-53529.1	cAGcAGuAcAcuAccAAcAdTsdT	UGUUGGuAGUGuACUGCUGdTsdT
132	133	915-933	AD-53530.1	cuGuuuuccAcuuuucAGuAdTsdT	uACUGAAAAAGUGGAAAcAGdTsdT
134	135	1138-1156	AD-53531.1	GGAcAcuuuGAAAcAAcAudTsdT	AUGUUUUUcAAAAUGUGUCCdTsdT
136	137	1324-1342	AD-53532.1	cuGuGAGAuuuAcucuGAudTsdT	AUcAGAGuAAAUCUcAcAGdTsdT
138	139	1927-1945	AD-53533.1	cccuGuGcGGGuuGcAGAudTsdT	AUCUGcAACCCCGcAcAGGGdTsdT
140	141	2312-2330	AD-53534.1	GucuucAGAGuuGucuuuAdTsdT	uAAAGAcAACUCUGAAGACdTsdT
142	143	646-664	AD-53535.1	cAcuGcAAAcAAuGcccdTsdT	AGGGcAUUUGCUUGcAGUGdTsdT
144	145	922-940	AD-53536.1	cAcuuuucAGuAuGAucGudTsdT	ACGAUcAUcUUGAAAAAGUGdTsdT
146	147	1163-1181	AD-53537.1	GGGGcAGGuGGuAcuAGAAAdTsdT	UUCuAGuACcACCUGCCCCcdTsdT
148	149	1347-1365	AD-53538.1	GGAAccAuGccuccAuGAudTsdT	AUcAUGGAGGGcAUUGGUUCCdTsdT
150	151	1964-1982	AD-53539.1	GucuGuGAuGAAcuAAuGAdTsdT	UcAUuAGUUCuAUcAcAGACdTsdT

(continuación)

SEQ ID NO: (sentido)	SEQ NO: (anti-sentido)	ID (anti-sentido)	Posición en el transcritto NM_000688.4	Nombre del dúplex	Secuencia sentido (5'-3')	Secuencia antisentido (5'-3')
152	153		2321-2339	AD-53540.1	GuuGucuuuAuGuGAAAdTsdT	AUuAcAuAAAAGAcAACdTsdt
154	155		671-689	AD-53541.1	GcAGcAcAGAuGAAuAcAGAdTsdt	UCUGAUUcAUCUGUGCGUCdTsdt
156	157		924-942	AD-53542.1	cuuuuAGuAuGAucGuuudTsdt	AAACGAUcAuACUGAAAAAGdTsdt
158	159		1164-1182	AD-53543.1	GGGcAGGuGuAcuAGAAAdTsdt	UUUCuAGuAcCACCUGCCCCdTsdt
160	161		1460-1478	AD-53544.1	GucuccAAGAuGuGGcAdTsdt	AUGCcAcAAUcUUGGGGACdTsdt
162	163		1976-1994	AD-53545.1	cuAAuGAGcAGAcAuAcAdTsdt	UGUuAUGUCUGUGcUcAUuAGdTsdt
164	165		786-804	AD-53546.1	GccccAGuGuGGGuAGuGudTsdt	AcAcuAAcAcAcACUGGGGcTsdt
166	167		935-953	AD-53547.1	GAucGuuuuuuuGAGAAAdTsdt	UUUUCuAAAAGAAACGAUCdTsdt
168	169		1165-1183	AD-53548.1	GGcAGGuGGuAcuAGAAAdTsdt	AUUUCuAGuAcCACCUGGGCcdTsdt
170	171		1530-1548	AD-53549.1	GuGAuGuGGcccAuGAGuudTsdt	AACUcAUGGGCcAcAUcAcCdTsdt
172	173		2003-2021	AD-53550.1	cAAGcAAucAAuuAccuAdTsdt	uAGGGuAAUUGAUUGCUUGdTsdt
174	175		788-806	AD-53551.1	cccAGuGuGGuuAGuGuGAdTsdt	UcAcAcuAAcAcAcACUGGGdTsdt
176	177		974-992	AD-53552.1	GAccAcAccuAucGAGuuudTsdt	AAACUCGAuAGGUGUGGUCdTsdt
178	179		1191-1209	AD-53553.1	GAAcuAGuAAAuuccAuGudTsdt	AcAUGGAAUuAcuAGUUCdTsdt
180	181		1541-1559	AD-53554.1	cAuGAGuuuGGAGcAAuAcAdTsdt	UGAUUGcUcCacAAACUcAUGdTsdt
182	183		2075-2093	AD-53555.1	ccccAGAuGAuGAAcuAcudTsdt	AGuAGUUCuAUCUUGGGGdTsdt
184	185		360-378	AD-53561.1	GcccAuucuuAuccccGAGudTsdt	ACUCGGGAuAAGAAUUGGGCdTsdt
186	187		1356-1374	AD-53567.1	ccuccAuGAuccAAGGGAuTsdt	AUCCCUUGGAUcAUGGAGGdTsdt
188	189		1631-1649	AD-53573.1	GucAuGcccAAAAAuGGAcAdTsdt	UGUCcAUUUUUUGGcAUGACdTsdt
190	191		1634-1652	AD-53579.1	AuGcccAAAAAuGGAcAucAdTsdt	UGAUGUCcAUUUUUUGGcAUdTsdt

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

SEQ NO: (sentido)	ID	SEQ NO: (anti-sentido)	ID	Posición en el transcrito NM_000688.4	Nombre del dúplex	Secuencia sentido (5'-3')	Secuencia antisentido (5'-3')
192		193		522-540	AD-55078.2	CUCGGCCAGUGAGAAAAGA	UCUUUCUCACUGGCCGGAG
194		195		669-687	AD-55084.2	UGGCAGCACAGAGAAUCA	UGAUUCAUCUGUGCUGCCA
196		197		790-808	AD-55090.2	CAGUGUGGUUAGUGGAAA	UUUCACACUAACCCACACUG
198		199		853-871	AD-55096.2	CAUCAUGCAAAAGCAAAGA	UCUUUGCUUUUGCAUGAUG
200		201		876-894	AD-55102.2	AAAGAGUGUCUACUCUUCU	AGAAGAUGAGACACUCUUU
202		203		877-895	AD-55106.2	AAGAGUGUCUACUCUUCU	AAGAAGAUGAGACACUCUU
204		205		914-932	AD-55111.2	UCUGUUUCCACUUUUCAGU	ACUGAAAAGUGGAAACAGA
206		207		923-941	AD-55073.2	ACUUUUUCAGUAUGAUCGUU	AACGAUCAUACUGAAAAAGU
208		209		926-944	AD-55079.2	UUUCAGUAUGAUCGUUUUCU	AGAAACGAUCAUACUGAAA
210		211		927-945	AD-55085.2	UUCAGUAUGAUCGUUUUCU	AAGAAACGAUCAUACUGAA
212		213		928-946	AD-55091.2	UCAGUAUGAUCGUUUUCU	AAAGAAACGAUCAUACUGA
214		215		932-950	AD-55097.2	UAUGAUCGUUUUCUUUGAGA	UCUCAAAAGAAACGAUCAUA
216		217		973-991	AD-55103.2	UGACCACACCUAUCGAGUU	AACUCGAUAGGUGUGGUCA
218		219		975-993	AD-55107.2	ACCACACCUAUCGAGUUUU	AAACUCGUAUAGGUGUGGU
220		221		1029-1047	AD-55112.2	UGGCAGUAUGACUAUUCAGA	UCUGAAUAGUCAUCUGCCA
222		223		1077-1095	AD-55074.2	UCUGGUGCAGUAAUGACUA	UAGUCAUUACUGCACCAGA
224		225		1124-1142	AD-55080.2	UGUGGGGCAGUUUUGGACA	UGUCCAUAAACUGCCCCACA
226		227		1137-1155	AD-55086.2	UGGACACUUUGAAACAACA	UGUUUGUUUCAAAGUGUCCA
228		229		1182-1200	AD-55098.2	AUAUUUCUGGAACUAGUAA	UUACUAGUCCAGAAAUAU
230		231		1184-1202	AD-55104.2	AUUUCUGGAACUAGUAAU	AUUUACUAGUCCAGAAU
232		233		1185-1203	AD-55108.2	UUUCUGGAACUAGUAAU	AUUUACUAGUCCAGAAA
234		235		1188-1206	AD-55113.2	CUGGAACUAGUAAUCCCA	UGGAAUUUACUAGUCCAG
236		237		1325-1343	AD-55075.2	UGUGAGAUUUACUCUGAUU	AAUCAGAGUAAUUCUCACA
238		239		1364-1382	AD-55081.2	AUCCAAGGGAUUCGAAACA	UGUUUCGAAUCCCUUGGAU
240		241		1382-1400	AD-55087.2	AGCCGAGUGCCAAAGUACA	UGUACUUUUGGCACUCGGCU

(continuación)

SEQ NO: (sentido)	ID SEQ NO: (anti-sentido)	ID	Posición en el transcrito NM_000688.4	Nombre del dúplex	Secuencia sentido (5'-3')	Secuencia antisentido (5'-3')
242	243		1478-1496	AD-55093.2	UUUAAAACUGUCCAUIUCAA	UUUAAUGGACAGUUUCAA
244	245		1531-1549	AD-55099.2	UGAUGUGGCCCAUGAGUUU	AAACUCAUGGGCCACAUA
246	247		1631-1649	AD-53573.3	GUCAUGCCAAAAAUGGACA	UGUCCAUUUUUGGCAUGAC
248	249		1637-1655	AD-55109.2	CCAAAAUGGACAUCAUUU	AAAUGAUGUCCAUUUUUGG
250	251		1706-1724	AD-55114.2	ACGAGUUCUCUGAUUGACA	UGUCAUCAGAGAUCUCGU
252	253		1962-1980	AD-55076.2	AAGUCUGUGAUGAACUAAU	AUUAGUUUCAUCACAGACUU
254	255		1967-1985	AD-55082.2	UGUGAUGAACUAUUGAGCA	UGCUCAUUAGUUAUCACA
256	257		1977-1995	AD-55088.2	UAAUGAGCAGACAUAACAU	AUGUUUAUGUCUGCUCAUUA
258	259		2189-2207	AD-55094.2	UUUGAAUGUGAUGAGUGAAA	UUUCACUCAUCACUUCAAA
260	261		2227-2245	AD-55100.2	AGGCUUGAGCAAGUUGGUA	UACCAACUUGCUCAAAGCCU
262	263		2313-2331	AD-55105.2	UCUUCAGAGUUGUCUUUAU	AUAAAAGACAACUCUGAAGA
264	265		2317-2335	AD-55110.2	CAGAGUUGUCUUUAUAUGU	ACAUUAAAAGACAACUCUG
266	267		2319-2337	AD-55115.2	GAGUUGUCUUUAUAUGUGA	UCACAUAUAAAAGACAACUC
268	269		2320-2338	AD-55077.2	AGUUGUCUUUAUAUGUGAA	UUACACUAUAAAAGACAACU
270	271		2344-2362	AD-55083.2	UUUAUUAAAAUUUUAAUCU	AGAUUAAAAUUUUAAUUA
272	273		2352-2370	AD-55089.2	AAUUUUAAUCUAUAGUAAA	UUUACUAUAUAUAAAAUU
274	275		2353-2371	AD-55095.2	AUUUUAAUCUAUAGUAAAA	UUUUACUAUAAGAUUAAAAU
276	277		2376-2394	AD-55101.2	AGUCCUGGAAUAAAUUCU	AGAAUUUAUUUCCAGGACU
278	279		358-376	AD-53511.1	CUGCCAUUCUUAUCCCGA	UCGGGAUAAGAAUUGGGCAG
280	281		789-807	AD-53512.1	CCAGUGUGGUUAGUGUGAA	UUACACUAACACACACUGG
282	283		1076-1094	AD-53513.1	GUCUGGUGCAGUAAUGACU	AGUCAUUACUGCACCCAGAC
284	285		1253-1271	AD-53514.1	GCACUCUUGUUUUCCUCGU	ACGAGGAAAAACAAGAGUGC
286	287		1544-1562	AD-53515.1	GAGUUUGGAGCAUUCACCU	AGGUGAUUUGCUCCAAACUC
288	289		2228-2246	AD-53516.1	GGCUUGAGCAAGUUGGUUU	AUACCAACUUGCUCACAGCC
290	291		404-422	AD-53517.1	GGCAAAUCUCUGUUGUUCU	AGAACAAACAGAGAUUUUGCC

(continuación)

SEQ NO: (sentido)	ID SEQ NO: (anti-sentido)	ID Posición en el transcrito NM_000688.4	Nombre del dúplex	Secuencia sentido (5'-3')	Secuencia antisentido (5'-3')
292	293	404-422	AD-53517.1	GGCAAAUCUCUGUUGUUCU	AGAACACAGAGAUUUGCC
294	295	866-884	AD-53518.1	CAAAGACCAGAAAGAGUGU	ACACUCUUUCUGGUCUUUG
296	297	1080-1098	AD-53519.1	GGUGCAGUAAUGACUACCU	AGGUAGUCAUUACUGCACC
298	299	1258-1276	AD-53520.1	CUUGUUUCCUCUGGCUUU	AAAGCACGAGGAAAAACAAG
300	301	1616-1634	AD-53521.1	GGGAUCGGGAUGGAGUCA	UGACUCCAUCCCGAUCCCC
302	303	2230-2248	AD-53522.1	CUUGAGCAAGUUGGUUUCU	AGAUACCAACUUGCUCAAG
304	305	436-454	AD-53523.1	CCCCAAGAUGAUGGAAGUU	AACUUCCAUCAUCUUGGGG
306	307	436-454	AD-53523.1	CCCCAAGAUGAUGGAAGUU	AACUUCCAUCAUCUUGGGG
308	309	885-903	AD-53524.1	CUCAUCUUCUUAAGAUAA	UUAUCUUUGAAGAAAGAG
310	311	1127-1145	AD-53525.1	GGGCAGUUUUGGACACUU	AAGUGCCAUAACUGCCCC
312	313	1315-1333	AD-53526.1	GAUGCCAGCUGUGAGAUU	AAUCUCACAGCCUGGCAUC
314	315	1870-1888	AD-53527.1	GAGACAGUAGCUAAUGGAU	AUCCAUAAGCAUCUGUCUC
316	317	2286-2304	AD-53528.1	CCCCAGGCCAUUAUCAUUA	AUAUGAUAAUGGCCUGGGG
318	319	489-507	AD-53529.1	CAGCAGUACACUACCAACA	UGUUGGUAGUGUACUCUG
320	321	489-507	AD-53529.1	CAGCAGUACACUACCAACA	UGUUGGUAGUGUACUCUG
322	323	915-933	AD-53530.1	CUGUUUCCACUUUUCAGUA	UACUGAAAAUGGAAACAG
324	325	1138-1156	AD-53531.1	GGACACUUUGAAACAACAU	AUGUUUUUCAAAGUGUCC
326	327	1324-1342	AD-53532.1	CUGUGAGAUUUACUCUGAU	AUCAGAGUAAAUCUCACAG
328	329	1927-1945	AD-53533.1	CCUGUGCGGGUUGCAGAU	AUCUGCAACCCGCACAGG
330	331	2312-2330	AD-53534.1	GUCUUCAGAGUUUCUUUA	UAAAGACAACUCUGAAGAC
332	333	646-664	AD-53535.1	CACUGCAAGCAAAUGCCCU	AGGGCAUUUGCUUGCAGUG
334	335	922-940	AD-53536.1	CACUUUUCAGUAUGAUCGU	ACGAUCAUACUGAAAAAGUG
336	337	1163-1181	AD-53537.1	GGGCAGGUGGUACUAGAA	UUCUAGUACCACCUGCCCC
338	339	1347-1365	AD-53538.1	GGAACCAUGCCUCCAUAGU	AUCAUGGAGGCAUGGUUCC
340	341	1964-1982	AD-53539.1	GUCUGUGAUGAACUAAUGA	UCAUUAGUUUAUCACAGAC

(continuación)

SEQ NO: (sentido)	ID SEQ NO: (anti- sentido)	ID	Posición en el transcrito NM_000688.4	Nombre del dúplex	Secuencia sentido (5'-3')	Secuencia antisentido (5'-3')
342	343		2321-2339	AD-53540.1	GUUGUCUUUAUUGUGAAU	AUUCACAUUAAAAGACAAC
344	345		671-689	AD-53541.1	GCAGCAGAGUAGAAUCAGA	UCUGAUUCAUCUGUGCUGC
346	347		924-942	AD-53542.1	CUUUUCAGUAUGAUCGUUU	AAACGAUCAUACUGAAAAAG
348	349		1164-1182	AD-53543.1	GGCAGGGUGGUACUAGAAA	UUUCUAGUACCAACCCUGCCC
350	351		1460-1478	AD-53544.1	GUCCCCAAGAUUGUGGCAU	AUGCCACAAUCUUGGGGAC
352	353		1976-1994	AD-53545.1	CUAAUGAGCAGACAUAAACA	UGUUUAUGUCUGCUCAUUAG
354	355		786-804	AD-53546.1	GCCCCAGUGUGGUUAGUGU	ACACUAAACCACACUGGGGC
356	357		935-953	AD-53547.1	GAUCGUUUUCUUUGAGAAAA	UUUUCUCAAAAGAAACGAUC
358	359		1165-1183	AD-53548.1	GGCAGGUGGUACUAGAAAAU	AUUUCUAGUACCACCUGCC
360	361		1530-1548	AD-53549.1	GUGAUGUGGCCCAUGAGUU	AACUCAUGGGCCACAUACAC
362	363		2003-2021	AD-53550.1	CAAGCAAUCAUUUACCCUA	UAGGGUAAUUUGAUUGCUUG
364	365		788-806	AD-53551.1	CCCAGUGUGGUUAGUGUGA	UCACACUAAACCACACUGGG
366	367		974-992	AD-53552.1	GACCACACCUAUCGAGUUU	AAACUCGAUAGGUGUGGUC
368	369		1191-1209	AD-53553.1	GAACUAGUAAAAUUCCAUGU	ACAUGGAAUUUACUAGUUC
370	371		1541-1559	AD-53554.1	CAUGAGUUUUGGAGCAAUCA	UGAUUUGCUCCAAACUCAUG
372	373		2075-2093	AD-53555.1	CCCCAGAUGAUGAACUACU	AGUAGUUUCAUCAUCUGGGG
374	375		360-378	AD-53561.1	GCCCAUUCUUUACCCGAGU	ACUCGGGAUAAAGAAUUGGGC
376	377		1356-1374	AD-53567.1	CCUCCAUGAUCCAAGGGAU	AUCCCUUGGAUCAUGGAGG
378	379		1631-1649	AD-53573.1	GUCAUGCCCCAAAAAUGGACA	UGUCCAUUUUUUGGCAUGAC
380	381		1634-1652	AD-53579.1	AUGCCAAAAAUGGACAUCA	UGAUGUCCAUUUUUUGGCAU

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

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

5 Cribado *in vitro*Cultivos celulares y transfecciones

Se cultivaron células Hep3B (ATCC, Manassas, VA) hasta casi llegar a la confluencia a 37 °C en una atmósfera de un 5% de CO₂ en MEM (ATCC) suplementada con un 10% de FBS, antes de liberarlas de la placa mediante tripsinización. La transfección se llevó a cabo añadiendo 14.8 µl de Opti-MEM más 0.2 µl de Lipofectamine RNAiMax por pocillo (Invitrogen, Carlsbad CA, N.º de catálogo 13778-150) a 5 µl de los dúplex de ARNip por pocillo en una placa de 96 pocillos y se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos. A continuación, se añadieron 80 µl de medio de cultivo completo que contenían ~2 x 10⁴ células Hep3B a la mezcla de ARNip. Las células se incubaron durante 24 o 120 horas antes de la purificación del ARN. Se llevaron a cabo experimentos de dosis individuales para una concentración final del dúplex de 10 nM y 0.1 nM y se llevaron a cabo experimentos de dosis-respuesta para una concentración final del dúplex de 10, 1.67, 0.27, 0.046, 0.0077, 0.0013, 0.00021 y 0.00004 nM.

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

Las células se recolectaron y lisaron en 150 µl de tampón de lisis/unión, a continuación se mezclaron durante 5 minutos a 850 rpm utilizando un instrumento Eppendorf Thermomixer (la velocidad de mezclado fue la misma a lo largo de todo el proceso). Se añadieron diez microlitros de microesferas magnéticas y 80 µl de mezcla de tampón de lisis/unión a una placa de fondo redondo y se mezclaron durante 1 minuto. Las microesferas magnéticas se capturaron utilizando un soporte magnético y se retiró el sobrenadante sin que se alteraran las microesferas. Después de retirar el sobrenadante, las células lisadas se añadieron a las microesferas remanentes y se mezclaron durante 5 minutos. Después de retirar el sobrenadante, las microesferas magnéticas se lavaron 2 veces con 150 µl de tampón de lavado A y se mezclaron durante 1 minuto. Las microesferas se capturaron nuevamente y se retiró el sobrenadante. A continuación, las microesferas se lavaron con 150 µl de tampón de lavado B, se capturaron y se retiró el sobrenadante. A continuación, las microesferas se lavaron con 150 µl de tampón de elución, se capturaron y se retiró el sobrenadante. Se permitió que las microesferas se secaran durante 2 minutos. Después del secado, se añadieron 50 µl de tampón de elución y se mezclaron durante 5 minutos a 70 °C. Las microesferas se capturaron con un imán durante 5 minutos. Se retiraron 40 µl de sobrenadante y se añadieron a otra placa de 96 pocillos.

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

Una mezcla patrón de 2 µl de 10X tampón, 0.8 µl de 25X dNTPs, 2 µl de cebadores aleatorios, 1 µl de transcriptasa inversa, 1 µl de inhibidor de RNasa y 3.2 µl de H₂O por reacción se añadió a 10 µl de ARN total. Se generó ADNc utilizando un ciclador térmico Bio-Rad C-1000 o S-1000 (Hercules, CA) mediante los pasos siguientes: 25 °C 10 min, 37 °C 120 min, 85 °C 5 s y se mantiene a 4 °C.

PCR a tiempo real

Se añadieron 2 µl de ADNc a una mezcla patrón que contenía 0.5 µl de una sonda TaqMan de GAPDH (Applied Biosystems, N.º de catálogo 4326317E), 0.5 µl de una sonda TaqMan de ALAS1 (Applied Biosystems, N.º de catálogo Hs00167441_m1) y 5 µl de una mezcla patrón para una sonda Lightcycler 480 (Roche, N.º de catálogo 04887301001) por pocillo en una placa de 384 pocillos (Roche, N.º de catálogo 04887301001). Se llevó a cabo una PCR a tiempo real en un sistema de PCR a tiempo real Roche LC480 (Roche) utilizando el ensayo de $\Delta\Delta C_t$ (RQ). Cada dúplex se evaluó en dos transfecciones independientes con dos réplicas biológicas para cada uno de ellos, y cada transfección se evaluó por duplicado, a menos que se indique de otro modo en las tablas de resumen.

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

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

La Tabla 4 ilustra la desactivación de ALAS1 en células Hep3B mediante los dúplex de ARNip modificados para ALAS1 (remítase a la Tabla 2). El silenciamiento se expresa como la fracción de mensaje de ARN remanente respecto al ARNip AD-1955 que actúa como control negativo (luciferasa). Los datos se generaron según se ha descrito anteriormente tras la transfección de una concentración 10 nM o 0.1 nM de cada ARNip. La qPCR se llevó a cabo utilizando la sonda TaqMan de ALAS1 Hs00167441_m1.

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

ID del dúplex	10 nM, media	0.1 nM, media	10 nM, desv. est.	0.1 nM, desv. est.
AD-55078.2	0.7	0.87	0.001	0.089
AD-55084.2	0.08	0.3	0	0.04
AD-55090.2	0.06	0.08	0.002	0.003
AD-55096.2	0.61	0.92	0.171	0.34
AD-55102.2	0.63	0.62	0.005	0.069
AD-55106.2	0.07	0.08	0.004	0.027
AD-55111.2	0.06	0.23	0.013	0.062
AD-55073.2	0.21	0.4	0.018	0.061
AD-55079.2	0.17	0.43	0.033	0.089
AD-55085.2	0.13	0.21	0.011	0.019
AD-55091.2	0.27	0.55	0.033	0.009
AD-55097.2	0.31	0.38	0.051	0.059
AD-55103.2	0.05	0.11	0.017	0.006
AD-55107.2	0.12	0.24	0.007	0.008
AD-55112.2	0.15	0.2	0.036	0.025
AD-55074.2	0.16	0.45	0.008	0.002
AD-55080.2	0.79	0.99	0.095	0.304
AD-55086.2	0.09	0.22	0.005	0.035
AD-55098.2	0.25	0.51	0.03	0.07
AD-55104.2	0.06	0.1	0.017	0.001
AD-55108.2	0.47	0.65	0.03	0.015
AD-55113.2	0.38	0.62	0.068	0.039
AD-55075.2	0.12	0.28	0.007	0.051
AD-55081.2	0.21	0.51	0.036	0.066
AD-55087.2	0.1	0.19	0.017	0.02
AD-55093.2	0.24	0.56	0.029	0.053
AD-55099.2	0.05	0.18	0.001	0.038
AD-53573.3	0.67	1.07	0.16	0.153
AD-55109.2	0.07	0.23	0.006	0.052
AD-55114.2	0.08	0.16	0.004	0.017
AD-55076.2	0.05	0.14	0.007	0.035
AD-55082.2	0.08	0.3	0.019	0.016
AD-55088.2	0.06	0.12	0.008	0.02
AD-55094.2	0.06	0.18	0.005	0.023
AD-55100.2	0.45	0.83	0.02	0.05
AD-55105.2	0.02	0.05	0.005	0.004
AD-55110.2	0.15	0.19	0.031	0.016
AD-55115.2	0.35	0.58	0.045	0.052
AD-55077.2	0.14	0.14	0.006	0.019
AD-55083.2	0.56	0.98	0.24	0.188

ES 2 804 510 T3

(continuación)

ID del dúplex	10 nM, media	0.1 nM, media	10 nM, desv. est.	0.1 nM, desv. est.
AD-55089.2	0.62	0.79	0.036	0.094
AD-55095.2	0.59	0.92	0.12	0.079
AD-55101.2	0.71	0.97	0.074	0.097
AD-1955	1.00	1.01	0.03	0.04
AD-53511.1	0.84	1.08	0.028	0.0515
AD-53512.1	0.15	0.65	0.062	0.023
AD-53513.1	0.34	0.86	0.055	0.011
AD-53514.1	0.12	0.61	0.003	0.008
AD-53515.1	0.25	0.66	0.005	0.004
AD-53516.1	1.05	1.02	0.032	0.011
AD-53517.1	0.145	0.725	0.025	0.0155
AD-53518.1	0.72	0.85	0.045	0.028
AD-53519.1	0.18	0.66	0.061	0.004
AD-53520.1	0.18	0.9	0.041	0.001
AD-53521.1	0.97	1.07	0.01	0.003
AD-53522.1	0.87	1.1	0.065	0.112
AD-53523.1	0.48	0.96	0.0305	0.0255
AD-53524.1	0.11	0.66	0.02	0.006
AD-53525.1	0.71	1.03	0.016	0.01
AD-53526.1	0.23	0.85	0.075	0.01
AD-53527.1	0.25	0.83	0.015	0.017
AD-53528.1	0.44	0.93	0.037	0.006
AD-53529.1	0.185	0.73	0.015	0.014
AD-53530.1	0.1	0.62	0.02	0.003
AD-53531.1	0.48	0.93	0.019	0.045
AD-53532.1	0.06	0.17	0	0.003
AD-53533.1	0.36	0.93	0.025	0.034
AD-53534.1	0.1	0.36	0.014	0.012
AD-53535.1	0.58	1.05	0.036	0.071
AD-53536.1	0.12	0.45	0.009	0.026
AD-53537.1	0.73	0.96	0.101	0.015
AD-53538.1	0.74	1.07	0	0.046
AD-53539.1	0.52	0.97	0.057	0.032
AD-53540.1	0.1	0.47	0.017	0.012
AD-53541.1	0.11	0.29	0.026	0.015
AD-53542.1	0.08	0.23	0.008	0.006
AD-53543.1	0.62	1.01	0.027	0.014
AD-53544.1	0.8	1.04	0.002	0.001
AD-53545.1	0.17	0.73	0.007	0.007
AD-53546.1	0.27	0.93	0.058	0.019

(continuación)

ID del dúplex	10 nM, media	0.1 nM, media	10 nM, desv. est.	0.1 nM, desv. est.
AD-53547.1	0.12	0.28	0.008	0.01
AD-53548.1	0.1	0.34	0.022	0.002
AD-53549.1	0.8	1.04	0.011	0.026
AD-53550.1	0.05	0.54	0.02	0.003
AD-53551.1	0.96	1.16	0.029	0.044
AD-53552.1	0.13	0.5	0.002	0.009
AD-53553.1	0.92	1.1	0.027	0.02
AD-53554.1	0.76	0.67	0.005	0.004
AD-53555.1	0.11	0.53	0.009	0.007
AD-53561.1	0.72	0.94	0.014	0.001
AD-53567.1	0.16	0.66	0.019	0.003
AD-53573.1	1.06	1.10	0.019	0.037
AD-53579.1	0.19	0.76	0.036	0.019

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ID del ratón	ALA (microM/L)	PBG (microM/L)	Creatinina (mg/dL)	ALA (micro M/mg de creatinina)	PBG (micro M/mg de creatinina)	ARNip	PB
Ha-17-4-6				29.7	7.9	Referencia	-
Ha-19-5-4/2				15.7	5.1	Referencia	-
Ha-20-39-4/3				28.6	6.7	Referencia	-
Ha-20-38-4				21.4	4.7	Referencia	-
Ha-21-33-4	934.92	483.71	0.4205	222.33	115.03	Luc	+
Ha-21-36-9	944.08	563.53	0.5055	186.76	111.48	Luc	+
Ha-21-18-8	32.88	8.69	0.133	24.72	6.53	ALAS1; 1 mg/kg	+
Ha-21-33-7	83.07	23.28	0.426	19.50	5.46	ALAS1; 1 mg/kg	+
Ha-21-34-5	59.15	18.41	0.263	22.49	7.00	ALAS1; 1 mg/kg	+

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

5

Tabla 13: Datos medios en orina

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

10

El tratamiento con fenobarbital indujo incrementos marcados (incrementos de ~25-30 veces) de ALA en orina (~9 veces por encima de los niveles de referencia) y PBG en orina (~19 veces por encima de los niveles de referencia) en los ratones tratados con ARNip de LUC, el control, mientras que tales incrementos no se observaron en los animales tratados con ARNip de ALAS1. Por lo tanto, el ARNip de ALAS1 bloqueó los incrementos inducidos por fenobarbital de ALA y PBG en orina. Estos resultados son coherentes con las medidas en plasma y muestran que el tratamiento con ARNip de ALAS1 fue eficaz a la hora de prevenir los incrementos de metabolitos en orina (ALA y PBG) asociados con los ataques agudos inducidos por fenobarbital en este modelo animal de AIP.

15

En otros experimentos (FIG. 12), se observó que el tratamiento con fenobarbital indujo grandes incrementos (~25 veces) en la expresión de ARNm de ALAS1 en el hígado del modelo de ratón. La administración de ARNip de ALAS1 bloqueó completamente esta inducción de ARNm de ALAS1. Estos resultados proporcionan más pruebas de que el ARNip de ALAS1 es eficaz en un modelo animal de AIP.

20

En conjunto, los resultados proporcionados en este Ejemplo muestran que el ARNip de ALAS1 fue eficaz a la hora de tratar ataques agudos en un modelo animal de la porfiria hepática aguda AIP. Las medidas de múltiples parámetros respaldan esta conclusión, incluidos los niveles de ALA en plasma, los niveles de PBG en plasma, los niveles de ALA en orina, los niveles de PBG en orina y los niveles de expresión de ARNm de ALAS1 en el hígado.

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

25

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

Tabla 7: Secuencias de AD-57929

SEQ ID NO: (sentido)	SEQ ID NO: (anti-sentido)	Posición de la sec. sentido en el transcrito NM_020559.2	Nombre del dúplex	Secuencia sentido (5'-3')	Secuencia antisentido (5'-3')	Posición de la sec. antisentido en el transcrito NM_020559.2
385	386	775-795	AD-56211	AfaGfuCfuGfuUfuUfcCfcAfcUfuUfuCfaAfl 96	uUfgAfaAfaGfuGfgaaAfcAfgAfcUfusU fsg	773-795
387	388	2168-2188	AD-56173	AfcAfuAfgUfaGfcCfcCfaGfaAfuUfgUfcUfl 96	aGfaCfaAfuUfcUfggcUfaCfuAfuGfus Gfsg	2166-2188
389	390	775-795	AD-57929	AfsasGfuCfuGfuUfuUfcCfcAfcUfuUfuCfaA fl96	usUfsgAfaAfaGfuGfgaaAfcAfgAfcUfu susg	773-795

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

Ejemplo 7. ARNip humanos

Se diseñaron y se produjeron ARNip humanos adicionales según se ha descrito en el Ejemplo 2. Se seleccionaron los 45 ARNip mejores en función de su eficacia prevista. Las secuencias de estos 45 ARNip se proporcionan en la Tabla 8 y la Lista de Secuencias adjunta a esta (p. ej., una secuencia sentido correspondiente a una de las secuencias con números impares identificadas como SEQ ID Nos: 391 a 551, y una secuencia antisentido correspondiente a una de las secuencias con números pares identificadas como SEQ ID Nos: 392 a 552, respectivamente). La Tabla 8 se describe en la Publicación Internacional N.º WO2013/155204A2.

Ejemplo 8. ARNip humanos

Se generaron ARNip humanos nonadecaméricos adicionales. Las secuencias de estos ARNip se proporcionan en la Tabla 9 y la Lista de Secuencias adjunta a esta (p. ej., una secuencia sentido correspondiente a una de las secuencias con números impares identificadas como SEQ ID Nos: 553 a 3365, y una secuencia antisentido correspondiente a una de las secuencias con números pares identificadas como SEQ ID Nos: 554 a 3366, respectivamente). La Tabla 9 se describe en la Publicación Internacional N.º WO2013/155204A2. Estos ARNip se pueden evaluar para determinar su eficacia utilizando métodos descritos en la presente y/o métodos conocidos en la técnica.

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

Se utilizó el modelo de ratón de AIP (remítase al Ejemplo 5) para investigar si el ARNip de ALAS1 funcionaría en un paradigma de tratamiento agudo para reducir los niveles ya elevados de ALA y PBG que estarían presentes, por ejemplo, cuando un paciente humano con porfiria padece un ataque agudo. La administración del ARNip de la formulación LNP11 AD-53558 con una dosis de 1 mg/kg 12 horas después de la última dosis de fenobarbital redujo rápidamente los niveles de ALA y PBG en plasma de ratón, mientras que en los animales tratados con control de Luc los niveles siguieron subiendo (FIG. 14). Estos resultados indican que el ARNip de ALAS1 es eficaz a la hora de tratar un ataque agudo. El ARNip de ALAS1 fue eficaz a la hora de reducir y prevenir incrementos adicionales de los niveles de ALA y PBG.

Como se puede observar en la FIG. 14, el ARNip de ALAS1 tuvo un rápido inicio del efecto en la reducción de los niveles de ALA y PBG. El inicio del efecto ocurrió en las horas posteriores a la administración del ARNip. El efecto del plasma en ALA se pudo observar en las 4 horas posteriores a la administración del ARNip (remítase a la FIG. 14; el ARNip se administró 12 horas después de la última dosis de fenobarbital, y se puede observar una reducción en ALA en plasma respecto al control 16 horas después de la última dosis de fenobarbital). El efecto en PBG en plasma se pudo observar en las 8 horas siguientes a la administración del ARNip (remítase a la FIG. 14; el ARNip se administró 12 horas después de la última dosis de fenobarbital, y se puede observar una reducción en ALA en plasma respecto al control 20 horas después de la última dosis de fenobarbital).

Ejemplo 10. ARNip que tienen ALAS1 como diana

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

Métodos

Transfección mediada por lípidos

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

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

Transfección de captación libre

Hepatocitos de *Cynomolgus* primarios conservados criológicamente (Celsis In Vitro Technologies, M003055-P) se descongelaron a 37 °C en un baño de agua inmediatamente antes de su uso y se suspendieron de nuevo con una concentración de 0.26×10^6 células/ml en medio InVitroGRO CP (para placas) (Celsis In Vitro Technologies, número de catálogo Z99029). Durante las transfecciones, las células se colocaron en una placa de colágeno de 96 pocillos BD BioCoat (BD, 356407) con una concentración de 25 000 células por pocillo y se incubaron a 37 °C en una atmósfera de un 5% de CO₂. Se realizaron experimentos de captación libre añadiendo 10 µl de dúplex de ARNip en PBS por pocillo en una placa de 96 pocillos (96p). A continuación, se añadieron 90 µl de medio de cultivo completo que contenía el número adecuado de células para el tipo celular al ARNip. Las células se incubaron durante 24 horas antes de la purificación del ARN. Se llevaron a cabo experimentos de dosis única con una concentración final del dúplex de 1 µM, 500 nM, 20 nM y 10 nM.

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

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

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

Se preparó una mezcla patrón de 2 µl de 10X tampón, 0.8 µl de 25X dNTPs, 2 µl de cebadores aleatorios, 1 µl de transcriptasa inversa, 1 µl de inhibidor de RNasa y 3.2 µl de H₂O por reacción. Se mezclaron volúmenes iguales de mezcla patrón y ARN para obtener un volumen final de 12 µl para las muestras cribadas *in vitro* o 20 µl para las muestras cribadas *in vivo*. El ADNc se generó utilizando un ciclador térmico Bio-Rad C-1000 o S-1000 (Hercules, CA) mediante los pasos siguientes: 25 °C durante 10 minutos, 37 °C durante 120 minutos, 85 °C durante 5 segundos y se mantiene a 4 °C.

PCR a tiempo real

Se añadieron 2 µl de ADNc a una mezcla patrón que contenía 2 µl de H₂O, 0.5 µl de una sonda TaqMan de GAPDH (Life Technologies, número de catálogo 4326317E para células Hep3B, número de catálogo 352339E para hepatocitos de ratón primarios o una sonda adaptada para hepatocitos primarios de cinomólogo), 0.5 µl de una sonda TaqMan C5 (Life Technologies, número de catálogo Hs00167441_m1 para células Hep3B o Mm00457879_m1 para hepatocitos de ratón primarios o una sonda adaptada para hepatocitos primarios de cinomólogo) y 5 µl de una mezcla patrón para una sonda Lightcycler 480 (Roche, número de catálogo 04887301001) por pocillo en una placa de 384 pocillos (384 p) (Roche, número de catálogo 04887301001). Se llevó a cabo una PCR a tiempo real en un sistema de PCR a tiempo real Roche LC480 (Roche) utilizando el ensayo $\Delta\Delta C_t$ (RQ). Para el cribado *in vitro*, cada dúplex se evaluó con dos réplicas biológicas, a menos que se indique de otro modo, y cada PCR a tiempo real se llevó a cabo en réplicas técnicas por duplicado. Para el cribado *in vivo*, cada dúplex se evaluó en uno o más experimentos (3 ratones por grupo) y cada PCR a tiempo real se llevó a cabo en réplicas técnicas por duplicado.

Para calcular el factor de cambio relativo en los niveles de ARNm de ALAS1, los datos a tiempo real se analizaron utilizando el método de $\Delta\Delta C_t$ y se normalizaron respecto a los ensayos realizados con células transfectadas con AD-1955 10 nM o células transfectadas con vector vacío. Los valores de CI₅₀ se calcularon utilizando un modelo de ajuste de 4 parámetros empleando XLFit y se normalizaron respecto a células transfectadas con AD-1955 para el mismo intervalo de dosis o respecto a su propia dosis más baja.

Las secuencias sentido y antisentido de AD-1955 son:

SENTIDO: cuuAcGcuGAGuAcuucGAdTsdT (SEQ ID NO:3682)

ANTISENTIDO: UCGAAGuACUcAGCGuAAGdTsdT (SEQ ID NO:3683).

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

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

SEQ ID NO: (sentido)	SEQ ID NO: (anti-sentido)	Nombre dúplex	del Secuencia sentido (5'-3')	Secuencia antisentido (5'-3')	Sitios diana de la secuencia antisentido en NM 000688.4
3371	3372	AD-58848	CfsasUfgCfaAfaAfaUfGfAfcAfuCfaUfL96	asUfsgAfuGfuCfcAfuuuUfuGfgCfaUfsgAfscc	1635-1657
3373	3374	AD-58849	AfsusUfuUfgAfaGfuUfgAfuGfAfgUfgAfaUfL96	usUfsuCfaCfaUfaUfcacUfuCfaAfaAfasGfsc	2189-2211
3375	3376	AD-58850	AfsgsUfuAfuAfuAfaUfaUfuUfuAfaUfL96	asGfsaUfaAfaAfaUfaUfaUfaAfaCfusUfsa	2344-2366
3377	3378	AD-58851	GfscsAfuUfuUfgAfaGfuGfuUfgAfgUfgAfaUfL96	usCfsaCfuCfaUfcAfuUfuUfuUfaAfaAfuGfcsAfsq	2187-2209
3379	3380	AD-58852	GfsasAfuUfaAfuGfAfaGfuAfcAfuAfaCfaUfL96	gsUfsuAfuGfuCfuCfuGfucAfuUfaGfuUfcsAfsu	1975-1997
3381	3382	AD-58853	AfsasUfgAfcCfaCfaCfaCfaUfaUfcGfuUfL96	asAfsccUfcGfaUfaGfgugUfgGfuCfaUfcsCfsu	973-995
3383	3384	AD-58854	UfsasAfaUfuUfuAfaUfUfcUfaUfaGfuAfaUfL96	usUfsuAfcUfaUfaGfaUfaAfaUfaUfasAfsu	2352-2374
3385	3386	AD-58855	UfsusCfaGfuAfuGfaUfUfcGfuUfuCfuUfuGfL96	csAfsaAfgAfaAfcGfaucAfuAfcUfgAfasAfsa	929-951
3387	3388	AD-58856	CfsasCfuUfuUfcAfaGfuUfaUfgAfuCfuUfuUfL96	asAfsaCfuAfuCfaUfacuGfaAfaAfgUfsgGfsa	924-946
3389	3390	AD-58857	AfsasAfuCfuGfuUfUfcAfcAfuUfuUfuCfaGfL96	csUfsgAfaAfaGfuGfgaaAfcAfgAfuUfcsUfsg	913-935
3391	3392	AD-58858	CfsasUfuUfgAfaAfaUfUfcCfaUfuCfaAfaUfL96	usUfsgAfaUfgGfaCfaCfaUfuCfaAfaUfsgCfsc	1478-1500
3393	3394	AD-58859	CfscsUfaUfcGfaGfuUfuUfaAfaAfaCfuGfL96	csAfsqUfuUfuAfaAfaaacUfcGfaUfaGfsgUfsg	983-1005
3395	3396	AD-58861	GfsasCfaAfaAfaGfaUfgUfcUfuCfuCfuCfL96	gsAfsuGfaGfaCfaCfaCfuCfuCfuGfgUfcsUfsu	872-894
3397	3398	AD-58862	AfsasCfaGfaAfaGfaGfuGfuCfuCfaUfuUfL96	asGfsaUfgAfaAfaAfcuUfuUfcUfgGfcsCfsu	873-895
3399	3400	AD-58863	AfscsUfaAfuGfaGfCfaGfuAfuUfuCfuGfAfaUfL96	asUfsgUfuAfuGfuCfuGfucUfcAfuUfaGfcsUfsc	1977-1999
3401	3402	AD-58864	UfsasGfuAfaAfaAfaAfaUfgUfcCfuGfgAfaUfL96	usCfscAfgGfaCfuAfuUfuUfuUfuAfcUfasUfsa	2366-2388
3403	3404	AD-58865	UfsasUfuUfcUfgGfaAfaUfaGfuAfaAfaUfL96	asAfsuUfuAfcUfaGfaUfuCfaGfaAfaUfasUfsu	1185-1207
3405	3406	AD-58867	UfsusCfuGfaAfaAfaGfCfaAfuUfuGfaGfL96	csUfscAfaGfaCfaCfuGfgcuUfuGfcaAfaGfasGfsa	706-728
3407	3408	AD-58868	GfsasGfgAfaAfaGfgGfuUfgCfuGfaAfaCfL96	gsUfsuUfcAfgCfaAfcuUfuUfcUfcUfcsAfscc	759-781
3409	3410	AD-58869	GfsgsUfaCfuAfaAfaAfaUfuUfuCfuGfgAfaUfL96	usCfscAfgAfaAfaAfuUfuUfuUfuCfaCfcsAfscc	1174-1196
3411	3412	AD-58870	GfsasCfaUfaAfuGfCfaAfaAfaGfaAfaAfgAfaUfL96	usCfsuUfuGfuCfuUfuUfugcAfuGfaUfcsCfsu	853-875
3413	3414	AD-58871	AfsasAfuUfuUfaAfuUfuCfuAfuUfaAfaAfaAfaUfL96	usUfsuUfaCfuAfaUfaGfaUfaAfaUfuUfasAfsa	2353-2375
3415	3416	AD-58873	CfsasUfgAfuCfaAfaGfgGfuUfuCfuGfaAfaUfL96	usUfsuUfaCfuAfaUfaGfaUfaAfaUfuUfasAfsa	1362-1384
3417	3418	AD-58874	AfsgsAfcCfaGfaAfaGfaGfuGfuCfuCfaUfL96	asUfsgAfgAfaAfcUfcUfuUfuUfgGfuCfusUfsu	871-893
3419	3420	AD-58875	AfsusCfuUfgAfaGfaGfCfaGfuUfgAfgGfgAfaUfL96	usCfscCfuCfaGfaGfucUfuCfaGfgAfaUfcsCfsc	1810-1832
3421	3422	AD-58876	GfscsCfuGfuGfaUfgAfaCfaUfaUfgAfgCfL96	gsCfsuCfaUfaUfgUfuUfuUfaAfaAfgAfcUfsc	1966-1988
3423	3424	AD-58877	CfsasGfaAfaGfaGfuGfuCfuCfaUfuCfuCfL96	gsAfsaGfaUfgAfgAfaAfcUfuUfuUfcsGfsu	875-897
3425	3426	AD-58878	AfscsUfuUfuCfaGfuUfaUfgAfuUfuCfuCfL96	gsAfsaAfcGfaUfcAfuUfuUfgAfaAfaGfcsGfsg	925-947
3427	3428	AD-58879	UfscsAfuGfCfaAfaAfaUfgGfaCfaUfcAfaUfL96	usGfsaUfgUfcCfaUfuUfuUfgGfaAfaUfgGfcsCfsu	1634-1656
3429	3430	AD-58880	AfsasUfaUfuUfcUfgGfaAfaUfaGfuAfaAfaUfL96	usUfsuAfcUfaGfuUfcaGfaAfaUfaUfcsUfsc	1183-1205
3431	3432	AD-58881	CfsusUfuCfaAfaGfaUfaCfuUfgCfaUfL96	usGfsgCfaAfaUfaUfuUfuUfgAfaGfaAfgsAfsu	892-914
3433	3434	AD-58882	UfsusUfcAfuUfaUfgGfaUfuCfuUfuUfL96	asAfsaGfaCfaCfuAfuUfuUfuUfgAfaAfasAfsq	928-950
3435	3436	AD-58883	CfscsCfaGfuGfuGfgUfuAfuUfgUfgAfaUfL96	usUfsuCfaCfaCfuAfaAfaAfaAfuUfgGfcsGfsc	790-812
3437	3438	AD-58884	GfscsUfgUfgAfaAfaUfuUfuUfuUfgAfaUfL96	asAfsuUfaGfaGfaUfaUfuUfuUfgAfaGfcsCfsu	1325-1347
3439	3440	AD-58885	AfsgsGfcUfuGfaGfCfaAfaGfuUfgGfuAfuCfL96	gsAfsuAfaCfaAfaUfuUfgUfuUfgAfaGfcsGfsa	2229-2251

(continuación)

SEQ ID NO: (sentido)	SEQ ID NO: (anti-sentido)	Nombre dúplex	del Secuencia sentido (5'-3')	Secuencia antisentido (5'-3')	Sitios diana de la secuencia antisentido en NM_000688.4
3441	3442	AD-58886	GfsasAfaGfaGfuGfUfCfuCfaUfcUfuCfuUfl96	asAfsaAfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsUfsg	877-899
3443	3444	AD-58887	AfsusUfuCfuGfgAfafCfuAfgUfaaUfuCfuUfl96	gsAfsaUfuUfaCfuUfgAfguuCfcAfgAfaAfsu	1186-1208
3445	3446	AD-58888	UfsgsUfgAfaGfuGfgCfcCfaUfgAfuUfuUfl96	asAfsaCfuCfaUfgGfgccAfcAfuCfaCfasCfsa	1531-1553
3447	3448	AD-58889	AfsasGfaGfaGfaGfuGfUfcAfuUfuCfuUfl96	gsAfsaAfaAfuAfgGfacuUfcUfcUfcsUfsc	2208-2230
3449	3450	AD-58890	UfsgsGfcAfgCfaCfaGfaUfcAfuUfcAfuUfl96	usCfsuGfaUfuCfaUfugUfgCfuGfcCfasGfsg	671-693
3451	3452	AD-58891	AfsusGfaUfcGfuUfCfuUfuGfaGfaAfaUfl96	usUfscUfcUfcAfaAfgaaAfcGfaUfcAfasAfc	935-957
3453	3454	AD-58892	UfscsUfgGfaAfcUfaGfuAfaUfuCfaUfl96	asUfsgGfaAfuUfaAfaGfuUfcCfaGfasAfsa	1189-1211
3455	3456	AD-59095	GfscsCfcAfuUfcUfAfuCfcCfaGfaUfl96	asCfsuCfsgGfgAfuAfaGfaAfuGfgsgsc	360-382
3457	3458	AD-59096	GfsgsAfaCfaAfuGfcCfcCfuCfaAfuGfaUfl96	asUfscAfuGfgAfgGfcuGfgUfscsc	1347-1369
3459	3460	AD-59097	UfsgsGfaGfuCfuGfUfgCfcGfaUfcUfl96	asGfsgAfuCfcGfcAfcagAfcUfscsa	1794-1816
3461	3462	AD-59098	CfsasCfcCfaCfcGfgUfgUfgGfgAfl96	usCfscCfaCfaCfaCfcGfgUfgGfgsg	1112-1134
3463	3464	AD-59099	GfsgsAfgUfcUfgUfgCfcGfaUfcCfuAfl96	usAfsaGfaUfcCfcGfcCfaCfaCfscsc	1795-1817
3465	3466	AD-59100	CfsasAfaAfcUfgCfcCfcAfaGfaUfgAfl96	usCfsaUfcUfuGfgGfgcaGfuUfscsg	428-450
3467	3468	AD-59101	GfscsCfuCfaAfuGfaUfcCfaAfgGfgAfl96	usCfscCfuUfgGfaUfcuGfgAfgsgsc	1355-1377
3469	3470	AD-59102	CfsasUfcAfuCfcCfuGfgCfcGfgGfuUfl96	asAfsaCfcGfcAfcAfggAfuUfgsgsg	1921-1943
3471	3472	AD-59103	AfscsCfcAfcGfgUfgUfgGfuGfgGfgAfl96	usCfscCfcAfcAfcAfcCfcGfgGfgsgsu	1113-1135
3473	3474	AD-59104	CfsasCfaUfcAfuCfcCfuGfgGfgGfgAfl96	usCfscGfcAfcAfgGfgGfaUfgsgsg	1919-1941
3475	3476	AD-59105	CfsasGfaAfaGfaGfuGfgCfuCfaUfcUfl96	asGfsaUfgAfgAfcAfcuUfuUfscsg	873-895
3477	3478	AD-59106	CfscsUfcCfaUfgAfuCfcAfaGfgGfaUfl96	asUfscCfcUfuGfgAfucaUfgGfgsgsg	1356-1378
3479	3480	AD-59107	UfsgsCfcCfaUfuCfuUfaUfcCfcGfaAfl96	usUfscGfgGfaUfaAfgaaUfgGfgscsa	359-381
3481	3482	AD-59108	CfsusUfcAfcCfcUfgGfgCfaAfgAfuAfl96	usAfsuCfuUfaGfcCfaggGfgGfgsgsg	1297-1319
3483	3484	AD-59109	AfsusCfaUfcCfcUfgUfgCfcGfgUfuAfl96	usAfsaCfcCfcCfaCfaCfaggGfgUfgsgsu	1922-1944
3485	3486	AD-59110	AfsgsAfaAfgAfgUfgUfcAfuCfuUfl96	asAfsaAfuGfaGfaCfaCfaccUfscsu	874-896
3487	3488	AD-59111	CfsusCfcAfuGfaUfcCfaAfgGfgAfuUfl96	asAfsuCfcCfuUfgGfaucAfuGfgsgsg	1357-1379
3489	3490	AD-59112	CfscsAfuUfcUfuAfuCfcCfcAfgUfcAfl96	usGfsaCfuCfcGfgGfgAfuuaGfaAfgsgsg	362-384
3491	3492	AD-59113	CfsasCfcCfuGfgCfuUfaGfaUfgAfuAfl96	usAfsuCfaUfcUfuAfgccAfgGfgsgsg	1300-1322
3493	3494	AD-59114	UfscsAfuCfcCfuGfgUfgCfcGfgUfgAfl96	usCfsaAfcCfcGfcAfcagGfgAfgsgsa	1923-1945
3495	3496	AD-59115	AfsasGfaGfuCfuCfuCfaUfcUfuCfuUfl96	asAfsaAfaGfaUfgAfgacAfcUfscsu	877-899
3497	3498	AD-59116	GfscsCfaUfgCfcAfaAfaAfuGfgAfaAfl96	usGfsuCfcAfuUfuUfuggCfaUfgsgsc	1631-1653
3499	3500	AD-59117	CfsasUfuCfuUfaUfcCfcGfaGfuCfcAfl96	usGfsgAfcUfcGfgGfgGfaaAfgAfgsgsg	363-385
3501	3502	AD-59118	AfscsCfcUfgGfcUfaAfgAfuGfaUfgAfl96	usCfsaUfcAfuCfuUfagcCfaGfgsgsu	1301-1323
3503	3504	AD-59119	CfsusCfuAfcCfcUfgGfcUfaAfgAfl96	usCfsuUfaGfcCfaCfaGfgguGfaAfgsgsg	1295-1317
3505	3506	AD-59120	AfsusGfcCfaAfaAfuUfgGfaCfaUfgAfl96	asGfsaUfgUfcCfaUfuuuUfgGfscasu	1634-1656
3507	3508	AD-59121	UfsgsCfcCfaAfaGfaUfgAfuGfgAfaUfl96	asUfscCfcAfuCfaUfcuuGfgGfgscsa	434-456
3509	3510	AD-59122	GfscsAfcCfaUfgCfcUfcCfaUfgAfuAfl96	usAfsuCfaUfgGfgGfgcaUfgGfscsu	1348-1370

(continuación)

SEQ ID NO: (sentido)	SEQ ID NO: (anti- sentido)	Nombre dúplex	Secuencia sentido (5'-3')	Secuencia antisentido (5'-3')	Sitios diana de la secuencia antisentido en NM_000688.4
3511	3512	AD-59123	UfscsUfuCfaCfcCfUfGfgCfuAfaGfaUfL96	asUfscUfuAfgCfcAfgggUfgAfasgsa	1296-1318
3513	3514	AD-59124	UfsgsCfcAfaAfaAfUfGfgAfcAfuCfaUfL96	asUfsgAfuGfuCfcAfuuuUfuGfgscsa	1635-1657
3515	3516	AD-59125	CfscsAfgAfaAfaAfGfUfgUfcAfuAfl96	usAfsuGfaGfaCfaCfucuUfuCfusgsg	872-894
3517	3518	AD-59126	GfsasAfaCfuGfuCfcCfaUfuAfaUfgAfl96	usCfsaUfuGfaAfuGfgacAfgUfususc	1481-1503
3519	3520	AD-59127	UfscsAfcCfcUfgGfCfuAfaAfgAfuGfaUfL96	asUfscAfuCfuUfaGfccaGfgGfusgsa	1299-1321
3521	3522	AD-59128	CfscsCfuGfgAfgUfCfuUfgCfgGfaUfL96	asUfscCfgCfaCfaGfacuCfcAfgsgsg	1791-1813
3523	3524	AD-59129	GfsasAfaGfaGfuGfCfuCfaUfcUfuAfl96	usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcUfususc	875-897
3525	3526	AD-59130	UfsgsGfaGfcCfcUfGfgGfaGfuCfuGfuAfl96	usAfsaAfgAfcUfcCfaggGfcUfscsa	1786-1808

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

SEQ ID (sentido)	NO: (anti-sentido)	Nombre dúplex	del Secuencia sentido (5'-3')	Secuencia antisentido (5'-3')	Sitios diana de la secuencia antisentido en
3684	3527	AD-58848	CAUGCCAAAAAUGGACAUCAU	AUGAUGUCCAUUUUUUGGCAUGAC	NM_000688.4
3528	3529	AD-58849	AUUUUUGAAGUGAGUGAAA	UUUCACUCAUCACUUCAAAAUGC	1635-1657
3530	3531	AD-58850	AGUUUUUUUUUUUUUAUCU	AGAUUUUUUUUUUUUAUAAUCUUA	2189-2211
3532	3533	AD-58851	GCAUUUUGAAGUGAUGAGUGA	UCACUACUACUUCUAAAAUGCAG	2344-2366
3534	3535	AD-58852	GAACUUAUGAGCAGACAUAA	GUUAGUCUCUCUACUUAUUAU	2187-2209
3536	3537	AD-58853	AAUGACCACACCUAUCGAGUU	AACUCGAUAGGUGUGUCAUUCU	1975-1997
3538	3539	AD-58854	UAAUUUUUAUCUUAUAGUAAA	UUUACUUAAGAUUUAAAAUUAAU	973-995
3540	3541	AD-58855	UUCAGUAUGAUCGUUUUUUUG	CAAAAGAAACGAUCAUCUGAAAA	2352-2374
3542	3543	AD-58856	CACUUUCAGUAUGAUCGUUU	AAACGAUCAUACUGAAAAUGGA	929-951
3544	3545	AD-58857	AAUUCUGUUUCCACUUUUUAG	CUGAAAAUGGAAACAGAUUUUG	924-946
3546	3547	AD-58858	CAUUUGAAACUGUCCAUUCAA	UUGAAUGGACAGUUUCAAUUGCC	913-935
3548	3549	AD-58859	CCUUCGAGUUUUUUAAAACUG	CAGUUUUAAAAACUCGUAAGGUG	1478-1500
3550	3551	AD-58861	GACCAGAAAGAGUGUCUUAUC	GAUGAGACACUUCUUGGUCUU	983-1005
3552	3553	AD-58862	ACCAGAAAGAGUGUCUUAUCU	AGAUGAGACUCUUCUUGGUCU	872-894
3554	3555	AD-58863	ACUAAUGAGCAGACAUAAU	AUGUUAUGUCUCUUAUUAUUG	873-895
3556	3557	AD-58864	UAGUAAAAACAUGUCCUGGA	UCCAGGACUAGUUUUUUAUUA	1977-1999
3558	3559	AD-58865	UAUUUCUGGAACUAGUAAUU	AAUUACUAGUUUCCAGAAUUAU	2366-2388
3560	3561	AD-58867	UUCUGCAAAGCCAGUCUUGAG	CUCAAGUCUGCUUUGCAGAAAG	1185-1207
3562	3563	AD-58868	GAGGAAAGAGGUUGCUGAAAC	GUUUCAGCAACCUUUCUCCUCAC	706-728
3564	3565	AD-58869	GGUACUAGAAUUAUUUCUGGA	UCCAGAAAUUAUUCUAGUACCAC	759-781
3566	3567	AD-58870	GACAUCAUGCAAAGCAAAGA	UCUUUGCUUUUGCAUGAUGUCU	1174-1196
3568	3569	AD-58871	AAAUUUUAUCUUAUAGUAAAA	UUUUACUUAAGAUUUAAAAUUUA	853-875
3570	3571	AD-58873	CAUGAUCCAAAGGAUUCGAAA	UUUCGAUCCCUUGGAUCAUGGA	2353-2375
3572	3573	AD-58874	AGACCAGAAAGAGUGUCUCAU	AUGAGACACUUCUUGGUCUUU	1362-1384
3574	3575	AD-58875	AUCCUGAAGAGCGCUGAGGGA	UCCUCAGCGCUCUUCAGGAUCC	871-893
3576	3577	AD-58876	GUCUGUGAUGAACUAAUAGAGC	GCUCAUUAUUAUCAUCACAGACU	1810-1832
3578	3579	AD-58877	CAGAAAGAGUGUCUCAUCUUC	GAAUGAGAGACACUUCUUGGU	1966-1988
3580	3581	AD-58878	ACUUUCAGUAUGAUCGUUUC	GAAACGAUCAUACUGAAAAUGG	875-897
3582	3583	AD-58879	UCAUGCCAAAAUUGGACAUCA	UGAUGUCCAUUUUUUGGCAUGACU	925-947
3584	3585	AD-58880	AAUUAUUCUGGAACUAGUAAA	UUUACUAGUUCAGAAAAUUUUC	1634-1656
3586	3587	AD-58881	CUUCUUAAGAUAAACUUGCCA	UGGCAAGUUUUCUUGAAGAAU	1183-1205
3588	3589	AD-58882	UUUCAGUAUGAUCGUUUUUU	AAAGAAA CGAUCAUACUGAAAAAG	892-914
3590	3591	AD-58883	CCCAGUGUGGUUAUGUGGAAA	UUUCACUUAACACACUGGGGC	928-950
3592	3593	AD-58884	GCUGUGAGUUUACUGUGAUU	AAUCAGAGUAAUUCACACAGCCU	790-812
3594	3595	AD-58885	AGGCUUGAGCAAGUUGGUUAC	GAUACCAACUUGCUCUACAGCCUGA	1325-1347
					2229-2251

(continuación)

SEQ ID NO: (sentido)	SEQ ID NO: (anti-sentido)	Nombre dúplex	del Secuencia sentido (5'-3')	Secuencia antisentido (5'-3')	Sitios diana de la secuencia antisentido en
3596	3597	AD-58886	GAAAGAGUGUCUACUUCUU	AAGAAGUAGAGACACUCUUCUG	NM_000688.4
3598	3599	AD-58887	AUUUCUGGAACUAGUAAUUC	GAAUUUACUAGUCCAGAAUUAU	877-899
3600	3601	AD-58888	UGUGAUGUGGCCCAUGAGUUU	AAACUCUAGGGCCACAUACACACA	1186-1208
3602	3603	AD-58889	AAGAGAGAAUCCUAAUUCUC	GAGAAUAGGACUUCUCUUCUUC	1531-1553
3604	3605	AD-58890	UGGACGACAGAUAAUACAGA	UCUGAUUACUCUGUCGCCAGG	2208-2230
3606	3607	AD-58891	AUGAUCGUUCUUAUAGAAAA	UUUUCUAAAAGAAACGAUCAUAC	671-693
3608	3609	AD-58892	UCUGGAACUAGUAAUUCCAU	AUGGAAUUUACUAGUCCAGAAA	935-957
3610	3611	AD-59095	GCCCAUUCUUAUCCCGAGU	ACUCGGGAUAAAGAAUGGGC	1189-1211
3612	3613	AD-59096	GGAACCAUGCCUCCAUAGU	AUCAUGGAGGCAUGGUUCC	360-382
3614	3615	AD-59097	UGGAGUCUGUGCGGAUCCU	AGGAUCCGCACAGACUCCA	1347-1369
3616	3617	AD-59098	CACCCACGGGUGUGUGGGA	UCCACACACCCGUGGGUG	1794-1816
3618	3619	AD-59099	GGAGUCUGUGCGGAUCCUA	UAGGAUCCGCACAGACUCC	1112-1134
3620	3621	AD-59100	CAAAACUGCCCCAAGAUGA	UCAUCUUGGGCAGUUUUG	1795-1817
3622	3623	AD-59101	GCCUCCAUGUCCAAAGGA	UCCCUUGGAUCAUGGAGGC	428-450
3624	3625	AD-59102	CAUCAUCCUGUGCGGGUU	AACCCGCACAGGGAUG	1355-1377
3626	3627	AD-59103	ACCCACGGGUGUGUGGGA	UCCACACACCCGUGGGU	1921-1943
3628	3629	AD-59104	CACAUCAUCCUGUGCGGA	UCGCGACAGGGAUGAUG	1113-1135
3630	3631	AD-59105	CAGAAAGAGUGUCUCAUCU	AGAUGAGACACUCUUUCUG	1919-1941
3632	3633	AD-59106	CCUCCAUGAUCCAAGGAU	AUCCCUUGGAUCAUGGAG	873-895
3634	3635	AD-59107	UGCCCAUUCUUAUCCCGAA	UUCGGGAUAAAGAAUGGCA	1356-1378
3636	3637	AD-59108	CUUACCCUGGCUAAGAU	UAUCUUAGCCAGGGUGAAG	359-381
3638	3639	AD-59109	AUCAUCCUGUGCGGGUUA	UAACCCGCACAGGGAUGAU	1297-1319
3640	3641	AD-59110	AGAAAGAGUGUCUCAUCU	AAGAUGAGACACUCUUUCU	1922-1944
3642	3643	AD-59111	CUCCAUGAUCCAAGGAU	AUCCCUUGGAUCAUGGAG	874-896
3644	3645	AD-59112	CCAUUCUUAUCCCGAGUCA	UGACUCGGGAUAAAGAAUG	1357-1379
3646	3647	AD-59113	CACCCUGGCUAAGAU	UAUCAUCUUAUAGCCAGGGUG	362-384
3648	3649	AD-59114	UCAUCCUGUGCGGGUUGA	UCAACCCGCACAGGGAUGA	1300-1322
3650	3651	AD-59115	AAGAGUGUCUCAUCUUCU	AAGAAGAUAGACACUCUU	1923-1945
3652	3653	AD-59116	GUCAUGCCAAAAUUGGACA	UGUCCAUUUUUGGCAUGAC	877-899
3654	3655	AD-59117	CAUUCUUAUCCCGAGUCCA	UGGACUCGGGAUAAAGAAUG	1631-1653
3656	3657	AD-59118	ACCCUGGCUAAGAU	UCAUCAUCUUAUAGCCAGGGU	363-385
3658	3659	AD-59119	CUCUUCACCCUGGCUAAGA	UCUUAGCCAGGGUGAAGAG	1301-1323
3660	3661	AD-59120	AUGCCAAAAUUGGACAUCU	UGAUGUCCAUUUUUGGCAU	1295-1317
3662	3663	AD-59121	UGCCCCAAGAUUGGAAU	AUCCCAUCAUCUUGGGCA	1634-1656
3664	3665	AD-59122	GAACCAUGCCUCCAUAGUA	UAUCAUGGAGGCAUGGUUC	434-456
					1348-1370

(continuación)

SEQ. ID (sentido)	NO: SEQ. ID NO: (anti-sentido)	Nombre dúplex	del Secuencia sentido (5'-3')	Secuencia antisentido (5'-3')	Sitios de la secuencia antisentido en
3666	3667	AD-59123	UCUUCACCCUGGCUAAGAU	AUCUUAGCCAGGGUGAAGA	NM_000688.4
3668	3669	AD-59124	UGCCAAAAUUGGACAUCAU	AUGAUGUCCAUUUUUUGGCA	1296-1318
3670	3671	AD-59125	CCAGAAAGAGUGUCUCAUA	UAUGAGACACUCUUUCUGG	1635-1657
3672	3673	AD-59126	GAAACUGUCCAUUCAAUGA	UCAUUGAAUGGACAGUUUC	872-894
3674	3675	AD-59127	UCACCCUGGCUAAGAU	AUCAUCUUA GCCAGGGUGA	1481-1503
3676	3677	AD-59128	CCCUGGAGUCUGGCGGAU	AUCCGCACAGACUCCAGGG	1299-1321
3678	3679	AD-59129	GAAAGAGUGUCUCAUCUUA	UAGGAUGAGACACUCUUUC	1791-1813
3680	3681	AD-59130	UGGAGCCCGGAGUCUGUA	UACAGACUCCAGGGCUCCA	875-897
					1786-1808

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

Tabla 16: Resultados de los ensayos funcionales

ID del dúplex	Especies diana	Tipo	Captación libre en cino.				Transfección en cino.		Transfección en Hep3b	
			1 µM, media	500 nM	20 nM, media	10 nM	20 nM, media	0.2 nM, media	10 nM, media	0.1 nM, media
AD-58848	Ratón/Rata/Rh/H	21/23	131.6	176.0	104.4	128.0	43.5	44.8	25.3	76.8
AD-58849	H/Rh	21/23	91.9	88.1	92.2	105.0	29.4	35.4	11.5	47.1
AD-58850	H/Rh	21/23	79.4	103.4	80.0	111.2	NA	62.2	31.3	72.0
AD-58851	H/Rh	21/23	99.7	74.7	94.8	104.7	NA	40.7	8.6	81.3
AD-58852	H/Rh	21/23	108.1	91.8	103.3	111.9	101.1	128.8	43.4	129.0
AD-58853	H/Rh	21/23	74.8	67.7	84.2	93.5	24.7	52.9	14.1	61.2
AD-58854	H/Rh	21/23	145.9	124.1	106.6	115.3	119.0	83.9	85.0	84.0
AD-58855	H/Rh	21/23	81.5	97.9	92.7	101.8	39.5	40.3	15.3	67.6
AD-58856	H/Rh	21/23	74.1	90.6	84.6	82.6	22.4	30.7	8.7	33.3
AD-58857	H/Rh	21/23	64.7	91.4	62.3	87.1	22.0	31.6	9.8	106.3
AD-58858	H/Rh	21/23	67.4	91.7	68.6	98.3	27.9	40.3	17.4	44.8
AD-58859	H/Rh	21/23	71.2	77.2	92.4	90.1	19.1	34.3	13.1	39.7
AD-58861	H/Rh	21/23	104.6	107.2	102.0	100.6	25.9	35.1	18.0	69.8
AD-58862	H/Rh	21/23	66.8	77.0	68.7	88.5	20.3	31.1	24.2	49.9
AD-58863	H/Rh	21/23	70.8	66.8	76.8	98.5	21.5	29.7	8.7	54.9
AD-58864	H/Rh	21/23	76.2	85.6	83.7	100.8	60.4	61.0	56.4	87.3
AD-58865	H/Rh	21/23	67.9	77.9	95.9	98.4	21.3	38.6	15.5	81.4
AD-58867	H/Rh	21/23	95.9	93.3	107.0	97.5	32.3	42.7	16.6	79.8
AD-58868	H/Rh	21/23	95.2	92.1	116.2	94.7	54.6	69.2	61.5	105.9
AD-58869	H/Rh	21/23	65.0	78.2	75.8	88.2	17.4	25.0	13.0	63.9
AD-58870	H/Rh	21/23	69.4	92.3	81.0	88.1	29.2	43.8	33.7	79.1
AD-58871	H/Rh	21/23	61.2	77.3	88.2	77.0	71.2	73.2	36.7	110.3
AD-58873	H/Rh	21/23	95.2	100.9	83.3	94.6	54.2	52.8	36.6	73.3
AD-58874	H/Rh	21/23	75.8	76.8	63.8	85.3	22.3	31.2	15.0	38.2
AD-58875	H/Rh	21/23	80.7	88.7	78.6	97.9	48.6	73.6	61.2	90.6
AD-58876	H/Rh	21/23	90.8	93.1	82.5	100.2	41.1	56.9	21.2	58.7
AD-58877	H/Rh	21/23	68.3	85.1	51.2	78.7	18.5	46.6	11.9	27.4
AD-58878	H/Rh	21/23	78.3	68.3	81.2	91.2	24.1	23.4	6.2	37.1
AD-58879	H/Rh	21/23	87.9	94.1	79.7	95.4	32.0	47.8	15.7	82.5
AD-58880	H/Rh	21/23	74.9	72.2	88.9	88.1	20.1	27.5	14.0	60.7
AD-58881	H/Rh	21/23	85.9	76.8	78.8	118.0	22.2	36.7	27.6	71.6
AD-58882	H/Rh	21/23	54.1	53.4	60.3	85.8	14.6	27.2	8.2	23.8
AD-58883	H/Rh	21/23	80.4	69.9	75.7	80.3	31.8	25.8	12.3	63.0
AD-58884	H/Rh	21/23	57.7	55.3	64.8	78.2	20.0	30.0	11.8	68.9
AD-58885	H/Rh	21/23	101.8	91.8	104.1	101.5	85.9	71.9	61.8	71.2
AD-58886	Ratón/Rata/Rh/H	21/23	47.1	58.0	36.3	93.3	16.0	26.6	9.2	32.0
AD-58887	H/Rh	21/23	73.6	98.7	82.6	95.2	28.5	33.5	12.8	65.2
AD-58888	H/Rh	21/23	90.2	69.9	69.4	85.6	46.9	45.0	16.6	72.0
AD-58889	H/Rh	21/23	83.6	98.6	82.4	92.2	36.5	40.3	31.6	99.4
AD-58890	H/Rh	21/23	69.5	95.4	84.2	88.2	50.8	45.6	21.7	92.9
AD-58891	H/Rh	21/23	62.8	75.7	75.4	109.2	23.6	34.3	15.6	55.8
AD-58892	H/Rh	21/23	60.2	92.9	89.8	92.9	22.8	43.3	20.2	75.6
AD-59095	Ratón/Rata/Rh/H	nonadecámero	88.9	NA	132.8	NA	48.3	97.4	54.3	99.0
AD-59096	Ratón/Rata/Rh/H	nonadecámero	95.5	NA	90.5	NA	105.7	138.6	131.4	120.7
AD-59097	Ratón/Rata/Rh/H	nonadecámero	92.5	NA	84.2	NA	75.0	NA	94.7	108.5
AD-59098	Ratón/Rata/Rh/H	nonadecámero	84.0	NA	87.7	NA	109.3	NA	130.0	87.3
AD-59099	Ratón/Rata/Rh/H	nonadecámero	89.7	NA	90.0	NA	77.8	85.4	46.8	74.9
AD-59100	Ratón/Rata/Rh/H	nonadecámero	84.8	NA	144.3	NA	70.6	108.1	91.5	117.6
AD-59101	Ratón/Rata/Rh/H	nonadecámero	79.0	NA	103.8	NA	89.8	102.9	124.2	107.0
AD-59102	Ratón/Rata/Rh/H	nonadecámero	85.9	NA	100.6	NA	72.2	68.5	87.9	95.1
AD-59103	Ratón/Rata/Rh/H	nonadecámero	86.0	NA	91.1	NA	93.0	81.3	130.0	96.0
AD-59104	Ratón/Rata/Rh/H	nonadecámero	92.6	NA	96.9	NA	94.9	91.4	124.4	83.1
AD-59105	Ratón/Rata/Rh/H	nonadecámero	48.9	NA	101.7	NA	18.4	48.9	17.0	34.7
AD-59106	Ratón/Rata/Rh/H	nonadecámero	63.2	NA	76.7	NA	28.5	40.7	28.6	46.4

(continuación)

AD-59107	Ratón/Rata/Rh/H	nonadecámero	71.4	NA	68.7	NA	37.1	45.3	26.8	63.6
AD-59108	Ratón/Rata/Rh/H	nonadecámero	70.7	NA	85.1	NA	89.9	84.8	139.2	101.7
AD-59109	Ratón/Rata/Rh/H	nonadecámero	86.1	NA	83.4	NA	84.9	96.2	131.7	86.7
AD-59110	Ratón/Rata/Rh/H	nonadecámero	70.8	NA	119.7	NA	38.5	60.4	67.4	80.3
AD-59111	Ratón/Rata/Rh/H	nonadecámero	66.1	NA	76.5	NA	52.2	61.0	69.7	87.6
AD-59112	Ratón/Rata/Rh/H	nonadecámero	71.2	NA	80.2	NA	91.2	83.4	127.4	89.0
AD-59113	Ratón/Rata/Rh/H	nonadecámero	67.0	NA	77.8	NA	49.1	59.0	66.8	91.4
AD-59114	Ratón/Rata/Rh/H	nonadecámero	81.7	NA	79.3	NA	96.3	88.0	129.6	72.4
AD-59115	Ratón/Rata/Rh/H	nonadecámero	40.4	NA	69.6	NA	19.6	35.7	9.3	16.9
AD-59116	Ratón/Rata/Rh/H	nonadecámero	72.2	NA	78.3	NA	53.5	77.8	70.1	107.8
AD-59117	Ratón/Rata/Rh/H	nonadecámero	70.7	NA	75.6	NA	75.8	74.9	129.0	103.5
AD-59118	Ratón/Rata/Rh/H	nonadecámero	68.8	NA	75.9	NA	81.4	82.1	114.1	89.7
AD-59119	Ratón/Rata/Rh/H	nonadecámero	64.9	NA	86.5	NA	85.1	125.1	122.8	124.8
AD-59120	Ratón/Rata/Rh/H	nonadecámero	63.5	NA	75.1	NA	29.9	52.0	16.1	54.1
AD-59121	Ratón/Rata/Rh/H	nonadecámero	67.6	NA	72.0	NA	88.8	77.4	108.0	103.1
AD-59122	Ratón/Rata/Rh/H	nonadecámero	60.2	NA	62.3	NA	25.1	45.3	16.2	54.8
AD-59123	Ratón/Rata/Rh/H	nonadecámero	68.6	NA	108.2	NA	59.2	84.6	80.0	97.7
AD-59124	Ratón/Rata/Rh/H	nonadecámero	47.5	NA	56.5	NA	23.9	40.0	9.8	18.9
AD-59125	Ratón/Rata/Rh/H	nonadecámero	45.4	NA	47.2	NA	15.2	40.7	14.7	15.1
AD-59126	Ratón/Rata/Rh/H	nonadecámero	64.3	NA	74.6	NA	51.6	57.1	35.5	54.4
AD-59127	Ratón/Rata/Rh/H	nonadecámero	103.4	NA	105.8	NA	94.0	156.4	135.9	113.7
AD-59128	Ratón/Rata/Rh/H	nonadecámero	102.4	NA	81.4	NA	66.3	89.3	60.2	74.9
AD-59129	Ratón/Rata/Rh/H	nonadecámero	41.3	NA	38.8	NA	17.9	41.4	8.6	12.6
AD-59130	Ratón/Rata/Rh/H	nonadecámero	58.3	NA	80.8	NA	94.9	78.3	106.7	88.0

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

Tabla 17: Valores de Cl_{50} de dúplex de ARNip de ALAS1 seleccionados

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

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

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

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

SEQ ID NO: (sentido)	SEQ ID NO: (anti-sentido)	Sitios diana de la secuencia antisentido	Nombre del dúplex	Secuencia sentido (5'-3')	Secuencia antisentido (5'-3')
4149	4150	873-895	AD-58632	GfsasAfaGfaGfuGfuCfuCfaUfcUfuCfuUfl.96	asAfsGafaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfosusg

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

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

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

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

SEQ ID NO: (sentido)	SEQ ID NO: (anti- sentido)	Nombre del dúplex	Secuencia sentido (5'-3')	Secuencia antisentido (5'-3')	Sitios diana de la secuencia antisentido en NM 000688.4
3685	3686	AD-59453	CAGGCAAAUCUCUGUUGUUDTdT	AACAACAGAGAUUUUGCCUGdTdT	402-420
3687	3688	AD-59395	GAAGAAAUUGAGAGAAAdTdT	UUUCUCAUAAUUUUUUUCdTdT	949-967
3689	3690	AD-59477	GGAAAGAUCCGCACUCUUDTdT	AAGAGUGCGCAUCUUUCCdTdT	1242-1260
3691	3692	AD-59492	UGUCUCAUCUUCUUAAGAdTdT	UCUUGAAGAAGAUAGACAdTdT	882-900
3693	3694	AD-59361	ACAUCUACGUGCAAGCAAUdTdT	AUUGCUUGCACGUAUGUdTdT	1992-2010
3695	3696	AD-59462	UUCUCUGAUUGACACCGUAdTdT	UACGGUGUCAAUACAGAGAdTdT	1711-1729
3697	3698	AD-59433	GCUGCUGGCUUCAUCUUCAdTdT	UGAAGUUGAAGCCAGACUGdTdT	1739-1757
3699	3700	AD-59424	AGCGCAACGUCAAACUAdTdT	AUGAGUUUGACGUUGCGCUdTdT	1851-1869
3701	3702	AD-59414	UAUUUCUGGAACUAGUAAAdTdT	UUUACUAGUCCAGAAAUAdTdT	1183-1201
3703	3704	AD-59539	GGUUGUGUUGGAGGUAACAdTdT	UGUACCCUCCAAACACAdTdT	1679-1697
3705	3706	AD-59400	GUGUCAGUCUGGUGCAGUAdTdT	UACUGCACAGACUGACAdTdT	1070-1088
3707	3708	AD-59551	CUUUGUGGCCAAUGACUCAdTdT	UGAGUCAUUGGCCACAAAGdTdT	1273-1291
3709	3710	AD-59482	AGAUGCUGCUAAAAACAdTdT	UGUGUUUUUAGCAGCAUCUdTdT	1942-1960
3711	3712	AD-59448	GAGUCAUGCCAAAAUGGAdTdT	UCCAUUUUUGGCAUGACUCdTdT	1629-1647
3713	3714	AD-59392	CUGUGCGGAUCCUGAAGAdTdT	CUCUUCAGGAUCCGCACAGdTdT	1800-1818
3715	3716	AD-59469	CACUUGAAACAAUUGUdTdT	ACCAUGUUGUUUCAAAGUGdTdT	1141-1159
3717	3718	AD-59431	AAGUGAUGAGUGAAAGAGAdTdT	UCUCUUUCACUACUACUdTdT	2193-2211
3719	3720	AD-59423	AUCUGCUAGUCACAUUGGAdTdT	UCCAUUGUGACUAGCAGUdTdT	2103-2121
3721	3722	AD-59517	UGGGCAGGUGGUACUAGAdTdT	UCUAGUACCCACUGGCCAdTdT	1162-1180
3723	3724	AD-59578	GCAGUAGACUAUUCAGACUdTdT	AGUCUGAAUAGUCAUCUGdTdT	1031-1049
3725	3726	AD-59495	GCCUCAUCCUACAGCUGAdTdT	CUCAGCUGAGGAUAGAGGdTdT	2143-2161
3727	3728	AD-59432	GUAGUACGUUUUCUUUGAGdTdT	CUCAAAAGAAACGAUCAUAdTdT	931-949
3729	3730	AD-59382	UAUCCAGAUUGGUUUCAGAdTdT	UCUGAAGACCAUCUGGAUdTdT	2302-2320
3731	3732	AD-59472	UAGUGUGAAACCGAUGGAdTdT	UCCAUCGGUUUUCACACUAdTdT	799-817
3733	3734	AD-59459	UCCCAUGGCAGAUACUAdTdT	UAGUCAUCUGCCCAUGGGAdTdT	1023-1041
3735	3736	AD-59413	CCACUAGCAGCAGUACUAdTdT	UAGUGUACUGCUGCAGUGdTdT	483-501
3737	3738	AD-59478	CUGUGAACCGGCAGCACAdTdT	UGUGCUGCCGGUUCACAGdTdT	999-1017
3739	3740	AD-59376	GGUCCUAUGCUGCUGGUdTdT	AAGCCAGCAGCAUAGGACdTdT	1731-1749
3741	3742	AD-59556	AGCCUUUGGUUGUUGGAdTdT	UCCAACACAAACCAAGGCUdTdT	1672-1690
3743	3744	AD-59399	AAUUCCAUGUGGACUUAAGAdTdT	UCUAAAGUCCACAUAGGAUdTdT	1200-1218
3745	3746	AD-59474	CCAGGGCACUGCAAGCAAAdTdT	UUUGCUUGCAGUGCCCGGdTdT	640-658
3747	3748	AD-53542	cuuuuAGuAuGauGuuuTsdT	AAACGAUcAuACUGAAAGdTTdT	924-942
3749	3750	AD-59480	GAAUCAGAGAGGCAGCAGUdTdT	ACUGCUGCCUCUCUGAUUCdTTdT	682-700
3751	3752	AD-59549	GCAAGAUUCUGACCCUCAdTdT	UGAGGGGUGCAGUUCUUGCdTTdT	1441-1459
3753	3754	AD-59515	GGAGAAGAGCUCUACGGAdTdT	UCCGUAGGAGCUCUUCUCCdTTdT	2033-2051
3755	3756	AD-59427	CCAUGAGUUUGGAGCAAUAdTdT	GAUUGCUCCAAACUCAUGGdTTdT	1540-1558

(continuación)

SEQ ID NO: (sentido)	SEQ ID NO: (anti-sentido)	Nombre del duplex	Secuencia sentido (5'-3')	Secuencia antisentido (5'-3')	Sitios diana de la secuencia antisentido en NM_000688.4
3757	3758	AD-59390	CUUUGAGAAAAAAUUGAUdTdT	AUCAAUUUUUUUCUCAAAGdTdT	943-961
3759	3760	AD-59511	UGAGCAGACAUAACAUCUAdTdT	UAGAUGUUUAUGUCUGCUCAdTdT	1980-1998
3761	3762	AD-59532	CGUGCAAGCAAUCAAUUACdTdT	GUAAUUGAUUUGCUUGCACGdTdT	1999-2017
3763	3764	AD-59562	AAAGCAAAGACCAGAAAAdTdT	UCUUUCUGUCUUUUGCUUUdTdT	862-880
3765	3766	AD-59513	GGAUGUGCAGGAGAAUAGAAUdTdT	AUCAAUUUCCUGCACAUCCdTdT	733-751
3767	3768	AD-59362	CAGCAUACUUCUGAACAUdTdT	AUGUUCAGGAAGUAGUCGdTdT	321-339
3769	3770	AD-53541	GcAGcAcAGAUgAAUcAGAdTsdT	UCUGAUUcAUCUGUGCUGCdTsdT	671-689
3771	3772	AD-59490	UCUGUUUGUUCUAUGCCCAAdTdT	UUGGGCAUAGAACAACAGAdTdT	412-430
3773	3774	AD-59422	UGAGACAGAUGCUAUUGGAdTdT	UCCAUUAGCAUCUGUCUCAdTdT	1869-1887
3775	3776	AD-59467	GCCAAUGACUCAACCCUCUdTdT	AGAGGGUUGAGUCAUUUGGCdTdT	1280-1298
3777	3778	AD-59579	GAGUGCAACUUCUGCAGGAdTdT	UCCUGCAGAAUUGUCACUCdTdT	2159-2177
3779	3780	AD-59426	GUGAAAGAGAGAACUUCUAdTdT	UAGGACUUUCUCUUUACAdTdT	2202-2220
3781	3782	AD-59363	UAACUUGCCAAAAUCUUGUdTdT	AACAGAUUUUGGCAAGUAdTdT	901-919
3783	3784	AD-59436	AAGCCAGUCUUGAGCUUCAdTdT	UGAAGCUCAAAGACUGGCUUdTdT	711-729
3785	3786	AD-53536	cAuuuucAGuAuGAcGudTsdT	ACGAUcAuACUGAAAAUGdTsdT	922-940
3787	3788	AD-59491	GCAGCAGUGUCUUCUGCAAdTdT	UUGCAGAAAGACACUGCUGCdTdT	693-711
3789	3790	AD-59500	UCCUGAACAUUGGAGUGUdTdT	ACACUCUCCAUUGUUCAGGAdTdT	330-348
3791	3792	AD-59394	AUUUCUGGAACACUUGGCAdTdT	UGCCAAUGUUUCCAGAAUdTdT	1652-1670
3793	3794	AD-59441	CAGUACACUACCAACAGAUdTdT	AUCUGUUGGUAUGUACUGdTdT	492-510
3795	3796	AD-59365	GCAUGACCUCAAUUUAUUCdTdT	GAAUAAUUGAGGUCAUGCdTdT	2261-2279
3797	3798	AD-59411	AGAACUGCUGCAAAAGAUdTdT	AGAUCUUUUGCAGCAGUUCUdTdT	1432-1450
3799	3800	AD-59544	CACCCAGAUAGAUAACUAdTdT	UAGUUCAUCAUCUGGGUGdTdT	2073-2091
3801	3802	AD-59428	GAUCCAAGGGAUUCGAAACdTdT	GUUUCGAAUCCCUUGGAUCdTdT	1363-1381
3803	3804	AD-59471	CUCAUACCCAAAAAGCAAGdTdT	CUUGCUUUUUUGGUAUGAGdTdT	1052-1070
3805	3806	AD-59518	ACAACAUGGUGUGGGGCAdTdT	UGCCCCAGCACCAUGUUUGdTdT	1150-1168
3807	3808	AD-53547	GAucGuuuuuuGAGAAAAdTsdT	UUUUCUcAAAGAAAACGAUCdTsdT	935-953
3809	3810	AD-59573	CAGCAGCAGUUCUCUGAUUdTdT	AUUCAGAGAAUCUGUGCUGdTdT	1702-1720
3811	3812	AD-59473	AAUGAUGUCAGCCACCUCAdTdT	UAGGUGGCUGACAUCAUAdTdT	1412-1430
3813	3814	AD-59412	AGUUAUGGACACUUAUAAAdTdT	UUUCAAAGUGUCCAUAAACUdTdT	1132-1150
3815	3816	AD-59522	GAUGAUGAACUACUUCUUdTdT	AAGGAAGUAGUUAUCAUCdTdT	2080-2098
3817	3818	AD-59502	GCAGGAAUAGAAUCCCGUGdTdT	CACGGCAUUCAUUUCCUGCdTdT	739-757
3819	3820	AD-59499	UCUUCAGAUAAAUUCCAdTdT	UGGCAAGUUUAUCUUGAAGAdTdT	892-910
3821	3822	AD-59520	CGAUGGAGGGGAUCCAGUdTdT	ACUGGGAUCCCCUCCAUCCGdTdT	811-829
3823	3824	AD-59581	CCAAAAAGCAAGUGUCAGUdTdT	ACUGACACUUUGCUUUUUUGdTdT	1059-1077
3825	3826	AD-59461	GAUUGGGGAUCGCGGAUGGAdTdT	UCCAUCGCCGAUCCCCAAUCdTdT	1612-1630
3827	3828	AD-59370	CCCUGGAGUCUGUGCGGAUdTdT	AUCCGCACAGACUCCAGGGdTdT	1791-1809

(continuación)

SEQ ID NO: (sentido)	SEQ ID NO: (anti- sentido)	Nombre del dúplex	Secuencia sentido (5'-3')	Secuencia antisentido (5'-3')	Sitios diana de la secuencia antisentido en NM 000688.4
3829	3830	AD-53540	GuuGucuuuAuAuGuGAAdTsdT	AUUCaAuAuAAAGAcAAcTsdT	2321-2339
3831	3832	AD-59574	CGGGCAUUGUCCACUCAGAdTdT	CUGCAGUGGACAAUGCCCGdTdT	473-491
3833	3834	AD-59375	UAUUCAGACUCCCUCAUCAdTdT	UGAUGAGGGAGUCUGAAUAdTdT	1040-1058
3835	3836	AD-59387	CACUGCAUUUUGAAGUGAUdTdT	AUCACUUCAAAUUGCAGUGdTdT	2181-2199
3837	3838	AD-59397	CCAGAAAGAGUGUCUCAUCdTdT	GAUGAGACACUCUUUCUGdTdT	872-890
3839	3840	AD-59396	AGCGGAGGGAUUGGGAUdTdT	AUCCCAAUCCUCCGCCUdTdT	1603-1621
3841	3842	AD-59393	AGACUCCAUUGGAAAGAUdTdT	AUCUUUCCCAUGGAGGUCUdTdT	1231-1249
3843	3844	AD-59483	GCAGGAGGCCACUGCAUUdTdT	AAUGCAGUGGCCUCCUGCdTdT	2172-2190
3845	3846	AD-59430	AUCUGUUUCCACUUUCAGdTdT	CUGAAAAGUGGAAACAGAUdTdT	913-931
3847	3848	AD-59463	AGAGAAGUCCUAUUUCAdTdT	UGAGAAAUAGGACUUCUCUdTdT	2209-2227
3849	3850	AD-53534	GucuuAcAGAGuuGucuuAdTsdT	uAAAAGAcAACUCUCUGAAGAcTsdT	2312-2330
3851	3852	AD-59514	GGCUGGAACUGAAGCCUCAdTdT	UGAGGCUUCAGUUCAGGCCdTdT	2130-2148
3853	3854	AD-59575	GCCAUUAUCAUAUCCAGAUdTdT	AUCUGGAUAUGAUAAUGGCdTdT	2292-2310
3855	3856	AD-59364	AGCAGGCCCCAGUGUGUdTdT	AACCAACUCUGGGCCUCUdTdT	781-799
3857	3858	AD-59402	UCAGCUGAGUGCAACUUCUdTdT	AGAAGUUGACUCAGCUGAdTdT	2153-2171
3859	3860	AD-59479	GAGCAACAUCUCCCCAUdTdT	UGGGGAAGAUUGUGCUCdTdT	1011-1029
3861	3862	AD-59481	ACUCCAGGACACUAGCAdTdT	UGCAUGAUGUCCUGGAAGUdTdT	843-861
3863	3864	AD-59530	CCUAUCGAGUUUUUAAACdTdT	GUUUUAAAAACUCGAUAGdTdT	981-999
3865	3866	AD-59582	CUUCCUUGAGAAUCUGCUAdTdT	UAGCAGAUUCUCAAGGAAdTdT	2092-2110
3867	3868	AD-59506	ACCAACAGAUCAAAAGAAcTdT	GUUUCUUUGAUCUGUUGGUdTdT	501-519
3869	3870	AD-59567	UAACCCAGGCCAUUAUCAdTdT	UGAUAAUGGCCUGGGGUAdTdT	2283-2301
3871	3872	AD-59485	CCAUGCCUCCAUAGAUCCAAdTdT	UUGGAUCAUGGAGGCAUGGdTdT	1351-1369
3873	3874	AD-59525	UGAUGAACUAUAGAGCAGAdTdT	UCUGCUCAUUAGUUCAUCAdTdT	1969-1987
3875	3876	AD-59566	CCUGAAGAGCGCUGAGGGAdTdT	UCCUCAGCGCUCUUCAGGdTdT	1810-1828
3877	3878	AD-59580	AACACUUGGCAAGCCUUdTdT	AAAGGCUUUGCCCAAGUUGUdTdT	1660-1678
3879	3880	AD-59512	UCUGCAGAAAGCAGGCAAAdTdT	UUUGCCUUGCUUUCUGCAGAdTdT	391-409
3881	3882	AD-59475	CCGGCCUCCUGUUGUCCAdTdT	UGGACAAACAGGGAGGCCGdTdT	1890-1908
3883	3884	AD-59438	CAUCAUCCUUGUGCGGUdTdT	AACCGCACAGGGGAUGAUdTdT	1921-1939
3885	3886	AD-59442	UGUGCGGUUGCAGAUUCUdTdT	AGCAUCUGCAACCCGCACAdTdT	1930-1948
3887	3888	AD-59516	GGAAGAGGUUGCUGAAAdTdT	GUUUCAGCAACCCUUCUCCdTdT	759-777
3889	3890	AD-59429	AGGUCCAGCAGUGGGCUdTdT	AGCCCCACUGCGUGCCUdTdT	1572-1590
3891	3892	AD-59510	UGCCGUGAGGAAAGAGUdTdT	AACCUUUUCCUCCAGCCAdTdT	751-769
3893	3894	AD-59457	GCUAUGGAUGCCGGCCUCdTdT	GAGCCCGGCAUCCAUUAGCdTdT	1879-1897
3895	3896	AD-59434	GAAGCAAGUGGGGUGGAAdTdT	UUCAGCCCCACUUGCUUdTdT	2119-2137
3897	3898	AD-59454	CAUCUUCCGCCACAUAUGAUdTdT	AUCAUUGUGCGGGAAGAUdTdT	1399-1417
3899	3900	AD-59468	AUUUCUCAGGCUUGAGCAAdTdT	UUGCUCAAAGCCUGAGAAUdTdT	2220-2238

(continuación)

SEQ ID NO: (sentido)	SEQ ID NO: (anti- sentido)	Nombre del dúplex	Secuencia sentido (5'-3')	Secuencia antisentido (5'-3')	Sitios diana de la secuencia antisentido en NM_000688.4
3901	3902	AD-59565	CCCGAGUCCCCCAGGCCUUdTdT	AAGGCCUGGGGACUCGGGdTdT	372-390
3903	3904	AD-59416	CAAGCAAAUGCCCCUUUCCUdTdT	AGGAAAGGCAUUUGCUUGdTdT	651-669
3905	3906	AD-59420	CCCCUCAGUCCCCCAAGAUdTdT	AAUCUUGGGACUGAGGGdTdT	1453-1471
3907	3908	AD-59552	CUACGGUGCCCCCGGGAGdTdT	UCUCCCCGGGCACCGUAGdTdT	2019-2037
3909	3910	AD-59558	AAAAUCGCCCCCAAGAUdTdT	AUCAUCUUGGGCAGUUUdTdT	429-447
3911	3912	AD-59404	ACAAACUCGUAAGGCCAAdTdT	UUGGCCUUAGCAGUUUUGdTdT	540-558
3913	3914	AD-59455	GAUUCUGGGAACCAUGCCUdTdT	AGGCAUGGUUCCCAAGAAUCdTdT	1340-1358
3915	3916	AD-59496	CCAGAUGGCACACAGCUUCdTdT	GAAGCUGUGGCCAUUGGdTdT	593-611
3917	3918	AD-59446	AGGAUUCGAAACAGCCGAdTdT	UCGGCUGUUUCGAAUCCCUdTdT	1369-1387
3919	3920	AD-59435	CUCUGCAGUCCUCAGCGCAdTdT	UGCGCUGAGGACUCAGAGdTdT	109-127
3921	3922	AD-59419	CCGCCGCCUCUGCAGUCCUdTdT	AGGACUGCAGAGGCGCGGdTdT	102-120
3923	3924	AD-59533	CUGGCUGGAGCCCGAGUdTdT	ACUCCAGGGCUCGAGCCAGdTdT	1781-1799
3925	3926	AD-59366	GACAUCAGCAAAAAGCAAdTdT	UUUGCUUUUGCAUGAUGUdTdT	851-869
3927	3928	AD-59521	GUUGAGCAAGUUUGUAUCdTdT	GAUACCAACUUGCUCAGGdTdT	2229-2247
3929	3930	AD-59563	CAGGCUGAGAUUUUACUCdTdT	GAGUAAAUCACACAGCCUdTdT	1320-1338
3931	3932	AD-59534	AGAGCUGUGAGUUGGCCdTdT	GGCCACAUACACACAGCUCdTdT	1522-1540
3933	3934	AD-59407	GGAGCUGGCAGACCUCUAdTdT	AUGGAGUUCGCCAGCUCCTdTdT	1222-1240
3935	3936	AD-59445	AUCCAGUGGACUCUGGAAAdTdT	UUCAGCAGUCCACUGGGAUdTdT	822-840
3937	3938	AD-59546	GUCAAACUCAUGAGACAGAdTdT	UCUGUCUCAUGAGUUUAGdTdT	1859-1877
3939	3940	AD-59456	CUUCCUGGCAGCACAGAUdTdT	AUCUGUGCUGCCAGGAAAGdTdT	663-681
3941	3942	AD-59503	CCUCCGGCCAGUGAGAAAdTdT	UUUCACUGGCCGGAGGdTdT	520-538
3943	3944	AD-59536	CUACCUAGGAUAGAGUCGdTdT	GCGACUCAUUCUAGGUAAdTdT	1093-1111
3945	3946	AD-59385	CCCAAGAUUGUGGCAUUUGdTdT	CAAAUGCCACAACUUGGGdTdT	1463-1481
3947	3948	AD-59367	GAGCAUACACCUUCGUGGAdTdT	UCCACGAAGGUAUUGCUCdTdT	1551-1569
3949	3950	AD-59458	UGCCCAUUCUUAUCCCGAGdTdT	CUCGGGAUAAAGAAUGGCAAdTdT	359-377
3951	3952	AD-59381	AAGGCCAAGGUCCCAACAGAdTdT	UCUGUUGGACCUUGGCCUdTdT	551-569
3953	3954	AD-59538	CACACAGCUUCCGUCUGGAdTdT	UCCAGACGGAAGCUGUGdTdT	601-619
3955	3956	AD-59421	UUAGGGGCUCCAGGCGGAdTdT	UCCGCCUCGAGCCCCAUAdTdT	1591-1609
3957	3958	AD-59388	UGUCUUCUGCAAAAGCCAGUdTdT	ACUGGCUUUUGCAGAAAGAdTdT	700-718
3959	3960	AD-59444	AGGCCUCAGCAAGCCUAdTdT	UGAGGUCAUGCUCAGGCCUdTdT	2253-2271
3961	3962	AD-59528	AUGGAAUUAAGUUAUUUdTdT	AAUAUAACUUAUUUAGAdTdT	2332-2350
3963	3964	AD-59498	ACUGCUGAAGAACUCCAGdTdT	CUGGAAGUUCUUCAGCAGUdTdT	832-850
3965	3966	AD-59497	UGAGAAAGACAAAACUGCUdTdT	AGCAGUUUUGUCUUUCUAdTdT	532-550
3967	3968	AD-59384	UCAGCCACCCUCAGAGAACUdTdT	AGUUCUCUGAGGUGGUGAdTdT	1419-1437
3969	3970	AD-59452	GGCAACGAGCGUUUCGUUUdTdT	AAACGAAACGCUCGUUCCdTdT	51-69
3971	3972	AD-59379	CCUGAUGGAUCCCGCAGAdTdT	UCUGCUGGGAUCCAUCAGGdTdT	572-590

(continuación)

SEQ ID NO: (sentido)	SEQ ID NO: (anti-sentido)	Nombre del dúplex	Secuencia sentido (5'-3')	Secuencia antisentido (5'-3')	Sitios diana de la secuencia antisentido en NM 000688.4
3973	3974	AD-59529	UGUGCCACUGGAAGAGCUdTdT	AGCUCUCCAGUGGGCACAdTdT	1509-1527
3975	3976	AD-59389	CCACAGGAGCCAGCAUAdTdT	AGUAUGCUGGCUCCUGGdTdT	311-329
3977	3978	AD-59585	GUGGUACUAGAAAUUUCdTdT	GAAAUUUUAGUAGCCACdTdT	1170-1188
3979	3980	AD-59570	UUCGCCGUGCCCAUUCUdTdT	AAGAAUGGGCAGCGCGAAdTdT	351-369
3981	3982	AD-59415	CCGCCAGCACACGCGCAAdTdT	GUUGCGCUGGUGCUGCGGdTdT	1840-1858
3983	3984	AD-59505	CGCUGAGGGACGGGUGCUdTdT	AAGCACCGGUCUCCAGCGdTdT	1819-1837
3985	3986	AD-59557	UGGACUUCUCGACUUGAGUdTdT	ACUCAAGUCGAGAAUCCAdTdT	69-87
3987	3988	AD-59548	AAAGAAACCCUCCGGCCAdTdT	UGGCCGGAGGGUUUUUdTdT	512-530
3989	3990	AD-59487	UUGACACCGUACGGUCCUAdTdT	UAGGACCGUACGGUGUCAAdTdT	1719-1737
3991	3992	AD-59550	CCCUUUCACCCUGGCUAdTdT	UUAGCCAGGGUGAAGAGGdTdT	1293-1311
3993	3994	AD-59572	CCCCAGGCCUUCUCGCAAdTdT	CUGCAGAAAGCCUGGGGdTdT	379-397
3995	3996	AD-59554	AUGCCAAACUGCCCAAdTdT	UUGGGCAGUUUUGGCAUdTdT	423-441
3997	3998	AD-59437	CUUGAGUGCCGCCUCCUdTdT	AAGGAGCGGGCACUCAAGdTdT	81-99
3999	4000	AD-59584	GGGUACAUCGCCAGCACGAdTdT	UUGUCUGCGCGAUACCCdTdT	1691-1709
4001	4002	AD-59373	GUGUGGGGCAUUAUGGAdTdT	GUCCAUAUCUGCCCAACAdTdT	1123-1141
4003	4004	AD-59545	ACAUAGUCCUGGAAUAAAdTdT	UUUAUUCCAGGACUAGUdTdT	2372-2390
4005	4006	AD-59547	AUCCAGCAGAGUCCAGAdTdT	AUCUGGACUCUGCUGGGAUdTdT	580-598
4007	4008	AD-59470	CUAGAUUCUUUCCACAGAdTdT	UCCUGUGAAAGAAUUAUdTdT	300-318
4009	4010	AD-59417	UUGUUUCCUCGUGCUUUGdTdT	CAAAAGCAGGAGAAACAAAdTdT	1259-1277
4011	4012	AD-59535	CCUCCUUCGCCGCCUCCdTdT	GAGCGGGCGCGAAGGAdTdT	93-111
4013	4014	AD-59507	UGAGGCUUCUCCCGGACAdTdT	UUGUCCGGGAGCAGCCUAdTdT	31-49
4015	4016	AD-59519	CCAACAGACUCCUGAUGGAdTdT	UCCAUCAGGAGUCUGUUGdTdT	562-580
4017	4018	AD-59391	UCACAUGGAAGCAAGUGGdTdT	CCCACUUGCUUCCAUUGAdTdT	2112-2130
4019	4020	AD-59537	CAUUCAAUGGAUGGGCGGdTdT	CCGCCCAUCCAUUGAAUGdTdT	1490-1508
4021	4022	AD-59450	AGGAUAGAGUCGCCACCCAdTdT	UGGGUGGCGACUCAUUCUdTdT	1099-1117
4023	4024	AD-59449	UGGACUUAAGCGGGAGCUdTdT	AGCUCGCCGUCUAAUCCAdTdT	1209-1227
4025	4026	AD-59418	CUAAAAACACAGAAUGCUdTdT	CAGACUUCUGUUUUUAGdTdT	1950-1968
4027	4028	AD-59561	CCUCCACACACAGCCAGdTdT	CUGGGUGUGUGUGAGGGdTdT	2062-2080
4029	4030	AD-59460	AAUCCUUGCUUCAGGGACUdTdT	AGUCCUGAAGCAAGGAUdTdT	171-189
4031	4032	AD-59409	UUGUGGCAUUGAAACUGUdTdT	ACAGUUUCAAUUGCCACAAdTdT	1470-1488
4033	4034	AD-59476	UCAUUACCCUACGGUGCCdTdT	GGCACCGUAGGGUAAUUGAdTdT	2010-2028
4035	4036	AD-59406	CAAGCCAGCCUCCUGGGCAdTdT	UGCCCGAGGGGCGUGGUdTdT	460-478
4037	4038	AD-59569	GAGUCUCCUCCUGGGAUdTdT	AUCCAGGAGGGAGACUCdTdT	259-277
4039	4040	AD-59451	UGGAGAGUGUUGUCCGCCdTdT	CGCGAAACAACACUCCAdTdT	339-357
4041	4042	AD-59553	ACCCUUGCCUCCACAAGdTdT	CUUGGCGAGGCAAGGdTdT	621-639
4043	4044	AD-59372	CUGGAUGGAUGAGUGGCUdTdT	AAGCCACUCAUCCAUCCAGdTdT	272-290

(continuación)

SEQ ID NO: (sentido)	SEQ ID NO: (anti- sentido)	Nombre del duplex	Secuencia sentido (5'-3')	Secuencia antisentido (5'-3')	Sitios diana de la secuencia antisentido en NM_000688.4
4045	4046	AD-59377	CAAGAUGAUGGAAGUUGGGdTdT	CCCAACUUCCAUCAUUUUUdTdT	439-457
4047	4048	AD-59531	UUUCGUUUUGGACUUCUGAdTdT	UCGAGAAGUCCAAACGAAAdTdT	62-80
4049	4050	AD-59560	UCAUCUUCACCAACCUCUCdTdT	AGAGAGGUGGUGAAGAUAdTdT	1749-1767
4051	4052	AD-59489	UGCCAGUUUUCUCCCGUGdTdT	CAGCGGAAGAACUGGGCAdTdT	132-150
4053	4054	AD-59540	AAAAUGGACAUCAUUUCdTdT	AGAAUUGAUGUCCAUUUUUdTdT	1639-1657
4055	4056	AD-59378	CUUGAGCUUCAGGAGAUAdTdT	CAUCCUCCUGAAGCUCUAdTdT	719-737
4057	4058	AD-59403	CCUCUCUGCCACCCAUUCdTdT	AGCAUGGUGGAGAGAGGdTdT	1761-1779
4059	4060	AD-59493	AAAGUCAGGAUCCCUAAGAdTdT	UCUUAGGGAUCCUGACUUdTdT	242-260
4061	4062	AD-59374	CGACCACGGAGGAUCCUdTdT	AAGGAUCCUCCGUGGUCGdTdT	159-177
4063	4064	AD-59380	UUCGUCUGGACACCCUdTdT	AAGGGGUGUCCAGACGGAAdTdT	609-627
4065	4066	AD-59576	CCACCCAUUGCUGGCGUGdTdT	CAGCCAGCAGCAUGGGUGdTdT	1769-1787
4067	4068	AD-59425	UGAGAAAAGAAUGACCAdTdT	GUGGUCUUUUUUUUCAdTdT	961-979
4069	4070	AD-59509	UAAGAUGAUGCCAGGUGdTdT	ACAGCCUUGGCAUCAUCUAdTdT	1309-1327
4071	4072	AD-59488	AGUUAUUUAUUUUAAUdTdT	AUUAAAUUUAUUUAACUdTdT	2342-2360
4073	4074	AD-59486	UCUUCGCGUGUGGGACAdTdT	UGUCCCCAGCGGGAGAGdTdT	140-158
4075	4076	AD-59465	UGCCACAAGCCAGGGCACUdTdT	AGUGCCCUGGCUUUGGCAdTdT	631-649
4077	4078	AD-59484	AGCGAGUUUAUGCCAGUdTdT	AACUGGGCAUAACUGCGCUdTdT	122-140
4079	4080	AD-59368	GGACCAGGAGAAAGUCAGdTdT	CCUGACUUUUCUCCUGUCCdTdT	232-250
4081	4082	AD-59464	UGUCCACUGCCCCAGCCAdTdT	GUGGCUUGGGCAGUGGACAdTdT	1903-1921
4083	4084	AD-59386	AUCGGGCGCUGAGGCGUdTdT	AGCAGCCUCAGGCGCGAUdTdT	22-40
4085	4086	AD-59439	GGGGAUGUGGGACCCAGGAdTdT	UCCUGGUCCCCACAUCUCCdTdT	222-240
4087	4088	AD-59440	CUGGAAUUAAUUUUCUdTdT	AGCAAGAAUUUAUUUCCAGdTdT	2380-2398
4089	4090	AD-59542	UUGAAACUGUCCAUUCAUdTdT	AUUGAAUGGACAGUUUCAAdTdT	1479-1497
4091	4092	AD-59559	GUGGGACACGACCACGAdTdT	UCCGUGGUGUGUCCUCCAdTdT	150-168
4093	4094	AD-59586	CGCAGUGGGGUUUUAUGGGdTdT	CCCAUAAAGCCUCCUGCGdTdT	1579-1597
4095	4096	AD-59408	UUGUCUUUAUAUGUAAUUdTdT	AAUUCACAUUAUAAAGACAAdTdT	2322-2340
4097	4098	AD-59568	UCACCCUGGCUAAGAUAdTdT	AUCAUCUUAGCCAGGUGAdTdT	1299-1317
4099	4100	AD-59398	GUACUGUCUGAGCCUGAGdTdT	CUCAGCCUGAGCAGAUAdTdT	2243-2261
4101	4102	AD-59508	AUGAGUGGCUUUCUCCAdTdT	UGGAGAAAGAGCCACUAdTdT	280-298
4103	4104	AD-59523	GAAGUUGGGGCAAGCCAGdTdT	CUGGCUUGGCCCCAACUUCdTdT	449-467
4105	4106	AD-59410	UCAGGGACUCGGACCCUGdTdT	CAGGCUCCGAGUCCUGAdTdT	181-199
4107	4108	AD-59541	UCCUACGGAUUGCCCCACdTdT	GUGGGGCAUCCGUAGGAdTdT	2043-2061
4109	4110	AD-59524	UUACUCUGAUUCUGGGAAdTdT	GUUCCAGAAUACAGAUAdTdT	1333-1351
4111	4112	AD-59501	AUCCUAAAGAGUCUCCUdTdT	AGGGAAGACUCUUAGGGAUdTdT	251-269
4113	4114	AD-59383	UGCCAAAGUACAUUCCGdTdT	CGGAAGAUUAUCCUUGGAdTdT	1389-1407
4115	4116	AD-59577	UCCUCGGGUUAGGGGAUGdTdT	CAUCCCUAAACCCGAGGAdTdT	210-228

(continuación)

SEQ ID NO: (sentido)	SEQ ID NO: (anti- sentido)	Nombre del dúplex	Secuencia sentido (5'-3')	Secuencia antisentido (5'-3')	Sitios diana de la secuencia antisentido en NM_000688.4
4117	4118	AD-59447	UGCUGAAACCCUCAGCAGGCdTdT	GCCUGCUGAGGUUUCAGCAdTdT	769-787
4119	4120	AD-59555	CCACCCACGGGUGUGGGdTdT	CCCACACACCCGUGGGdTdT	1111-1129
4121	4122	AD-59405	UGGUGCAGUAAUGACUACcTdT	GGUAGUCAUUACUGCACCAdTdT	1079-1097
4123	4124	AD-59371	UUCUCCACCCUAGAUUCUUdTdT	AAAGAAUCUAGGUGGAGAAdTdT	292-310
4125	4126	AD-59443	UAAGGCGCCGGCGAUCCGdTdT	CGCGAUCGCCGCGCCUUAdTdT	9-27
4127	4128	AD-59401	UGGAACUAGUAAAUUCCAUdTdT	AUGGAAUUUACUAGUCCAdTdT	1189-1207
4129	4130	AD-59494	GGACCCUGCUGGACCCCUdTdT	AAGGGUCCAGCAGGGUCCdTdT	192-210
4131	4132	AD-59504	UCAAUUUUUCACUUAACcTdT	GGUUAAGUGAAAAUUAUGAdTdT	2269-2287
4133	4134	AD-59369	CCCGGACAAAGGCAACGAGdTdT	CUCGUUGCCCUUUGCCGGdTdT	41-59
4135	4136	AD-59571	UUUUAAAACUGUGAACCCGGdTdT	CCGGUUCACAGUUUUAAAAdTdT	991-1009
4137	4138	AD-59527	GUGCUUCGCCGCCAGCACcTdT	GGUGCUGCGCGCGAAGCACdTdT	1832-1850
4139	4140	AD-59466	UGGACCCCUUCCUCGGGUdTdT	AACCCGAGGAAGGGGUCCAdTdT	201-219
4141	4142	AD-59526	CUGUAUUUUAAGGCGCCGGdTdT	CCGGCGCCUUAAUUAACAGdTdT	1-19
4143	4144	AD-59543	UUGCCCCCACCCCUACACAdTdT	UGGUGAGGGGUGGGGGCAAdTdT	2052-2070
4145	4146	AD-59564	AUGGGCGGUGUGCCCCACUdTdT	AGUGGGCACACCGCCCCAUdTdT	1500-1518
4147	4148	AD-59583	CUAUAGUAAAAACAUAAGUCdTdT	GACUAUGUUUUUACUAUAGdTdT	2361-2379

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

5

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

Dúplex	% de ARNm remanente	Desv. est.
AD-59453	11.2	1.5
AD-59395	12.7	1.1
AD-59477	14.5	2.0
AD-59492	14.8	2.1
AD-59361	15.1	4.9
AD-59462	15.4	2.6
AD-59433	15.8	2.7
AD-59424	16.0	1.7
AD-59414	16.1	1.3
AD-59539	16.2	2.6
AD-59400	16.2	1.8
AD-59551	16.3	2.3
AD-59482	16.6	2.1
AD-59448	16.6	3.7
AD-59392	16.9	3.5
AD-59469	16.9	2.2
AD-59431	17.0	2.0
AD-59423	17.1	3.8
AD-59517	17.2	1.5
AD-59578	17.3	3.1
AD-59495	17.7	3.7
AD-59432	17.7	2.8
AD-59382	17.9	3.2
AD-59472	18.6	3.5
AD-59459	18.7	3.8
AD-59413	18.8	2.4
AD-59478	18.9	3.0
AD-59376	18.9	3.2
AD-59556	18.9	2.4
AD-59399	19.0	4.1
AD-59474	19.4	1.6
AD-53542	19.4	1.7
AD-59480	19.6	1.6
AD-59549	19.7	2.1
AD-59515	19.8	4.4
AD-59427	19.9	3.2
AD-59390	19.9	3.4
AD-59511	19.9	2.2
AD-59532	20.0	2.4
AD-59562	20.2	2.6
AD-59513	20.3	3.9
AD-59362	20.6	2.5
AD-53541	20.6	2.2
AD-59490	20.7	2.3
AD-59422	20.8	4.5
AD-59467	21.2	2.3
AD-59579	21.2	3.3
AD-59426	21.7	2.3
AD-59363	21.7	2.7
AD-59436	21.7	2.7
AD-53536	21.9	1.5
AD-59491	21.9	2.6
AD-59500	22.2	2.8
AD-59394	22.3	10.1
AD-59441	22.3	2.6

ES 2 804 510 T3

(continuación)

Dúplex	% de ARNm remanente	Desv. est.
AD-59365	22.4	4.2
AD-59411	22.5	2.9
AD-59544	22.5	2.1
AD-59428	22.7	4.7
AD-59471	22.9	5.0
AD-59518	22.9	2.3
AD-53547	22.9	1.5
AD-59573	23.0	4.2
AD-59473	23.2	1.8
AD-59412	23.4	2.5
AD-59522	23.4	3.3
AD-59502	23.6	2.7
AD-59499	23.6	1.6
AD-59520	23.8	3.8
AD-59581	23.9	6.0
AD-59461	24.3	4.2
AD-59370	24.3	5.6
AD-53540	24.4	2.1
AD-59574	24.5	2.0
AD-59375	24.6	2.3
AD-59387	24.8	7.2
AD-59397	24.9	9.6
AD-59396	25.0	10.2
AD-59393	25.3	11.6
AD-59483	25.4	3.8
AD-59430	25.5	1.8
AD-59463	25.6	4.8
AD-53534	25.9	3.1
AD-59514	26.2	5.7
AD-59575	26.2	3.2
AD-59364	26.2	4.5
AD-59402	26.3	3.1
AD-59479	26.3	2.5
AD-59481	26.4	2.2
AD-59530	26.4	4.4
AD-59582	26.6	3.9
AD-59506	27.0	4.1
AD-59567	27.3	1.1
AD-59485	27.7	4.7
AD-59525	28.3	3.1
AD-59566	28.5	0.6
AD-59580	28.7	7.1
AD-59512	29.5	2.5
AD-59475	29.6	4.2
AD-59438	29.6	3.3
AD-59442	29.9	2.8
AD-59516	30.4	3.8
AD-59429	30.8	4.3
AD-59510	31.3	1.9
AD-59457	31.4	1.2
AD-59434	31.6	3.5
AD-59454	32.0	1.9
AD-59468	32.2	3.2
AD-59565	32.4	1.5
AD-59416	32.7	1.7
AD-59420	33.2	3.1
AD-59552	33.2	2.2
AD-59558	33.8	3.8
AD-59404	34.0	5.4

ES 2 804 510 T3

(continuación)

Dúplex	% de ARNm remanente	Desv. est.
AD-59455	34.8	1.3
AD-59496	34.9	5.2
AD-59446	35.5	1.7
AD-59435	35.9	1.2
AD-59419	36.0	1.4
AD-59533	36.7	3.7
AD-59366	36.7	6.0
AD-59521	36.9	4.3
AD-59563	36.9	4.1
AD-59534	36.9	3.3
AD-59407	37.1	4.7
AD-59445	37.2	3.2
AD-59546	37.9	4.9
AD-59456	38.3	4.0
AD-59503	38.8	5.0
AD-59536	39.8	4.2
AD-59385	39.9	13.7
AD-59367	40.0	3.6
AD-59458	40.0	3.4
AD-59381	40.3	9.9
AD-59538	40.8	4.9
AD-59421	40.9	6.4
AD-59388	41.0	9.1
AD-59444	41.1	2.7
AD-59528	41.9	3.3
AD-59498	42.2	3.3
AD-59497	42.4	4.9
AD-59384	42.7	17.6
AD-59452	42.7	3.1
AD-59379	43.6	2.6
AD-59529	43.8	4.8
AD-59389	44.1	6.4
AD-59585	44.3	3.2
AD-59570	45.1	4.0
AD-59415	46.6	2.3
AD-59505	47.5	6.2
AD-59557	48.1	4.4
AD-59548	49.9	4.0
AD-59487	50.7	3.2
AD-59550	50.8	5.8
AD-59572	51.1	4.0
AD-59554	51.3	6.0
AD-59437	52.2	4.8
AD-59584	54.9	2.7
AD-59373	55.3	20.1
AD-59545	55.4	3.4
AD-59547	55.9	4.7
AD-59470	56.0	2.7
AD-59417	56.4	7.7
AD-59535	57.6	5.1
AD-59507	58.8	4.7
AD-59519	59.1	5.6
AD-59391	60.1	12.5
AD-59537	60.6	9.1
AD-59450	60.7	7.2
AD-59449	61.6	6.8
AD-59418	61.8	8.4
AD-59561	62.2	7.2
AD-59460	62.8	4.7

ES 2 804 510 T3

(continuación)

Dúplex	% de ARNm remanente	Desv. est.
AD-59409	64.4	9.0
AD-59476	65.2	5.6
AD-59406	65.6	3.5
AD-59569	66.7	7.6
AD-59451	66.9	2.9
AD-59553	67.2	8.8
AD-59372	67.3	25.6
AD-59377	68.7	5.1
AD-59531	68.7	9.0
AD-59560	68.7	12.7
AD-59489	69.6	8.9
AD-59540	70.1	10.1
AD-59378	70.6	14.1
AD-59403	71.4	3.3
AD-59493	72.3	3.5
AD-59374	75.9	5.1
AD-59380	76.4	11.1
AD-59576	77.5	16.2
AD-59425	77.9	10.6
AD-59509	78.0	3.2
AD-59488	78.6	7.1
AD-59486	79.4	5.0
AD-59465	79.5	5.1
AD-59484	79.8	3.2
AD-59368	80.0	11.9
AD-59464	80.2	9.3
AD-59386	80.6	33.2
AD-59439	80.9	4.0
AD-59440	82.2	1.9
AD-59542	83.3	10.6
AD-59559	83.7	9.1
AD-59586	83.8	11.5
AD-59408	86.3	2.8
AD-59568	86.8	4.2
AD-59398	87.4	24.9
AD-59508	87.5	2.5
AD-59523	87.6	11.8
AD-59410	88.8	8.3
AD-59541	88.9	10.8
AD-59524	89.5	12.1
AD-59501	89.9	5.1
AD-59383	90.8	27.4
AD-59577	91.1	2.3
AD-59447	91.3	12.9
AD-59555	91.7	3.4
AD-59405	92.5	5.7
AD-59371	93.5	31.7
AD-59443	93.8	9.0
AD-59401	94.5	7.1
AD-59494	95.1	9.1
AD-59504	96.8	11.7
AD-59369	96.8	4.8
AD-59571	97.4	7.0
AD-59527	98.6	7.8
AD-59466	99.7	14.0
AD-59526	102.9	4.6
AD-59543	103.7	3.0
AD-59564	103.7	12.1
AD-59583	112.4	13.2

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

Ejemplo 13: Inhibición en respuesta a la dosis de los precursores de porfirina ALA y PBG utilizando ARNip de ALAS1

Se investigaron los efectos de respuesta a la dosis de un ARNip de ALAS1 en un modelo en ratón de AIP (remítase al Ejemplo 5). Este modelo muestra ~30% de actividad de PBGD residual, un incremento de ~2 veces en los niveles de ALA y PBG del punto de referencia, un incremento de ~30-100 veces en los niveles de ALA y PBG tras la inducción con inyecciones de fenobarbital una vez al día durante 3-4 días. Los animales de más edad tienen degeneración axonal y deficiencia de la función motora.

El ARNip de ALAS1 utilizado en este ejemplo fue el dúplex AD-53558 en la formulación AF11. En el día 1, a los ratones se les administraron 1 mg/kg, 0.5 mg/kg, 0.1 mg/kg o 0.05 mg/kg de ARNip de ALAS1 o control de LUC AD-1955 mediante inyección i.v. Se administraron tres inyecciones de fenobarbital (1 inyección al día en los días 2, 3 y 4) para inducir ALAS1 hepática y los precursores de la porfirina, ALA y PBG. Se recogieron muestras de orina de toda la noche y de plasma en el día 5 y se midieron los niveles de metabolitos por LC-MS. Se midieron los niveles del punto de referencia de ALA y PBG antes del primer tratamiento en el día 1. Los resultados se muestran en la FIG. 16. El ARNip de ALAS1 inhibió los niveles de ALA y PBG en una manera dependiente de la dosis. Se observó el efecto inhibitor en los niveles de ALA en plasma con dosis de ARNip de ALAS1 de tan solo 0.05 mg/kg, y se observó el efecto inhibitor en los niveles de PBG en plasma con dosis de ARNip de tan solo 0.1 mg/kg.

Ejemplo 14: Inhibición duradera de los precursores de porfirina ALA y PBG utilizando ARNip de ALAS1

Se investigó la duración de los efectos de ARNip de ALAS1 en un modelo en ratón de AIP (remítase al Ejemplo 5). El ARNip de ALAS1 utilizado en este ejemplo fue el dúplex AD-53558 en la formulación AF11. El diseño experimental y los resultados de este experimento se muestran en la Fig. 17. En el día 1, a los ratones se les administró 1 mg/kg de ARNip de ALAS1 o control de LUC AD-1955 mediante inyección i.v. Se administraron tres inyecciones de fenobarbital en la semana 0 (1 inyección al día en los días 2, 3 y 4), semana 2 (1 inyección al día en los días 15, 16 y 17) y semana 4 (1 inyección al día en los días 29, 30 y 31) para inducir ALAS1 hepático y los precursores de porfirina ALA y PBG. Se recogieron muestras de orina de toda la noche y plasma en los días 5, 18 y 32 y se midieron los niveles de metabolitos por LC-MS. Se midieron los niveles del punto de referencia de ALA y PBG antes del primer tratamiento en el día 1.

Tal como se muestra en la FIG. 17, el ARNip de ALAS1 tuvo un efecto duradero en la reducción de los niveles de ALA y PBG en plasma. La administración de ARNip de ALAS1 suprimió los niveles de ALA y PBG en plasma durante al menos 2 semanas. Estos resultados indican que el ARNip de ALAS1 es un tratamiento eficaz para reducir los niveles elevados de ALA y PBG y, por lo tanto, se puede utilizar en la profilaxis, por ejemplo, para reducir los niveles crónicamente elevados de ALA y PBG y para prevenir ataques porfíricos recurrentes.

Ejemplo 15: ARNip de ALAS1 proporciona un inicio de acción más rápido en comparación con el tratamiento con hemina

Se compararon los efectos del tratamiento con ARNip de ALAS1 con los efectos del tratamiento con hemina en un modelo en ratón de AIP (remítase al Ejemplo 5). El ARNip de ALAS1 utilizado en este ejemplo fue el dúplex AD-53558 en la formulación AF11. El diseño experimental y los resultados de este experimento se muestran en la FIG. 18. Se administraron fenobarbital (PB) y dietilditiocarbamato (DDC) en los días 1, 2 y 3. DDC es otro inductor de p450 que, como el fenobarbital, incrementa la demanda de hemo y ayuda a propagar la inducción de los metabolitos ALA/PBG.

Se administró una dosis de hemina de 4 mg/kg, una dosis de ARNip de ALAS1 de 2 mg/kg o tratamiento de control por vía intravenosa 8 horas después de la última administración de PB y DDC.

Como se muestra en la FIG. 18, el inicio de los efectos del tratamiento fue más rápido con el tratamiento de ARNip de ALAS1 en comparación con el tratamiento de hemina. La rápida reducción de ALA y PBG con el tratamiento con ARNip indica que ARNip es un tratamiento eficaz para los ataques agudos, debido a que se espera que la reducción de los niveles de ALA y PBG esté acompañada por una rápida mejora en los síntomas clínicos.

Ejemplo 16: Efectos del conjugado de ARNip de ALAS1-GalNAc AD-58632

AD-58632 es un heneicosámero/tricosámero descrito en el Ejemplo 11. AD-58632 tiene como diana el transcrito humano NM_000688.4 y también presenta reactividad cruzada con transcritos de ARNm de ratón, rata y mono cinomolgo. AD-58632 es el único heneicosámero/tricosámero con reactividad cruzada identificado en un cribado de aproximadamente 45 compuestos. Se describen experimentos adicionales con este dúplex en este ejemplo.

Efectos dependientes de la dosis de AD-58632 en la supresión de ARNm de ALAS1

Se investigaron en ratas los efectos de respuesta a la dosis de AD-58632 en la supresión de ARNm de ALAS1, respecto a ARNm de GAPDH. Se estudiaron dosis de 30 mg/kg, 10 mg/kg y 3 mg/kg. Se midieron los niveles de ARNm de ALAS1 en el hígado 72 horas después de la última dosis. AD-58632, comparado con el control de PBS, suprimió el ARNm de ALAS1 de manera dependiente de la dosis (remítase a la FIG. 19). AD-58632 tuvo una DE50 de dosis única de aproximadamente 10 mg/kg.

Efectos de AD-58632 en un modelo de AIP en rata

Se investigó en mayor medida el efecto de respuesta a la dosis del ARNip conjugado ALAS1-GalNAc AD-58632 en un modelo de AIP en rata. En este modelo, se utilizó ARNip en un LNP para reducir el nivel de PBGD específicamente en el hígado antes de inducir la demanda de hemo con fenobarbital. El modelo de AIP en rata muestra una reducción transitoria con ARNip de PBGD en el hígado, tiene ~15% ARNm de PBGD residual, y muestra un incremento de aproximadamente 10-50 veces en los niveles de ALA y PBG tras la inducción con inyecciones diarias de fenobarbital durante tres días.

El diseño experimental se muestra en la FIG. 20. Se estudiaron cuatro grupos de ratas. Un grupo se trató con solo fenobarbital (PB) en los puntos temporales indicados. Un segundo grupo se trató con fenobarbital y ARNip de porfobilinógeno-desaminasa (PBGD). Un tercer grupo recibió fenobarbital, ARNip de PBGD y una dosis de 30 mg/kg del ARNip de ALAS1. Un cuarto grupo recibió fenobarbital, ARNip de PBGD y una dosis de 10 mg/kg del ARNip de ALAS1. Como se muestra en la FIG. 20, el ARNip de PBGD se administró por vía intravenosa en el día 1. El ARNip ALAS1-GalNAc se administró en el día 4. Las inyecciones de fenobarbital se administraron en los días 4, 5, 6 y 7. Se recogió la orina a lo largo de un período de 24 horas empezando en el día 7 y finalizando en el día 8. Se evaluaron los niveles de ARNm de PBGD, ARNm de GAPDH y ARNm de ALAS-1 en hígado en el día 8 utilizando un ensayo de ADNr. Se determinaron los niveles de PBG y ALA en orina utilizando LC-MS.

Los resultados del ARNm se muestran en la FIG. 21. El ARNip de PBGD disminuyó el nivel de ARNm de PBGD pero no disminuyó el nivel de ARNm de ALAS1. El ARNip de ALAS1 disminuyó los niveles de ARNm de ALAS1 de manera dependiente de la dosis (véase la FIG. 21). Los resultados de ALA y PBG se muestran en la FIG. 22. ARNip de ALAS1 disminuyó los niveles de ALA y PBG de manera dependiente de la dosis (véase la FIG. 22).

Ejemplo 17: Dosificación dividida con AD-58632

Se investigó la eficacia del conjugado ARNip de ALAS1-GalNAc AD-58632 en dos paradigmas de dosificación dividida separados. Para cada uno de estos estudios, se utilizaron ratas Sprague Dawley hembra. Las ratas se alojaron en SCLR (una habitación con ciclo de luz de 12 horas con luz y 12 horas sin luz) y se sacrificaron 72 horas después de la última inyección. Se midieron los niveles de ARNm de ALAS1 y GAPDH en el hígado utilizando un ensayo de ADN ramificado (ADNr).

Paradigma de cinco dosis diarias frente a una dosis en bolo

En el primer paradigma, se administraron a los grupos de ratas cinco dosis de ARNip (una dosis cada día) o una única dosis en bolo que tuvo la misma concentración total que la suma de las cinco dosis individuales. Específicamente, las ratas se asignaron a una de las siguientes condiciones de tratamiento: (1) inyección subcutánea de 6 mg/kg de ARNip una vez al día durante cinco días, (2) inyección subcutánea de 2 mg/kg de ARNip una vez al día durante cinco días, (3) inyección subcutánea de 1 mg/kg de ARNip una vez al día durante cinco días, (4) inyección subcutánea de una única dosis en bolo de 30 mg/kg de ARNip, (5) inyección subcutánea de una única dosis en bolo de 10 mg/kg de ARNip, (6) inyección subcutánea de una única dosis en bolo de 5 mg/kg de ARNip o (7) tratamiento de control con PBS.

Los resultados se muestran en la FIG. 23. En este paradigma, una única dosis en bolo de ARNip proporcionó una supresión mayor del ARNm de ALAS1 que la dosificación repetida de la misma concentración de ARNip a lo largo de un ciclo de cinco días. Esto fue cierto para todas las dosis estudiadas.

Dosificación de una vez a la semana durante cuatro semanas

En el segundo paradigma, se administraron a las ratas inyecciones subcutáneas de ARNip con una de tres dosis (10 mg/kg, 5 mg/kg o 2.5 mg/kg) una vez a la semana durante cuatro semanas. Un grupo de control recibió inyecciones de PBS.

Los resultados se muestran en la FIG. 24. En comparación con la dosificación única, proporcionar cuatro dosis semanales de 10 mg/kg mejoró la reducción máxima conseguida (DE50 es 10 mg/kg con una dosis única). Por el contrario, la dosificación múltiple de 5 y 2.5 mg/kg a la semana no mejoró el silenciamiento en este paradigma.

Ejemplo 18: Identificación y estudio de ARNip de ALAS1 con hebras sentido y antisentido más cortas

Se realizaron experimentos adicionales para explorar los efectos del acortamiento de dúplex de ARNip hasta nonadecámeros-nonadecámeros. Se identificaron cinco dúplex más nonadecámeros-nonadecámeros con

reactividad cruzada que se unen a transcritos de ARNm de ALAS1 humano (h) (NM_000688.4), mono Rhesus (rh) (XM_001090440.2), ratón (m) (NM_020559.2) y rata (r) (NM_024484.2). Ninguno de estos dúplex mostró resultados tan buenos como el heneicosámero/tricosámero AD-58632 (remítase a la FIG. 25).

- 5 Se investigaron los efectos de modificar la longitud y protuberancias de los dos mejores nonadecámeros-nonadecámeros (AD-59115 y AD-59125) (FIG. 26 y 27). Las secuencias modificadas se muestran en la Tabla 21.

Tabla 21: Secuencias para la evaluación de la longitud/protuberancia de los dos mejores nonadecámeros-nonadecámeros

SEQ ID NO: (sentido)	SEQ ID NO: (antisentido)	Sitios diana de la secuencia antisentido en NM_000688.4	Reactividad cruzada	Protuberancia	Nombre del dúplex	Secuencia sentido (5'-3')	Secuencia antisentido (AS) (5'-3')
4172	4173	877-895	h/rh/m/r	19/19	AD-59115	AfsasGfaGfuGfuCfUfCfaUfcUfuCfuUfL 96	asAfsGfaGfaUfgAfgacAfcUfcsusu
4174	4175	875-895	h/rh/m/r	19/21	AD-60090	AfsasGfaGfuGfuCfUfCfaUfcUfuCfuUfL 96	asAfsGfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfususc
4176	4177	877-895	NCOH*	19/21	AD-60091	AfsasGfaGfuGfuCfUfCfaUfcUfuCfuUfL 96	asAfsGfaGfa UfgAfgacAfcUfcUfusasa
4178	4179	873-895	h/rh/m/r	21/23	AD-58632	GfsasAfaGfaGfuGfUfCfuCfaUfcUfuCfu UfL96	asAfsGfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfcsu sg
4180	4181	875-895	NC OH*	21/23	AD-60092	GfsasAfaGfaGfuGfUfCfuCfaUfcUfuCfu UfL96	asAfsGfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfcsa sa
4182	4183	875-893	h/rh/m/r	19/19	AD-59129	GfsasAfaGfaGfuGfUfCfuCfaUfcUfuAfl 96	usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcUfcsusc
4184	4185	873-893	h/rh/m/r	19/21	AD-60093	GfsasAfaGfaGfuGfUfCfuCfaUfcUfuAfl 96	usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcUfcsusg
4186	4187	875-893	NC OH*	19/21	AD-60094	GfsasAfaGfaGfuGfUfCfuCfaUfcUfuAfl 96	usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcUfcsasa
4188	4189	871-893	h/rh	21/23	AD-60095	CfsasGfaAfaGfaGfuGfUfCfuCfaUfcUfu Afl96	usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcUfcsu su
4190	4191	871-893	m/r	21/23	AD-60096	CfsasGfaAfaGfaGfuGfUfCfuCfaUfcUfu Afl96	usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcUfcsu sc
*Protuberancia no complementaria							

Las protuberancias mejoran la potencia. También proporcionan una secuencia derivada adicional (AD-60489, que se basó en AD-60095) para estudios adicionales de la relación estructura actividad (SAR) (1 apareamiento erróneo en la pos23 con roedor).

Ejemplo 19: Efectos de conjugados de ARNip de ALAS1-GalNAc AD-60489 y AD-58632

- 5 Se investigaron los efectos de un dúplex de ARNip de ALAS1 conjugado con GalNAc AD-60489 y se compararon con los efectos de AD-58632. Las secuencias de estos dúplex se muestran en la Tabla 22A. AD-60489 tuvo un único emparejamiento erróneo con ARNm de ALAS1 de roedor en el extremo 3' de la secuencia antisentido. Por lo tanto, mientras que AD-58632 es totalmente complementario con las secuencias de ser humano, de mono cinomolgo, ratón y rata, AD-60489 es totalmente complementario solo con secuencias de ser humano y mono cinomolgo.

Tabla 22A: Secuencias de dúplex de ARNip de ALAS1 AD-58632 y AD-60489

<u>SEQ ID NO:</u> <u>(sentido)</u>	<u>SEQ ID NO:</u> <u>(antisentido)</u>	<u>Sitios diana de la</u> <u>secuencia antisentido</u> <u>en NM_000688.4</u>	<u>Nombre del</u> <u>dúplex</u>	<u>Secuencia sentido (5'-3')</u>	<u>Secuencia antisentido (5'-3')</u>
4149	4150	873-895	AD-58632	GfsasAfaGfaGfuGfuCfaUfcUfuCfuUf L96	asAfsGAlaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcs usg
4151	4152	871-893	AD-60489	CfsasGfaAfaGfaGfuGfuCfaUfcUfuAf L96	usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcUfuUfcUfcs gsu

La supresión de ARNm de ALAS1 se muestra en la FIG. 28. En comparación con AD-58632, AD-60489 proporcionó una supresión más eficaz con 3 mg/kg y 10 mg/kg y mostró una mejora de aproximadamente dos veces en la DE50. La DE50 de dosis única de AD-60489 fue de aproximadamente 5 mg/kg.

Ejemplo 20: Efectos de los conjugados ARNip de ALAS1-GalNAc AD-60489 y AD-58632 en estudios con primates no humanos

Se estudió la eficacia de AD-58632 y AD-60489 en la supresión del ARNm hepático en primates no humanos. El diseño experimental se muestra en la FIG. 29. Se administraron por vía subcutánea dosis de ARNip (5 mg/kg, 2.5 mg/kg o 1.25 mg/kg) o control de PBS en un volumen de 2 ml/kg a diario durante 5 días, después cada 2 días durante 3 semanas. Se evaluó el silenciamiento de ARNm de ALAS1 en tejido hepático obtenido de una biopsia hepática realizada en el día 15. La biopsia se realizó después de una extracción de suero y antes de la administración de la dosis 10 (remítase a la FIG. 29). Se extrajeron muestras de suero para el método de detección de ARN extracelular circulante (cERD) (remítase al Ejemplo 21) en los días -10, -3, 7, 15, 23, 31 y 43. Se extrajo suero para un panel de química clínica en los días -3, 6, 30 y 43. El panel de química clínica incluyó la evaluación de los niveles de alanina-aminotransferasa (ALT), aspartato-aminotransferasa (AST) y fosfatasa alcalina (ALP).

AD-58632 y AD-60489 suprimieron el ARNm de ALAS1 en el hígado en una manera dependiente de la dosis (remítase a la FIG. 30). AD-60489 mostró una eficacia mayor que AD-58632. Por ejemplo, en el nivel de dosis más bajo estudiado (1.25 mg/kg), AD-60489 suprimió el mensaje de ALAS1 relativo hasta aproximadamente un 42% del nivel de control, mientras que AD-58632 mostró poca supresión a esta dosis. Con 2.5 mg/kg, AD-60489 suprimió el mensaje de ALAS1 relativo hasta aproximadamente un 26% del nivel de control, mientras que AD-58632 suprimió el mensaje de ALAS1 relativo hasta aproximadamente un 64% del nivel de control. Con 5 mg/kg, AD-60489 suprimió el mensaje de ALAS1 relativo hasta aproximadamente un 21% del nivel de control, y AD-58632 suprimió el mensaje de ALAS1 relativo hasta aproximadamente un 55% del nivel de control.

Los resultados de la química clínica indicaron que la atenuación sostenida de ALAS1 utilizando los ARNip de ALAS1 fue segura y bien tolerada. No se observaron elevaciones de ALT, AST o ALP.

Ejemplo 21: Efectos de los conjugados de ARNip de ALAS1-GalNAc AD-60489 y AD-58632 en estudios con primates no humanos según se evalúa utilizando el ensayo cERD

Se evaluaron los efectos de los conjugados de ARNip de ALAS1-GalNAc AD-60489 y AD-58632 en primates no humanos utilizando el método de detección de ARN extracelular circulante (cERD). Este método se describe, p. ej., en Sehgal, A. *et al.* Quantitation of tissue-specific target gene modulation using circulating RNA (Póster presentado en el 9 de febrero de 2012 en el simposio Keystone Gene Silencing by small RNAs (Vancouver, 7-12 de febrero de 2012) y en Sehgal, A. *et al.* Tissue-specific gene silencing monitored in circulating RNA, *RNA*, 20: 1-7, con publicación electrónica del 19 de diciembre de 2013. Como se muestra en la FIG. 29, se tomaron muestras de suero para el método de detección del ARN extracelular circulante (cERD) en los días -10, -3, 7, 15, 23, 31 y 43.

Para el ensayo cERD, se descongelaron las muestras de suero en hielo. Se añadieron 375-400 µl de LiCl 8 M a 3-3.5 ml de suero en tubos de ultracentrifugación (UC, por sus siglas en inglés), y se incubaron a una temperatura de 4 °C durante al menos 1 hora. Se añadió PBS en la parte superior de cada tubo de UC, dejando aproximadamente 1 cm de espacio seco en la parte superior del tubo para evitar que las paredes de los tubos se rompieran durante la centrifugación. Los tubos se secaron para evitar que cualquier condensación se incubara en el hielo. Las muestras se colocaron en un Rotor MC 55 en una campana y las muestras se centrifugaron a 150 000-200 000g durante 100-200 minutos. Se desechó el sobrenadante del sedimento. Se añadió 1 ml de de Trizol al sedimento en el tubo de UC, el tubo se agitó en vórtex y el contenido se transfirió a un tubo de microcentrifugación de 1.5 ml. Se añadieron 200 µl de clorofórmico a cada tubo y el tubo se invirtió varias veces para mezclarlo. Se preparó una muestra de cada vez. Las muestras se centrifugaron a 13 000 RPM durante 10-20 minutos a 4 °C. La fase acuosa superior se transfirió a un tubo de 1.5 ml nuevo (volumen de ~500 µl). Se añadió un volumen idéntico de isopropanol al 100%, 1 µl de acrilamida lineal (4^º) y 1/10 volúmenes de NaOAc 3 M pH 5.5 o menos a cada muestra (normalmente 500 µl de isopropanol y 50 µl de NaOAc). La muestra se centrifugó a 13 000 RPM durante 10 min a 4 °C. Se guardaron los sobrenadantes. El sedimento se lavó dos veces con EtOH al 70% enfriado en hielo (500 µl en cada lavado) y se centrifugó a 13 000 RPM durante ~5 min a 4 °C después de cada lavado. Se permitió que el sedimento se secara al aire durante ~5 minutos y a continuación se resuspendió en 20 µl de NF H₂O. Se utilizaron 10 µl en la reacción de ADNc. El ARN resuspendido se almacenó a -80 °C.

Resultados

Se evaluó la atenuación del ARNm en suero utilizando el ensayo cERD correlacionado con los resultados obtenidos de la biopsia hepática. Remítase a la FIG. 31. Este es un resultado sorprendente debido a que ALAS1 no es una proteína sérica. El ensayo cERD que se proporciona en la presente permite monitorizar el ARNm de ALAS1 circulante. Esto tiene la ventaja, por ejemplo, de que los niveles de ARNm de ALAS1 se pueden medir en el tiempo sin realizar biopsias hepáticas en serie, lo que sería caro y difícil desde un punto de vista técnico.

Se determinó la cinética de la atenuación del ARNm utilizando los resultados del ensayo cERD. Remítase a la FIG. 32. AD-60489 logró más de un 50% de atenuación, incluso con una dosis de tan solo 1.25 mg/kg.

Ejemplo 22: Estudios de seguridad de los ARNip de ALAS1

Los siguientes estudios de seguridad indican que la atenuación sostenida de ALAS1 es segura y se tolera bien.

Estudios con primates no humanos

- 5 Como se ha descrito anteriormente (remítase al Ejemplo 20), en los estudios con primates no humanos, no se observaron elevaciones de ALT, AST o ALP después de la administración de AD-60489 y AD-58632.

Estudios en ratas

- 10 En ratas, se llevó a cabo un estudio de cuatro semanas con AD-58632. Se administraron 10 mg/kg del ARNip cada día durante 5 días en la primera semana y después 10 mg/kg en días alternos durante las semanas 2-4 del estudio. La exposición total fue de 140 mg. No se observaron señales clínicas adversas ni cambios en el peso corporal. No se observaron cambios relacionados con el artículo de prueba en los parámetros hematológicos o de coagulación. Además, no se observó una histopatología adversa. Hubo una vacuolación mínima y una fibrosis subcapsular mínima en el riñón.

Estudios en ratones

- 15 En ratones, se evaluaron los ARNm de P450 después de la atenuación de ALAS1. Se observaron incrementos dependientes de la dosis mínimos en Cyp2b10 48 horas después de la administración de una formulación de LNP de ALAS1. Esto se resolvió en 168 horas.

Ejemplo 23: Identificación de ARNip de ALAS1 más eficaces utilizando estudios de la relación estructura-actividad

- 20 Se llevaron a cabo estudios de la relación estructura-actividad (SAR, por sus siglas en inglés), incluidos estudios descritos en otros ejemplos de la presente, para identificar ARNip de ALAS1 más eficaces derivados de los que ya se habían identificado, p. ej., AD-58632 y AD-60489. Se estudiaron los efectos de las modificaciones químicas. Las modificaciones químicas incluyen 1) modificaciones 2'-O-metilo frente a 2'-fluoro, 2) descenso en 2'Uf (modificaciones 2'-fluoro), 3) adición de PS (fosforotioato), 4) utilización de dT internas y/o 5) ácidos glicolnucleicos (GNA). Sin desear ceñirse a la teoría, las modificaciones pueden mejorar la potencia, p. ej., mediante 1) mejor despliegamiento o mejora de la carga RISC, o 2) mejor acoplamiento catalítico con la diana. Las modificaciones también pueden mejorar la estabilidad de manera que los compuestos se pueden acumular y funcionar mejor cuando se administran múltiples dosis.

- 30 Se observó mejora de la actividad respecto a otros dúplex (p. ej., AD-58632 y/o AD-60489) en algunos casos (remítase a la Tabla 22B), mientras que se observó una actividad similar (remítase a la Tabla 23) o una actividad reducida (Tabla 24) en otros casos. Estos casos se presentan meramente como ejemplos basados en el cribado de más de 150 ARNip. En la presente se proporciona una ejemplificación adicional de los estudios SAR.

Tabla 22B: Actividad mejorada respecto al original

Dúplex*	CI50	Sentido (5' a 3')	Antisentido (5' a 3')
AD-58632.10 (original)	0.017	GfsasAfaGfaGfuGfUfCfuCfaUfcUfuCfuUfL 96 (SEQ ID NO: 4192)	asAfsGfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcs usg (SEQ ID NO: 4193)
AD-80643.1	0.004	GfsasAfaGfAfGfuGfdTcucacucucuuL96 (SEQ ID NO: 4194)	asAfsGfaGfaUfgAfgAfcAfcucucuuusg (SEQ ID NO: 4195)
AD-60489.3 (original)	0.010	CfsasGfaAfaGfaGfUfGfuCfuCfaUfcUfuAfL 96 (SEQ ID NO: 4196)	usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcUfuUfcUfgs gsu (SEQ ID NO: 4197)
AD-60879.1	0.001	CfsasGfaAfaGfaGfdTGfuCfuCf(Agn)UfscU fsuAfsL96 (SEQ ID NO: 4198)	usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcdTuUfcUfgs gsu (SEQ ID NO: 4199)
*El número tras el punto decimal en un nombre de un dúplex en esta y otras tablas simplemente se refiere a un número de la producción en lotes			

Tabla 23: Actividad similar respecto al original pero mayor estabilidad

Dúplex	CI50	Sentido (5' a 3')	Antisentido (5' a 3')
AD-58632.10 (original)	0.017	GfsasAfaGfaGfuGfUfCfuCfaUfcUfuCfuUfL96 (SEQ ID NO: 4200)	asAfsGfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsusg (SEQ ID NO: 4201)
AD-60839.1	0.014	gsasaagaGfuGfuCfucacuuuuL96 (SEQ ID NO: 4202)	asAfsGfaGfaugAfgacAfcucuuuucsusg (SEQ ID NO: 4203)

Tabla 24: Actividad reducida respecto al original

Dúplex	CI50	Sentido (5' a 3')	Antisentido (5' a 3')
AD-58632.10 (original)	0.017	GfsasAfaGfaGfuGfUfCfuCfaUfcUfuCfuUfL96 (SEQ ID NO: 4204)	asAfsGfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsusg (SEQ ID NO: 4205)
AD-60886.1	0.801	GfsasAfaGfAfGfuGfdTcucaucuucuuL96 (SEQ ID NO: 4206)	asAfsGf(Agn)GfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsusg (SEQ ID NO: 4207)

5 **Ejemplo 24: Estudios de la reacción estructura-actividad *in vitro* de AD-58632**

Se generaron AD-58632 y derivados de ARNip de AD-58632 y se cribaron algunos ARNip *in vitro* para determinar la actividad. En la Tabla 1 se proporcionan las abreviaturas para las modificaciones químicas.

Actividad *in vitro* con ARNip 10 nM y 0.1 nM

10 Se estudió la actividad *in vitro* de los ARNip para suprimir el ARNm de ALAS1 en células Hep3B que se transfectaron utilizando Lipofectamine2000 como un reactivo de transfección. Los experimentos se realizaron con las concentraciones de ARNip indicadas (p. ej., 0.1 nM, 10 nM) y se analizaron mediante el ensayo de ADN ramificado (ADNr) 24 horas después de la transfección. Los resultados se expresan como ARNm restante porcentual relativo al ARNip AD-1955, un ARNip no dirigido que se utilizó como control negativo.

15 Las secuencias de los ARNip y los resultados de las pruebas *in vitro* se proporcionan en la Tabla 25, Tabla 26 y Tabla 27.

Tabla 25: Secuencias y resultados del cribado *in vitro* para AD-58632 y ARNip derivados de AD-58632

ID NO: (sentido)	SEQ ID NO: (antisentido)	Sitios diana de la antisentido en NM_000688.4	Dúplex	Secuencia sentido (5'-3')	Secuencia antisentido (AS) (5'-3')	Prom 10 nM	DE 10 nM	Prom 0.1 nM	DE 0.1 nM
4208	4209	873-895	AD-58632.8	GfsasAfaGfaGfuGfuCfuCfuCfuCfuCfuUfL96	asAfsGfaGfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsu sg	11.79	2.70	46.65	4.21
4210	4211	873-895	AD-60405.1	GfsasAfaGfaGfuGfuCfuCfaucuuCfuul96	asAfsGfaGfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsu sg	15.61	4.49	63.49	10.51
4212	4213	873-895	AD-60411.1	GfsasAfaGfaGfuGfuCfuCfaucuuL96	asAfsGfaGfaGfaUfgAfgAfcAfcUfcUfuUfcs usg	15.04	6.13	62.59	10.05
4214	4215	873-895	AD-60417.1	GfsasagaGfuGfuCfuCfaucuuL96	asAfsGfaGfaGfaUfgAfgAfcAfcUfcUfuUfcs usg	13.96	5.47	66.10	8.21
4216	4217	873-895	AD-60423.1	gsasaaagaGfuGfuCfuCfaucuuL96	asAfsGfaGfaGfaUfgAfgAfcAfcUfcUfuUfcs usg	12.59	3.03	41.47	3.77
4218	4219	873-895	AD-60423.2	gsasaaagaGfuGfuCfuCfaucuuL96	asAfsGfaGfaGfaUfgAfgAfcAfcUfcUfuUfcs usg	13.79	3.38	55.93	7.90
4220	4221	873-895	AD-60434.1	gsasaaagaGfuGfuCfaucuuL96	asAfsGfaGfaGfaUfgAfgAfcAfcUfcUfuUfcs usg	14.74	2.76	48.68	6.64
4222	4223	873-895	AD-60440.1	gsasaaagaGfuGfucucauL96	asAfsGfaGfaGfaUfgAfgAfcAfcUfcUfuUfcs usg	28.31	8.68	77.01	3.99
4224	4225	873-895	AD-60400.1	gsasaaagaguGfucucauL96	asAfsGfaGfaGfaUfgAfgAfcAfcUfcUfuUfcs usg	39.90	5.67	99.64	8.58
4226	4227	873-895	AD-60406.1	gsasaaagagugucucauL96	asAfsGfaGfaGfaUfgAfgAfcAfcUfcUfuUfcs usg	56.06	2.08	95.83	17.01
4228	4229	873-895	AD-60412.1	GfsasagaGfuGfucucauL96	asAfsGfaGfaGfaUfgAfgAfcAfcUfcUfuUfcs usg	43.09	2.23	87.52	8.10
4230	4231	873-895	AD-60418.1	gsasaaagaGfuGfucucauL96	asAfsGfaGfaGfaUfgAfgAfcAfcUfcUfuUfcsu sg	65.84	7.75	108.07	21.88
4232	4233	873-895	AD-60424.1	gsasaaagaGfuGfucucauL96	asAfsGfaGfaGfaUfgAfgAfcAfcUfcUfuUfcsu sg	45.51	11.82	84.40	10.69
4234	4235	873-895	AD-60429.1	gsasaaagaGfuGfucucauL96	asAfsGfaGfaGfaUfgAfgAfcAfcUfcUfuUfcsu g	63.96	13.25	81.21	1.96
4236	4237	873-895	AD-60435.1	gsasaaagaGfuGfucucauL96	asAfsGfaGfaGfaugAfgAfcAfcUfcUfuUfcsu sg	80.12	10.02	95.33	23.09
4238	4239	873-895	AD-60441.1	gsasaaGfaGfuGfucucauL96	asAfsGfaGfaGfaugAfgAfcAfcUfcUfuUfcsu sg	63.29	17.48	97.07	8.04
4240	4241	873-895	AD-60401.1	gsasaaGfaGfuGfucucauL96	asAfsGfaGfaGfaugAfgAfcAfcUfcUfuUfcsu sg	55.27	10.26	109.06	4.23
4242	4243	873-895	AD-60407.1	GfsasaaGfaGfuGfucucauL96	asAfsGfaGfaGfaugAfgAfcAfcUfcUfuUfcsu sg	47.39	1.88	98.04	22.58

(continuación)

ID NO: (sentido)	SEQ ID NO: (antisentido)	Sitios diana de la antisentido en NM_000688.4	Dúplex	Secuencia sentido (5'-3')	Secuencia antisentido (AS) (5'-3')	Prom 10 nM	DE 10 nM	Prom 0.1 nM	DE 0.1 nM
4244	4245	873-895	AD-60413.1	GfsasAfaGfAfGfuGfucucaucuuL96	asAfsGfAfaGfaugAfgAfcAfcucuucsu	55.60	11.65	92.88	5.65
4246	4247	873-895	AD-60419.1	GfsasAfaGfAfGfuGfdT caucucuulL96	asAfsGfAfaGfaugAfgAfcAfcucuucsu	20.82	15.07	57.82	8.31
4248	4249	873-895	AD-60425.1	GfsasAfaGfAfGfuGfudCaucucuulL96	asAfsGfAfaGfaugAfgAfcAfcucuucsu	35.58	13.30	73.46	10.91
4250	4251	873-895	AD-60430.1	GfsasAfaGfAfGfuGfudTcaucuulL96	asAfsGfAfaGfaugAfgAfcAfcucuucsu	40.54	1.41	81.87	11.23
4252	4253	873-895	AD-60436.1	GfsasAfaGfAfGfuGfudCaucucuulL96	asAfsGfAfaGfaugAfgAfcAfcucuucsu	60.12	11.74	81.51	7.41
4254	4255	873-895	AD-60442.1	GfsasAfaGfAfGfuGfudCaucucuulL96	asAfsGfAfaGfaugAfgAfcAfcucuucsu	40.82	12.61	83.06	1.05
4256	4257	873-895	AD-60402.1	GfsasAfaGfAfGfuGfudCadTcuuL96	asAfsGfAfaGfaugAfgAfcAfcucuucsu	62.16	11.24	123.60	6.71
4258	4259	873-895	AD-60408.1	GfsasAfaGfAfGfuGfudCaucucuulL96	asAfsGfAfaGfaugAfgAfcAfcucuucsu	45.39	15.50	86.69	6.12
4260	4261	873-895	AD-60414.1	GfsasAfaGfAfGfuGfudCaucudTcuuL96	asAfsGfAfaGfaugAfgAfcAfcucuucsu	32.56	3.52	84.21	0.24
4262	4263	873-895	AD-60420.1	GfsasAfaGfAfGfuGfudCaucucuulL96	asAfsGfAfaGfaugAfgAfcAfcucuucsu	52.57	10.77	94.45	3.43
4264	4265	873-895	AD-60426.1	GfsasAfaGfAfGfuGfudCaucucuulTL96	asAfsGfAfaGfaugAfgAfcAfcucuucsu	52.49	1.91	91.15	14.49
4266	4267	873-895	AD-60431.1	gsasaaGfaGfuGfudCudCaucucuulL96	asAfsGfAfaGfaugAfgAfcAfcucuucsu	26.66	1.16	73.09	6.83
4268	4269	873-895	AD-60437.1	gsasaaGfaGfuGfudCudCadTcuuL96	asAfsGfAfaGfaugAfgAfcAfcucuucsu	32.80	4.58	69.03	3.02
4270	4271	873-895	AD-60443.1	gsasaaGfaGfuGfudCudCaucudTcuuL96	asAfsGfAfaGfaugAfgAfcAfcucuucsu	35.10	7.10	69.92	17.93
4272	4273	873-895	AD-60403.1	gsasaaGfaGfuGfudCudCaucudTcuuL96	asAfsGfAfaGfaugAfgAfcAfcucuucsu	25.28	1.68	105.23	23.99
4274	4275	873-895	AD-60409.1	gsasaaGfaGfuGfudCudCadTcdTcuuL96	asAfsGfAfaGfaugAfgAfcAfcucuucsu	30.48	1.88	72.34	3.34
4276	4277	873-895	AD-60415.1	gsasaaGfaGfuGfudCudCadTcdTudCuuL96	asAfsGfAfaGfaugAfgAfcAfcucuucsu	25.28	7.10	69.53	10.72
4278	4279	873-895	AD-60421.1	gsasaaGfaGfuGfudCaucucuulL96	asAfsGfAfaGfadTgAfgAfcAfcucuucsu _g	59.28	5.83	66.88	0.63
4280	4281	873-895	AD-60427.1	gsasaaGfaGfuGfudCaucucuulL96	asAfsGfAfaGfaugAfgAfcAfcudTcuuucsu _g	34.80	8.13	79.65	11.25
4282	4283	873-895	AD-60432.1	gsasaaGfaGfuGfudCaucucuulL96	asAfsGfAfaGfaugAfgAfcAfcudTcuucsu _g	46.78	6.42	79.19	16.72
4284	4285	873-895	AD-60438.1	gsasaaGfaGfuGfudCaucucuulL96	asAfsGfAfaGfadTgAfgAfcAfcudTcuuucsu _{sg}	32.07	9.46	57.87	10.18
4286	4287	873-895	AD-60444.1	gsasaaGfaGfuGfudCaucucuulL96	asAfsGfAfaGfadTgAfgAfcAfcudTcuuucsu _{sg}	55.55	10.17	89.52	3.91

(continuación)

ID NO: (sentido)	SEQ ID NO: (antisentido)	Sitios diana de la antisentido en NM_000688.4	Dúplex	Secuencia sentido (5'-3')	Secuencia antisentido (AS) (5'-3')	Prom 10 nM	DE 10 nM	Prom 0.1 nM	DE 0.1 nM
4288	4289	873-895	AD-60404.1	gsasaaGfaGfuGfucucaucuuL96	asAfsGfAfaGfa(Tgn)gAfgAfcAfcucuucs usg	50.06	9.17	93.46	2.56
4290	4291	873-895	AD-60410.1	gsasaaGfaGfuGfucucaucuuL96	asAfsGfAfaGfaGfaGfaAfcAfc(Tgn)cuuucs usg	44.40	13.93	88.96	6.06
4292	4293	873-895	AD-60416.1	gsasaaGfaGfuGfucucaucuuL96	asAfsGfAfaGfaGfaGfaAfcAfc(Tgn)uucs usg	28.56	7.82	76.36	19.47
4294	4295	873-895	AD-60422.1	GfsasAfaGfAfGfuGf(Tgn)cucaucuuL 96	asAfsGfAfaGfaGfaGfaAfcAfcucuucsusg	40.37	10.86	84.06	12.08
4296	4297	873-895	AD-60428.1	GfsasAfaGfAfGfuGfuc(Tgn)cucaucuuL 96	asAfsGfAfaGfaGfaGfaAfcAfcucuucsusg	56.81	22.64	92.15	0.26
4298	4299	873-895	AD-60433.1	GfsasAfaGfAfGfuGfucuc(Agn)ucuuL 96	asAfsGfAfaGfaGfaGfaAfcAfcucuucsusg	36.78	5.31	67.92	12.55
4300	4301	873-895	AD-60439.1	GfsasAfaGfAfGfuGfucuca(Tgn)cuuL 96	asAfsGfAfaGfaGfaGfaAfcAfcucuucsusg	32.81	6.72	77.93	13.33
4302	4303	873-895	AD-60445.1	GfsasAfaGfAfGfuGfucucauc(Tgn)cuuL 96	asAfsGfAfaGfaGfaGfaAfcAfcucuucsusg	13.25	3.28	78.08	4.05
4304	4305	873-895	AD-60451.1	GfsasAfaGfAfGfuGfucucauc(Tgn)cuuL 96	asAfsGfAfaGfaGfaGfaAfcAfcucuucsusg	34.74	11.06	88.93	5.19
4306	4307	873-895	AD-60457.1	GfsasAfaGfAfGfuGfucucaucuc(Tgn)uL 96	asAfsGfAfaGfaGfaGfaAfcAfcucuucsusg	41.26	6.16	92.15	0.64
4308	4309	873-895	AD-60463.1	GfsasAfaGfaGfuGfUfCfuCfaUfcUfuCfuA fL96	usAfsGfAfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsu sg	19.58	7.98	69.67	4.64
4310	4311	873-895	AD-60469.1	CfsasAfaGfaGfuGfUfCfuCfaUfcUfuCfuU fL96	asAfsGfAfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfgsa sc	19.35	9.30	72.30	0.50
4312	4313	873-895	AD-60474.1	CfsusAfaGfaGfuGfUfCfuCfaUfcUfuCfuU fL96	asAfsGfAfaGfa UfgAfgacAfcUfcUfuUfgsasc	21.60	4.27	76.35	11.71
4314	4315	873-895	AD-60479.1	CfsusUfaGfaGfuGfUfCfuCfaUfcUfuCfu UfL96	asAfsGfAfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfaAfgsa sc	28.01	4.45	76.55	27.32
4316	4317	873-895	AD-60484.1	CfsusUfaGfaGfuGfUfCfuCfaUfcUfuCfu UfL96	asAfsGfAfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfaAfgsu sg	20.31	3.08	71.99	9.53
4318	4319	873-895	AD-60446.1	GfsusUfuGfaGfuGfUfCfuCfaUfcUfuCfu UfL96	asAfsGfAfaGfa UfgAfgacAfcUfcAfaAfcusg	18.65	5.11	73.52	17.87

(continuación)

ID NO: (sentido)	SEQ ID NO: (antisentido)	Sitios diana de la sec antisentido en NMI_000688.4	Dúplex	Secuencia sentido (5'-3')	Secuencia antisentido (AS) (5'-3')	Prom 10 nM	DE 10 nM	Prom 0.1 nM	DE 0.1 nM
4320	4321	873-895	AD-60452.1	GfsasUfuCfaGfuGfuCfuCfaUfcUfuCfuUfL96	asAfsGfAfaGfaUfgAfgacAfcUfgAfaUfcsu sg	28.72	1.21	83.09	15.75
4322	4323	873-895	AD-60458.1	GfsasAfuCfuGfuGfuCfuCfaUfcUfuCfuUfL96	asAfsGfAfaGfaUfgAfgacAfcAfgAfuUfcsus g	50.15	13.02	114.93	11.58
4324	4325	873-895	AD-60464.1	GfsasAfaGfaGfuGfuCfuCfaUfcUfuCfuUfL96	(Agn)AfsGfAfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfc susg	35.71	5.07	103.88	3.01
4326	4327	873-895	AD-60470.1	GfsasAfaGfaGfuGfuCfuCfaUfcUfuCfuUfL96	asAfs(Ggn)AfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUf csusg	17.59	0.78	73.15	11.75
4328	4329	873-895	AD-60475.1	GfsasAfaGfaGfuGfuCfuCfaUfcUfuCfuUfL96	asAfsGf(Agn)AfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfc susg	22.07	4.57	68.64	25.12
4330	4331	873-895	AD-60480.1	GfsasAfaGfaGfuGfuCfuCfaUfcUfuCfuUfL96	asAfsGfAfc(Agn)GfaUfgAfgacAfcUfcUfuUf csusg	15.54	1.22	66.39	14.34
4332	4333	873-895	n/a	GfsasAfaGfaGfuGfuCfuCfaUfcUfuCfuUfL96	asAfsGfAfa(Ggn)AfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfc susg				
4334	4335	873-895	AD-60447.1	GfsasAfaGfaGfuGfuCfuCfaUfcUfuCfuUfL96	asAfsGfAfaGf(Agn)UfgAfgacAfcUfcUfuUf csusg	31.33	4.75	104.36	7.71
4336	4337	873-895	AD-60453.1	GfsasAfaGfaGfuGfuCfuCfaUfcUfuCfuUfL96	asAfsGfAfaGfa(Tgn)gAfgacAfcUfcUfuUfc susg	15.42	0.90	76.29	0.41
4338	4339	873-895	AD-60459.1	GfsasAfaGfaGfuGfuCfuCfaUfcUfuCfuUfL96	asAfsGfAfaGfaUf(Ggn)AfgacAfcUfcUfuUf csusg	27.70	10.91	89.20	3.46
4340	4341	873-895	AD-60465.1	GfsasAfaGfaGfuGfuCfuCfaUfcUfuCfuUfL96	asAfsGfAfaGfaUfg(Agn)gacAfcUfcUfuUfc susg	28.44	6.84	87.28	5.73
4342	4343	873-895	AD-60471.1	GfsasAfaGfaGfuGfuCfuCfaUfcUfuCfuUfL96	asAfsGfAfaGfa UfgAfc(Ggn)acAfcUfcUfuUfcsusg	24.03	8.87	85.86	14.62
4344	4345	873-895	AD-60476.1	GfsasAfaGfaGfuGfuCfuCfaUfcUfuCfuUfL96	asAfsGfAfaGfaUfgAfg(Agn)AfcUfcUfuUf csusg	21.48	5.53	88.73	25.48
4346	4347	873-895	AD-60481.1	GfsasAfaGfaGfuGfuCfuCfaUfcUfuCfuUfL96	asAfsGfAfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsu sg	15.18	4.19	68.10	6.86
4348	4349	873 - 895	AD-60486.1	GfsasAfaGfaGfuGfuCfuCfaUfcUfuCf(T gn)UfL96	asAfsGfAfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsu sg	15.31	0.31	74.06	8.48
4350	4351	873 - 895	AD-60448.1	GfsasAfaGfaGfuGfuCfuCfaUfcUfu(Cgn u)UfL96	asAfsGfAfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsu sg	14.89	1.35	59.22	6.64

(continuación)

ID	NO: (sentido)	SEQ ID NO: (antisentido)	Sitios diana de la antisentido en NM_000688.4	Dúplex	Secuencia sentido (5'-3')	Secuencia antisentido (AS) (5'-3')	Prom 10 nM	DE 10 nM	Prom 0.1 nM	DE 0.1 nM
4352		4353	873 - 895	AD-60454.1	GfsasAfaGfaGfuGfUfCfuCfaUfcUf(Tgn)CfuUfL96	asAfsG AfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsu sg	19.24	5.72	75.90	1.27
4354		4355	873 - 895	AD-60460.1	GfsasAfaGfaGfuGfUfCfuCfaUfc(Tgn)UfuUfL96	asAfsG AfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsu sg	14.91	5.84	60.11	6.01
4356		4357	873 - 895	AD-60466.1	GfsasAfaGfaGfuGfUfCfuCfaUfc(Cgn)UfuUfL9 6	asAfsG AfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsu sg	13.99	7.53	56.83	11.59
4358		4359	873 - 895	AD-60472.1	GfsasAfaGfaGfuGfUfCfuCfaUfc(Tgn)cUfuCfuUfL96	asAfsG AfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsu sg	12.35	0.60	64.36	11.74
4360		4361	873 - 895	AD-60477.1	GfsasAfaGfaGfuGfUfCfuCf(Agn)UfcUfuUfL96	asAfsG AfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsu sg	15.62	1.76	65.96	7.77
4362		4363	873-895	AD-60482.1	GfsasAfaGfaGfuGfUfCfu(Cgn)aUfcUfuCfuUfL96	asAfsG AfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsu sg	18.58	6.43	66.67	2.31
4364		4365	873 - 895	AD-60487.1	GfsasAfaGfaGfuGfUfCf(Tgn)CfaUfcUfuUfL96	asAfsG AfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsu sg	34.89	15.62	86.39	6.10
4366		4367	873 - 895	AD-60449.1	GfsasAfaGfaGfuGfUf(Cgn)UcUfcUfuUfL96	asAfsG AfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsu sg	22.65		80.09	0.75
4368		4369	873 - 895	AD-60455.1	GfsasAfaGfaGfuGf(Tgn)CfuCfaUfcUfuUfL96	asAfsG AfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsu sg	31.05	2.82	104.24	23.01
4370		4371	873 - 895	AD-60461.1	GfsasAfaGfaGfuGfUfCfuCfaUfcUfu(Cgn)UfL96	asAfs(Ggn)AfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUf csusg	16.30	2.08	85.78	22.00
4372		4373	873 - 895	AD-60467.1	GfsasAfaGfaGfuGfUfCfuCfaUfcUf(Tgn)CfuUfL96	asAfsG(Agn)aGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUf csusg	17.77	8.38	82.16	18.92
4374		4375	873 - 895	AD-60473.1	GfsasAfaGfaGfuGfUfCfuCfaUfc(Tgn)UfuUfL96	asAfsG Af(Agn)GfaUfgAfgacAfcUfcUfuUf csusg	14.64	4.25	61.05	7.88
4376		4377	873 - 895	n/a	GfsasAfaGfaGfuGfUfCfuCfaUfc(Cgn)UfuUfL9 6	asAfsG Afa(Ggn)aUfgAfgacAfcUfcUfuUf csusg				
4378		4379	873 - 895	AD-60483.1	GfsasAfaGfaGfuGfUfCfuCfaUfc(Tgn)cUfuCfuUfL96	asAfsG AfaGf(Agn)UfgAfgacAfcUfcUfuUf csusg	26.18	2.83	91.12	16.03
4380		4381	873 - 895	AD-60488.1	GfsasAfaGfaGfuGfUfCfuCf(Agn)UfcUfuUfL96	asAfsG AfaGfa(Tgn)gAfgacAfcUfcUfuUf csusg	24.74	0.56	87.66	7.90
4382		4383	873 - 895	AD-60450.1	GfsasAfaGfaGfuGfUfCfu(Cgn)aUfcUfuUfL96	asAfsG AfaGfaUf(Ggn)AfgacAfcUfcUfuUf csusg	37.09	2.89	111.90	1.97

(continuación)

ID NO: (sentido)	SEQ ID NO: (antisentido)	Sitios diana de la antisentido en NM_000688.4	Dúplex	Secuencia sentido (5'-3')	Secuencia antisentido (AS) (5'-3')	Prom 10 nM	DE 10 nM	Prom 0.1 nM	DE 0.1 nM
4384	4385	873 - 895	AD-60456.1	GfsasAfaGfaGfuGfuCf(Tgn)CfaUfcUfuCfuUfL96	asAfsgAfaGfaUfg(Agn)gacAfcUfcUfuUfc susg	41.82	0.60	102.56	11.25
4386	4387	873 - 895	AD-60462.1	GfsasAfaGfaGfuGfuCf(Cgn)uCfaUfcUfuCfuUfL96	asAfsgAfaGfaUfgAf(Ggn)acAfcUfcUfuUf csusg	38.91	3.89	122.47	35.17
4388	4389	873 - 895	AD-60468.1	GfsasAfaGfaGfuGf(Tgn)CfuCfaUfcUfuCfuUfL96	asAfsgAfaGfaUfgAfg(Agn)cAfcUfcUfuUf csusg	28.44	3.05	97.09	2.66
4390	4391	873 - 895	AD-60550.1	GfsasAfaGfaGfuGfuCfuCfaUfcUfuCfuUfL96	asAfsgAfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsu sg	20.35	0.63	69.13	22.65
4392	4393	873 - 895	AD-60555.1	GfsasAfaGfaGfuGfuCfuCfaUfscUfsuCfuUfL96	asAfsgAfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsu Ufcsusg	19.17	8.76	68.86	17.72
4394	4395	873 - 895	AD-60560.1	GfsasAfaGfaGfuGfuCfuCfaUfcUfuCfuUfL96	asAfsgAfaGfaUfgAfgacAfcUfscUfscsusg	25.71	5.66	67.63	27.72
4396	4397	873 - 895	AD-60565.1	GfsasAfaGfaGfuGfuCfuCfaUfscUfsuCfuUfL96	asAfsgAfaGfaUfgAfgacAfcUfscUfscUfsc susg	22.78	7.32	74.11	1.85

Como se muestra en la tabla anterior, en este cribado *in vitro*, los ARNip que proporcionan la supresión de ARNm de ALAS1 mayor (más de un 80% de supresión, de modo que permanece menos de un 20% del ARNm) con la concentración de 10 nM incluyeron AD-58632, AD-60472, AD-60423, AD-60445, AD-60423, AD-60417, AD-60466, AD-60473, AD-60434, AD-60448, AD-60460, AD-60411, AD-60481, AD-60486, y AD-60453, AD-60480, AD-60405, AD-60477, AD-60461, AD-60470, AD-60467, AD-60482, AD-60446, AD-60555, AD-60454, AD-60469 y AD-60463. Además, en este cribado *in vitro*, los ARNip que proporcionan la mayor supresión de ARNm de ALAS1 (más de un 30% de supresión, de modo que permanece menos de un 70% del ARNm) con la concentración de 0.1 nM incluyeron AD-60423, AD-58632, AD-60434, AD-60423, AD-60466, AD-60419, AD-60438, AD-60448, AD-60460, AD-60473, AD-60411, AD-60405, AD-60472, AD-60477, AD-60417, AD-60480, AD-60482, AD-60421, AD-60560, AD-60433, AD-60481, AD-60475, AD-60555, AD-60437, AD-60550, AD-60415, AD-60463 y AD-60443.

Como se muestra en la siguiente tabla, las pruebas de más ARNm mostraron que los siguientes dúplex proporcionaron más de un 80% de supresión con la concentración de 10 nM: AD-58632, AD-60405, AD-60423, AD-60434, AD-60445, AD-60480, AD-60460 y AD-60466, y los siguientes dúplex proporcionaron más de un 30% de supresión con la concentración de 0.1 nM: AD-58632, AD-60405, AD-60423, AD-60434, AD-60419, AD-60480, AD-60460 y AD-60466.

Tabla 26: Secuencias y resultados del cribado *in vitro* adicionales para AD-58632 y ARNip derivados de AD-58632

SEQ ID NO: (sentido)	SEQ ID NO: (antisentido)	Sitios diana de la sec antisentido en NM_000688.4	Nombre del dúplex	Secuencia sentido (5'-3')	Secuencia antisentido (AS) (5'-3')	Prom 10 nM	DE 10 nM	Prom 0.1 nM	DE 0.1 nM
4398	4399	873 - 895	AD-58632.8	GfsasAfaGfaGfuGfuCfuCfaUfuUfL96	asAfsGfAfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsug	11.8	2.7	46.7	4.2
4400	4401	873 - 895	AD-60405.1	GfsasAfaGfaGfuGfuCfuCfaucuuCfuul96	asAfsGfAfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsug	15.6	4.5	63.5	10.5
4402	4403	873 - 895		GfsasAfaGfaGfuGfuCfuCfaucuuCfuul96	asAfsGfAfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsug				
4404	4405	873 - 895		GfsasAfaGfaGfuGfuCfuCfaucuuCfuul96	asAfsGfAfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsug				
4406	4407	873 - 895		GfsasAfaGfaGfuGfuCfuCfaucuuCfuul96	asAfsGfAfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsug				
4408	4409	873 - 895	AD-60423.2	gsasaagaGfuGfuCfuCfaucuuCfuul96	asAfsGfAfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsug	13.8	3.4	55.9	7.9
4410	4411	873 - 895		gsasaagaGfuGfuCfuCfaucuuCfuul96	asAfsGfAfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsug				
4412	4413	873 - 895		gsasaagaGfuGfuCfuCfaucuuCfuul96	asAfsGfAfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsug				
4414	4415	873 - 895		gsasaagaGfuGfuCfuCfaucuuCfuul96	asAfsGfAfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsug				
4416	4417	873 - 895		gsasaagaGfuGfuCfuCfaucuuCfuul96	asAfsGfAfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsug				
4418	4419	873 - 895	AD-60434.1	gsasaagaGfuGfuCfuCfaucuuCfuul96	asAfsGfAfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsug	14.7	2.8	48.7	6.6
4420	4421	873 - 895		gsasaagaGfuGfuCfuCfaucuuCfuul96	asAfsGfAfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsug				
4422	4423	873 - 895		gsasaagaGfuGfuCfuCfaucuuCfuul96	asAfsGfAfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsug				
4424	4425	873 - 895		gsasaagaGfuGfuCfuCfaucuuCfuul96	asAfsGfAfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsug				
4426	4427	873 - 895		gsasaagaGfuGfuCfuCfaucuuCfuul96	asAfsGfAfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsug				
4428	4429	873 - 895	AD-60419.1	GfsasAfaGfAfaGfuGfuCfuCfaucuuCfuul96	asAfsGfAfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsug	20.8	15.1	57.8	8.3
4430	4431	873 - 895		GfsasAfaGfAfaGfuGfuCfuCfaucuuCfuul96	asAfsGfAfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsug				
4432	4433	873 - 895		GfsasAfaGfAfaGfuGfuCfuCfaucuuCfuul96	asAfsGfAfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsug				
4434	4435	873 - 895		GfsasAfaGfAfaGfuGfuCfuCfaucuuCfuul96	asAfsGfAfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsug				
4436	4437	873 - 895		GfsasAfaGfAfaGfuGfuCfuCfaucuuCfuul96	asAfsGfAfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsug				
4438	4439	873 - 895	AD-60445.1	GfsasAfaGfAfaGfuGfuCfuCfaucuuCfuul96	asAfsGfAfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsug	13.3	3.3	78.1	4.0
4440	4441	873 - 895		GfsasAfaGfAfaGfuGfuCfuCfaucuuCfuul96	asAfsGfAfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsug				
4442	4443	873 - 895		GfsasAfaGfAfaGfuGfuCfuCfaucuuCfuul96	asAfsGfAfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsug				

(continuación)

SEQ ID NO: (sentido)	SEQ ID NO: (antisentido)	Sitios diana de la sec antisentido en NM_000688.4	Nombre del dúplex	Secuencia sentido (5'-3')	Secuencia antisentido (AS) (5'-3')	Prom DE	Prom DE	DE
4444	4445	873 - 895		GfsasAfaGfAtGfuGfucucauc(Tgn)ucuuL96	asAfsgAfaGfaugAfgaAfcAfcucuuucsug	10 nM	10 nM	0.1 nM
4446	4447	873 - 895		GfsasAfaGfAtGfuGfucucauc(Tgn)ucuuL96	asAfsgAfaGfaugAfgaAfcAfcucuuucsug			
4448	4449	873 - 895	AD-60480.1	GfsasAfaGfaGfuGfuCfuCfaUfcUfuCfuUfL96	asAfsgAf(Agn)GfaUfgAfgaAfcUfcUfuUfcsu sg	15.5	1.2	66.4
4450	4451	873 - 895		gsasaagaGfuGfuCfuCfaucucuulL96	asAfsgAf(Agn)GfaUfgAfgaAfcUfcUfuUfcsu sg			14.3
4452	4453	873 - 895		gsasaagaGfuGfuCfuCfaucucuulL96	asAfsgAf(Agn)GfaUfgAfgaAfcUfcUfuUfcsu sg			
4454	4455	873 - 895		GfsasAfaGfAtGfuGfdTcucucuulL96	asAfsgAf(Agn)GfaUfgAfgaAfcUfcUfuUfcsu sg			
4456	4457	873 - 895		GfsasAfaGfAtGfuGfucucauc(Tgn)ucuuL96	asAfsgAf(Agn)GfaUfgAfgaAfcUfcUfuUfcsu sg			
4458	4459	873 - 895		GfsasAfaGfAtGfuGfucucauc(Tgns)ucuuL96	asAfsgAfs(Agns)GfaUfgAfgaAfcUfcUfuUfcsu susg			
4460	4461	873 - 895		GfsasAfaGfaGfuGfuCfuCfaUfcUfuCfuUfL96	asAfsgAf(Agn)GfaugAfgaAfcucuuucsug			
4462	4463	873 - 895		gsasaagaGfuGfuCfuCfaucucuulL96	asAfsgAf(Agn)GfaugAfgaAfcucuuucsug			
4464	4465	873 - 895		gsasaagaGfuGfuCfuCfaucucuulL96	asAfsgAf(Agn)GfaugAfgaAfcucuuucsug			
4466	4467	873 - 895		GfsasAfaGfAtGfuGfdTcucucuulL96	asAfsgAf(Agn)GfaugAfgaAfcucuuucsug			
4468	4469	873 - 895		GfsasAfaGfAtGfuGfucucauc(Tgn)ucuuL96	asAfsgAf(Agn)GfaugAfgaAfcucuuucsug			
4470	4471	873 - 895		GfsasAfaGfAtGfuGfucucauc(Tgns)ucuuL96	asAfsgAfs(Agns)GfaugAfgaAfcucuuucsug			
4472	4473	873 - 895	AD-58632.8	GfsasAfaGfaGfuGfuCfuCfaUfcUfuCfuUfL96	asAfsgAfaGfaUfgAfgaAfcUfcUfuUfcsug	11.8	2.7	46.7
4474	4475	873 - 895		GfsasAfaGfaGfuGfuTCfuCfaUfcUfuCfuUfL96	asAfsgAfaGfaUfgAfgaAfcUfcUfuUfcsug			
4476	4477	873 - 895		GfsasAfaGfaGfuGfuCfuCfaUfcUfuCfuUfL96	asAfsgAfaGfaUfgAfgaAfcUfcUfuUfcsug			

(continuación)

SEQ ID NO: (sentido)	SEQ ID NO: (antisentido)	Sitios diana de la sec antisentido en NM_000688.4	Nombre del dúplex	Secuencia sentido (5'-3')	Secuencia antisentido (AS) (5'-3')	Prom DE nM	Prom DE nM
4478	4479	873 - 895		GfsasAfaGfaGfuGfdTCfuCfaUfcUfuCfuUfsl96	asAfsGfAfaGfaUfgAfgacAfcdTcUfuUfcsusg		
4480	4481	873 - 895		GfsasAfaGfaGfuGfdTCfuCfaUfcUfsuUfsl96	asAfsGfAfaGfaUfgAfgacAfcdTcUfuUfcsusg		
4482	4483	873 - 895		GfsasAfaGfaGfuGfdTCfuCfaUfcUfsucsuUfsl96	asAfsGfAfaGfaUfgAfgacAfcdTcUfuUfcsusg		
4484	4485	873 - 895	AD-60460.1	GfsasAfaGfaGfuGfdTCfuCfaUfc(Tgn)UfCfuUfL96	asAfsGfAfaGfaUfgAfgacAfcdTcUfuUfcsusg	14.9	5.8 60.1 6.0
4486	4487	873 - 895		GfsasAfaGfaGfuGfdTCfuCfaUfc(Tgn)UfCfuUfL96	asAfsGfAfaGfaUfgAfgacAfcdTcUfuUfcsusg		
4488	4489	873 - 895		GfsasAfaGfaGfuGfdTCfuCfaUfc(Tgn)UfCfuUfL96	asAfsGfAfaGfaUfgAfgacAfcdTcUfuUfcsusg		
4490	4491	873 - 895		GfsasAfaGfaGfuGfdTCfuCfaUfc(Tgn)UfCfuUfL96	asAfsGfAfaGfaUfgAfgacAfcdTcUfuUfcsusg		
4492	4493	873 - 895		GfsasAfaGfaGfuGfdTCfuCfaUfc(Tgn)suUfsl96	asAfsGfAfaGfaUfgAfgacAfcdTcUfuUfcsusg		
4494	4495	873 - 895		GfsasAfaGfaGfuGfdTCfuCfaUfc(Tgn)sucsuUfsl96	asAfsGfAfaGfaUfgAfgacAfcdTcUfuUfcsusg		
4496	4497	873-895	AD-60466.1	GfsasAfaGfaGfuGfdTCfuCfaUf(Cgn)UfuCfuUfsl96	asAfsGfAfaGfaUfgAfgacAfcdTcUfuUfcsusg	14.0	7.5 56.8 11.6
4498	4499	873 - 895		GfsasAfaGfaGfuGfdTCfuCfaUf(Cgn)UfuCfuUfsl96	asAfsGfAfaGfaUfgAfgacAfcdTcUfuUfcsusg		
4500	4501	873 - 895		GfsasAfaGfaGfuGfdTCfuCfaUf(Cgn)UfuCfuUfsl96	asAfsGfAfaGfaUfgAfgacAfcdTcUfuUfcsusg		
4502	4503	873 - 895		GfsasAfaGfaGfuGfdTCfuCfaUf(Cgn)UfuCfuUfsl96	asAfsGfAfaGfaUfgAfgacAfcdTcUfuUfcsusg		
4504	4505	873 - 895		GfsasAfaGfaGfuGfdTCfuCfaUf(Cgn)UfsuUfsl96	asAfsGfAfaGfaUfgAfgacAfcdTcUfuUfcsusg		
4506	4507	873 - 895		GfsasAfaGfaGfuGfdTCfuCfaUf(Cgn)UfsucsuUfsl96	asAfsGfAfaGfaUfgAfgacAfcdTcUfuUfcsusg		

Tabla 27: Secuencias adicionales de ARNip derivados de AD-58632

SEQ ID NO: (sentido)	SEQ ID NO: (antisentido)	Sitios diana de la secuencia antisentido en NM _L	Nombre del dúplex	Secuencia sentido (5'-3')	Secuencia antisentido (5'-3')
4508	4509	873 - 895	AD-58632	GfsasAfaGfaGfuGfUfCfuCfaUfcUfuCfuUfL96	asAfsGfAfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsusg
4510	4511	873 - 895	AD-60405.1	GfsasAfaGfaGfuGfuCfuCfaucuuCfuul96	asAfsGfAfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsusg
4512	4513	873 - 895	AD-60887	GfsasAfaGfaGfuGfuCfuCfaucuuCfuul96	asAfsGfAfaGfaugAfgAfcAfcucuuucsusg
4514	4515	873 - 895	AD-60923	GfsasAfaGfaGfuGfuCfuCfaucuuCfuul96	asAfsGfAfaGfaUfgAfgAfcAfcUfcUfuUfcsusg
4516	4517	873 - 895	AD-60434.1	gsasaagaGfuGfuCfuCfaucuuCfuul96	asAfsGfAfaGfaUfgAfgAfcAfcUfcUfuUfcsusg
4518	4519	873 - 895	AD-60892	gsasaagaGfuGfuCfuCfaucuuCfuul96	asAfsGfAfaGfaugAfgAfcAfcucuuucsusg
4520	4521	873 - 895	AD-60891	gsasaagaGfuGfuCfuCfaucuuCfuul96	asAfsGfAfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsusg
4522	4523	873 - 895	AD-60419.1	GfsasAfaGfAfgfuGfdTcucaucuuCfuul96	asAfsGfAfaGfaugAfgAfcAfcucuuucsusg
4524	4525	873 - 895	AD-60924	GfsasAfaGfAfgfuGfdTcucaucuuCfuul96	asAfsGfAfaGfaUfgAfgAfcAfcUfcUfuUfcsusg
4526	4527	873 - 895	AD-60885	GfsasAfaGfAfgfuGfdTcucaucuuCfuul96	asAfsGfAfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsusg
4528	4529	873 - 895	AD-60445.1	GfsasAfaGfAfgfuGfucucauc(Tgn)ucuuL96	asAfsGfAfaGfaugAfgAfcAfcucuuucsusg
4530	4531	873 - 895	AD-60925	GfsasAfaGfAfgfuGfucucauc(Tgn)ucuuL96	asAfsGfAfaGfaUfgAfgAfcAfcUfcUfuUfcsusg
4532	4533	873 - 895	AD-60890	GfsasAfaGfAfgfuGfucucauc(Tgn)ucuuL96	asAfsGfAfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsusg
4534	4535	873 - 895	AD-60926	GfsasAfaGfaGfuGfUfCfuCfaUfcUfuUfL96	asAfsGfAfaGfaUfgAfgAfcAfcUfcUfuUfcsusg

CI50 basadas en la actividad *in vitro*

De manera similar a los experimentos descritos anteriormente, se realizaron más experimentos de dosis-respuesta con una concentración final del dúplex de 10 nM, 1.66667 nM, 0.277778 nM, 0.046296 nM, 0.007716 nM, 0.001286 nM, 0.000214 nM y 3.57E-05 nM, y se calcularon las CI50.

Tabla 28: Secuencias y CI50 adicionales de AD-58632 y ARNip derivados de AD-58632

SEQ ID NO: (sentido)	SEQ ID NO: (antisentido)	Sitios diana de la sec antisentido en NM_00688.4	Nombre del dúplex	Secuencia sentido (5'-3')	Secuencia antisentido (AS) (5'-3')	CI50
4536	4537	873 - 895	AD-58632.10	GfsasAfaGfaGfuGfuCfuCfuCfaUfcUfuCfuUfL96	asAfsGAtaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsusg	0.017
4538	4539	873 - 895	AD-60405.2	GfsasAfaGfaGfuGfuCfuCfaucuuCfuul96	asAfsGAtaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsusg	0.070
4540	4541	873 - 895	AD-60887.1	GfsasAfaGfaGfuGfuCfuCfaucuuCfuul96	asAfsGAtaGfaugAfgAfcAfcucuuuucsusg	0.120
4542	4543	873 - 895	AD-60819.1	GfsasAfaGfaGfuGfuCfuCfaucuuCfuul96	asAfsGAtaGfaugAfgAfcAfcucuuuucsusg	0.009
4544	4545	873 - 895	AD-60823.1	GfsasAfaGfaGfuGfuCfuCfaucuuCfuul96	asAfsGAtaGfaugAfgacAfcucuuuucsusg	0.032
4546	4547	873 - 895	AD-60423.3	gsasaagaGfuGfuCfuCfaucuuuul96	asAfsGAtaGfaUfgAfgAfcAfcUfcUfuUfcsusg	0.020
4548	4549	873 - 895	AD-60889.1	gsasaagaGfuGfuCfuCfaucuuuul96	asAfsGAtaGfaugAfgAfcAfcucuuuucsusg	0.242
4550	4551	873 - 895	AD-60827.1	gsasaagaGfuGfuCfuCfaucuuuul96	asAfsGAtaGfaugAfgAfcAfcucuuuucsusg	0.044
4552	4553	873 - 895	AD-60831.1	gsasaagaGfuGfuCfuCfaucuuuul96	asAfsGAtaGfaugAfgacAfcucuuuucsusg	0.077
4554	4555	873 - 895	AD-60434.2	gsasaagaGfuGfuCfucauuuul96	asAfsGAtaGfaUfgAfgAfcAfcUfcUfuUfcsusg	0.028
4556	4557	873 - 895	AD-60891.1	gsasaagaGfuGfuCfucauuuul96	asAfsGAtaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsusg	0.078
4558	4559	873 - 895	AD-60892.1	gsasaagaGfuGfuCfucauuuul96	asAfsGAtaGfaugAfgAfcAfcucuuuucsusg	0.138
4560	4561	873 - 895	AD-60835.1	gsasaagaGfuGfuCfucauuuul96	asAfsGAtaGfaugAfgAfcAfcucuuuucsusg	0.015
4562	4563	873 - 895	AD-60839.1	gsasaagaGfuGfuCfucauuuul96	asAfsGAtaGfaugAfgacAfcucuuuucsusg	0.014
4564	4565	873 - 895	AD-60419.2	GfsasAfaGfaGfuGfuTcucauuuulL96	asAfsGAtaGfaugAfgAfcAfcucuuuucsusg	0.014
4566	4567	873 - 895	AD-60885.1	GfsasAfaGfaGfuGfuTcucauuuulL96	asAfsGAtaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsusg	0.091
4568	4569	873 - 895	AD-60419.3	GfsasAfaGfaGfuGfuTcucauuuulL96	asAfsGAtaGfaugAfgAfcAfcucuuuucsusg	0.026
4570	4571	873 - 895	AD-60843.1	GfsasAfaGfaGfuGfuTcucauuuulL96	asAfsGAtaGfaugAfgAfcAfcucuuuucsusg	0.004
4572	4573	873 - 895	AD-60847.1	GfsasAfaGfaGfuGfuTcucauuuulL96	asAfsGAtaGfaugAfgacAfcucuuuucsusg	0.012
4574	4575	873 - 895	AD-60445.2	GfsasAfaGfaGfuGfucuauc(Tgn)uuuL96	asAfsGAtaGfaugAfgAfcAfcucuuuucsusg	0.077

(continuación)

SEQ ID NO: (sentido)	SEQ ID NO: (antisentido)	Sitios diana de la sec. antisentido en NM_00688.4	Nombre del duplex	Secuencia sentido (5'-3')	Secuencia antisentido (AS) (5'-3')	
4576	4577	873 - 895	AD-60890.1	GfsasAfaGfAfGfuGfucucauc(Tgn)ucuu L96	asAfsgAfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsusg	CI50
4578	4579	873 - 895	AD-60445.3	GfsasAfaGfAfGfuGfucucauc(Tgn)ucuu L96	asAfsGfAfaGfaugAfgAfcAfcucuuucsusg	1.201
4580	4581	873 - 895	AD-60820.1	GfsasAfaGfAfGfuGfucucauc(Tgn)ucuu L96	asAfsgAfaGfaugAfgAfcAfcucuuucsusg	0.302
4582	4583	873 - 895	AD-60824.1	GfsasAfaGfAfGfuGfucucauc(Tgn)ucuu L96	asAfsgAfaGfaugAfgacAfcucuuucsusg	0.006
4584	4585	873 - 895	AD-60480.2	GfsasAfaGfAfgfuGfuCfuCfaUfcUfuCfu uL96	asAfsgAf(Agn)GfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsu sg	0.032
4586	4587	873 - 895	AD-60893.1	gsasaagaGfuGfuCfuCfaucuuuL96	asAfsgAf(Agn)GfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsu sg	0.066
4588	4589	873 - 895	AD-60884.1	gsasaagaGfuGfuCfuCfaucuuuL96	asAfsgAf(Agn)GfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsu sg	0.034
4590	4591	873 - 895	AD-60886.1	GfsasAfaGfAfGfuGfuCfaucuuuL96	asAfsgAf(Agn)GfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsu sg	0.157
4592	4593	873 - 895	AD-60888.1	GfsasAfaGfAfGfuGfucucauc(Tgn)ucuu L96	asAfsgAf(Agn)GfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsu sg	0.801
4594	4595	873 - 895	AD-60828.1	GfsasAfaGfAfGfuGfucucauc(Tgns)uc uuL96	asAfsgAfs(Agns)GfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfc susg	0.201
4596	4597	873 - 895	AD-60832.1	GfsasAfaGfAfgfuGfuCfuCfaUfcUfuCfu uL96	asAfsgAf(Agn)GfaugAfgacAfcucuuucsusg	0.145
4598	4599	873 - 895	AD-60836.1	gsasaagaGfuGfuCfuCfaucuuuL96	asAfsgAf(Agn)GfaugAfgacAfcucuuucsusg	0.036
4600	4601	873 - 895	AD-60840.1	gsasaagaGfuGfuCfuCfaucuuuL96	asAfsgAf(Agn)GfaugAfgacAfcucuuucsusg	0.076
4602	4603	873 - 895	AD-60844.1	GfsasAfaGfAfGfuGfuCfaucuuuL96	asAfsgAf(Agn)GfaugAfgacAfcucuuucsusg	0.033
4604	4605	873 - 895	AD-60848.1	GfsasAfaGfAfGfuGfucucauc(Tgn)ucuu L96	asAfsgAf(Agn)GfaugAfgacAfcucuuucsusg	0.017
4606	4607	873 - 895	AD-60821.1	GfsasAfaGfAfGfuGfucucauc(Tgns)uc uuL96	asAfsgAfs(Agns)GfaugAfgacAfcucuuucsus g	0.007
4608	4609	873 - 895	AD-58632.11	GfsasAfaGfAfgfuGfuCfuCfaUfcUfuCfu uL96	asAfsgAfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsusg	0.076
4610	4611	873 - 895	AD-60825.1	GfsasAfaGfAfgfuGfuCfuCfaUfcUfuCf uL96	asAfsgAfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsusg	0.063
					asAfsgAfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsusg	0.031

(continuación)

SEQ ID NO: (sentido)	SEQ ID NO: (antisentido)	Sitios diana de la sec antisentido en NM_00688.4	Nombre del dúplex	Secuencia sentido (5'-3')	Secuencia antisentido (AS) (5'-3')	
4612	4613	873 - 895	AD-60829.1	GfsasAfaGfaGfuGfdUfcuGfaUfcUfuCfuUfL96	asAfsGfAfaGfaUfgAfgacAfcdTcUfuUfcsug	CI50
4614	4615	873 - 895	AD-60833.1	GfsasAfaGfaGfuGfdTCfuCfaUfcUfuCfuUfL96	asAfsGfAfaGfaUfgAfgacAfcdTcUfuUfcsug	0.033
4616	4617	873 - 895	AD-60837.1	GfsasAfaGfaGfuGfdTCfuCfaUfcUfuCfuUfL96	asAfsGfAfaGfaUfgAfgacAfcdTcUfuUfcsug	0.100
4618	4619	873 - 895	AD-60841.1	GfsasAfaGfaGfuGfdTCfuCfaUfcUfuCfuUfL96	asAfsGfAfaGfaUfgAfgacAfcdTcUfuUfcsug	0.031
4620	4621	873 - 895	AD-60460.2	GfsasAfaGfaGfuGfdTCfuCfaUfc(Tgn)uUfL96	asAfsGfAfaGfaUfgAfgacAfcdTcUfuUfcsug	0.010
4622	4623	873 - 895	AD-60845.1	GfsasAfaGfaGfuGfdTCfuCfaUfc(Tgn)uUfL96	asAfsGfAfaGfaUfgAfgacAfcdTcUfuUfcsug	0.009
4624	4625	873 - 895	AD-60849.1	GfsasAfaGfaGfuGfdTCfuCfaUfc(Tgn)uUfL96	asAfsGfAfaGfaUfgAfgacAfcdTcUfuUfcsug	0.002
4626	4627	873 - 895	AD-60822.1	GfsasAfaGfaGfuGfdTCfuCfaUfc(Tgn)uUfL96	asAfsGfAfaGfaUfgAfgacAfcdTcUfuUfcsug	0.005
4628	4629	873 - 895	AD-60826.1	GfsasAfaGfaGfuGfdTCfuCfaUfc(Tgn)uUfL96	asAfsGfAfaGfaUfgAfgacAfcdTcUfuUfcsug	0.007
4630	4631	873 - 895	AD-60830.1	GfsasAfaGfaGfuGfdTCfuCfaUfc(Tgn)uUfL96	asAfsGfAfaGfaUfgAfgacAfcdTcUfuUfcsug	0.009
4632	4633	873 - 895	AD-60466.2	GfsasAfaGfaGfuGfdTCfuCfaUfc(Cgn)UfUfL96	asAfsGfAfaGfaUfgAfgacAfcdTcUfuUfcsug	0.019
4634	4635	873 - 895	AD-60834.1	GfsasAfaGfaGfuGfdTCfuCfaUfc(Cgn)UfUfL96	asAfsGfAfaGfaUfgAfgacAfcdTcUfuUfcsug	0.066
4636	4637	873 - 895	AD-60838.1	GfsasAfaGfaGfuGfdTCfuCfaUfc(Cgn)UfUfL96	asAfsGfAfaGfaUfgAfgacAfcdTcUfuUfcsug	0.024
4638	4639	873 - 895	AD-60842.1	GfsasAfaGfaGfuGfdTCfuCfaUfc(Cgn)UfUfL96	asAfsGfAfaGfaUfgAfgacAfcdTcUfuUfcsug	0.013
4640	4641	873 - 895	AD-60846.1	GfsasAfaGfaGfuGfdTCfuCfaUfc(Cgn)UfUfL96	asAfsGfAfaGfaUfgAfgacAfcdTcUfuUfcsug	0.010
4642	4643	873 - 895	AD-60850.1	GfsasAfaGfaGfuGfdTCfuCfaUfc(Cgn)UfUfL96	asAfsGfAfaGfaUfgAfgacAfcdTcUfuUfcsug	0.011
						0.018

Como se muestra en la Tabla 28, los siguientes dúplex tuvieron una CI50 inferior a 0.01 nM: AD-60845, AD-60843, AD-60849, AD-60820, AD-60848, AD-60822, AD-60826, AD-60819 y AD-60460.

5 Los siguientes dúplex tuvieron una CI50 inferior a 0.02 nM: AD-60845, AD-60843, AD-60849, AD-60820, AD-60848, AD-60822, AD-60826, AD-60819, y AD-60460, AD-60841, AD-60842, AD-60846, AD-60847, AD-60838, AD-60419, AD-60839, AD-60835, AD-586320, AD-60844, AD-60850 y AD-60830.

Los siguientes dúplex tuvieron una CI50 inferior a 0.05 nM: AD-60845, AD-60843, AD-60849, AD-60820, AD-60848, AD-60822, AD-60826, AD-60819, y AD-60460, AD-60841, AD-60842, AD-60846, AD-60847, AD-60838, AD-60419, AD-60839, AD-60835, AD-586320, AD-60844, AD-60850, AD-60830, AD-60423, AD-60834, AD-60419, AD-60434, AD-60825, AD-60837, AD-60823, AD-60824, AD-60840, AD-60829, AD-60893, AD-60832 y AD-60827.

10 **Ejemplo 25: Estudios de la relación estructura-actividad *in vivo* de AD-58632**

Se generaron derivados del ARNip original AD-58632 y se cribaron *in vivo* en ratas. Las secuencias de ARNip que se cribaron se proporcionan en la siguiente tabla.

Tabla 29: Secuencias de dúplex de ARNip de ALAS1

SEQ ID NO: (sentido)	SEQ ID NO: (antisentido)	Sitios diana de la secuencia antisentido en NM_000688.4	Nombre del dúplex	Secuencia sentido (5'-3')	Secuencia antisentido (5'-3')
4644	4645	873 - 895	AD-58632	GfsasAfaGfaGfuGfuCfuCfaUfcUfuCfuUfL96	asAfsGfAfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfu Ufcsusg
4646	4647	873 - 895	AD-60405	GfsasAfaGfaGfuGfuCfuCfaucuuCfuul96	asAfsGfAfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsusg
4648	4649	873 - 895	AD-60887	GfsasAfaGfaGfuGfuCfuCfaucuuCfuul96	asAfsGfAfaGfaugAfgAfcAfcucuuucsusg
4650	4651	873 - 895	AD-60923	gsasaagaGfuGfuCfuCfaucuuCfuul96	asAfsGfAfaGfaUfgAfgAfcAfcUfcUfuUfcsusg
4652	4653	873 - 895	AD-60434	gsasaagaGfuGfuCfuCfaucuuCfuul96	asAfsGfAfaGfaUfgAfgAfcAfcUfcUfuUfcsusg
4654	4655	873 - 895	AD-60892	gsasaagaGfuGfuCfuCfaucuuCfuul96	asAfsGfAfaGfaugAfgAfcAfcucuuucsusg
4656	4657	873 - 895	AD-60419	GfsasAfaGfAfGfuGfdTcucaucuuCfuul96	asAfsGfAfaGfaugAfgAfcAfcucuuucsusg
4658	4659	873 - 895	AD-60924	GfsasAfaGfAfGfuGfdTcucaucuuCfuul96	asAfsGfAfaGfaUfgAfgAfcAfcUfcUfuUfcsusg
4660	4661	873 - 895	AD-60445	GfsasAfaGfAfGfuGfucucauc(Tgn)ucuuL96	asAfsGfAfaGfaugAfgAfcAfcucuuucsusg
4662	4663	873 - 895	AD-60925	GfsasAfaGfAfGfuGfucucauc(Tgn)ucuuL96	asAfsGfAfaGfaUfgAfgAfcAfcUfcUfuUfcsusg
4664	4665	873 - 895	AD-60926	GfsasAfaGfaGfuGfuCfuCfaUfcUfuCfuUfL96	asAfsGfAfaGfaUfgAfgAfcAfcUfcUfuUfcsusg

Se administró una única dosis de 5 mg/kg de ARNip. El día 5 tras la administración del ARNip, se realizaron medidas del ARNm de ALAS1 de rata (rALAS1) y ARNm de GAPDH de rata (rGAPDH) utilizando un ensayo de ADN_r, y se determinaron los niveles tisulares del fármaco utilizando qPCR. Los resultados se proporcionan en la FIG. 33 y FIG. 34. Como se muestra en la FIG. 33, al menos diez dúplex (AD-60405, AD-60887, AD-60923, AD-60434, AD-60892, AD-60419, AD-60924, AD-60445, AD-60925 y AD-60926) que se cribaron mostraron una mejora de la supresión del ARNm de ALAS1 en comparación con AD-58632. Además, como se muestra en la FIG. 34, estos dúplex (con la excepción de AD-60926) lograron concentraciones hepáticas más elevadas que AD-58632.

Ejemplo 26: Eficacia de AD-60925 y AD-60926 en un modelo de AIP en rata

Se estudió la eficacia terapéutica de AD-60925 y AD-60926 (descritos en el ejemplo anterior) en un modelo de AIP en rata. Se muestra el diseño experimental en la parte superior de la FIG. 35. Las ratas fueron tratadas con PBS o 3 mg/kg de ARNip de ALAS1-GalNAc tres veces por semana, fenobarbital (PB) y ARNip de PBGD en una formulación de LNP AF11 (AF11-PBGD) en los momentos indicados en la FIG. 35. Las ratas de control recibieron el ARNip de PBGD solo, sin inducción con fenobarbital.

Los resultados se muestran en la FIG. 35, FIG. 36 y FIG. 37. Administrar fenobarbital indujo la expresión de ARNm de ALAS1 e incrementó los niveles de PBG y ALA en orina, en comparación con el control. El tratamiento con un total de ocho dosis de 3 mg/kg de AD-60925 o AD-60926 tres veces a la semana suprimió el ARNm de ALAS1 (FIG. 35), PBG en orina (FIG. 36 y FIG. 37, parte superior) y ALA en orina (FIG. 36 y FIG. 37, parte inferior). El fenobarbital indujo incrementos en ARNm de ALAS1, PBG y ALA en orina. La evolución temporal de los efectos del tratamiento se muestra en la FIG. 37. Las flechas indican los puntos temporales en los que se administró PB. El tratamiento con ARNip previno los incrementos inducidos por fenobarbital en ARNm de ALAS1, PBG y ALA en orina.

Tanto AD-60925 como AD-60926 mostraron la eficacia terapéutica del tratamiento de AIP. AD-60925 fue aún más eficaz que AD-60926 al suprimir ARNm de ALAS1, ALA en orina y PBG en orina.

Ejemplo 27: Estudios adicionales de la relación estructura-actividad *in vivo* de AD-58632

Se generaron y cribaron *in vivo* en ratas derivados del ARNip original AD-58632.

Cribado *in vivo*, parte I

Las secuencias de los ARNip que se cribaron se proporcionan en la siguiente tabla.

Tabla 30: Secuencias de dúplex de ARNip de ALAS1

SEQ ID NO: (sentido)	SEQ ID NO: (antisentido)	Sitios diana de secuencia antisentido en NM_000688.4	Nombre del dúplex	Secuencia sentido (5'-3')	Secuencia antisentido (5'-3')
4666	4667	873 - 895	AD-58832	GfsasAfaGfaGfuGfUfCfuCfaUfcUfuCfuUfL96	asAfsGafaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsusg
4668	4669	873 - 895	AD-60820	GfsasAfaGfAfGfuGfucucauc(Tgn)jucuulL96	asAfsGafaGfaGfaugAfgAfcAfcucuucsusg
4670	4671	873 - 895	AD-60824	GfsasAfaGfAfGfuGfucucauc(Tgn)jucuulL96	asAfsGafaGfaGfaugAfgAfcAfcucuucsusg
4672	4673	873 - 895	AD-61137	GfsasAfaGfAfGfuGfucucauc(Tgn)jucuulL96	asAfsGafaGfaUfgAfgAfcAfcUfuUfcsusg
4674	4675	873 - 895	AD-60843	GfsasAfaGfAfGfuGfdTcucaucucuulL96	asAfsGafaGfaGfaugAfgAfcAfcucuucsusg
4676	4677	873 - 895	AD-60847	GfsasAfaGfAfGfuGfdTcucaucucuulL96	asAfsGafaGfaGfaugAfgAfcAfcucuucsusg
4678	4679	873 - 895	AD-61138	GfsasAfaGfAfGfuGfdTcucaucucuulL96	asAfsGafaGfaUfgAfgAfcAfcUfuUfcsusg
4680	4681	873 - 895	AD-60819	GfsasAfaGfaGfuGfuCfuCfaucuuCfuulL96	asAfsGafaGfaGfaugAfgAfcAfcucuucsusg
4682	4683	873 - 895	AD-60823	GfsasAfaGfaGfuGfuCfuCfaucuuCfuulL96	asAfsGafaGfaGfaugAfgAfcAfcucuucsusg
4684	4685	873 - 895	AD-61139	GfsasAfaGfaGfuGfuCfuCfaucuuCfuulL96	asAfsGafaGfaUfgAfgAfcAfcUfuUfcsusg
4686	4687	873 - 895	AD-61140	GfsasAfaGfaGfuGfdTcuCfaUfc(Tgn)juCfuUfL96	asAfsGafaGfaGfaugAfgAfcAfcucuucsusg

A las ratas se les administraron cuatro dosis de 2.5 mg/kg de ARNip bisemanalmente (dos veces por semana) durante dos semanas. 72 horas después de la administración de la última dosis de ARNip, se sacrificaron los animales y se realizaron medidas de los niveles de ARNm de ALAS1 de rata (rALAS1) y ARNm de GAPDH de rata (rGAPDH) utilizando el ensayo de ADNr.

- 5 Como se muestra en la FIG. 38, al menos cuatro de los ARNip (AD-60820, AD-60843, AD-60819 y AD-61140) que se estudiaron mostraron una mejora de la supresión del ARNm de ALAS1 en comparación con AD-58632.

Cribado *in vivo*, parte II

Las secuencias de los ARNip que se cribaron se proporcionan en la siguiente tabla.

Tabla 31 Secuencias de dúplex de ARNip de ALAS1

SEQ ID (sentido)	NO:	SEQ ID (antisentido)	NO:	Símbolos de la secuencia antisentido en NM_000688.4	Nombre del dúplex	Secuencia sentido (5'-3')	Secuencia antisentido (5'-3')
4688		4689		873 - 895	AD-58632	GfsasAfaGfaGfuGfUfCfuCfaUfcUfuCfuUfL96	asAfsGafaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsusg
4690		4691		873 - 895	AD-61141.2	GfsasAfaGfaGfuGfUfCfuCfaUfc(Tgn)UfCfuUfL96	asAfsGafaGfaUfgAfgacAfcucuuucsusg
4692		4693		873 - 895	AD-61142.2	GfsasAfaGfaGfuGfUfCfuCfaUfc(Tgn)UfCfuUfL96	asAfsGafaGfaUfgAfgAfcAfcUfcUfuUfcsusg
4694		4695		873 - 895	AD-60835	gsasaagaGfuGfuCfucaucuuuL96	asAfsGafaGfaugAfgAfcAfcucuuucsusg
4696		4697		873 - 895	AD-60839	gsasaagaGfuGfuCfucaucuuuL96	asAfsGafaGfaugAfgacAfcucuuucsusg
4698		4699		873 - 895	AD-61143.2	gsasaagaGfuGfuCfucaucuuuL96	asAfsGafaGfaUfgAfgAfcAfcUfcUfuUfcsusg
4700		4701		873 - 895	AD-61144.1	gsasaagaGfuGfdTCfucaucuuuL96	asAfsGafaGfaugAfgAfcAfcucuuucsusg
4702		4703		873 - 895	AD-61145.1	gsasaagaGfuGfdTCfucaucuuuL96	asAfsGafaGfaugAfgacAfcucuuucsusg
4704		4705		873 - 895	AD-61146.1	gsasaagaGfuGfdTCfucaucuuuL96	asAfsGafaGfaUfgAfgAfcAfcUfcUfuUfcsusg

A las ratas se les administró una única dosis de 2.5 mg/kg de ARNip. 72 horas después de la administración del ARNip, se realizaron medidas de ARNm de los niveles de ARNm de ALAS1 de rata (rALAS1) y ARNm de GAPDH de rata (rGAPDH) utilizando el ensayo de ADNr.

5 Como se muestra en la FIG. 39, los ARNip AD-61141, AD-61142, AD-60835, AD-60839, AD-61143, AD-61144, AD-61145 y AD-61146 mostraron una mejora de la supresión de ARNm de ALAS1 en comparación con AD-58632. El ARNip que proporcionó la supresión mayor en este experimento fue AD-60835.

Ejemplo 28: Estudios de la relación estructura-actividad *in vitro* de AD-60489

10 Se generaron AD-60489 y ARNip derivados de AD-60489 y algunos ARNip se cribaron *in vitro* para determinar su actividad. La actividad *in vitro* de los ARNip para suprimir el ARNm de ALAS1 se estudió tal como se ha descrito en el Ejemplo 24. Las secuencias de ARNip y los resultados de los estudios *in vitro* se proporcionan en las siguientes tablas.

Tabla 32: Secuencias y resultados del cribado *in vitro* para AD-60489 y ARNip derivados de AD-60489

SEQ ID NO: (sentido)	SEQ ID NO: (antisentido)	Sitios de antisentido en NM_000688.4	Nombre del sec del antisentido en dúplex*	Secuencia sentido (5'-3')	Secuencia antisentido (AS) (5'-3')	Prom 10 nM	DE 10 nM	Prom 0.1 nM	DE 0.1 nM
4706	4707	871-893	AD-60489.1	CfsasGfaAfaGfaGfuGfuCfuCfaUfcUfuAflL96	usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcUfuUfcUfgsgsu	17.02	0.18	50.65	5.11
4708	4709	871-893	AD-60495.1	CfsasGfaAfaGfaGfuGfuCfuCfaucuuAflL96	usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcUfuUfcUfgsgsu	17.13	5.94	63.58	18.61
4710	4711	871 - 893	AD-60501.1	CfsasGfaAfaGfaGfuGfuCfuCfaucuuAflL96	usAfsaGfaUfgAfgAfcAfcUfcUfuUfcUfgsgsu	11.90	0.66	45.19	8.93
4712	4713	871 - 893	AD-60507.1	CfsasgaaaGfaGfuGfuCfuCfaucuuAflL96	usAfsaGfaUfgAfgAfcAfcUfcUfuUfcUfgsgsu	14.63	7.85	48.50	19.55
4714	4715	871 - 893	AD-60513.1	CfsasgaaaGfaGfuGfuCfuCfaucuuAflL96	usAfsaGfaUfgAfgAfcAfcUfcUfuUfcUfgsgsu	14.39	2.44	51.03	7.01
4716	4717	871 - 893	AD-60519.1	csasgaaaGfaGfuGfuCfuCfaucuuAflL96	usAfsaGfaUfgAfgAfcAfcUfcUfuUfcUfgsgsu	14.67	4.88	51.70	7.72
4718	4719	871 - 893	AD-60525.1	csasgaaaGfaGfuguCfuCfaucuuAflL96	usAfsaGfaUfgAfgAfcAfcUfcUfuUfcUfgsgsu	45.24	18.1 6	105.09	14.17
4720	4721	871 - 893	AD-60531.1	csasgaaaGfaGfuguCfuCfaucuuAflL96	usAfsaGfaUfgAfgAfcAfcUfcUfuUfcUfgsgsu	62.19	12.4 7	107.18	1.37
4722	4723	871 - 893	AD-60490.1	csasgaaaGfaGfugucucaucuualL96	usAfsaGfaUfgAfgAfcAfcUfcUfuUfcUfgsgsu	39.06	10.9 2	82.70	10.67
4724	4725	871 - 893	AD-60496.1	csasgaaaGfaGfugucucaucuualL96	usAfsaGfaUfgAfgAfcAfcUfcUfuUfcUfgsgsu	48.90	1.85	71.55	5.47
4726	4727	871 - 893	AD-60502.1	csasgaaaGfaGfugucucaucuualL96	usAfsaGfaUfgAfgAfcAfcUfcUfuUfcUfgsgsu	51.83	12.6 2	81.85	4.25
4728	4729	871 - 893	AD-60508.1	csasgaaaGfaGfugucucaucuualL96	usAfsaGfaUfgAfgAfcAfcUfcUfuUfcUfgsgsu	65.34	21.7 5	89.23	11.08
4730	4731	871-893	AD-60514.1	csasgaaaGfaGfugucucaucuualL96	usAfsaGfaUfgAfgAfcAfcAfcucuucuugsgsu	97.13	3.47	102.94	7.36
4732	4733	871-893	AD-60520.1	csasgaaaGfaGfugucucaucuualL96	usAfsaGfaugAfgAfcAfcucuucuugsgsu	104.9 7	0.93	126.75	20.47
4734	4735	871-893	AD-60526.1	csasgaaaGfaGfugucucaucuualL96	usAfsaGfaugAfgAfcAfcucuucuugsgsu	61.48	15.4 4	81.28	7.99
4736	4737	871-893	AD-60532.1	csasgaaaGfaGfugucucaucuualL96	usAfsaGfaugAfgAfcAfcdTcuucuugsgsu	83.47	13.3 6	94.13	8.11

(continuación)

SEQ ID NO: (sentido)	SEQ ID NO: (antisentido)	Sitios de antisentido en NM_000688.4	Nombre del secuencia en dúplex*	Secuencia sentido (5'-3')	Secuencia antisentido (AS) (5'-3')	Prom 10 nM	DE 10 nM	Prom 0.1 nM	DE 0.1 nM
4738	4739	871-893	AD-60491.1	csasgaAfaGfAfGfugucucauuaL96	usAfsAfGfaugAfGfAfcdTcuuucugsgsu	109.05	0.43	97.85	9.77
4740	4741	871-893	AD-60497.1	CfsasgaAfaGfAfGfugucucauuaL96	usAfsAfGfaugAfGfAfcdTcuuucugsgsu	73.81	10.17	95.01	5.40
4742	4743	871-893	AD-60503.1	csasgaaaGfAfGfudGucucucauuaL96	usAfsAfGfaugAfGfAfcdTcuuucugsgsu	75.30	11.29	96.03	6.30
4744	4745	871-893	AD-60509.1	csasgaaaGfAfGfudGucucucauuaL96	usAfsAfGfaugAfGfAfcdTcuuucugsgsu	71.37	24.41	104.36	18.62
4746	4747	871-893	AD-60515.1	csasgaaaGfAfGfugucudCaucucauuaL96	usAfsAfGfaugAfGfAfcdTcuuucugsgsu	64.16	13.95	98.80	0.92
4748	4749	871-893	AD-60521.1	csasgaaaGfAfGfugucudTcuuaL96	usAfsAfGfaugAfGfAfcdTcuuucugsgsu	73.99	36.39	99.96	7.29
4750	4751	871-893	AD-60527.1	csasgaaaGfAfGfugucucaudTuaL96	usAfsAfGfaugAfGfAfcdTcuuucugsgsu	82.69	26.56	114.13	4.81
4752	4753	871-893	AD-60533.1	csasgaaaGfAfGfudGudCucucauuaL96	usAfsAfGfaugAfGfAfcdTcuuucugsgsu	89.41	4.69	107.40	9.67
4754	4755	871-893	AD-60492.1	csasgaaaGfAfGfudGucudCaucucauuaL96	usAfsAfGfaugAfGfAfcdTcuuucugsgsu	83.52	1.56	100.70	0.79
4756	4757	871-893	AD-60498.1	csasgaaaGfAfGfudGucucadTcuuaL96	usAfsAfGfaugAfGfAfcdTcuuucugsgsu	64.64	16.21	98.41	19.60
4758	4759	871-893	AD-60504.1	csasgaaaGfAfGfudGudCucadTcuuaL96	usAfsAfGfaugAfGfAfcdTcuuucugsgsu	57.55	5.13	93.14	0.41
4760	4761	871-893	AD-60510.1	csasgaaaGfAfGfudGudCudCadTcuuaL96	usAfsAfGfaugAfGfAfcdTcuuucugsgsu	58.88	25.48	91.39	2.06
4762	4763	871-893	AD-60516.1	csasgaaaGfAfGfugucucauuaL96	usAfsAfGfadTgAfGfAfcdTcuuucugsgsu	53.24	6.56	84.40	2.73
4764	4765	871-893	AD-60522.1	csasgaAfaGfAfGfugucucauuaL96	usAfsAfGfadTgAfGfAfcdTcuuucugsgsu	67.17	6.48	91.62	5.43
4766	4767	871-893	AD-60528.1	CfsasgaAfaGfAfGfugucucauuaL96	usAfsAfGfadTgAfGfAfcdTcuuucugsgsu	81.44	37.04	89.71	8.60
4768	4769	871-893	AD-60534.1	csasgaaaGfAfGfugucucauuaL96	usAfsAfGfaugAfGfAfcdTcdTuuucugsgsu	62.63	20.55	99.62	7.37

(continuación)

SEQ ID NO: (sentido)	SEQ ID NO: (antisentido)	Sitios de antisentido en NM_000688.4	Nombre del sec del dúplex*	Secuencia sentido (5'-3')	Secuencia antisentido (AS) (5'-3')	Prom 10 nM	DE 10 nM	Prom 0.1 nM	DE 0.1 nM
4770	4771	871-893	AD-60493.1	csasgaaaGfAfGfugucucaucuaaL96	usAfsAfGfaugAfGfAfcdTcuudTcugsgsu	107.18	0.11	87.98	2.41
4772	4773	871-893	AD-60499.1	csasgaaaGfAfGfugucucaucuaaL96	usAfsAfGfiadTgAfGfAfcd cuudTcugsgsu	35.92	13.78	77.52	6.68
4774	4775	871-893	AD-60505.1	csasgaaaGfAfGfugucucaucuaaL96	usAfsAfGfiagAfGfAfcd(Tgn)cuuucugsgsu	66.77	16.45	109.82	2.48
4776	4777	871-893	AD-60511.1	csasgaAfaGfAfGfugucucaucuaaL96	usAfsAfGfiagAfGfAfcd(Tgn)cuuucugsgsu	82.10	10.11	95.50	14.73
4778	4779	871-893	AD-60517.1	CfsasgaAfaGfAfGfugucucaucuaaL96	usAfsAfGfiagAfGfAfcd(Tgn)cuuucugsgsu	80.83	29.69	93.57	18.41
4780	4781	871-893	AD-60523.1	GfsasGfaAfaGfaGfUfGfuCfuCfaUfcUfuAfL96	usAfsaGfaUfgAfGfAfcdUfcUfuUfcUfcscsa	29.60	1.64	67.16	8.40
4782	4783	871-893	AD-60529.1	GfsusGfaAfaGfaGfUfGfuCfuCfaUfcUfuAfL96	usAfsaGfaUfgAfGfAfcdUfcUfuUfcUfcscsa	21.15	1.21	79.02	28.99
4784	4785	871-893	AD-60535.1	GfsusCfaAfaGfaGfUfGfuCfuCfaUfcUfuAfL96	usAfsaGfaUfgAfGfAfcdUfcUfuUfgAfcdscsa	31.78	13.54	79.36	26.56
4786	4787	871-893	AD-60494.1	GfsusCfaAfaGfaGfUfGfuCfuCfaUfcUfuAfL96	usAfsaGfaUfgAfGfAfcdUfcUfuUfgAfcdscsu	30.14	3.42	81.46	12.88
4788	4789	871-893	AD-60500.1	CfsusCfuAfaGfaGfUfGfuCfuCfaUfcUfuAfL96	usAfsaGfaUfgAfGfAfcdUfcUfuUfgAfcdscsu	29.85	11.78	72.14	4.56
4790	4791	871-893	AD-60506.1	CfsusCfuUfaGfaGfUfGfuCfuCfaUfcUfuAfL96	usAfsaGfaUfgAfGfAfcdUfcUfaAfgUfgsgsu	19.06	1.98	88.93	11.13
4792	4793	871-893	AD-60512.1	CfsusGfuUfuGfaGfUfGfuCfuCfaUfcUfuAfL96	usAfsaGfaUfgAfGfAfcdUfcAfaAfcUfgsgsu	29.71	1.79	86.32	17.69
4794	4795	871-893	AD-60518.1	CfsasGfaAfaGfaGfUfGfuCfuCfaUfcUfuAfL96	(Tgns)AfsaGfaUfgAfGfAfcdUfcUfuUfcUfgsgsu	27.47	2.59	81.03	10.93
4796	4797	871-893	AD-60524.1	CfsasGfaAfaGfaGfUfGfuCfuCfaUfcUfuAfL96	usAfs(Agn)GfaUfgAfGfAfcdUfcUfuUfcUfgsgsu	17.02	1.39	71.65	17.42
4798	4799	871-893	n/a	CfsasGfaAfaGfaGfUfGfuCfuCfaUfcUfuAfL96	usAfsa(Ggn)aUfgAfGfAfcdUfcUfuUfcUfgsgsu				
4800	4801	871-893	AD-60536.1	CfsasGfaAfaGfaGfUfGfuCfuCfaUfcUfuAfL96	usAfsaGf(Agn)aUfgAfGfAfcdUfcUfuUfcUfgsgsu	61.77	10.19	91.55	2.20

(continuación)

SEQ ID NO: (sentido)	SEQ ID NO: (antisentido)	Sitios de antisentido en NM_000688.4	Nombre del secuencia en dúplex*	Secuencia sentido (5'-3')	Secuencia antisentido (AS) (5'-3')	Prom 10 nM	DE 10 nM	Prom 0.1 nM	DE 0.1 nM
4802	4803	871-893	AD-60541.1	CfsasGfaAfaGfaGfUfGfuCfuCfaUfcUfuAfL96	usAfsaGfa(Tgn)gAfgAfcacUfcUfuUfcUfgsgs	25.47	2.83	54.36	15.02
4804	4805	871-893	AD-60546.1	CfsasGfaAfaGfaGfUfGfuCfuCfaUfcUfuAfL96	usAfsaGfaUf(Ggn)AfgAfcacUfcUfuUfcUfgsg	49.32	1.50	90.79	11.36
4806	4807	871-893	AD-60551.1	CfsasGfaAfaGfaGfUfGfuCfuCfaUfcUfuAfL96	usAfsaGfaUfg(Agn)gAfgAfcacUfcUfuUfcUfgsgs	24.37	1.11	76.80	24.99
4808	4809	871-893	AD-60556.1	CfsasGfaAfaGfaGfUfGfuCfuCfaUfcUfuAfL96	usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcUfuUfcUfgsg	21.43	4.71	61.90	5.64
4810	4811	871-893	AD-60561.1	CfsasGfaAfaGfaGfUfGfuCfuCfaUfcUfuAfL96	usAfsaGfaUfgAfg(Agn)cacUfcUfuUfcUfgsgs	28.25	6.41	71.84	27.01
4812	4813	871-893	AD-60566.1	CfsasGfaAfaGfaGfUfGfuCfuCfaUfcUfuAfL96	usAfsaGfaUfgAfgAfc(Cgn)acUfcUfuUfcUfgsg	27.57	4.87	67.91	18.28
4814	4815	871-893	AD-60570.1	CfsasGfaAfaGfaGfUfGfuCfuCfaUfcUfuAfL96	usAfsaGfaUfgAfgAfc(Agn)cUfcUfuUfcUfgsg	24.11	0.04	58.75	21.02
4816	4817	871-893	AD-60583.1	CfsasGfaAfaGfaGfUfGfuCfuCfaUfcUfuAfL96	asAfsaGfaGfaUfgAfgAfcUfcUfuUfcUfgsg	15.32	4.78	42.01	9.51
4818	4819	871-893	AD-60585.1	CfsasGfaAfaGfaGfUfGfuCfuCfaUfcUfuAfL96	asAfsaGfaGfaUfgAfgAfcUfcUfuUfcUfgsg	21.15	4.14	49.54	13.34
4820	4821	871-893	AD-60587.1	CfsasGfaAfaGfaGfUfGfuCfuCfaUfcUfuAfL96	asAfsaGfaGfaUfgAfgAfcUfcUfuUfcUfgsg	14.66	1.73	41.47	13.20
4822	4823	871-893	AD-60589.1	CfsasGfaAfaGfaGfUfGfuCfuCfaUfcUfuAfL96	asAfsaGfaGfaUfgAfgAfcUfcUfuUfcUfgsg	20.77	5.12	43.97	15.63
4824	4825	871-893	AD-60591.1	CfsasGfaAfaGfaGfUfGfuCfuCfaUfcUfuAfL96	asAfsaGfaGfaUfgAfgAfcUfcUfuUfcUfgsg	13.66	0.05	36.42	16.94
4826	4827	871-893	AD-60592.1	CfsasGfaAfaGfaGfUfGfuCfuCfaUfcUfuAfL96	asAfsaGfaGfaUfgAfgAfcUfcUfuUfcUfgsg	13.35	4.11	35.43	11.36
4828	4829	871-893	AD-60593.1	CfsasGfaAfaGfaGfUfGfuCfuCfaUfcUfuAfL96	asAfsaGfaGfaUfgAfgAfcUfcUfuUfcUfgsg	15.13	0.28	39.99	19.39
4830	4831	871-893	AD-60582.1	CfsasGfaAfaGfaGfUfGfuCfuCfaUfcUfuAfL96	asAfsaGfaGfaUfgAfgAfcUfcUfuUfcUfgsg	19.56	8.17	51.59	1.11
4832	4833	871-893	AD-60584.1	CfsasGfaAfaGfaGfUfGfuCfuCfaUfcUfuAfL96	asAfsaGfaGfaUfgAfgAfcUfcUfuUfcUfgsg	23.36	6.63	58.79	10.35

(continuación)

SEQ ID NO: (sentido)	SEQ ID NO: (antisentido)	Sitios de antisentido en NM_000688.4	Nombre del secuencia en dúplex*	Secuencia sentido (5'-3')	Secuencia antisentido (AS) (5'-3')	Prom 10 nM	DE 10 nM	Prom 0.1 nM	DE 0.1 nM
4834	4835		AD-60586.1	CfsasGfaAfaGfaGfUfGf(Tgn)CfuCfaUfcUfuAfL96	asAfsGfaAfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsusg	27.78	2.20	76.86	6.81
4836	4837		AD-60588.1	CfsasGfaAfaGfaGfUfGf(Ggn)juCfuCfaUfcUfuAfL96	asAfsGfaAfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsusg7	105.2	14.2 5	99.26	19.62
4838	4839		AD-60590.1	CfsasGfaAfaGfaGf(Tgn)GfuCfuCfaUfcUfuAfL96	asAfsGfaAfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsusg	28.74	1.66	81.88	22.04
4840	4841		AD-60558.1	CfsasGfaAfaGfaGfUfGfuCfuCfaUfc(Tgn)juAfL96	usAfs(Agn)GfaUfgAfgAfcacUfcUfuUfcsusg	22.74	14.8 5	60.42	19.38
4842	4843		n/a	CfsasGfaAfaGfaGfUfGfuCfuCfaUf(Cgn)UfuAfL96	usAfsa(Ggn)aUfgAfgAfcacUfcUfuUfcsusg				
4844	4845		AD-60568.1	CfsasGfaAfaGfaGfUfGfuCfuCfa(Tgn)juCfuAfL96	usAfsaGf(Agn)aUfgAfgAfcacUfcUfuUfcsusg	86.66	21.9 3	110.05	16.44
4846	4847		AD-60572.1	CfsasGfaAfaGfaGfUfGfuCfuCf(Agn)UfcUfuAfL96	usAfsaGfa(Tgn)gAfgAfcacUfcUfuUfcsusg	22.37	4.86	71.24	22.19
4848	4849		AD-60539.1	CfsasGfaAfaGfaGfUfGfuCfu(Cgn)jaUfcUfuAfL96	usAfsaGfaUf(Ggn)AfgAfcacUfcUfuUfcsusg	43.35	14.5 3	104.44	2.51
4850	4851		AD-60544.1	CfsasGfaAfaGfaGfUfGfuCf(Tgn)CfaUfcUfuAfL96	usAfsaGfaUfg(Agn)gAfcacUfcUfuUfcsusg	25.85	1.18	69.98	5.86
4852	4853		AD-60549.1	CfsasGfaAfaGfaGfUfGfu(Cgn)juCfaUfcUfuAfL96	usAfsaGfaUfgAf(Ggn)AfcacUfcUfuUfcsusg	29.40	4.62	72.98	20.16
4854	4855		AD-60554.1	CfsasGfaAfaGfaGfUfGf(Tgn)CfuCfaUfcUfuAfL96	usAfsaGfaUfgAfg(Agn)cacUfcUfuUfcsusg	33.74	0.45	75.36	19.39
4856	4857		n/a	CfsasGfaAfaGfaGfUfGf(Ggn)juCfuCfaUfcUfuAfL96	usAfsaGfaUfgAfgAf(Cgn)acUfcUfuUfcsusg				
4858	4859		AD-60564.1	CfsasGfaAfaGfaGf(Tgn)GfuCfuCfaUfcUfuAfL96	usAfsaGfaUfgAfgAfc(Agn)juCfuUfcUfcsusg	27.77	10.3 4	77.01	11.51
4860	4861		AD-60569.1	CfsasGfaAfaGfaGfUfGfuCfuCfaUfcUfuAfsL96	usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcUfuUfcsusg	20.34	5.29	59.40	19.74
4862	4863		AD-60573.1	CfsasGfaAfaGfaGfUfGfuCfuCfaUfscUfsuAfsL96	usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcUfuUfcsusg	20.07	3.83	60.80	14.93
4864	4865		AD-60540.1	CfsasGfaAfaGfaGfUfGfuCfuCfaUfcUfuAfsL96	usAfsaGfaUfsgAfgAfcacUfcUfsuUfscUfcsusg	24.36	0.56	75.75	14.97

(continuación)

SEQ ID NO: (sentido)	SEQ ID NO: (antisentido)	Sitios de antisentido en NM_000688.4	diana sec antisentido en	Nombre del dúplex*	Secuencia sentido (5'-3')	Secuencia antisentido (AS) (5'-3')	Prom 10 nM	DE 10 nM	Prom 0.1 nM	DE 0.1 nM
4866	4867	871-893		n/a	CfsasGfaAfaGfaGfUGfuCfuCfaUfscUfsuAfs L96	usAfsaGfaUfsgAfgAfcacUfcUfsuUfscUfgsgs u	10 nM	10 nM	0.1 nM	0.1 nM

En el cribado *in vitro* para el cual se muestran los resultados en la tabla anterior, los ARNip que proporcionaron la mayor supresión de ARNm de ALAS1 (más de un 80% de supresión, de modo que permaneció menos de un 20% del ARNm) con una concentración de 10 nM incluyeron AD-60501, AD-60592, AD-60591, AD-60513, AD-60507, AD-60587, AD-60519, AD-60593, AD-60583, AD-60524, AD-60489, AD-60495, AD-60506 y AD-60582.

- 5 En el cribado *in vitro* para el cual se muestran los resultados en la tabla anterior, los ARNip que proporcionaron la mayor supresión del ARNm de ALAS1 (más de un 30% de supresión, de modo que permaneció menos de un 70% de ARNm) con una concentración de 0.1 nM incluyeron AD-60592, AD-60591, AD-60593, AD-60587, AD-60583, AD-60589, AD-60501, AD-60507, AD-60585, AD-60489, AD-60513, AD-60582, AD-60519, AD-60541, AD-60570, AD-60584, AD-60569, AD-60558, AD-60573, AD-60556, AD-60495, AD-60523, AD-60566 y AD-60544.
- 10 Como se muestran en la siguiente tabla, el estudio de más ARNip reveló que los siguientes dúplex proporcionaron más de un 80% de supresión con una concentración de 10 nM: AD-60489, AD-60495, AD-60501, AD-60507, AD-60513, AD-60519, AD-60583, AD-60591, AD-60592 y AD-60593, y los siguientes dúplex proporcionaron más de un 30% de supresión con una concentración de 0.1 nM: AD-60489, AD-60495, AD-60501, AD-60507, AD-60513, AD-60519, AD-60583, AD-60591, AD-60592 y AD-60593.

Tabla 33: Secuencias y resultados del cribado *in vitro* para AD-60489 y ARNip derivados de AD-60489

SEQ NO: (sentido)	SEQ ID (antisentido)	NO: (antisentido)	Sitios sec en NM_000688.4	diana antisentido	Nombre del dúplex	Secuencia sentido (5'-3')	Secuencia antisentido (AS) (5'-3')	Prom 10 nM	DE 10 nM	Prom 0.1 nM	DE 0.1 nM
4868	4869		871 - 893		AD-60489.1	CfsasGfaAfaGfaGfuGfuGfuCfuCfaUfcUfuAfl.96	usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcUfuUfcUfgsgs _u	17.0	0.2	50.7	5.1
4870	4871		871 - 893		AD-60495.1	CfsasGfaAfaGfaGfuGfuCfuCfaucuuAfl.96	usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcUfuUfcUfgsgs _u	17.1	5.9	63.6	18.6
4872	4873		871 - 893		AD-60501.1	CfsasGfaAfaGfaGfuGfuCfuCfaucuuAfl.96	usAfsAfgfaUfgAfgAfcAfcUfcUfuUfcUfgs _{gsu}	11.9	0.7	45.2	8.9
4874	4875		871 - 893			CfsasGfaAfaGfaGfuGfuCfuCfaucuuAfl.96	usAfsaAfgaugAfgAfcAfcucuuucugsgs _u				
4876	4877		871 - 893			CfsasGfaAfaGfaGfuGfuCfuCfaucuuAfl.96	usAfsaAfgfadTgAfgAfcAfcTcuudTcugsg _{su}				
4878	4879		871 - 893			CfsasGfaAfaGfaGfuGfuCfuCfaucuuAfl.96	usAfsaGfadTgAfgAfcAfcTcuudTcugsgs _u				
4880	4881		871 - 893			CfsasGfaAfaGfaGfuGfuCfuCfaucuuAfl.96	usAfsaAfgfadTgAfgAfcacdTcuudTcugsgs _u				
4882	4883		871 - 893		AD-60507.1	CfsasgaaaGfaGfuGfuCfuCfaucuuAfl.96	usAfsaAfgfaUfgAfgAfcAfcUfcUfuUfcUfgs _{gsu}	14.6	7.8	48.5	19.6
4884	4885		871 - 893			CfsasgaaaGfaGfuGfuCfuCfaucuuAfl.96	usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcUfuUfcUfgsgs _u				
4886	4887		871 - 893			CfsasgaaaGfaGfuGfuCfuCfaucuuAfl.96	usAfsaAfgaugAfgAfcAfcucuuucugsgs _u				
4888	4889		871 - 893			CfsasgaaaGfaGfuGfuCfuCfaucuuAfl.96	usAfsaAfgfadTgAfgAfcAfcTcuudTcugsg _{su}				
4890	4891		871 - 893			CfsasgaaaGfaGfuGfuCfuCfaucuuAfl.96	usAfsaGfadTgAfgAfcAfcTcuudTcugsgs _u				
4892	4893		871 - 893			CfsasgaaaGfaGfuGfuCfuCfaucuuAfl.96	usAfsaAfgfadTgAfgAfcacdTcuudTcugsgs _u				
4894	4895		871 - 893		AD-60513.1	CfsasgaaaGfaGfuGfuCfuCfaucuuAfl.96	usAfsaAfgfaUfgAfgAfcAfcUfcUfuUfcUfgs _{gsu}	14.4	2.4	51.0	7.0
4896	4897		871 - 893			CfsasgaaaGfaGfuGfuCfuCfaucuuAfl.96	usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcUfuUfcUfgsgs _u				
4898	4899		871 - 893			CfsasgaaaGfaGfuGfuCfuCfaucuuAfl.96	usAfsaAfgaugAfgAfcAfcucuuucugsgs _u				
4900	4901		871 - 893			CfsasgaaaGfaGfuGfuCfuCfaucuuAfl.96	usAfsaAfgfadTgAfgAfcAfcTcuudTcugsg _{su}				

(continuación)

SEQ NO: (sentido)	SEQ ID NO: (antisentido)	Símbolos de sec antisentido en NM_000688.4	Nombre del dúplex	Secuencia sentido (5'-3')	Secuencia antisentido (AS) (5'-3')	Prom 10 nM	DE 10 nM	Prom 0.1 nM	DE 0.1 nM
4902	4903	871 - 893		CfsasgaaaGfaGfuGfuCfuCfaucuuuL96	usAfsaGfadTgAfgAfcAfcadTcuudTcugsgs u				
4904	4905	871 - 893		CfsasgaaaGfaGfuGfuCfuCfaucuuuL96	usAfsaGfadTgAfgAfcadTcuudTcugsgs u				
4906	4907	871 - 893	AD-60519.1	csasgaaaGfaGfuGfuCfuCfaucuuuL96	usAfsaGfaUfgAfgAfcAfcUfcUfuUfcUfgs gsu	14.7	4.9	51.7	7.7
4908	4909	871 - 893		csasgaaaGfaGfuGfuCfuCfaucuuuL96	usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcUfuUfcUfgsgs u				
4910	4911	871 - 893		csasgaaaGfaGfuGfuCfuCfaucuuuL96	usAfsaGfaugAfgAfcAfcucuuucugsgsu				
4912	4913	871 - 893		csasgaaaGfaGfuGfuCfuCfaucuuuL96	usAfsaGfadTgAfgAfcAfcadTcuudTcugsg su				
4914	4915	871 - 893		csasgaaaGfaGfuGfuCfuCfaucuuuL96	usAfsaGfadTgAfgAfcAfcadTcuudTcugsgs u				
4916	4917	871 - 893		csasgaaaGfaGfuGfuCfuCfaucuuuL96	usAfsaGfadTgAfgAfcadTcuudTcugsgs u				
4918	4919	871 - 893	AD-60499.1	csasgaaaGfaGfuGfuCfuCfaucuuuL96	usAfsaGfadTgAfgAfcAfcadTcuudTcugsg su	35.9	13.8	77.5	6.7
4920	4921	871 - 893		csasgaaaGfaGfuGfuCfuCfaucuuuL96	usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcUfuUfcUfgsgs u				
4922	4923	871 - 893		csasgaaaGfaGfuGfuCfuCfaucuuuL96	usAfsaGfaUfgAfgAfcAfcUfcUfuUfcUfgs gsu				
4924	4925	871 - 893		csasgaaaGfaGfuGfuCfuCfaucuuuL96	usAfsaGfaugAfgAfcAfcucuuucugsgsu				
4926	4927	871 - 893		csasgaaaGfaGfuGfuCfuCfaucuuuL96	usAfsaGfadTgAfgAfcAfcadTcuudTcugsgs u				
4928	4929	871 - 893		csasgaaaGfaGfuGfuCfuCfaucuuuL96	usAfsaGfadTgAfgAfcadTcuudTcugsgs u				
4930	4931	871 - 893		csasgaaaGfaGfuGfuCfuCfaucuuuL96	usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcUfuUfcUfgsgs u				
4932	4933	871 - 893		csasgaaaGfaGfuGfuCfuCfaucuuuL96	usAfsaGfaUfgAfgAfcAfcUfcUfuUfcUfgs gsu				
4934	4935	871 - 893		csasgaaaGfaGfuGfuCfuCfaucuuuL96	usAfsaGfaugAfgAfcAfcucuuucugsgsu				

(continuación)

SEQ NO: (sentido)	ID	SEQ ID NO: (antisentido)	Símbolos de sec antisentido en NM_000688.4	Nombre del duplex	Secuencia sentido (5'-3')	Secuencia antisentido (AS) (5'-3')	Prom 10 nM	DE 10 nM	Prom 0.1 nM	DE 0.1 nM
4936		4937	871 - 893		csasgaaaGfAfGfugucuca(Tgn)cuuaL96	usAfsaAfGfadTgAfGfAfcaTcuudTcuugsgsu				
4938		4939	871 - 893		csasgaaaGfAfGfugucuca(Tgn)cuuaL96	usAfsaGfadTgAfGfAfcaTcuudTcuugsgsu				
4940		4941	871 - 893		csasgaaaGfAfGfugucuca(Tgn)cuuaL96	usAfsaAfGfadTgAfGfAfcaTcuudTcuugsgsu				
4942		4943	871 - 893	AD-60583.1	CfsasGfaAfaGfaGfUfGfuCfuCfaUfcUfu(Agn)UfcUfuA	asAfsaGfaGfaUfgAfGacAfcUfcUfuUfcsusg	15.3	4.8	42.0	9.5
4944		4945	871 - 893	AD-60591.1	CfsasGfaAfaGfaGfUfGfuCfuCfaUfcUfuA	asAfsaGfaGfaUfgAfGacAfcUfcUfuUfcsusg	13.7	0.0	36.4	16.9
4946		4947	871 - 893	AD-60592.1	CfsasGfaAfaGfaGfUfGfuCfuCfaUfcUfuA	asAfsaGfaGfaUfgAfGacAfcUfcUfuUfcsusg	13.4	4.1	35.4	11.4
4948		4949	871 - 893	AD-60593.1	CfsasGfaAfaGfaGfUfGfuCfuCfaUfcUfuA	asAfsaGfaGfaUfgAfGacAfcUfcUfuUfcsusg	15.1	0.3	40.0	19.4
4950		4951	871 - 893	AD-60489.1	CfsasGfaAfaGfaGfUfGfuCfuCfaUfcUfuA	usAfsaGfaGfaUfgAfGacAfcUfcUfuUfcsusg	17.0	0.2	50.7	5.1
4952		4953	871 - 893		CfsasGfaAfaGfaGfUfGfuCfuCfaUfcUfuA	usAfsaGfaGfaUfgAfGacAfcUfcUfuUfcsusg				
4954		4955	871 - 893		CfsasGfaAfaGfaGfUfGfuCfuCfaUfcUfuA	usAfsaGfaGfaUfgAfGacAfcUfcUfuUfcsusg				
4956		4957	871 - 893		CfsasGfaAfaGfaGfUfGfuCfuCfaUfcUfuA	usAfsaGfaGfaUfgAfGacAfcUfcUfuUfcsusg				
4958		4959	871 - 893		CfsasGfaAfaGfaGfUfGfuCfuCfaUfcUfuA	usAfsaGfaGfaUfgAfGacAfcUfcUfuUfcsusg				
4960		4961	871 - 893		CfsasGfaAfaGfaGfUfGfuCfuCfaUfcUfuA	usAfsaGfaGfaUfgAfGacAfcUfcUfuUfcsusg				
4962		4963	871 - 893	AD-60591.1	CfsasGfaAfaGfaGfUfGfuCfuCfaUfcUfuA	asAfsaGfaGfaUfgAfGacAfcUfcUfuUfcsusg	13.7	0.0	36.4	16.9
4964		4965	871 - 893		CfsasGfaAfaGfaGfUfGfuCfuCfaUfcUfuA	asAfsaGfaGfaUfgAfGacAfcUfcUfuUfcsusg				
4966		4967	871 - 893		CfsasGfaAfaGfaGfUfGfuCfuCfaUfcUfuA	usAfsaGfaGfaUfgAfGacAfcUfcUfuUfcsusg				

(continuación)

SEQ NO: (sentido)	SEQ ID NO: (antisentido)	Sitios diana de sec antisentido en NM_000688.4	Nombre del dúplex	Secuencia sentido (5'-3')	Secuencia antisentido (AS) (5'-3')	Prom 10 nM	DE 10 nM	Prom 0.1 nM	DE 0.1 nM
4968	4969	871 - 893	CfsasGfaAfaGfaGfdTGfuCfuCfa(Tgn)cUfuAfl96	usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcdTuUfcUfgsgsu					
4970	4971	871 - 893	CfsasGfaAfaGfaGfdTGfuCfuCfa(Tgn)scUfusuAfsL96	usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcdTuUfcUfgsgsu					
4972	4973	871 - 893	CfsasGfaAfaGfaGfdTGfuCfuCfa(Tgn)scusuAfsL96	usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcdTuUfcUfgsgsu					
4974	4975	871 - 893	CfsasGfaAfaGfaGfdTGfuCfuCf(Agn)UfcUfuAD-60592.1Afl96	asAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcdTuUfcUfgsgsu	13.4	4.1	35.4	11.4	
4976	4977	871 - 893	CfsasGfaAfaGfaGfdTGfuCfuCf(Agn)UfcUfuAfl96	asAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcdTuUfcUfgsgsu					
4978	4979	871 - 893	CfsasGfaAfaGfaGfdTGfuCfuCf(Agn)UfcUfuAfl96	usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcdTuUfcUfgsgsu					
4980	4981	871 - 893	CfsasGfaAfaGfaGfdTGfuCfuCf(Agn)UfcUfuAfl96	usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcdTuUfcUfgsgsu					
4982	4983	871 - 893	CfsasGfaAfaGfaGfdTGfuCfuCf(Agn)UfscUfusuAfsL96	usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcdTuUfcUfgsgsu					
4984	4985	871 - 893	CfsasGfaAfaGfaGfdTGfuCfuCf(Agn)UfscusuAfsL96	usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcdTuUfcUfgsgsu					
4986	4987	871 - 893	CfsasGfaAfaGfaGfdTGfuCfuCf(Agns)UfscUfusuAfsL96	usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcdTuUfcUfgsgsu					
4988	4989	871 - 893	CfsasGfaAfaGfaGfdTGfuCfuCf(Agns)UfscusuAfsL96	usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcdTuUfcUfgsgsu					

Tabla 34: Secuencias adicionales de ARNip derivados de AD-60489

SEQ ID NO: (sentido)	SEQ ID (antisentido)	NO:	Símbolos secuencia antisentido en NM_000688.4	Nombre del dúplex	Secuencia sentido (5'-3')	Secuencia antisentido (5'-3')
4990	4991		871 - 893	AD-60489	CfsasGfaAfaGfaGfuGfuCfaUfcUfuAflL96	usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcUfuUfcUfgsgsu
4992	4993		871 - 893	AD-60501.1	CfsasGfaAfaGfaGfuGfuCfuCfaucuuAflL96	usAfsaGfaUfgAfgAfcAfcUfcUfuUfcUfgsgsu
4994	4995		871 - 893	AD-60900.1	CfsasGfaAfaGfaGfuGfuCfuCfaucuuAflL96	usAfsaGfaUfgAfgAfcAfcUfcUfuUfcUfgsgsu
4996	4997		871 - 893	AD-60519.1	csasgaaaGfaGfuGfuCfuCfaucuuL96	usAfsaGfaUfgAfgAfcAfcUfcUfuUfcUfgsgsu
4998	4999		871 - 893	AD-60905.1	csasgaaaGfaGfuGfuCfuCfaucuuL96	usAfsaGfaUfgAfgAfcAfcUfcUfuUfcUfgsgsu
5000	5001		871 - 893	AD-60901.1	csasgaaaGfaGfuGfuCfuCfaucuuL96	usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcUfuUfcUfgsgsu
5002	5003		871 - 893	AD-60495.2	csasgaaaGfaGfuGfuCfuCfaucuuL96	usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcUfuUfcUfgsgsu
5004	5005		871 - 893	AD-60935.1	CfsasGfaAfaGfaGfuGfuCfaUfcUfuAflL96	usAfsaGfaUfgAfgAfcAfcUfcUfuUfcUfgsgsu

Tabla 35: Secuencias y CI50 adicionales de AD-60489 y ARNip derivados de AD-60489

SEQ ID NO: (sentido)	SEQ ID NO: (antisentido)	Sitios diana de antisentido NM_000688.4	Nombre de sec en dúplex*	Secuencia sentido (5'-3')	Secuencia antisentido (AS) (5'-3')	CI50
5006	5007	871 - 893	AD-60489.3	CfsasGfaAfaGfaGfuUfguGfuCfaUfcUfuAflL96	usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcUfuUfcUfgsgsu	0.010
5008	5009	871 - 893	AD-60495.2	CfsasGfaAfaGfaGfuGfuCfaucuuAflL96	usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcUfuUfcUfgsgsu	0.254
5010	5011	871 - 893	AD-60501.2	CfsasGfaAfaGfaGfuGfuCfaucuuAflL96	usAfsaGfaUfgAfgAfcAfcUfcUfuUfcUfgsgsu	0.006
5012	5013	871 - 893	AD-60898.1	CfsasGfaAfaGfaGfuGfuCfaucuuAflL96	usAfsaGfaUfgAfgAfcAfcuucuuugsgsu	na
5014	5015	871 - 893	AD-60900.1	CfsasGfaAfaGfaGfuGfuCfaucuuAflL96	usAfsaGfadTgAfgAfcAfcadTcuudTcuugsgsu	0.151
5016	5017	871 - 893	AD-60851.1	CfsasGfaAfaGfaGfuGfuCfaucuuAflL96	usAfsaGfadTgAfgAfcAfcadTcuudTcuugsgsu	0.033
5018	5019	871 - 893	AD-60855.1	CfsasGfaAfaGfaGfuGfuCfaucuuAflL96	usAfsaGfadTgAfgAfcadTcuudTcuugsgsu	0.065
5020	5021	871 - 893	AD-60507.2	CfsasgaaaGfaGfuGfuCfaucuuAflL96	usAfsaGfaUfgAfgAfcAfcUfcUfuUfcUfgsgsu	0.029
5022	5023	871 - 893	AD-60902.1	CfsasgaaaGfaGfuGfuCfaucuuAflL96	usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcUfuUfcUfgsgsu	0.024
5024	5025	871 - 893	AD-60904.1	CfsasgaaaGfaGfuGfuCfaucuuAflL96	usAfsaGfaUfgAfgAfcAfcuucuuugsgsu	na
5026	5027	871 - 893	AD-60894.1	CfsasgaaaGfaGfuGfuCfaucuuAflL96	usAfsaGfadTgAfgAfcAfcadTcuudTcuugsgsu	0.011
5028	5029	871 - 893	AD-60860.1	CfsasgaaaGfaGfuGfuCfaucuuAflL96	usAfsaGfadTgAfgAfcAfcadTcuudTcuugsgsu	0.249
5030	5031	871 - 893	AD-60864.1	CfsasgaaaGfaGfuGfuCfaucuuAflL96	usAfsaGfadTgAfgAfcadTcuudTcuugsgsu	1.899
5032	5033	871 - 893	AD-60513.2	CfsasgaaaGfaGfuGfuCfaucuuAflL96	usAfsaGfaUfgAfgAfcAfcUfcUfuUfcUfgsgsu	0.019
5034	5035	871 - 893	AD-60896.1	CfsasgaaaGfaGfuGfuCfaucuuAflL96	usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcUfuUfcUfgsgsu	0.034
5036	5037	871 - 893	AD-60899.1	CfsasgaaaGfaGfuGfuCfaucuuAflL96	usAfsaGfaUfgAfgAfcAfcuucuuugsgsu	na
5038	5039	871 - 893	AD-60868.1	CfsasgaaaGfaGfuGfuCfaucuuAflL96	usAfsaGfadTgAfgAfcAfcadTcuudTcuugsgsu	0.249
5040	5041	871 - 893	AD-60872.1	CfsasgaaaGfaGfuGfuCfaucuuAflL96	usAfsaGfadTgAfgAfcadTcuudTcuugsgsu	0.014
5042	5043	871 - 893	AD-60519.2	csasgaaaGfaGfuGfuCfaucuuAflL96	usAfsaGfaUfgAfgAfcAfcUfcUfuUfcUfgsgsu	0.026
5044	5045	871 - 893	AD-60901.1	csasgaaaGfaGfuGfuCfaucuuAflL96	usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcUfuUfcUfgsgsu	0.080
5046	5047	871 - 893	AD-60903.1	csasgaaaGfaGfuGfuCfaucuuAflL96	usAfsaGfaUfgAfgAfcAfcuucuuugsgsu	na
5048	5049	871 - 893	AD-60905.1	csasgaaaGfaGfuGfuCfaucuuAflL96	usAfsaGfadTgAfgAfcAfcadTcuudTcuugsgsu	0.018
5050	5051	871 - 893	AD-60876.1	csasgaaaGfaGfuGfuCfaucuuAflL96	usAfsaGfadTgAfgAfcAfcadTcuudTcuugsgsu	0.091
5052	5053	871 - 893	AD-60880.1	csasgaaaGfaGfuGfuCfaucuuAflL96	usAfsaGfadTgAfgAfcadTcuudTcuugsgsu	0.131
5054	5055	871 - 893	AD-60499.2	csasgaaaGfaGfuGfuCfaucuuAflL96	usAfsaGfadTgAfgAfcAfcadTcuudTcuugsgsu	na
5056	5057	871 - 893	AD-60895.1	csasgaaaGfaGfuGfuCfaucuuAflL96	usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcUfuUfcUfgsgsu	na
5058	5059	871 - 893	AD-60897.1	csasgaaaGfaGfuGfuCfaucuuAflL96	usAfsaGfaUfgAfgAfcAfcUfcUfuUfcUfgsgsu	na

(continuación)

SEQ NO: (sentido)	ID	SEQ ID NO: (antisentido)	Sitios antisentido NM_000688.4	Nombre del dúplex*	Secuencia sentido (5'-3')	Secuencia antisentido (AS) (5'-3')	CI50
5060	5061		871 - 893	AD-60526.2	csasgaaaGfAfGfugucucauuuL96	usAfsAFgaugAfGfAfcuucuuugsgsu	na
5062	5063		871 - 893	AD-60852.1	csasgaaaGfAfGfugucucauuuL96	usAfsaGfadTgAfGfAfcadTcuudTcuugsgsu	4.970
5064	5065		871 - 893	AD-60856.1	csasgaaaGfAfGfugucucauuuL96	usAfsAFGfadTgAfGfAfcadTcuudTcuugsgsu	na
5066	5067		871 - 893	AD-60861.1	csasgaaaGfAfGfugucuca(Tgn)cuuL96	usAfsaGfaUfgAfGfAfcacUfcUfuUfcUfgsgsu	0.019
5068	5069		871 - 893	AD-60865.1	csasgaaaGfAfGfugucuca(Tgn)cuuL96	usAfsAFGfaUfgAfGfAfcUfcUfuUfcUfgsgsu	0.061
5070	5071		871 - 893	AD-60869.1	csasgaaaGfAfGfugucuca(Tgn)cuuL96	usAfsAFGfaugAfGfAfcAfcuucuuugsgsu	na
5072	5073		871 - 893	AD-60873.1	csasgaaaGfAfGfugucuca(Tgn)cuuL96	usAfsAFGfadTcuudTcuugsgsu gAfGfAfcadT	0.009
5074	5075		871 - 893	AD-60877.1	csasgaaaGfAfGfugucuca(Tgn)cuuL96	usAfsaGfadTgAfGfAfcadTcuudTcuugsgsu	0.008
5076	5077		871 - 893	AD-60881.1	csasgaaaGfAfGfugucuca(Tgn)cuuL96	usAfsAFGfadTgAfGfAfcadTcuudTcuugsgsu	0.025
5078	5079		871 - 893	AD-60583.2	CfsasGfaAfaGfaGfUfGfuCfuCfaUfcUfu(Agn)L96	usAfsaGfaUfgAfGfAfcacUfcUfuUfcUfgsgsu	0.022
5080	5081		871 - 893	AD-60591.3	CfsasGfaAfaGfaGfUfGfuCfuCfa(Tgn)cUfuAfl96	usAfsaGfaUfgAfGfAfcacUfcUfuUfcUfgsgsu	0.031
5082	5083		871 - 893	AD-60592.3	CfsasGfaAfaGfaGfUfGfuCfuCf(Agn)UfcUfuAfl96	usAfsaGfaUfgAfGfAfcacUfcUfuUfcUfgsgsu	0.010
5084	5085		871 - 893	AD-60593.2	CfsasGfaAfaGfaGfUfGfuCfu(Cgn)aUfcUfuAfl96	usAfsaGfaUfgAfGfAfcacUfcUfuUfcUfgsgsu	0.006
5086	5087		871 - 893	AD-60489.4	CfsasGfaAfaGfaGfUfGfuCfuCfaUfcUfuAfl96	usAfsaGfaUfgAfGfAfcacUfcUfuUfcUfgsgsu	0.011
5088	5089		871 - 893	AD-60857.1	CfsasGfaAfaGfaGfdTGfuCfuCfaUfcUfuAfl96	usAfsaGfaUfgAfGfAfcacUfcUfuUfcUfgsgsu	0.019
5090	5091		871 - 893	AD-60862.1	CfsasGfaAfaGfaGfUfGfuCfuCfaUfcUfuAfl96	usAfsaGfaUfgAfGfAfcacUfcUfuUfcUfgsgsu	0.012
5092	5093		871 - 893	AD-60866.1	CfsasGfaAfaGfaGfdTGfuCfuCfaUfcUfuAfl96	usAfsaGfaUfgAfGfAfcacUfcUfuUfcUfgsgsu	0.015
5094	5095		871 - 893	AD-60870.1	CfsasGfaAfaGfaGfdTGfuCfuCfaUfscUfsuAfsL96	usAfsaGfaUfgAfGfAfcacUfcUfuUfcUfgsgsu	0.012
5096	5097		871 - 893	AD-60874.1	CfsasGfaAfaGfaGfdTGfuCfuCfaUfscuAfsL96	usAfsAFGfaUfgAfGfAfcacUfcUfuUfcUfgsgsu	0.003
5098	5099		871 - 893	AD-60591.2	CfsasGfaAfaGfaGfUfGfuCfuCfa(Tgn)cUfuAfl96	asAfsGfAfaGfa UfgAfGacAfcUfcUfuUfcsusg	0.014
5100	5101		871 - 893	AD-60878.1	CfsasGfaAfaGfaGfdTGfuCfuCfa(Tgn)cUfuAfl96	asAfsGfAfaGfaUfgAfGacAfcUfcUfuUfcsusg	0.008
5102	5103		871 - 893	AD-60882.1	CfsasGfaAfaGfaGfUfGfuCfuCfa(Tgn)cUfuAfl96	usAfsaGfaUfgAfGfAfcacUfcUfuUfcUfgsgsu	0.003
5104	5105		871 - 893	AD-60853.1	CfsasGfaAfaGfaGfdTGfuCfuCfa(Tgn)cUfuAfl96	usAfsaGfaUfgAfGfAfcacUfcUfuUfcUfgsgsu	0.007
5106	5107		871 - 893	AD-60858.1	CfsasGfaAfaGfaGfdTGfuCfuCfa(Tgn)scUfsuAfsL96	usAfsaGfaUfgAfGfAfcacUfcUfuUfcUfgsgsu	0.013
5108	5109		871 - 893	AD-60863.1	CfsasGfaAfaGfaGfdTGfuCfuCfa(Tgn)scusuAfsL96	usAfsAFGfaUfgAfGfAfcacUfcUfuUfcUfgsgsu	0.002
5110	5111		871 - 893	AD-60592.2	CfsasGfaAfaGfaGfUfGfuCfuCf(Agn)UfcUfuAfl96	asAfsGfAfaGfaUfgAfGacAfcUfcUfuUfcsusg	0.013
5112	5113		871 - 893	AD-60867.1	CfsasGfaAfaGfaGfdTGfuCfuCf(Agn)UfcUfuAfl96	asAfsGfAfaGfaUfgAfGacAfcUfcUfuUfcsusg	0.084

(continuación)

SEQ NO: (sentido)	ID	SEQ ID NO: (antisentido)	Sitios diana de sec antisentido NM_000688.4	Nombre del dúplex*	Secuencia sentido (5'-3')	Secuencia antisentido (AS) (5'-3')	CI50
5114	5115		871 - 893	AD-60871.1	CfsasGfaAfaGfaGfaGfUGfuCfuCf(Agn)UfcUfuAfl96	usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcdTuUfcUfgsgsu	0.008
5116	5117		871 - 893	AD-60875.1	CfsasGfaAfaGfaGfaGfdTGfuCfuCf(Agn)UfcUfuAfl96	usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcdTuUfcUfgsgsu	0.004
5118	5119		871 - 893	AD-60879.1	CfsasGfaAfaGfaGfaGfdTGfuCfuCf(Agn)UfscUfsuAfsL96	usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcdTuUfcUfgsgsu	0.001
5120	5121		871 - 893	AD-60883.1	CfsasGfaAfaGfaGfaGfdTGfuCfuCf(Agn)UfscusuAfsL96	usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcdTuUfcUfgsgsu	0.004
5122	5123		871 - 893	AD-60854.1	CfsasGfaAfaGfaGfaGfdTGfuCfuCfs(Agns)UfscUfsuAfsL96	usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcdTuUfcUfgsgsu	0.002
5124	5125		871 - 893	AD-60859.1	CfsasGfaAfaGfaGfaGfdTGfuCfuCfs(Agns)UfscusuAfsL96	usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcdTuUfcUfgsgsu	0.002

Como se muestra en la tabla anterior, una serie de dúplex mostraron eficacia para suprimir ARNm de ALAS1. Los siguientes dúplex tuvieron una CI50 de menos de 0.01 nM: AD-60879, AD-60859, AD-60863, AD-60854, AD-60882, AD-60874, AD-60883, AD-60875, AD-60501, AD-60593, AD-60853, AD-60877, AD-60878, AD-60871 y AD-60873. Los siguientes dúplex tuvieron una CI50 de menos de 0.02 nM: AD-60879, AD-60859, AD-60863, AD-60854, AD-60882, AD-60874, AD-60883, AD-60875, AD-60501, AD-60593, AD-60853, AD-60877, AD-60878, AD-60871, AD-60873, AD-60489, AD-60592, AD-60894, AD-60489, AD-60870, AD-60862, AD-60858, AD-60592, AD-60591, AD-60872, AD-60866, AD-60905, AD-60857, AD-60513 y AD-60861. Los siguientes dúplex tuvieron una CI50 de menos de 0.05 nM: AD-60879, AD-60859, AD-60863, AD-60854, AD-60882, AD-60874, AD-60883, AD-60875, AD-60501, AD-60593, AD-60853, AD-60877, AD-60878, AD-60871, AD-60873, AD-60489, AD-60592, AD-60894, AD-60489, AD-60870, AD-60862, AD-60858, AD-60592, AD-60591, AD-60872, AD-60866, AD-60905, AD-60857, AD-60513, AD-60861, AD-60583.2, AD-60902.1, AD-60881.1, AD-60519.2, AD-60507.2, AD-60591.3, AD-60851.1, AD-60896.1 y AD-60537.2.

Ejemplo 29: Estudios de la relación estructura-actividad *in vivo* de AD-60489

Se generaron y cribaron *in vivo* en ratas derivados del ARNip original AD-60489.

15 Cribado *in vivo* 1 de derivados de AD-60489

Las secuencias de los ARNip que se cribaron se proporcionan en la siguiente tabla.

Tabla 36: Secuencias de dúplex de ARNip de ALAS1

SEQ ID NO: (sentido)	SEQ ID NO: (antisentido)	Sitios diana de la secuencia antisentido en NIM_00688.4	Nombre del dúplex	Secuencia sentido (5'-3')	Secuencia antisentido (5'-3')
5126	5127	871-893	AD-60489	CfsasGfaAfaGfaGfUfGfuCfuCfaUfuAfl.96	usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcUfuUfcUfgsgsu
5128	5129	871-893	AD-60501.2	CfsasGfaAfaGfaGfuGfuCfuCfaucuuAfl.96	usAfsaGfaUfgAfgAfcUfcUfuUfcUfgsgsu
5130	5131	871-893	AD-60519.2	csasgaaaGfaGfuGfuCfuCfaucuuA.96	usAfsaGfaUfgAfgAfcUfcUfuUfcUfgsgsu
5132	5133	871-893	AD-60901.1	csasgaaaGfaGfuGfuCfuCfaucuuA.96	usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcUfuUfcUfgsgsu
5134	5135	871-893	AD-60495.2	CfsasGfaAfaGfaGfuGfuCfuCfaucuuAfl.96	usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcUfuUfcUfgsgsu
5136	5137	871-893	AD-60900.1	CfsasGfaAfaGfaGfuGfuCfuCfaucuuAfl.96	usAfsaGfadTgAfgAfcAfcdTcuudTcugsgsu
5138	5139	871-893	AD-60935.1	CfsasGfaAfaGfaGfUfGfuCfuCfaUfuAfl.96	usAfsaGfaUfgAfgAfcUfcUfuUfcUfgsgsu
5140	5141	871-893	AD-60905.1	csasgaaaGfaGfuGfuCfuCfaucuuA.96	usAfsaGfadTgAfgAfcAfcdTcuudTcugsgsu

A las ratas se les administró una única dosis de 3 mg/kg de ARNip. 5 días después de la administración del ARNip, se realizaron medidas de ARNm de ALAS1 de rata (rALAS1) y ARNm de GAPDH de rata (rGAPDH) utilizando un ensayo de ADN_r, y se determinaron los niveles tisulares del fármaco (ARNip) utilizando qPCR.

5 Como se muestra en la FIG. 40 (parte superior), los ARNip AD-60501, AD-60519, AD-60901, AD-60495, AD-60900 y AD-60935 mostraron una mejora de la supresión del ARNm de ALAS1 en comparación con AD-60489. Los ARNip AD-60519, AD-60901, AD-60495 y AD-60935, lograron niveles hepáticos más elevados que AD-60489 (remítase a la FIG. 40, parte inferior). Por lo tanto, la mayoría de los dúplex que proporcionaron una mejora de la supresión del ARNm de ALAS1 también lograron niveles hepáticos más elevados.

10 Al menos para los dúplex AD-60489, AD-60519 y AD-60901, la eficacia se correlacionó con los niveles hepáticos del ARNip (remítase a la FIG. 41), de modo que un nivel más elevado de ARNip en el hígado se asoció con una mayor supresión del ARNm de ALAS1.

Cribado *in vivo* 2 de derivados de AD-60489

Las secuencias de los ARNip que se cribaron se proporcionan en la siguiente tabla.

A las ratas se les administró una única dosis de 2.5 mg/kg de ARNip. 5 días después de la administración del ARNip, se realizaron las medidas del ARNm de ALAS1 de rata (rALAS1) y ARNm de GAPDH de rata (rGAPDH) utilizando el ensayo de ADNr.

- 5 Como se muestra en la FIG. 42, los ARNip AD-60879, AD-61190, AD-61191, AD-60865, AD-60861, AD-60876, AD-61193 y AD-60519 mostraron una mejora de la supresión del ARNm de ALAS1 en comparación con AD-60489.

Ejemplo 30: Múltiples dosis mejoran la potencia

- 10 Para estudiar los efectos de la administración de múltiples dosis de ARNip, se administró a ratas (n=3 por grupo) PBS o un ARNip (AD-58632, AD-60925, AD-60419, AD-60445, AD-60892, AD-60489, AD-60519 o AD-60901) en una dosis de 2.5 mg/kg dos veces a la semana durante 2 semanas. Los niveles de ARNm de ALAS1 de rata (rALAS1) y ARNm de GAPDH de rata (rGAPDH) se evaluaron utilizando el ensayo de ADNr.

Tabla 38: Secuencias de dúplex de ARNip de ALAS1

SEQ ID NO: (sentido)	SEQ ID (antisentido)	NO:	Símbolos secuencia antisentido en NM_000688.4	Nombre del dúplex	Secuencia sentido (5'-3')	Secuencia antisentido (3'-5')
5164	5165		873-895	AD-58632	GfsaAfaGfaGfuGfUcfuCfaUfcUfuCfuUfl96	asAfsGfAfaGfaUfgAfgacAfcUfcUfuUfcsusg
5166	5167		873-895	AD-60925	GfsaAfaGfAfGfuGfucucauc(Tgn)ucuul96	asAfsGfAfaGfaUfgAfgAfcUfcUfuUfcsusg
5168	5169		873-895	AD-60419	GfsaAfaGfAfGfuGfdTcucaucuucuul96	asAfsGfAfaGfaugAfgAfcAfcucuucuusg
5170	5171		873-895	AD-60445	GfsaAfaGfAfGfuGfucucauc(Tgn)ucuul96	asAfsGfAfaGfaugAfgAfcAfcucuucuusg
5172	5173		873-895	AD-60892	gsasaagaGfuGfuCfucucuucuul96	asAfsGfAfaGfaugAfgAfcAfcucuucuusg
5174	5175		871-893	AD-60489	CfsaGfaAfaGfaGfUfGfuCfucfaUfcUfuAfl96	usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcUfuUfcUfgsgsu
5176	5177		871-893	AD-60519.2	csasgaaaGfaGfuGfuCfuCfaucuual96	usAfsaGfaUfgAfgAfcAfcUfcUfuUfcUfgsgsu
5178	5179		871-893	AD-60901.1	csasgaaaGfaGfuGfuCfuCfaucuual96	usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcUfuUfcUfgsgsu

Como se muestra en la FIG. 43, los ARNip derivados de AD-58632 AD-60892, AD-60419, AD-60445 y AD-60925, mostraron una mejora de la supresión de ARNm de ALAS1 en comparación con el AD-58632 original. Además, los ARNip derivados de AD-60489 AD-60519 y AD-60901 mostraron una mejora de la supresión del ARNm de ALAS1 en comparación con el AD-60489 original.

5 **Ejemplo 31: Estudios con múltiples dosis con AD-60519 y AD-60489**

Se estudió la eficacia terapéutica de AD-60519 en un modelo de AIP en rata. El diseño experimental se muestra en la FIG. 44 (parte superior). Las ratas se trataron con PBS o con 2.5 mg/kg o 5 mg/kg ARNip de ALS1-GalNAc dos veces a la semana durante tres semanas. Se administraron fenobarbital (Fenobarb) y un ARNip de PBGD en una formulación de LNP AF11 en los momentos indicados en la FIG. 44. Un grupo de control recibió PBS y el ARNip de PBGD solo, sin inducción con fenobarbital. Se recogió orina en los días 18-19 del estudio.

Los resultados se muestran en la FIG. 44 (parte inferior). La administración de fenobarbital y PBS indujo la expresión de ARNm de ALAS1 e incrementó los niveles de PBG y ALA en orina (remítase a la FIG. 44), en comparación con PBS solo. El tratamiento con un total de seis dosis de 2.5 o 5 mg/kg de AD-60519 dos veces a la semana suprimió los incrementos inducidos por fenobarbital en PBG en orina y ALA en orina (FIG. 44). Estos resultados demuestran que AD-60519 es eficaz para suprimir ALA y PBG cuando se administran dosis repetidas de tan solo 2.5 mg/kg. En particular, AD-60519 fue eficaz para reducir los incrementos en los niveles en orina de PBG y ALA asociados con ataques agudos en el model de AIP en rata.

En estudios adicionales que utilizan el mismo diseño experimental pero en un modelo en ratón (remítase a la representación esquemática en la parte superior de la FIG. 44), se estudió la eficacia terapéutica de AD-60519 y AD-60489 para suprimir los incrementos inducidos por fenobarbital de PGB y ALA en suero. En el grupo de control con PBS ("solución salina"), la administración de fenobarbital incrementó los niveles de PBG y ALA en suero (remítase a la FIG. 45), en comparación con PBS solo. El tratamiento con un total de seis dosis de 2.5 o 5 mg/kg de AD-60519 o AD-60489 dos veces a la semana suprimió los incrementos inducidos por fenobarbital de PBG en suero y ALA en suero (FIG. 44). Estos resultados demuestran que tanto AD-60519 como AD-60489 son eficaces para suprimir ALA y PBG cuando se administran dosis repetidas de tan solo 2.5 mg/kg. En particular, AD-60519 y AD-60489 son eficaces para reducir los incrementos de PBG y ALA en suero asociados con los ataques agudos.

Debido a que los tratamientos en este ejemplo se administraron antes de la inducción con fenobarbital, estos resultados indican que AD-60519 y AD-60489 tienen efectos profilácticos.

Ejemplo 32: Secuencias de ARNip adicionales

También se han generado las siguientes secuencias de ARNip derivadas de AD-58632 (Tabla 39) y derivadas de AD-60489 (Tabla 40).

Tabla 39: Secuencias derivadas de AD-58632

SEQ ID NO: (sentido)	SEQ ID (antisentido)	NO:	Sitios diana de la secuencia antisentido en NM_000688.4	Nombre del dúplex	Secuencia sentido (5'-3')	Secuencia antisentido (5'-3')
5180	5181		873-895	AD-60802	GfsasAfaGfAfGfuGfucucauc(Tgn)ucuulL96	asAfsGAtaGfaugAfgAfcAfcucuuucsug
5182	5183		873-895	AD-60824	GfsasAfaGfAfGfuGfucucauc(Tgn)ucuulL96	asAfsGAtaGfaugAfgAfcAfcucuuucsug
5184	5185		873-895		GfsasAfaGfAfGfuGfucucauc(Tgn)ucuulL96	asAfsGAtaGfaUfgAfgAfcAfcUfcUfuUfcsug
5186	5187		873-895	AD-60843	GfsasAfaGfAfGfuGfdTcucaucuuL96	asAfsGAtaGfaugAfgAfcAfcucuuucsug
5188	5189		873-895	AD-60847	GfsasAfaGfAfGfuGfdTcucaucuuL96	asAfsGAtaGfaugAfgAfcAfcucuuucsug
5190	5191		873-895		GfsasAfaGfAfGfuGfdTcucaucuuL96	asAfsGAtaGfaUfgAfgAfcAfcUfcUfuUfcsug
5192	5193		873-895	AD-60819	GfsasAfaGfaGfuGfuCfuCfaucuuCfuulL96	asAfsGAtaGfaugAfgAfcAfcucuuucsug
5194	5195		873-895	AD-60823	GfsasAfaGfaGfuGfuCfuCfaucuuCfuulL96	asAfsGAtaGfaugAfgAfcAfcucuuucsug
5196	5197		873-895		GfsasAfaGfaGfuGfuCfuCfaucuuCfuulL96	asAfsGAtaGfaUfgAfgAfcAfcUfcUfuUfcsug
5198	5199		873-895		GfsasAfaGfaGfuGfdTCfuCfaUfc(Tgn)uCfuUf L96	asAfsGAtaGfaugAfgAfcAfcucuuucsug
5200	5201		873-895		GfsasAfaGfaGfuGfdTCfuCfaUfc(Tgn)uCfuUf L96	asAfsGAtaGfaugAfgAfcAfcucuuucsug
5202	5203		873-895		GfsasAfaGfaGfuGfdTCfuCfaUfc(Tgn)uCfuUf L96	asAfsGAtaGfaUfgAfgAfcAfcUfcUfuUfcsug
5204	5205		873-895	AD-60853	gsasaagaGfuGfuCfucaucuuL96	asAfsGAtaGfaugAfgAfcAfcucuuucsug
5206	5207		873-895	AD-60839	gsasaagaGfuGfuCfucaucuuL96	asAfsGAtaGfaugAfgAfcAfcucuuucsug
5208	5209		873-895		gsasaagaGfuGfuCfucaucuuL96	asAfsGAtaGfaUfgAfgAfcAfcUfcUfuUfcsug
5210	5211		873-895		gsasaagaGfuGfdTCfucaucuuL96	asAfsGAtaGfaugAfgAfcAfcucuuucsug
5212	5213		873-895		gsasaagaGfuGfdTCfucaucuuL96	asAfsGAtaGfaugAfgAfcAfcucuuucsug
5214	5215		873-895		gsasaagaGfuGfdTCfucaucuuL96	asAfsGAtaGfaUfgAfgAfcAfcUfcUfuUfcsug

Tabla 40: Secuencias derivadas de AD-60489

SEQ ID NO: (sentido)	SEQ ID (antisentido)	NO:	Sitios diana de secuencia antisentido NM_000688.4	Nombre del dúplex	Secuencia sentido (5'-3')	Secuencia antisentido (5'-3')
5216	5217		871-893		CfsasGfaAfaGfaGfdTGfuCfuCf(Agn)UfscUfs uAfsL96	usAfsaGfadTgAfgAfcAfcAfcdTcuudTcuugsgsu
5218	5219		871-893	AD-60879	CfsasGfaAfaGfaGfdTGfuCfuCf(Agn)UfscUfs uAfsL96	usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcdTulUfcUfgsgsu
5220	5221		871-893		CfsasGfaAfaGfaGfdTGfuCfuCf(Agn)UfscUfs uAfsL96	usAfsaGfaUfgAfgAfcAfcUfcUfuUfcUfgsgsu
5222	5223		871-893		CfsasGfaAfaGfaGfdTGfuCfuCf(Agn)UfscUfs uAfsL96	usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcUfuUfcUfgsgsu
5224	5225		871-893	AD-60877	csasgaaaGfAfGfugucuca(Tgn)cuuaL96	usAfsaGfadTgAfgAfcAfcAfcdTcuudTcuugsgsu
5226	5227		871-893		csasgaaaGfAfGfugucuca(Tgn)cuuaL96	usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcdTulUfcUfgsgsu
5228	5229		871-893	AD-60865	csasgaaaGfAfGfugucuca(Tgn)cuuaL96	usAfsaGfaUfgAfgAfcAfcUfcUfuUfcUfgsgsu
5230	5231		871-893	AD-60861	csasgaaaGfAfGfugucuca(Tgn)cuuaL96	usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcUfuUfcUfgsgsu
5232	5233		871-893	AD-60876	csasgaaaGfaGfuGfuCfuCfaucuaL96	usAfsaGfadTgAfgAfcAfcAfcdTcuudTcuugsgsu
5234	5235		871-893		csasgaaaGfaGfuGfuCfuCfaucuaL96	usAfsaGfaUfgAfgAfcacUfcdTulUfcUfgsgsu
5236	5237		871-893	AD-60519	csasgaaaGfaGfuGfuCfuCfaucuaL96	usAfsaGfaUfgAfgAfcAfcUfcUfuUfcUfgsgsu

Ejemplo 33: Estudios de múltiples dosis adicionales con AD-60519

Se estudió la eficacia terapéutica de AD-60519 en un modelo de AIP en rata como el utilizado en el Ejemplo 31. El diseño experimental se muestra en la FIG. 46 (parte superior). Las ratas se trataron con PBS o 3 mg/kg, 1 mg/kg o 0.3 mg/kg de ARNip de ALAS1-GalNAc una vez a la semana durante cuatro semanas (tratamiento en el día 0, día 7, día 14 y día 21). Se administraron fenobarbital (Fenobarb) y un ARNip de PBGD en una formulación de LNP AF11 en los momentos indicados en la FIG. 46. Un grupo de control recibió PBS y el ARNip de PBGD solo, sin inducción con fenobarbital. La orina se recogió en el día 25 del estudio.

Los resultados se muestran en la FIG. 46 (parte inferior) y en la FIG. 47. La administración de fenobarbital y PBS indujo la expresión de ARNm de ALAS1 e incrementó los niveles de PBG y ALA en orina, en comparación con PBS solo. El tratamiento con un total de cuatro dosis de 3 mg/kg, 1 mg/kg o 0.3 mg/kg de AD-60519 una vez a la semana suprimió los incrementos inducidos por fenobarbital de los niveles de ARNm de ALAS1 de rata en el hígado en una manera dependiente de la dosis (remítase a la FIG. 46). (Los niveles de ARNm de ALAS1 de rata (rALAS1) en el hígado se expresan en relación con los niveles de ARNm de GAPDH de rata). Los niveles de PBG en orina y ALA en orina también mostraron efectos del tratamiento dependientes de la dosis.

Las dosis semanales repetidas de AD-60519 fueron eficaces para suprimir la expresión de ARNm de ALAS1 y para reducir los niveles elevados de ALA y PBG asociados con ataques agudos inducidos en un modelo de AIP en rata. Estos efectos del tratamiento fueron dependientes de la dosis. Estos resultados ilustran que AD-60519 puede actuar de manera profiláctica cuando se administran dosis antes de un ataque.

Ejemplo 34: Efectos de múltiples dosis de conjugados de ARNip de ALAS1-GalNAc en primates no humanos

Se estudiaron los efectos de conjugados de ARNip de ALAS1-GalNAc para suprimir el ARNm de ALAS1 en el hígado y ARNm de ALAS1 circulante en un estudio en primates no humanos (NHP). Se emplearon los conjugados de GalNAc AD-58632, AD-60519, AD-61193 y AD-60819. El diseño del estudio se muestra en la Tabla 41 y en la FIG. 48.

Tabla 41: Diseño del estudio con NHP

Artículo de prueba	N.º de grupo	N	Nivel de dosis (mg/kg)	Conc de la dosis (mg/ml)	Frecuencia de la dosis	Días de la dosis	Volumen de la dosis (ml/kg)	Ruta de la dosis
AD-58632	1	3	2.5	1.25	Cada día x 5 Sem 1, Dos veces a la semana Sem 2-4	1, 2, 3, 4, 5, 8, 11, 15, 18, 22, 25	2	SC
AD-60519	2	3	1.25	0.625	Cada día x 5 Sem 1, Dos veces a la semana Sem 2-4			
	3	3	2.5	1.25	Cada día x 5 Sem 1, Dos veces a la semana Sem 2-4			

(continuación)

	4	3	2.5	1.25	Cada día x 5 Sem 1, Cada semana Sem 2-4	1, 2, 3, 4, 5, 11, 18, 25		
	5	3	5	2.5	Cada día x 5 Sem 1, Cada semana Sem 2-4			
AD-61193	6	3	2.5	1.25	Cada día x 5 Sem 1, Dos veces a la semana Sem 2-4	1, 2, 3, 4, 5, 8, 11, 15, 18, 22, 25		
AD-60819	7	3	2.5	1.25	Cada día x 5 Sem 1, Dos veces a la semana Sem 2-4	1, 2, 3, 4, 5, 8, 11, 15, 18, 22, 25		

Cada grupo recibió múltiples dosis subcutáneas de un conjugado de ANRip de ALAS1-GalNAc en un volumen de dosis de 2 mg/ml. El Grupo 1 (n=3) recibió 2.5 mg/kg de AD-58632 de 1.25 mg/ml en los días 1, 2, 3, 4, 5, 8, 11, 15, 18, 22 y 25. El Grupo 2 (n=3) recibió 1.25 mg/kg de AD-60519 de 0.625 mg/ml en 1, 2, 3, 4, 5, 8, 11, 15, 18, 22 y 25. El Grupo 3 (n=3) recibió 2.5 mg/kg de AD-60519 de 1.25 mg/ml en los días 1, 2, 3, 4, 5, 8, 11, 15, 18, 22 y 25. El Grupo 4 (n=3) recibió 2.5 mg/kg de AD-60519 de 1.25 mg/ml en los días 1, 2, 3, 4, 5, 11, 18 y 25. El Grupo 5 (n=3) recibió 5 mg/kg de AD-60519 de 2.5 mg/ml en los días 1, 2, 3, 4, 5, 11, 18, y 25. El Grupo 6 (n=3) recibió 2.5 mg/kg de AD-61193 de 1.25 mg/ml en los días 1, 2, 3, 4, 5, 8, 11, 15, 18, 22 y 25. El Grupo 7 (n=3) recibió 2.5 mg/kg de AD-60819 de 1.25 mg/ml en los días 1, 2, 3, 4, 5, 8, 11, 15, 18, 22 y 25.

Las muestras de suero para un ensayo de detección de ARN extracelular circulante (cERD) (remítase al Ejemplo 21) se recogieron en los días -3, 7, 13, 21, 27, 39, 46 y 60 (en la FIG. 48, "Extracciones PD" indica los días en los que se recogió el suero). El suero se recogió para un panel de química clínica en los días -3 y 6. El panel de química clínica incluyó la evaluación de los niveles de alanina-aminotransferasa (ALT), aspartato-aminotransferasa (AST) y fosfatasa alcalina (ALP). Se evaluó el silenciamiento del ARNm de ALAS1 en tejido hepático obtenido de una biopsia hepática realizada el día 21 (remítase a la FIG. 48). La biopsia se realizó después de una extracción de suero.

Supresión de los niveles de ARNm de ALAS1 en el hígado

Los niveles de ARNm de ALAS 1 en el hígado en el día de estudio 21 se muestran en la FIG. 49. Los resultados se muestran como un porcentaje del nivel promedio observado en un grupo de control tratado con PBS. Los resultados se muestran como los valores promedio para cada grupo de tratamiento.

Estos resultados presentados en la FIG. 49 demuestran que en comparación con los animales de control que recibieron tratamiento con PBS, todas las condiciones de tratamiento fueron eficaces para suprimir los niveles en el hígado de ARNm de ALAS1. Los tratamientos lograron un silenciamiento de ARNm comprendido entre aproximadamente un 20% y un 80% (correspondiente a niveles de ARNm de ALAS1 comprendidos entre aproximadamente un 80% y un 20% de los niveles de control).

Los animales individuales que recibieron AD-58632 mostraron un silenciamiento de aproximadamente un 20-50%, siendo el nivel promedio de silenciamiento de aproximadamente un 40% (los niveles de ARNm de ALAS1 estuvieron

de promedio en aproximadamente un 60% de los niveles de control). Con todas las programaciones posológicas empleadas, AD-60519 fue sumamente eficaz para suprimir los niveles de ARNm de ALAS1. Los animales individuales que recibieron AD-60519 mostraron un silenciamiento de entre aproximadamente un 60% y un 80% (los niveles de ARNm de ALAS1 fueron de aproximadamente un 20% a un 40% de los niveles de control). De promedio, los regímenes de tratamiento AD-60519 lograron un silenciamiento de entre aproximadamente un 65% y un 75%. Como se describe en la presente, AD-60519 es un derivado de AD-60489. Se describen resultados similares para AD-60489 en el Ejemplo 20 y se muestran en la FIG. 30. Además, AD-61193 (un derivado de AD-60489) y AD-60819 (un derivado de AD-58632) también lograron un silenciamiento de más de un 50%. Cabe destacar que los niveles de silenciamiento mencionados en este ejemplo y en el Ejemplo 20 (p. ej., de aproximadamente un 20% a un 80%) se lograron incluso en un estado "no inducido"; se anticipa que en un estado inducido, p. ej., cuando los niveles de ALAS1 estén elevados de manera crónica o aguda (p. ej., en un paciente que tiene o está en riesgo de tener porfiria, p. ej., una porfiria hepática aguda, p. ej., AIP), niveles más bajos de silenciamiento, p. ej., reducción de los niveles de ARNm de ALAS1 hasta niveles normales o anteriores al ataque, puedan ser suficiente para lograr una eficacia terapéutica.

Supresión de los niveles de ARNm de ALAS1 extracelular circulante

La FIG. 50 muestra los niveles de ARNm de ALAS1 extracelular circulante (medias y desviaciones estándar) en cada punto temporal a lo largo del estudio cuando se obtuvieron las muestras de suero. Los resultados de ARNm de ALAS1 extracelular circulante demuestran eficacia del silenciamiento de ARNm tras el tratamiento multidosis con cada uno de los ARNip estudiados (AD60519, AD-61193, AD-60819 y AD-58632). En todos los grupos, el efecto de supresión mayor en el ARNm de ALAS1 circulante se observó en el día 27, tras la dosis final de ARNip en el día 25. En todos los grupos de tratamiento, durante las semanas después del cese del tratamiento, los niveles de ARNm de ALAS1 se incrementaron gradualmente y volvieron al punto de referencia en la medida final del día 60.

La supresión más pronunciada de ARNm de ALAS1 circulante (silenciamiento máximo de casi un 80%) se observó en el Grupo 3 (2.5 mg/kg de AD-60519 cada día x 5, dos veces a la semana x 3) y el Grupo 5 (5 mg/kg de AD-60519, cada día x 5, cada semana x 3). El Grupo 2 (1.25 mg/kg de AD-60519, cada día x 5, dos veces a la semana x 3), Grupo 4 (2.5 mg/kg de AD-60519, cada día x 5, cada semana x 3), Grupo 7 (2.5 mg/kg de AD-60819, cada día x 5, dos veces a la semana x 3) y el Grupo 6 (2.5 mg/kg de AD-61193, cada día x 5, dos veces a la semana x 3) también mostraron una supresión excelente, con un silenciamiento máximo (día 27) superior a un 50%. En el grupo 1, también se logró un silenciamiento notable (más de un 30% en el día 27).

Los resultados concuerdan con los resultados de ARNm de ALAS1 en el hígado y confirman la potente actividad de AD-60519. Con niveles de dosis de tan solo 1.25 mg/kg, AD-60519 proporcionó un 65-75% de silenciamiento.

Correlación entre los niveles de ARNm de ALAS1 circulante y en el hígado

La FIG. 27 muestra los niveles de ARNm de ALAS1 en el hígado (barras de la izquierda) y en suero (barras de la derecha). Existe una buena correlación entre los niveles de ARNm de ALAS1 relativo medidos en el hígado y suero, lo que indica que estas medidas proporcionan resultados coherentes.

Ejemplo 35: Estudios con dosis única en rata de AD-60519 y AD-60589 utilizando un ensayo cERD en orina para monitorizar la duración de la supresión de ARNm de ALAS1

Se llevó a cabo un estudio de dosis única en ratas utilizando los conjugados de ARNip de ALAS1-GalNAc AD-60489 y AD-60519. La eficacia de estos conjugados de GalNAc para inhibir la expresión de ARNm de ALAS1 se monitorizó utilizando evaluaciones de orina con un ensayo de detección de ARN extracelular circulante. El ensayo fue similar al ensayo utilizado en los Ejemplos 21 y 34, excepto en que se utilizaron muestras de orina. Las muestras de orina se liofilizaron para concentrarlas. La orina liofilizada se resuspendió en 4 ml de dH₂O y se agitó en vórtex. A continuación, la muestra se centrifugó a 4000xg durante 10-20 minutos para sedimentar cualquier desecho. Los pasos restantes fueron similares a los descritos en el Ejemplo 21.

A los grupos de ratas se les administró una dosis única de 10 mg/kg de AD-60489 o AD-60519. Los niveles normalizados de ARNm de ALAS1 en diversos puntos temporales a lo largo del estudio se muestran en la FIG. 51. El punto temporal indicado como "0 horas" es para la muestra de orina anterior a la dosis de referencia extraída justo antes de la administración del ARNm de ALAS1. Los resultados para los puntos temporales posteriores se expresan como una fracción del nivel anterior a la dosis.

Como se puede apreciar a partir de los resultados mostrados en la FIG. 51, AD-60519 proporcionó una mejora de la potencia en comparación con AD-60489. En su máximo, la dosis única de AD-60519 proporcionó una supresión de hasta aproximadamente un 80%, mientras que la supresión proporcionada por AD-60489 fue de aproximadamente un 60%. El efecto de una única dosis de 10 mg/kg de los ARNip de ALAS1 en la supresión de ARNm de ALAS1 duró aproximadamente 21 días. Estos resultados demuestran la validez del ensayo cERD en orina para monitorizar los niveles de ARNm de ALAS1.

Ejemplo 36: Efectos farmacológicos de AD-60519 en primates no humanos

Se llevó a cabo un estudio adicional de los efectos del conjugado de ARNip de ALAS1-GalNAc AD-60519 en primates no humanos. El estudio investigó los efectos de una dosificación semanal frente a bisemanal, el uso de una dosis de carga frente a ausencia de dosis de carga, y la cinética del silenciamiento de ARNm de ALAS1 tras una única dosis. El diseño del estudio se muestra en la Tabla 42 y en la FIG. 52.

5

Tabla 42: Diseño del estudio farmacológico para el estudio con AD-60519

N.º de grupo	N	Nivel de dosis (mg/kg)	Frecuencia de la dosis	Necesidades del material (mg)*	Vol dosis (ml/kg)	Días de la dosis	Conc de la dosis (mg/ml)	Ruta de la dosis
1	3	2.5	Cada semana x 8 semanas	210	0.125	1,8, 15, 22, 29, 36, 43, 50	20	SC
2	3	5	Cada semana x 8 semanas	420	0.25			
3	3	Carga-5 mg/kg cada día x3, mant-5 mg/kg	Carga D1-D3, cada semana x 7 semanas	525	0.25/25	1, 2, 3, 8, 15, 22, 29, 36, 43, 50		
4	3	Carga-5 mg/kg cada día x3, mant-2.5 mg/kg	Carga D1-D3, cada semana x 7 semanas	270	0.25/0.125			
5	3	5	Dos veces a la semana x 8 semanas	924	0.25	1, 4, 8, 11, 15, 18, 22 25, 29, 32, 36, 39, 43, 46, 50, 53		
6	3	1	Dosis única	12	0.05	1		
7	3	10	Dosis única	116	0.5	1		

Cada grupo recibió una o más dosis subcutáneas de AD-60519 como se proporciona en la Tabla 42. El Grupo 1 (n=3) recibió 2.5 mg/kg en un volumen de dosis de 0.125 ml/kg una vez a la semana durante 8 semanas (las dosis se administraron en los días de dosis 1, 8, 15, 22, 29, 36, 43 y 50). El Grupo 2 (n=3) recibió 5 mg/kg en un volumen de dosis de 0.25 mg/ml una vez a la semana durante 8 semanas (las dosis se administraron en los días de dosis 1, 8, 15, 22, 29, 36, 43 y 50). El Grupo 3 (n=3) recibió una dosis de carga de 5 mg/kg en un volumen de dosis de 0.25 ml/kg una vez al día durante tres días seguida por una dosis de mantenimiento de 5 mg/kg en un volumen de dosis de 0.25 ml/kg una vez a la semana durante 7 semanas (las dosis se administraron en los días 1, 2, 3, 8, 15, 22, 29, 36, 43 y 50). El Grupo 4 (n=3) recibió una dosis de carga de 5 mg/kg en un volumen de dosis de 0.25 ml/kg una vez al día durante tres días, seguida por una dosis de mantenimiento de 2.5 mg/kg en un volumen de dosis de 0.125 ml/kg una vez a la semana durante 7 semanas (las dosis se administraron en los días 1, 2, 3, 8, 15, 22, 29, 36, 43 y 50). El Grupo 5 (n=3) recibió 5 mg/kg en un volumen de dosis de 0.25 ml/kg dos veces a la semana durante 8 semanas (las dosis se administraron en los días de dosis 1, 4, 8, 11, 15, 18, 22, 25, 29, 32, 36, 39, 43, 46, 50 y 53). El Grupo 6 (n=3) recibió una única dosis de 1 mg/kg en un volumen de dosis de 0.05 ml/kg en el día 1. El Grupo 7 (n=3) recibió una única dosis de 10 mg/kg en un volumen de dosis de 0.5 ml/kg en el día 1.

Las muestras de suero (enumeradas como "extracciones PD" en la FIG. 52), muestras de plasma (enumeradas como "extracciones PK" en la FIG 52) y las muestras de orina se recogieron como se indica en la FIG. 52 y la Tabla

43. Las muestras de orina y suero se sometieron al ensayo cERD. Todas las muestras de sangre y orina recogidas en el día de una biopsia hepática se recogieron antes de la biopsia hepática.

Tabla 43: Programación de la recogida de muestras

Suero para la detección de ARNm		Biopsia hepática		Orina para la detección de ARNm exploratoria		Plasma para PK	
Gps 1-4	Día -3, y días 5, 10, 17, 24, 31, 38, 45, 52, 57, 64, 78, 92	Grupos 1-5	Día 24*	Gps 1-5	Día -3, y días 24*, 52	Gp7	Día -3, y días 1 a 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 12 horas y días 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 15, 22, 29, 36
Gp 5	Día -3, y días 3, 10, 17, 24, 31, 38, 45, 52, 60, 67, 81, 95	Grupos 6-7	Día 4*				
Gps 6-7	Día -3, y días 2, 4, 6, 9, 15, 22, 29, 36						
*Todas las muestras de sangre y orina se recogieron antes de la biopsia hepática							
**Recogida de la primera orina de la mañana							

5 Los resultados de ARNm de ALAS1 se muestran en la FIG. 53. Se logró una supresión de ARNm de ALAS1 significativa en todas las condiciones de estudio. Se logró hasta un 75-80% de silenciamiento de ALAS1 en regímenes de múltiples dosis utilizando AD-60519. Tres días después de una única dosis, se logró un silenciamiento de aproximadamente un 15% con una única dosis de 1 mg/kg, y se logró un silenciamiento de aproximadamente un 70% con una única dosis de 10 mg/kg (remítase a la FIG. 53). La comparación de los datos de los grupos 1 y 7
10 revela una ligera diferencia en la cinética después de una única dosis (en el grupo 7) frente a múltiples dosis (grupo 1) de la misma cantidad acumulada (30 mg administrados), según se evalúa 3 días después de la dosis en el grupo 7 y dos días después de la cuarta dosis en el grupo 1. En particular, se observó un silenciamiento mayor después de una única dosis (silenciamiento de aproximadamente un 70% en promedio en el grupo 7 frente al silenciamiento de aproximadamente un 45% en promedio en el grupo 1). Remítase a la FIG. 54. Este tipo de resultado también se
15 observó en los estudios en ratas.

Los resultados de ARNm de ALAS1 en suero a lo largo del día 22 se muestran en la FIG. 54 (parte superior). La correlación entre ARNm de ALAS1 en hígado, ARNm de ALAS1 en suero y ARNm de ALAS1 en plasma se muestra en la FIG. 55. Estos resultados demuestran una buena correlación entre los niveles de ARNm de ALAS1 en hígado, suero y orina. Los resultados también proporcionan evidencia adicional que demuestra una potente actividad de AD-
20 60519. Se observó un silenciamiento de un 55-75% en todos los niveles de dosis en los regímenes posológicos de múltiples dosis. La administración de dosis de carga (una vez al día durante 3 días, como en los grupos 3 y 4) dio como resultado una disminución regulada ligeramente más rápida del ARNm de ALAS1. Los grupos que recibieron dosis semanales (grupos 1 y 2) o dosis bisemanales (grupo 5) mostraron en última instancia niveles comparables de supresión de ARNm de ALAS1, lo que indica que la acumulación a lo largo del tiempo proporciona una atenuación
25 sostenida.

Los resultados que muestran la cinética del silenciamiento de ARNm de ALAS1 después de una única dosis se muestran en la FIG. 54 (parte inferior). En el grupo de 1 mg/kg, se observó una supresión de ARNm de ALAS1 de aproximadamente un 20% el día 6. En el grupo de 10 mg/kg, hubo una reducción rápida, de aproximadamente un 70% de ARNm de ALAS1 el día 4, con una recuperación de un 20% o menos del punto de referencia el día 22 (21
30 días después de la dosis). Los niveles de ARNm de ALAS1 en suero volvieron al punto de referencia aproximadamente 2 semanas o 4 semanas después de una única dosis de 1 mg/kg o 10 mg/kg, respectivamente.

El ciclo completo de ARNm de ALAS en suero de hasta 8 semanas después de la administración de AD-60519 se muestra en la FIG. 56. Todos los grupos alcanzaron un máximo de un 80% de la supresión de ARNm de ALAS1 en las semanas 5 a 8 después de la dosificación con ALN-AS1. Los grupos con tres dosis diarias en la semana 1 (cada día x 3) tuvieron un inicio más rápido de supresión de ARNm de ALAS1 que los que simplemente recibieron una dosis en la primera semana (cada semana x 8). Todos los animales volvieron a los niveles de ALAS1 del punto de referencia, aproximadamente 30-40 días después de la última dosis.

Ejemplo 37: Producción de un producto farmacológico de ARNip

ALN-60519 (FIG. 57) es un oligonucleótido bicatenario sintetizado por medios químicos ligado covalentemente a un ligando que contiene tres residuos de N-acetilgalactosamina (GalNAc). Todos los nucleótidos tienen modificaciones 2'-OMe o 2'-F y están conectados a través de uniones fosfodiéster 3'-5', para formar de esta manera el esqueleto de azúcar-fosfato del oligonucleótido. La hebra sentido y la hebra antisentido contienen 21 y 23 nucleótidos, respectivamente. El extremo 3' de la hebra sentido está conjugado con el resto de GalNAc de tres antenas (denominado L96) mediante una unión fosfodiéster. La hebra antisentido contiene cuatro uniones fosforotioato, dos en el extremo 3' y dos en el extremo 5'. La hebra sentido contiene dos uniones fosforotioato en el extremo 5'. Los 21 nucleótidos de la hebra sentido se hibridan con los 21 nucleótidos complementarios de la hebra antisentido y de esta manera forman pares de bases de 21 nucleótidos y una protuberancia de dos bases en el extremo 3' de la hebra antisentido. Las dos hebras sencillas, la hebra sentido y la hebra antisentido, se sintetizaron mediante síntesis de oligonucleótidos en fase sólida convencional, empleando química de fosforamiditos estándar con el grupo 5'-hidroxilo protegido como éter dimetoxitrietilmetílico (DMT). Cada hebra se ensambló desde el extremo 3' al 5' mediante la adición secuencial de nucleósidos fosforamiditos protegidos.

AD-60519, también denominado en la presente ALN-60519, se formuló como una solución para la inyección para el uso subcutáneo, denominada en la presente ALN-AS1. ALN-60519 se disolvió en agua para inyección (WFI, por sus siglas en inglés) y se ajustó el pH (objetivo 7.0). Se determinó la concentración de ALN-60519 y se ajustó añadiendo WFI. La solución con una concentración final de aproximadamente 200 mg/ml se esterilizó por filtración a continuación y se rellenaron viales de vidrio de Tipo I con 2 ml. Se escogió un volumen de relleno de aproximadamente 0.55 ml para permitir la extracción completa de 0.5 ml de producto farmacológico.

Ejemplo 38: Medida de los niveles de ARNm de ALAS1 en suero u orina en pacientes con AIP o voluntarios sanos utilizando el método cERD

Los estudios farmacológicos en primates no humanos con ALN-AS1 indicaron que el método de detección de ARN extracelular circulante (cERD) para medir el ARNm de ALAS1 en suero u orina era robusto y reproducible. El ensayo cERD también se utilizó para medir los niveles de ARNm de ALAS1 en suero y orina de pacientes con AIP y voluntarios sanos. Los niveles de ARNm de ALAS1 se incrementaron en general en pacientes con AIP respecto a los voluntarios sanos, lo que concuerda con la función que la inducción de ALAS1 desempeña en la patofisiología de la enfermedad (FIG. 58). De manera importante, los niveles de ALAS1 en suero y orina de un mismo paciente se correlacionaron entre sí. En dos pacientes en los que se recogieron repetidamente orina y suero el nivel del ARNm de ALAS1 fue coherente a lo largo del tiempo. En global, estos datos indican que el ARNm de ALAS1 se puede medir en muestras de suero y orina de sujetos humanos incluidos pacientes con AIP, y el método cERD es útil para rastrear la actividad farmacodinámica de ALN-AS1.

Ejemplo 39: Estudios clínicos ejemplares

Se puede llevar a cabo un estudio en seres humanos para determinar la seguridad y tolerabilidad de ALN-AS1 cuando se administra como una única dosis y múltiples dosis a pacientes con AIP que son excretadores elevados asintomáticos (ASHE, por sus siglas en inglés) (pacientes que tienen niveles elevados de ALA y/o PBG, como se describe en la presente) o pacientes con AIP que padecen ataques recurrentes.

Los objetivos secundarios incluyen la caracterización de PK en plasma y orina para ALN-AS1 así como también la evaluación después de la dosis del impacto de ALN-AS1 en los niveles de ALA y PBG tanto en plasma como urinarios. Se utiliza el ensayo cERD que mide el ARNm en los exosomas para medir 5-aminolevulinato-sintasa (ARNm de ALAS-1) en suero (o en plasma) y urinario.

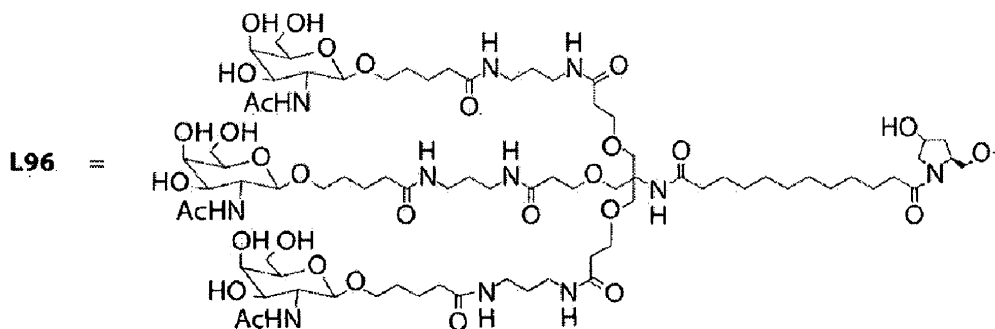
En los excretadores elevados asintomáticos, se administra ALN-AS1 en dosis únicas, p. ej., de 0.1, 0.35, 1.0 o 2.5 mg/kg, o en dosis semanales repetidas, p. ej., de 1 y 2.5 mg/kg, durante varias semanas (p. ej., durante 4 semanas). Como una comparación, se administra un tratamiento de control (p. ej., placebo). Se evalúan la seguridad, farmacocinética y efectos del fármaco en los niveles de ALA y PBG. Una dosis de ALN-AS1 que reduce ALA y PBG hasta dentro del intervalo de referencia normal (p. ej., una dosis que normaliza los niveles de ALA y/o PBG por debajo de 2x el valor de referencia superior) se puede seleccionar para estudios posteriores, p. ej., en pacientes con AIP.

En los pacientes con AIP, la tasa de ataques y los síntomas de referencia se evalúan durante un periodo de preinclusión anterior a la dosificación (p. ej., de 12 semanas). A los pacientes se les administra ALN-AS1, p. ej., con una dosis de 1-2.5 mg/kg a la semana. Se evalúan la seguridad, farmacocinética y efectos del fármaco en los niveles

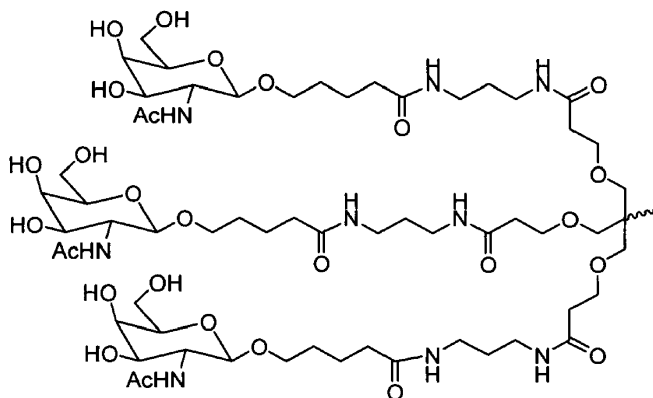
de ALA y PBG. Además, se monitorizan los cambios en el número de ataques, uso de hemo, uso de medicamentos para el dolor y hospitalización.

REIVINDICACIONES

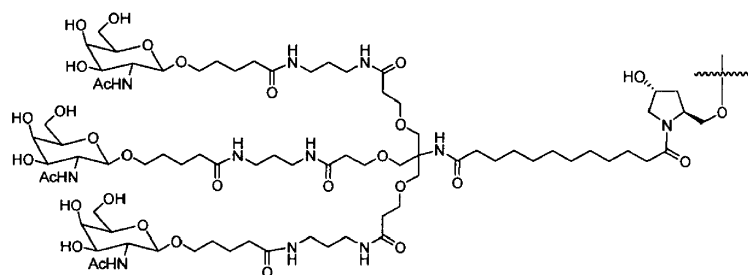
1. Un ácido ribonucleico bicatenario (ARNbc) para inhibir la expresión de ALAS1, donde dicho ARNbc comprende una hebra sentido y una hebra antisentido, comprendiendo la hebra antisentido una región de complementariedad con un transcrito de ARN de ALAS1 (p. ej., SEQ ID NO: 1), cuya hebra antisentido comprende
 5 usAfsAfGfaUfgAfgAfcAfcUfcUfuUfgsgsu (SEQ ID NO: 4161), donde c, a, g, u = ribonucleósidos 2'-OMe; Af, Cf, Gf, Uf = ribonucleósidos 2'F; s = fosforotioato, o una secuencia que difiere en no más de 1, 2 o 3 nucleótidos de esta.
2. El ARNbc de la reivindicación 1, que comprende además una hebra sentido que comprende csasgaaaGfaGfuGfuCfuCfaucuuL96 (SEQ ID NO: 4160), donde



3. El ARNbc de la reivindicación 1 o 2, donde dicho ARNbc tiene uno o más de los siguientes:
- (a) comprende una región dúplex que tiene una longitud de 17-23 pares de nucleótidos;
 - (b) al menos una hebra comprende una protuberancia 3' de al menos 2 nucleótidos; o
 - (c) cada hebra no tiene más de 26 nucleótidos de longitud.
4. El ARNbc de la reivindicación 3, donde la región dúplex tiene una longitud de 21-23 pares de nucleótidos o 21
 15 pares de nucleótidos.
5. El ARNbc de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además un ligando.
6. El ARNbc de la reivindicación 5, donde el ligando tiene uno o más de los siguientes:
- (a) se conjuga con el extremo 3' de la hebra sentido del ARNbc;
 - (b) comprende un carbohidrato, opcionalmente donde el ligando es un ligando GalNAc, donde
 20 opcionalmente el ligando es:



- (c) se une mediante un conector ramificado bivalente o trivalente, opcionalmente donde el ligando y conector son como se muestra en la Fórmula XXIV:



o

(d) dirige el ARNbc a los hepatocitos.

7. El ARNbc de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la hebra antisentido comprende o está constituida por usAfsAfGfaUfgAfgAfcAfcUfcUfuUfcUfgsgsu (SEQ ID NO: 4161), y/o la hebra sentido comprende o está constituida por csasgaaaGfaGfuGfuCfuCfaucuuuL96 (SEQ ID NO: 4160).

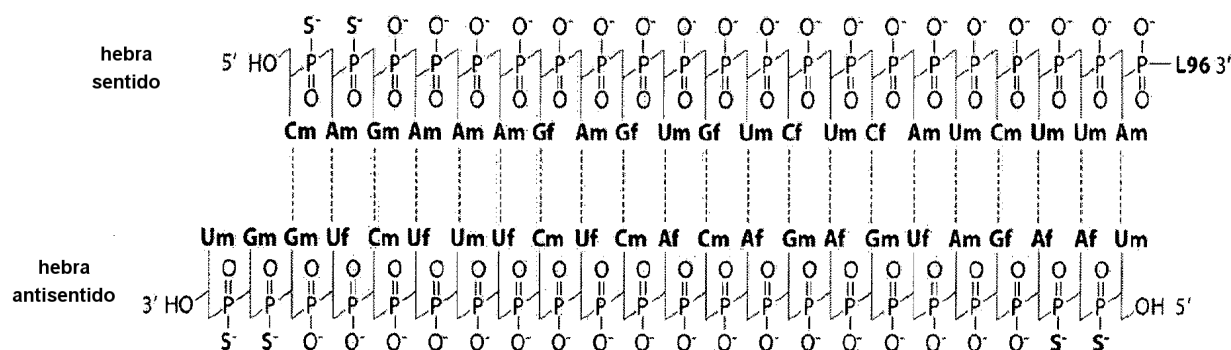
8. El ARNbc de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el ARNbc tiene uno, dos o todos los siguientes:

(i) se sintetiza por medios químicos;

(ii) tiene una protuberancia 3'; o

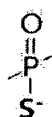
(iii) comprende o está constituido por una hebra sentido que tiene csasgaaaGfaGfuGfuCfuCfaucuuuL96 (SEQ ID NO: 4160) y una hebra antisentido que tiene usAfsAfGfaUfgAfgAfcAfcUfcUfuUfcUfgsgsu (SEQ ID NO: 4161).

9. El ARNbc de la reivindicación 1, donde dicho ARNbc está en forma de un conjugado que tiene la estructura de:



15 o una sal farmacéuticamente aceptable de este,

donde Af, Cf, Gf, Uf = ribonucleósidos 2'-F; Am, Cm, Gm, Um = ribonucleósidos 2'-OMe;

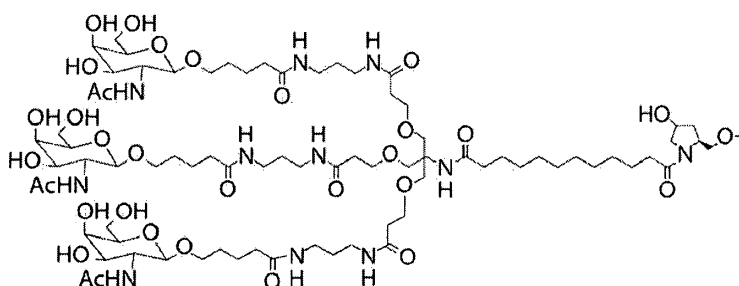


= fosforotioato;



20 = fosfodiéster, y donde

L96 =



10. Una célula que comprende el ARNbc de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.

11. Una composición farmacéutica que comprende el ARNbc de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, opcionalmente donde la composición comprende agua para inyección, opcionalmente donde la composición es adecuada para la administración subcutánea.

12. Un ARNbc de cualquiera de las reivindicaciones 1-9, o una composición farmacéutica de la reivindicación 11, para su uso en un método para inhibir la expresión de ALAS1 en una célula, comprendiendo el método:

(a) introducir en la célula el ARNbc de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, o la composición farmacéutica de la reivindicación 11, y

(b) mantener la célula del paso (a) durante un tiempo suficiente para obtener degradación del transcrito de ARNm de un gen de ALAS1, para inhibir de esta manera la expresión del gen de ALAS1 en la célula, opcionalmente donde la expresión de ALAS1 se inhibe en la célula en al menos un 20%, o al menos un 30%, opcionalmente donde la expresión de ALAS1 se inhibe en la célula en al menos un 80% según se mide mediante un ensayo de ADN ramificado (ADNr).

13. Un ADNbc de cualquiera de las reivindicaciones 1-9, o una composición farmacéutica de la reivindicación 11, para su uso en un método para reducir el nivel de una porfirina o un precursor de porfirina (p. ej., ALA o PBG) en una célula (p. ej., un hepatocito), que comprende poner en contacto la célula con el ARNbc de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, o con la composición farmacéutica de la reivindicación 11, en una cantidad eficaz para reducir el nivel de porfirina o del precursor de porfirina en la célula.

14. Un ARNbc de cualquiera de las reivindicaciones 1-9, o una composición farmacéutica de la reivindicación 11, para su uso en el tratamiento de una porfiria en un sujeto, opcionalmente donde la porfiria es una porfiria hepática o una porfiria intermitente aguda (AIP), opcionalmente donde la porfiria es porfiria hepática aguda.

15. Un ARNbc de la reivindicación 7 para su uso en el tratamiento de una porfiria hepática aguda.

16. El ARNbc, o una composición farmacéutica, para su uso de la reivindicación 14 o 15, donde el uso tiene uno o más de los siguientes:

(a) el sujeto está en riesgo de desarrollar, o se le ha diagnosticado, una porfiria;

(b) la porfiria es porfiria intermitente aguda o porfiria por deficiencia de ALA-deshidratasa;

(c) (i) el ARNbc o la composición se administra después de un ataque agudo de porfiria, (ii) el ARNbc o la composición se administra durante un ataque agudo de porfiria, o (iii) el ARNbc o la composición se administra de manera profiláctica para prevenir un ataque agudo de porfiria;

(d) el ARNbc se administra en una dosis de 0.05 a 50 mg/kg de peso corporal del sujeto, p. ej., en una dosis de 0.01 mg/kg a 5 mg/kg de peso corporal del sujeto;

(e) el método (i) reduce el nivel de una porfirina o un precursor de porfirina (p. ej., ácido δ -aminolevulínico (ALA) o porfobilinógeno (PBG)) en el sujeto, opcionalmente donde el nivel se reduce en al menos un 30%, y/o (ii) inhibe la expresión de ALAS1 en el sujeto;

(f) dicho método (i) mejora un síntoma asociado con un trastorno relacionado con ALAS1 (p. ej., una porfiria), (ii) reduce la frecuencia de ataques agudos de síntomas asociados con una porfiria en el sujeto, y/o (iii) reduce la incidencia de ataques agudos de síntomas asociados con una porfiria en el sujeto donde el sujeto está expuesto a un factor precipitante;

(g) el ARNbc o la composición que comprende el ARNbc se administra de acuerdo con un régimen posológico, p. ej., semanal, bisemanal o mensualmente;

(h) el ARNbc se administra antes de un ataque agudo de porfiria, p. ej., durante un pródromo;

- 5
- (i) el sujeto tiene un nivel elevado (p. ej., nivel en plasma u orina) de ALA y/o PBG, y opcionalmente donde el sujeto padece de dolor crónico;
 - (j) el método reduce el nivel elevado de ALA y/o PBG;
 - (k) el método reduce o previene el dolor, neuropatía y/o daño nervioso;
 - (l) el método previene ataques agudos de porfiria; o
 - (m) el ARNbc o la composición que comprende el ARNbc se administra repetidamente.

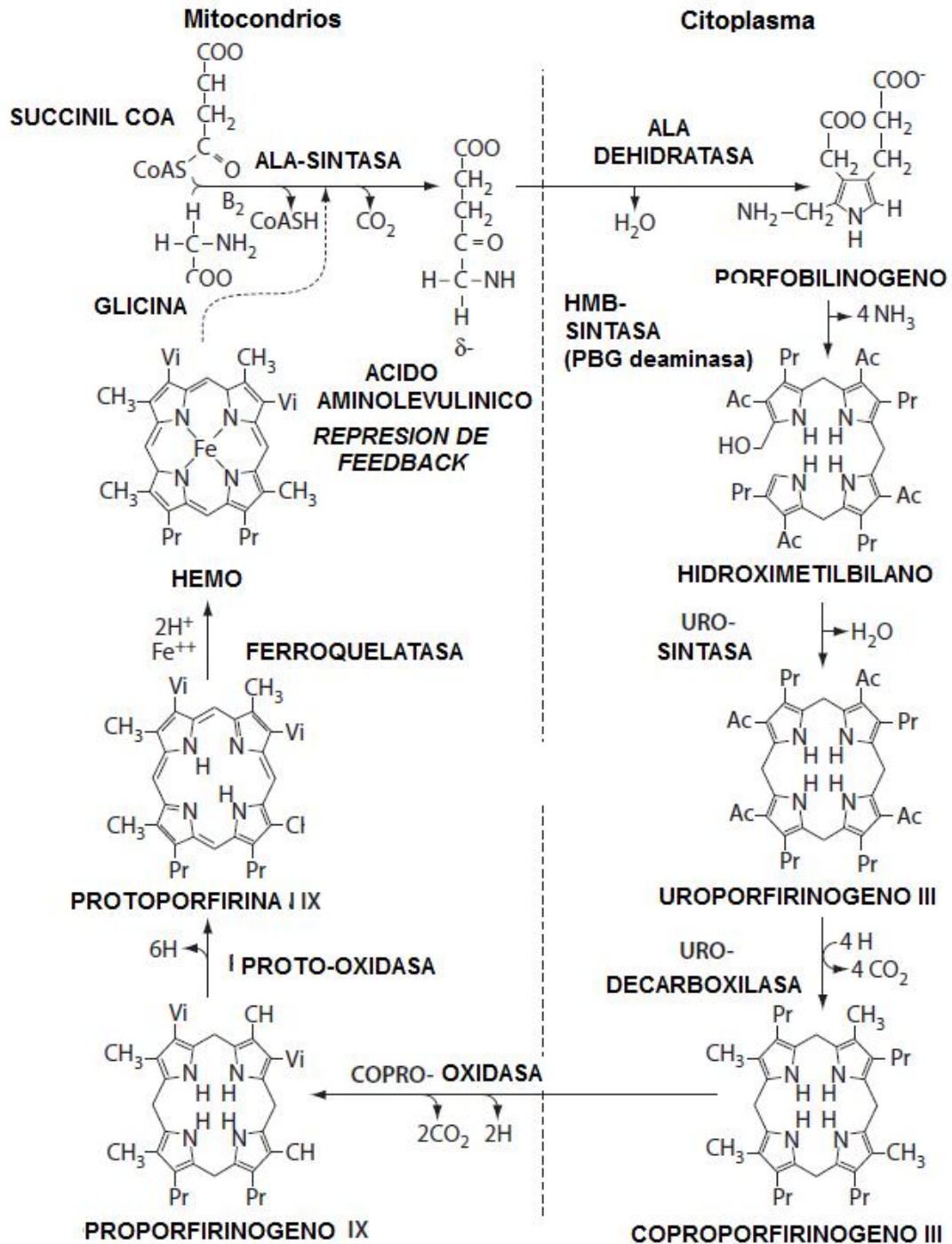


FIG. 1

FIG. 2A

Enzima, ubicación cromosómica	Reacción catalizada	Porfiria asociada	Tipo de porfiria	Patrón de herencia típico	Síntomas típicos
<p>δ-aminolevulinato (ALA) sintasa 1</p> <p>3p21</p>	<p>Glicina+succinilCoA</p> <p>↓</p> <p>Ácido δ-aminolevulínico (ALA)</p>				
<p>δ-aminolevulinato (ALA) sintasa 2 (ALAS2) (específico para eritroide)</p> <p>Xp11.21</p>	<p>Glicina+succinilCoA</p> <p>↓</p> <p>Ácido δ-aminolevulínico (ALA)</p>	<p>Anemia sideroblástica vinculada a X (XLSA)</p> <p>Protoporfiria vinculada a X (XLP)</p>	Eritropoética	Vinculado a X	
<p>δ-aminolevulinato dehidratasa (ALAD)</p> <p>9q34</p>	<p>Ácido δ-aminolevulínico (ALA)</p> <p>↓</p> <p>Porfobilinógeno (PBG)</p>	Porfiria por deficiencia de ALA dehidratasa (ADP o porfiria de Doss)	hepática	Autosómico recesivo	Dolor abdominal, neuropatía
<p>PBG deaminasa (PBGD) o hidroximetilbilano sintasa (HMBS)</p> <p>11q23</p>	<p>Porfobilinógeno (PBG)</p> <p>↓</p> <p>Hidroximetilbilano (HMB)</p>	Porfiria aguda intermitente (AIP)	hepática	Autosómico recesivo	Dolor abdominal periódico, neuropatía periférica, trastornos psiquiátricos, taquicardia

FIG. 2B

Uroporfirinógeno III sintasa (UROS) 10q26	Hidroximetilbilano ↓ Uroporfirinógeno III(URO)				Severa fotosensibilidad con eritema, hinchazón y ampollas, Anemia hemolítica, esplenomegalia
Uroporfirinógeno decarboxilasa (UROD) 1q34	Uroporfirinógeno III(URO) ↓ Coporfirinógeno III	Porfiria cutánea tarda (PCT)	Hepática	Autosómica dominante o esporádica	Fotosensibilidad con vesículas y ampollas
Coporfirinógeno III oxidasa (CPOX)3q12	Coporfirinógeno III (COPRO) ↓ Protoporfirinógeno IX	Coproporfiria hereditaria (HCP)	Hepática	Autosómica dominante	Fotosensibilidad, síntomas neurológicos, cólicos.
Coporfirinógeno oxidasa (PPOX) 1q14	Protoporfirinógeno IX (PROTO) ↓ Protoporfirina IX	Porfiria variegada (VP)	Mixta	Autosómica dominante	Fotosensibilidad, síntomas neurológicos, retardo del desarrollo
Ferroquelatasa 18q21.3	Protoporfirina IX ↓ Hemo	Protoporfiria eritropoiética (EPP)	eritropoiética	Autosómica recesivo	Fotosensibilidad con lesiones en la piel, cálculos vesiculares, moderada disfunción hepática

FIG. 3A

```

1  ctgtatatta aggcgcgcgc gatecgcggcc tgaggctgct cccggacaag ggcaacgagc
61  gtttcgtttg gacttctcga cttgagtgc cgcctccttc gccgcgcct ctgcagtcct
121  cagcgcagtt atgccagtt cttcccgctg tggggacacg accacggagg aatccttgct
181  tcagggactc gggaccctgc tggaccctt cctcgggttt aggggatgtg gggaccagga
241  gaaagtcagg atccctaaga gtcttcctg cctggatgga tgagtggctt cttctccacc
301  tagattcttt ccacaggagc cagcatactt cctgaacatg gagagtgttg ttcgccgctg
361  cccattctta tcccgagtcc cccaggcctt totgcagaaa gcaggcaaat ctctgttggt
421  ctatgcccac aactgcccc agatgatgga agttggggcc aagccagccc ctccggcatt
481  gtccactgca gcagtacact accaacagat caaagaaacc cctccggcca gtgagaaaga
541  caaaactgct aaggccaagg tccaacagac tccatgatgga tccagcaga gtccagatgg
601  cacacagctt ccgtctggac accccttgcc tgcacaagc cagggcactg caagcaaatg
661  ccttttctg gcagcacaga tgaatcagag aggcagcagt gtcttctgca aagccagtct
721  tgagcttcag gaggatgtgc aggaatgaa tgcctgagg aaagaggttg ctgaaacctc
781  agcaggcccc agtgtggtta gtgtgaaac cgatggaggg gatccagtg gactgctgaa
841  gaacttcag gacatcatgc aaaagcaaag accagaaaga gtgtctcatc ttcttcaaga
901  taacttgcca aaatctgttt ccacttttca gtatgatcgt ttctttgaga aaaaaattga
961  tgagaaaaag aatgaccaca cctatcgagt ttttaaaact gtgaaccggc gagcacacat
1021  cttcccatg gcagatgact attcagactc cctcatcacc aaaaagcaag tgtcagtctg
1081  gtgcagtaat gactacctag gaatgagtcg ccaccacgg gtgtgtgggg cagttatgga
1141  cactttgaaa caacatggtg ctggggcagg tggtagtaga aatatttctg gaactagtaa
1201  attccatgtg gacttagagc gggagctggc agacctccat gggaaagatg ccgcactctt
1261  gttttctctg tgctttgtgg ccaatgactc aacctcttc accctggcta agatgatgcc
1321  aggctgtgag atttactctg attctgggaa ccatgcctcc atgatccaag ggattcgaaa
1381  cagccgagtg ccaaagtaca tcttcgcca caatgatgtc agccacctca gagaactgct
1441  gcaaagatct gacctcag tccccagat tgtggcattt gaaactgtcc attcaatgga
1501  tggggcggtg tgcccaactg aagagctgtg tgatgtggcc catgagtttg gagcaatcac
1561  cttcgtggat gaggtccacg cagtggggct ttatggggct cgaggcggag ggattgggga
1621  tcgggatgga gtcatgccc aaatggacat catttctgga acacttgga aagcctttgg
1681  ttgtgttgga gggtagatc ccagcacgag ttctctgatt gacaccgtac ggtcctatgc
1741  tgctggcttc atcttcacca cctctctgcc acccatgctg ctggctggag cctggagtc
1801  tgtgcggatc ctgaagagcg ctgagggacg ggtgcttcgc cgcagcacc agcgcaacgt
1861  caaactcatg agacagatgc taatggatgc cggcctcctt gttgtccact gcccagcca
1921  cateatccct gtgcgggttg cagatgctgc taaaaacaca gaagtctgtg atgaactaat
1981  gagcagacat aacatctacg tgcaagcaat caattacctt acggtgcccc ggggagaaga
2041  gctcctacgg attgccccca cccctacca cacacccag atgatgaact acttccttga
2101  gaatctgcta gtcacatgga agcaagtggg gctggaactg aagcctcatt cctcagctga
2161  gtgcaacttc tgcaaggagg cactgcattt tgaagtgatg agtgaaagag agaagtccta
2221  tttctcaggg ttgagcaagt tggtagctgc tcaggcctga gcatgacctc aattatttca

```

FIG. 3B

2281 ctttaacccca ggccattatc atatccagat ggtcttcaga gttgtcttta tatgtgaatt
2341 aagtttatatt aaattttaat ctatagtaaa aacatagtcg tggaaataaa ttcttgctta
2401 aatgggtg
(SEQ ID NO:1)

FIG. 4A

```

1  cagaagaagg cagcgcccaa ggcgcatgog cagcggteac tcccgtgtga tattaaggcg
61  ccggcgatcg cggcctgagg ctgctcccgg acaagggcaa cgagcgtttc gtttggactt
121 ctcgacttga gtgcccgcct ccttcgcgcg cgcctctgca gtctcagcg cagttatgcc
181 cagttcttcc cgctgtgggg acacgaccac ggaggaatcc ttgcttcagg gactcgggac
241 cctgctggac cccttcctcg ggtttagggg atgtggggac caggagaaaag tcaggatccc
301 taagagtctt ccctgcctgg atggatgagt ggcttcttct ccacctagat tctttccaca
361 ggagccagca tacttcctga acatggagag tgttgctcgc cgctgcccac tcttatcccg
421 agtccccacg gcctttctgc agaaagcagg caaatctctg ttgttctatg cccaaaactg
481 cccaagatg atggaagttg gggccaagcc agccctcgg gcattgtcca ctgcagcagt
541 aactaccaa cagatcaaaag aaacccctcc ggccagttag aaagacaaaa ctgctaaggc
601 caaggtccaa cagactcctg atggatccca gcagagtcca gatggcacac agcttcgcgc
661 tggacacccc ttgcctgcca caagccaggg cactgcaagc aaatgccctt tcttggcagc
721 acagatgaat cagagaggca gcagtgtctt ctgcaaaagc agtcttgagc ttcaggagga
781 tgtgcaggaa atgaatgccg tgaggaaaga ggttgctgaa acctcagcag gcccagtggt
841 ggttagtggtg aaaaccgatg gaggggatcc cagtggactg ctgaagaact tccaggacat
901 catgcaaaaag caaagaccag aaagagtgtc tcatcttctt caagataact tgccaaaact
961 tgtttccact tttcagtatg atcgtttctt tgagaaaaaa attgatgaga aaaagaatga
1021 ccacacctat cgagttttta aaactgtgaa ccggcgagca cacatcttcc ccatggcaga
1081 tgactattca gactccctca tcaccaaaaa gcaagtgtca gtctggtgca gtaatgacta
1141 cctaggaatg agtcgccacc caggggtgtg tggggcagtt atggacactt tgaacaaca
1201 tgggtgctggg gcaggtggtg ctagaaatat ttctggaact agtaaattcc atgtggactt
1261 agagcgggag ctggcagacc tccatgggaa agatgccgca ctcttgtttt cctcgtgctt
1321 tgtggccaat gactcaacce tcttcacctt ggctaagatg atgccaggct gtgagattta
1381 ctctgattct gggaacctat cctccatgat ccaagggatt cgaaacagcc gactgcaaaa
1441 gtacatcttc cgccacaatg atgtcagcca cctcagagaa ctgctgcaaa gatctgaccc
1501 ctcagtcocc aagattgtgg catttgaaac tgtccattca atggatgggg cgggtgtgcc
1561 actggaagag ctgtgtgatg tggcccatga gtttggagca atcaccttcg tggatgaggt
1621 ccacgcagtg gggttttatg gggctcgagg cggagggatt ggggatcggg atggagtcat
1681 gccaaaaatg gacatcattt ctggaacact tggcaaagcc tttggttgtg ttggagggtg
1741 catcgccagc acgagttctc tgattgacac cgtacggctc tatgctgctg gcttcattct
1801 caccacctct ctgccacca tgctgctggc tggagccctg gactctgtgc ggatcctgaa
1861 gacgctgag ggacgggtgc ttgcgcgcca gcaccagcg cactcaaac tcatgagaca
1921 gatgetaatg gatgcgggcc tccctgttgt ccaactgccc agccacatca tccctgtgcg
1981 ggttgcatag gctgctaaaa acacagaagt ctgtgatgaa ctaatgagca gacataacat
2041 ctacgtgcaa gcaatcaatt accctacggt gcccggggga gaagagctcc tacggattgc
2101 cccacccct caccacacac ccagatgat gaactacttc cttgagaatc tgctagtca
2161 atggaagcaa gtggggctgg aactgaagcc tcattcctca gctgagtga acttctgcag
2221 gagggcactg cattttgaag tgatgagtga aagagagaag tccatttct caggcttgag

```

FIG. 4B

```
2281 caagttggta tctgctcagg cctgagcatg acctcaatta tttcacttaa ccccaggcca
2341 ttatcatatc cagatgggtct tcagagttgt ctttatatgt gaattaagtt atattaaatt
2401 ttaatctata gtaaaaacat agtcctggaa ataaattctt gcttaaattg tgaaaaaa
      (SEQ ID NO:382)
```

FIG. 5

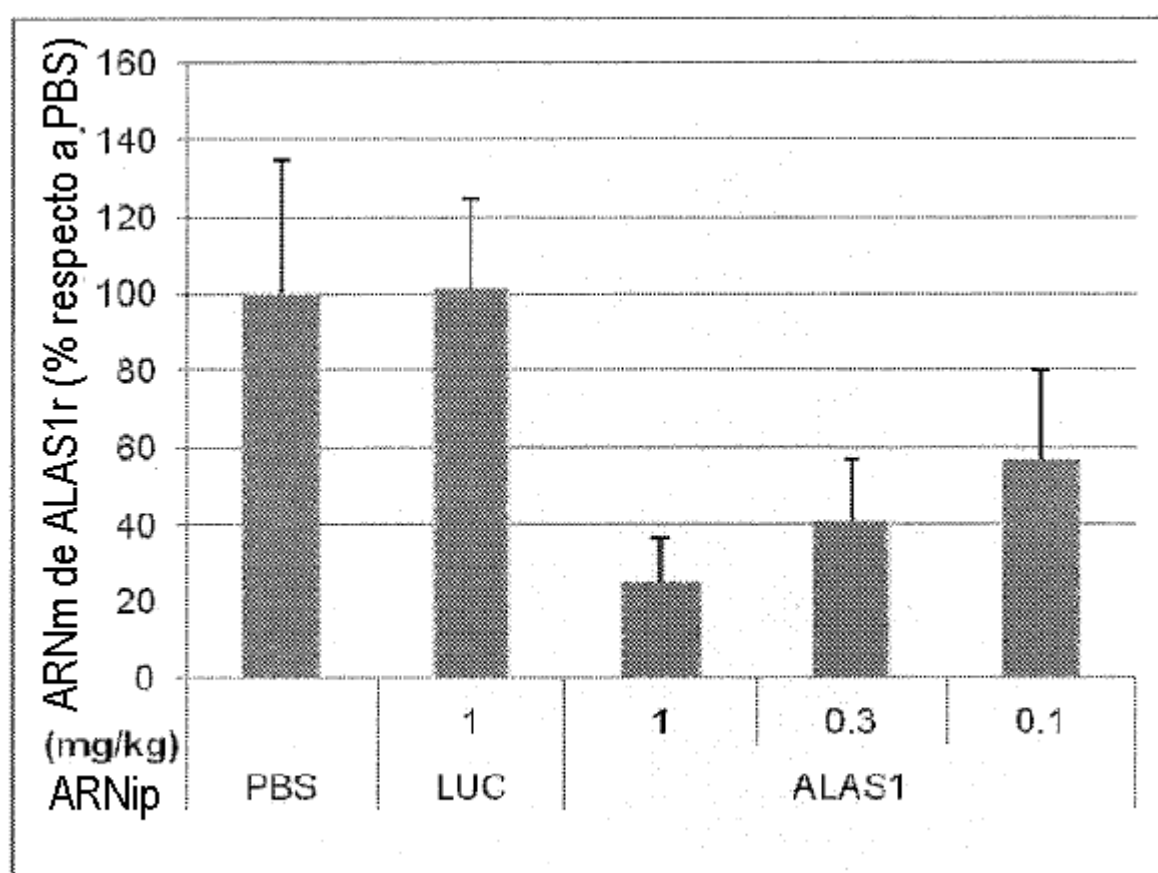


FIG. 6

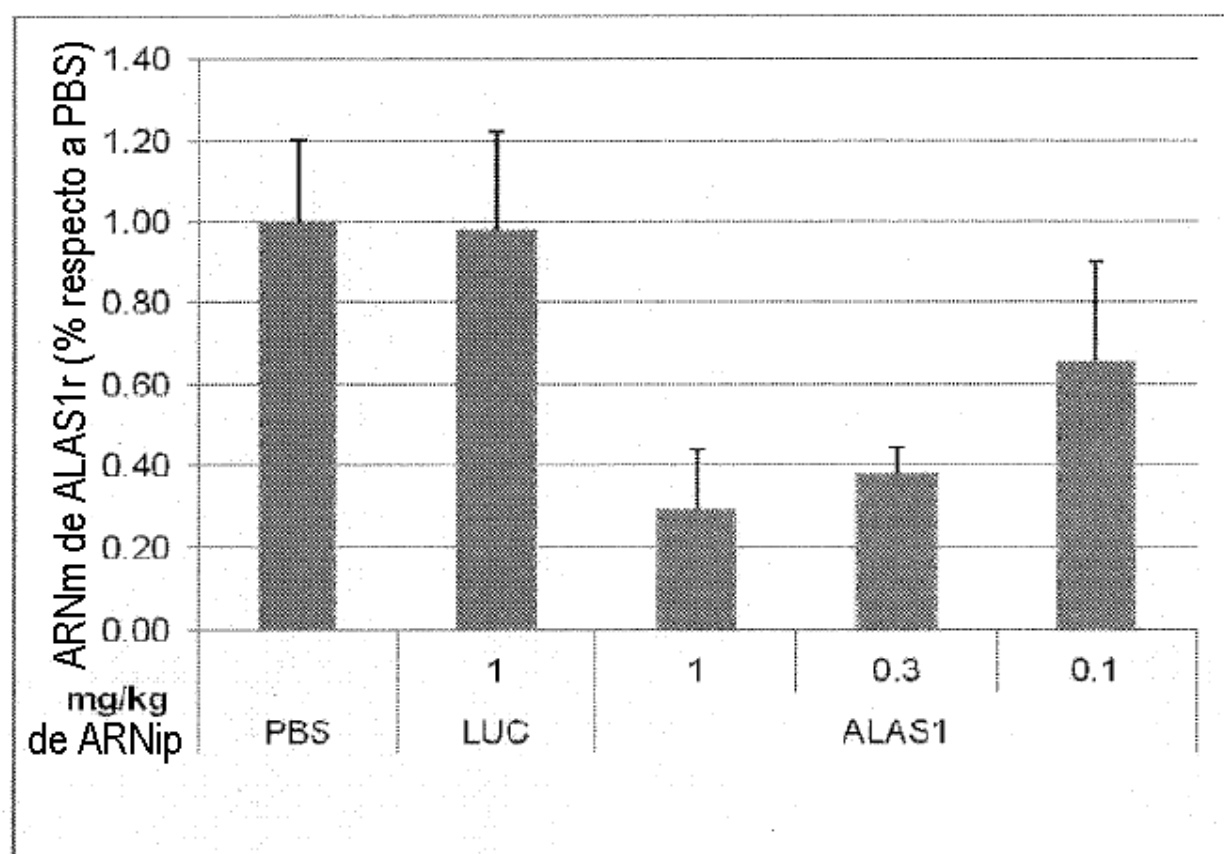


FIG. 7

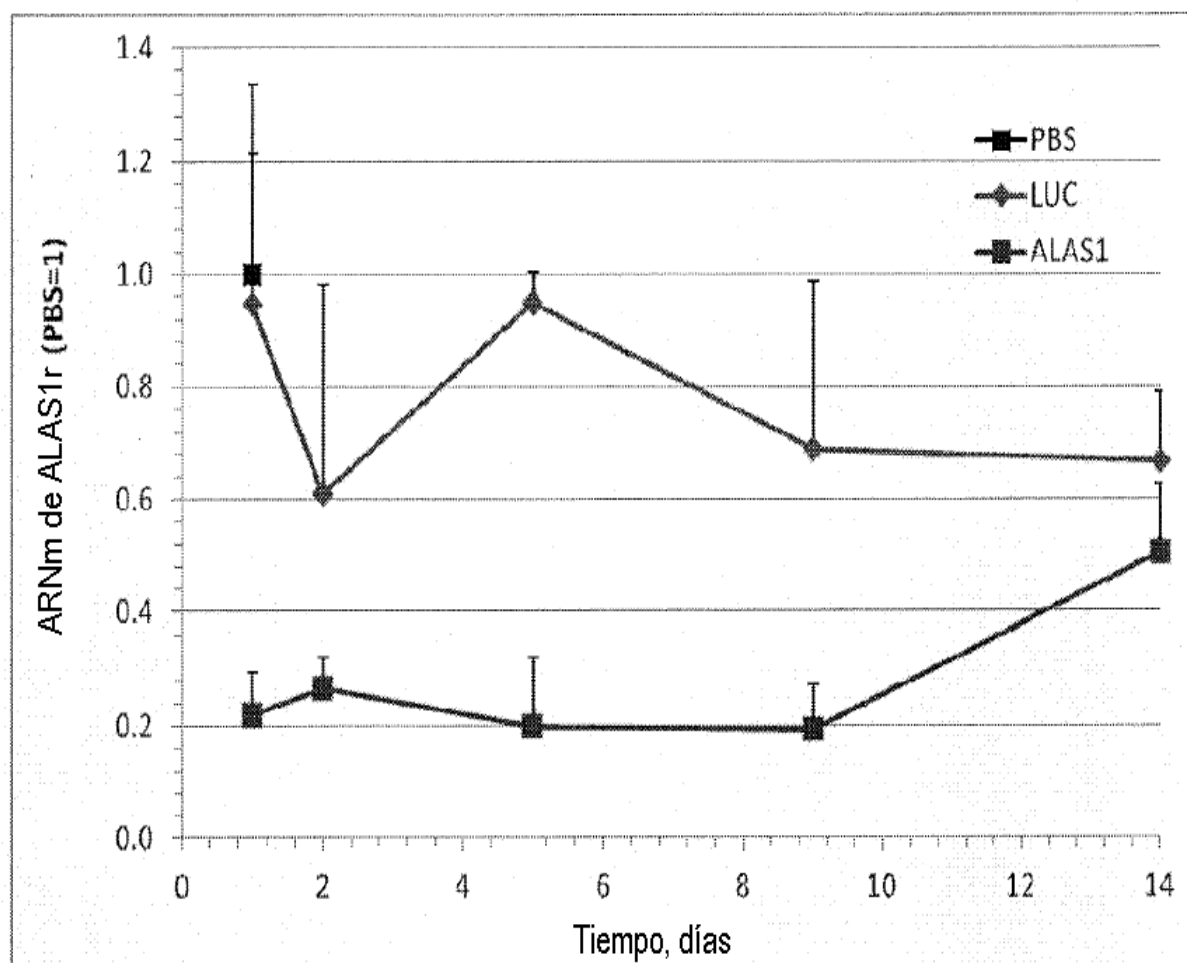


FIG. 8

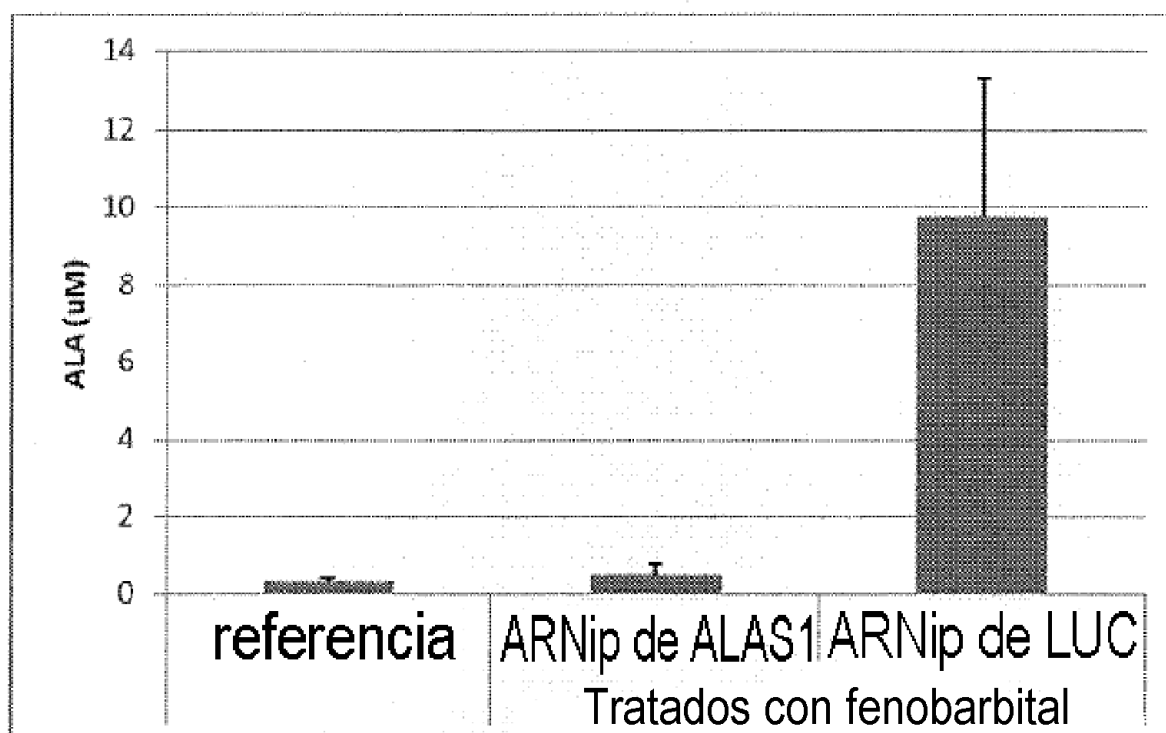


FIG. 9

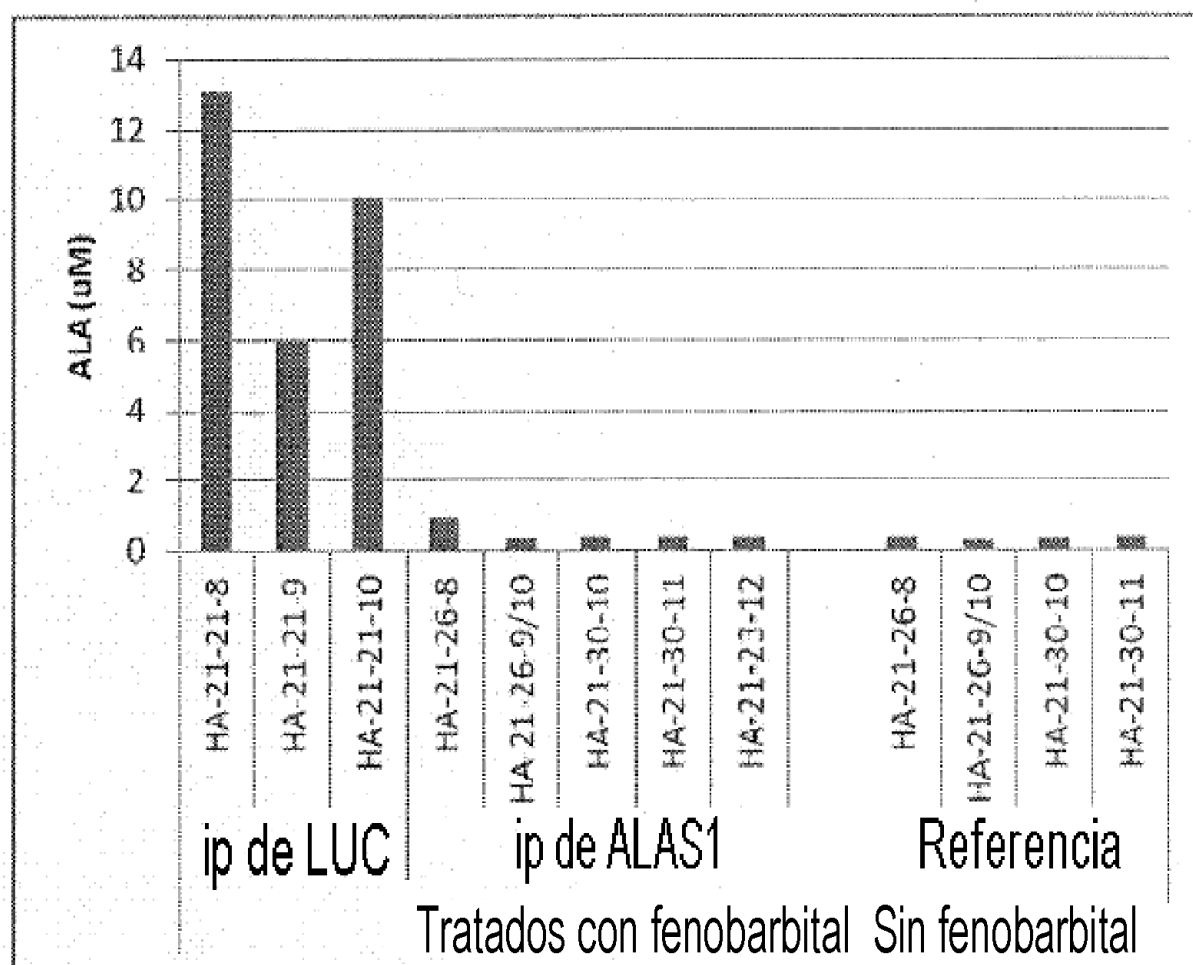


FIG. 10

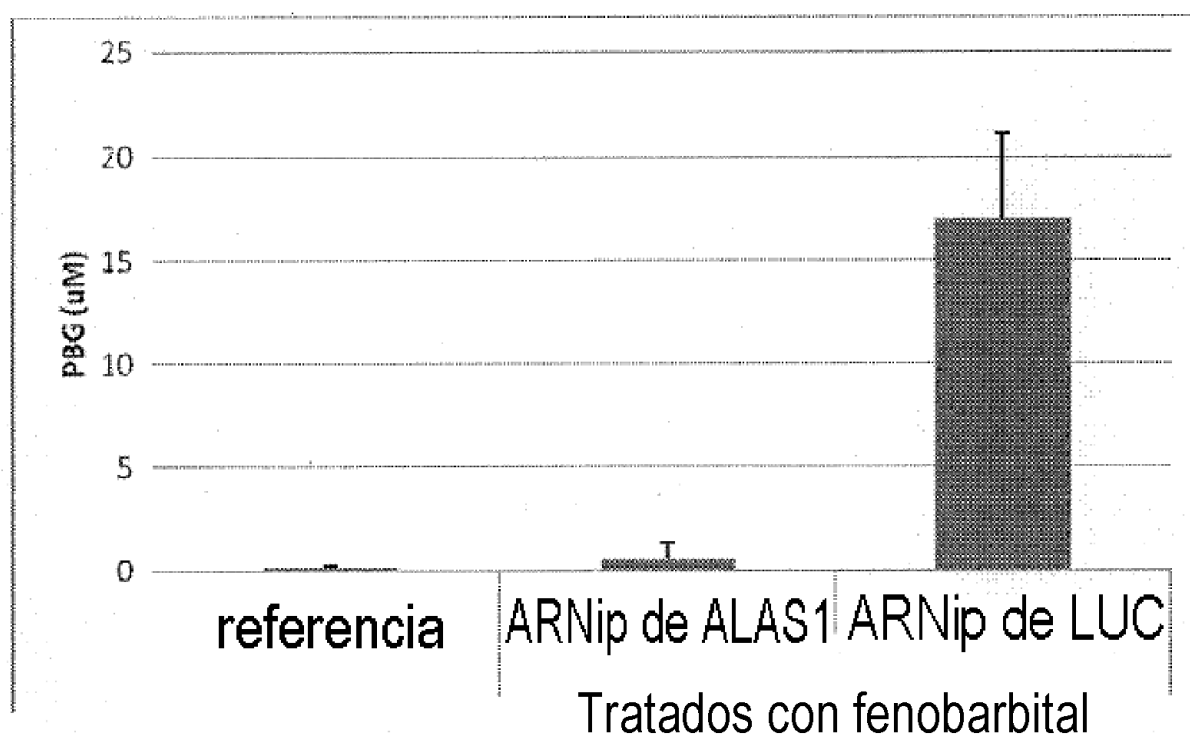


FIG. 11

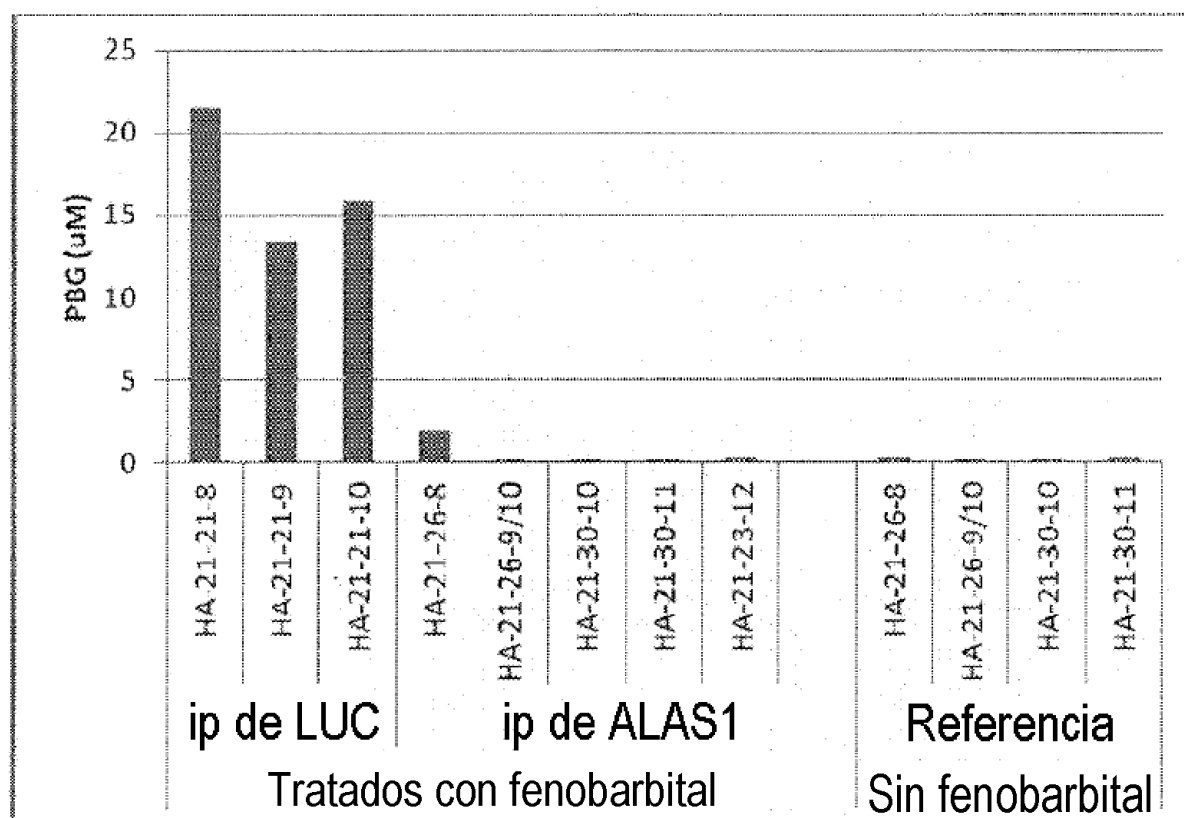


FIG. 12

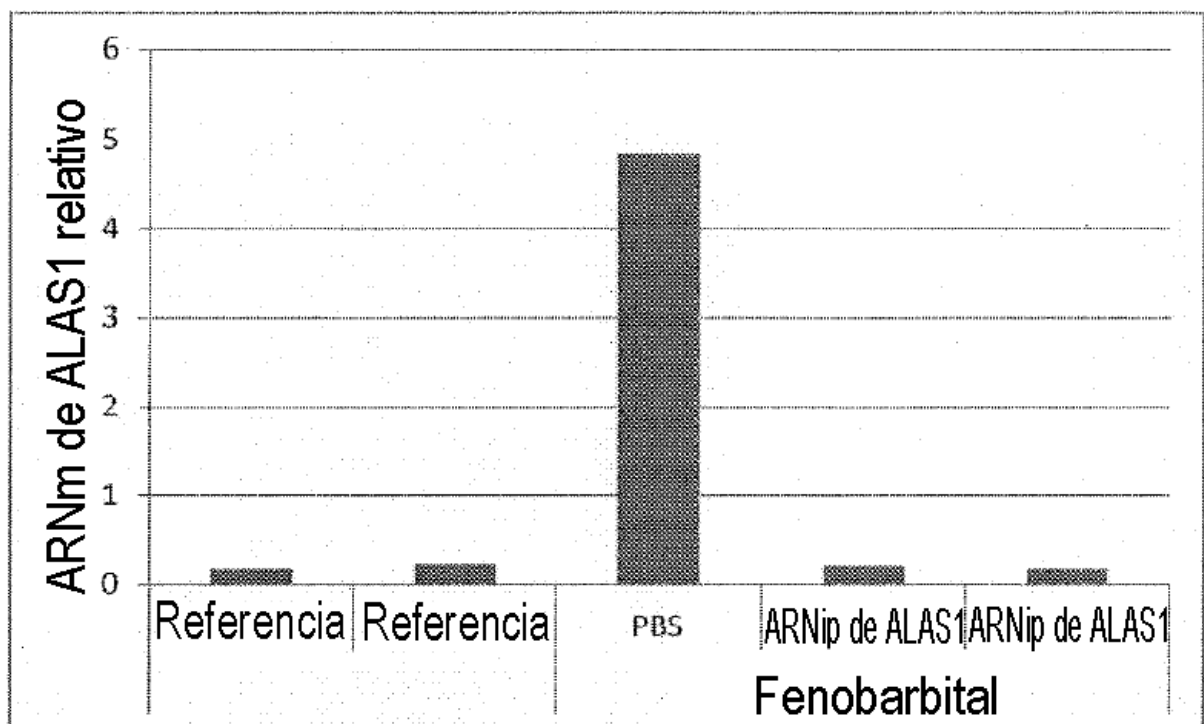


FIG. 13

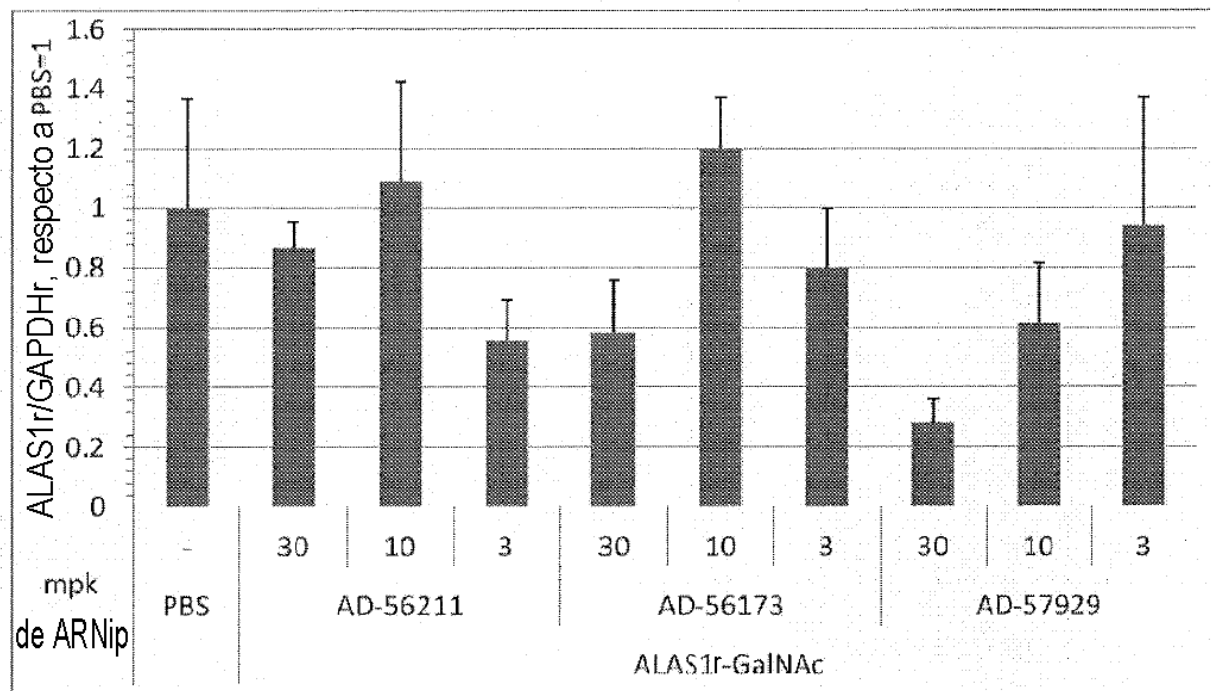


FIG. 14

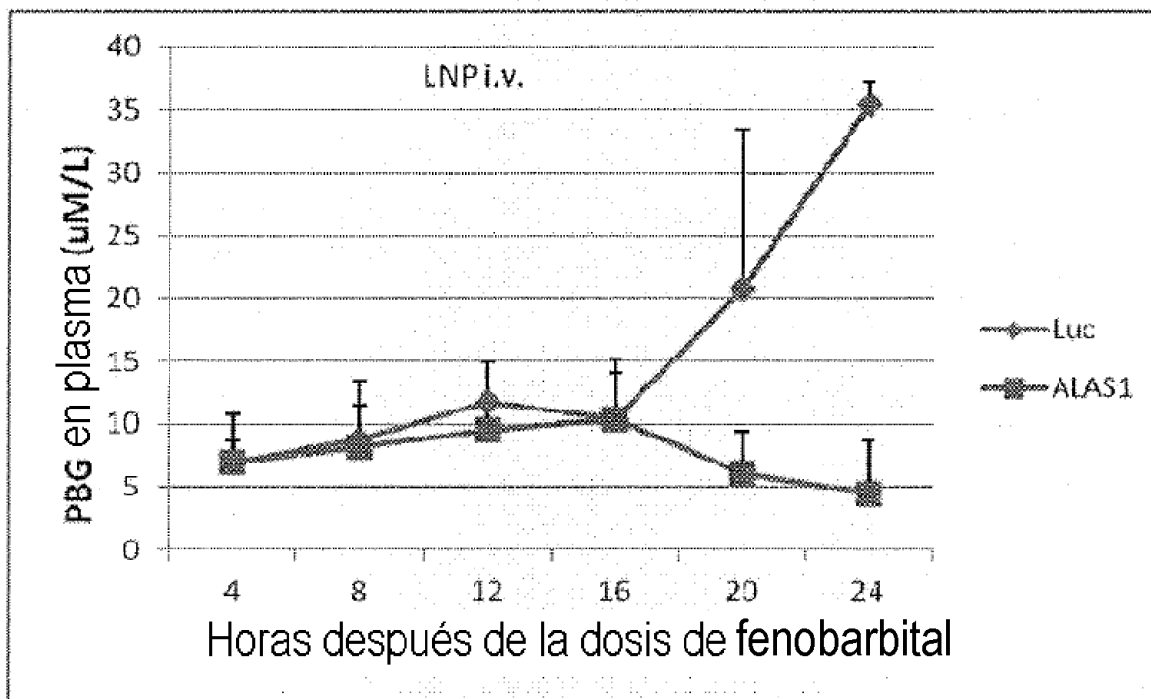
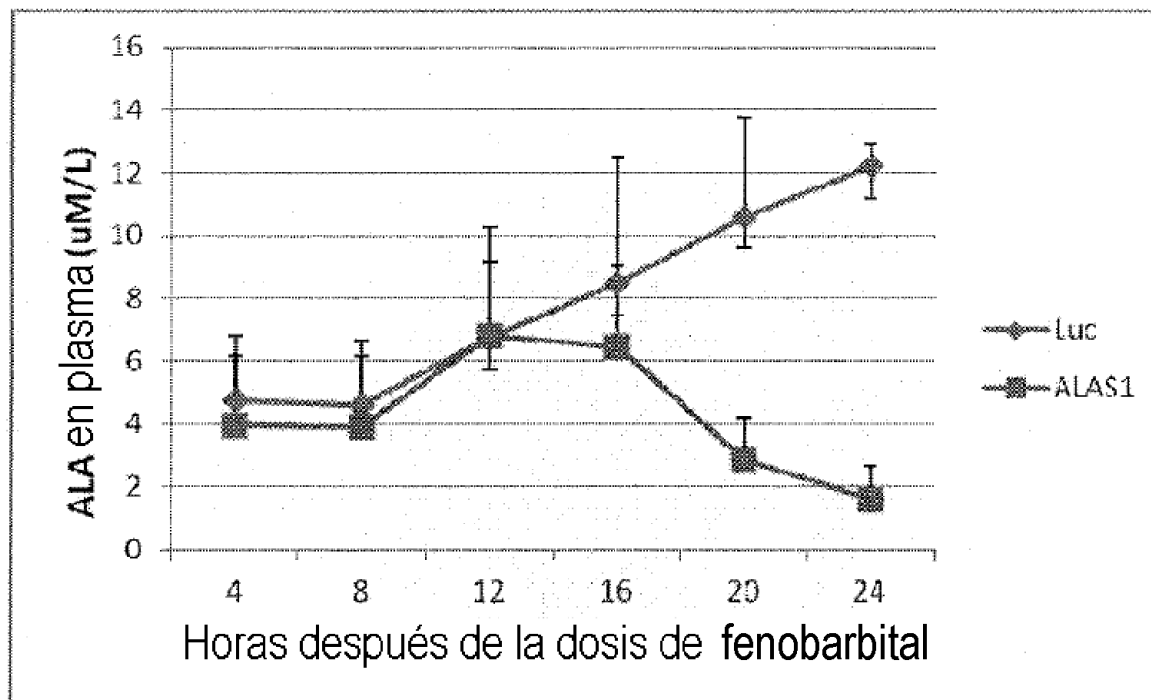


FIG. 15

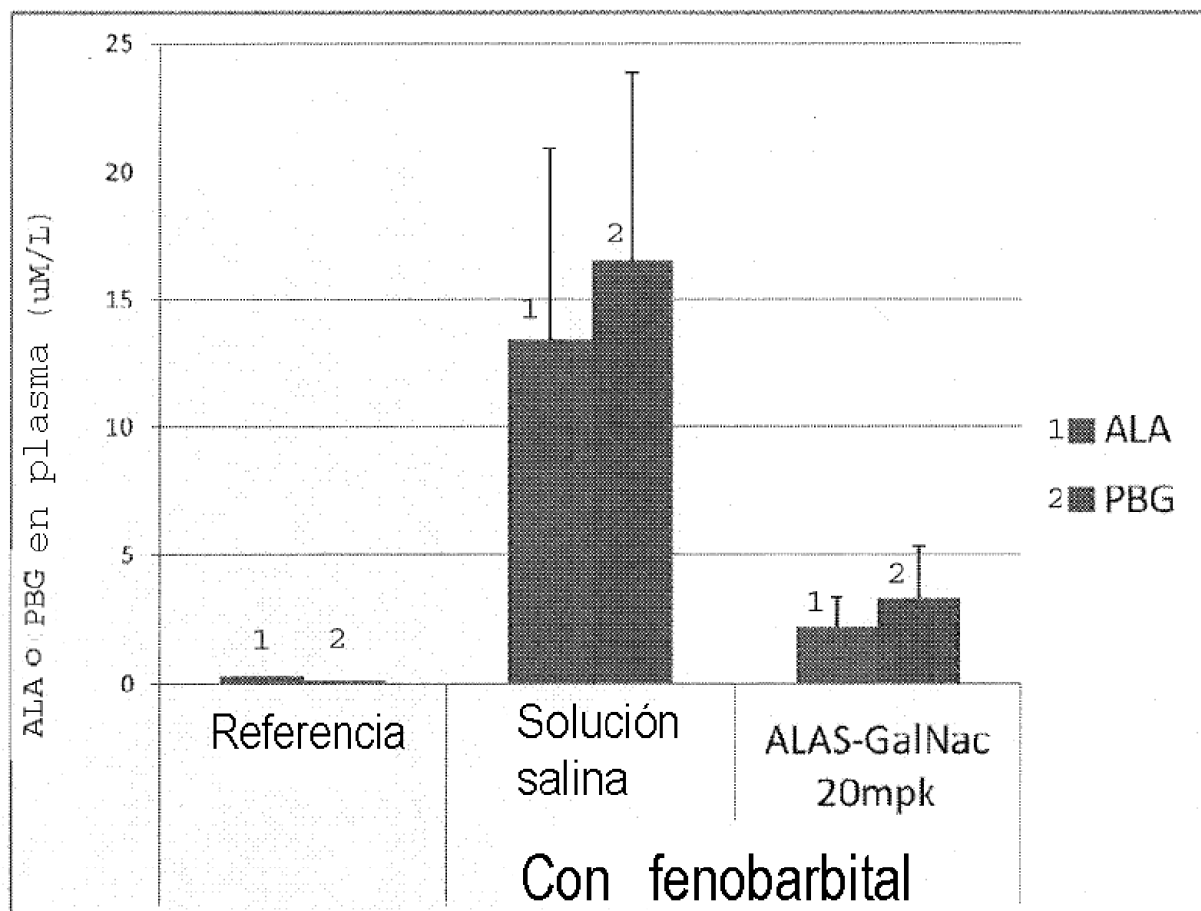


FIG. 16

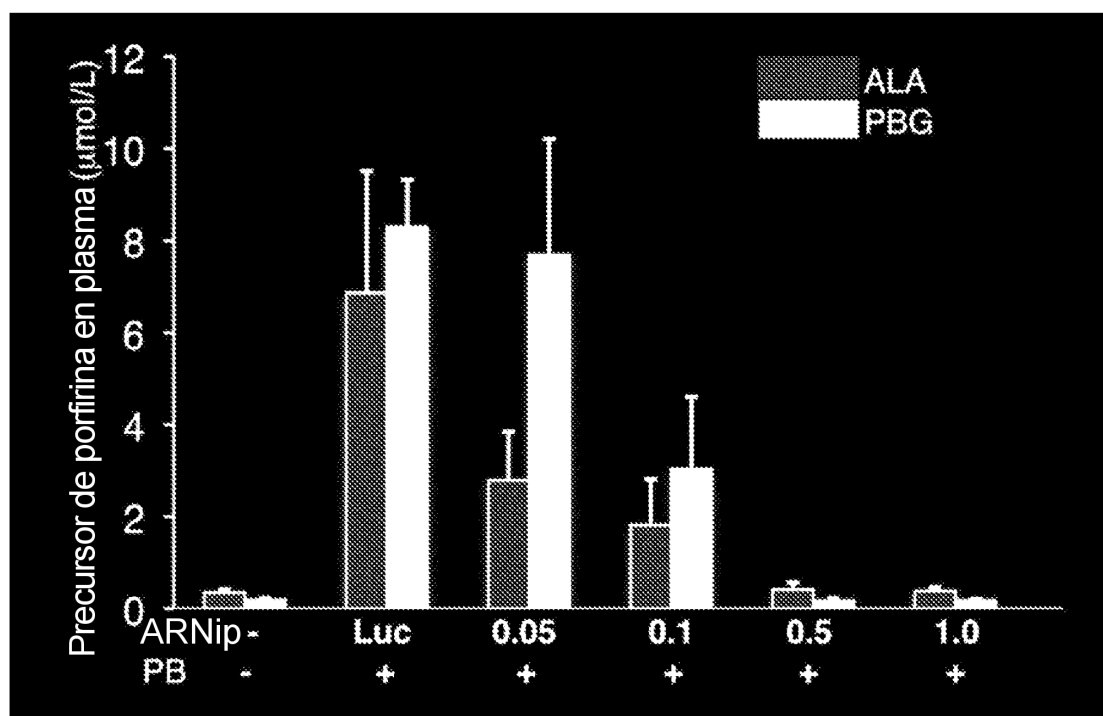


FIG. 17

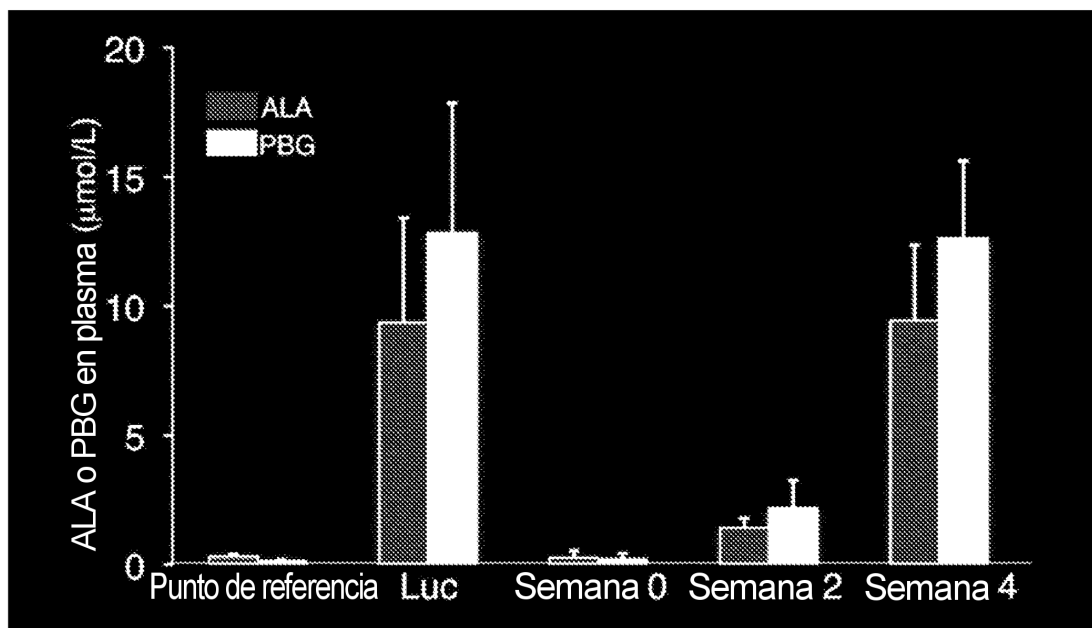
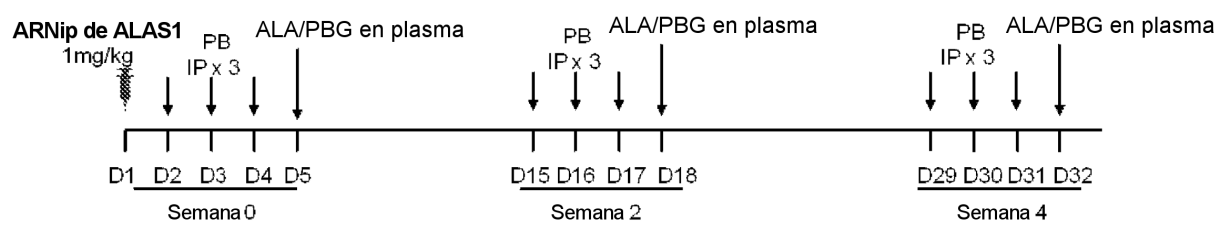


FIG. 18

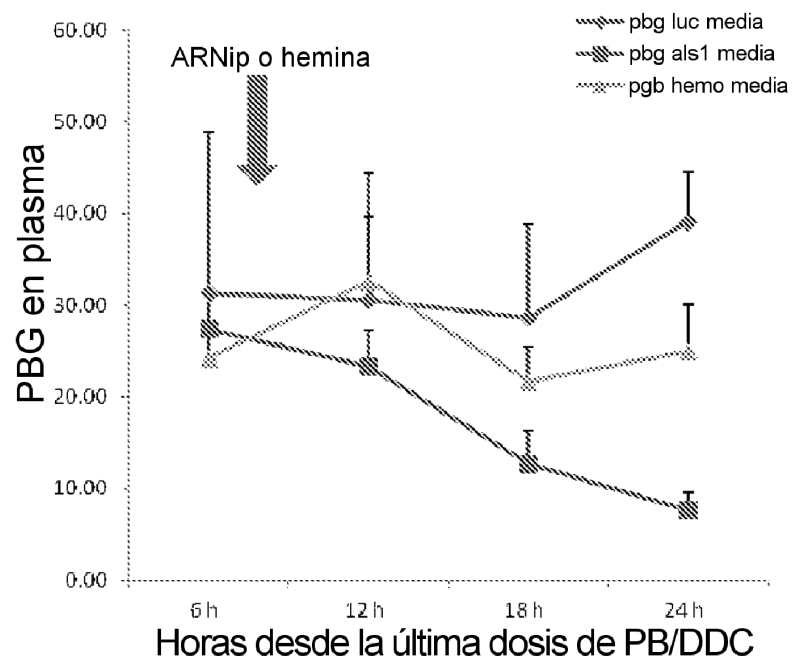
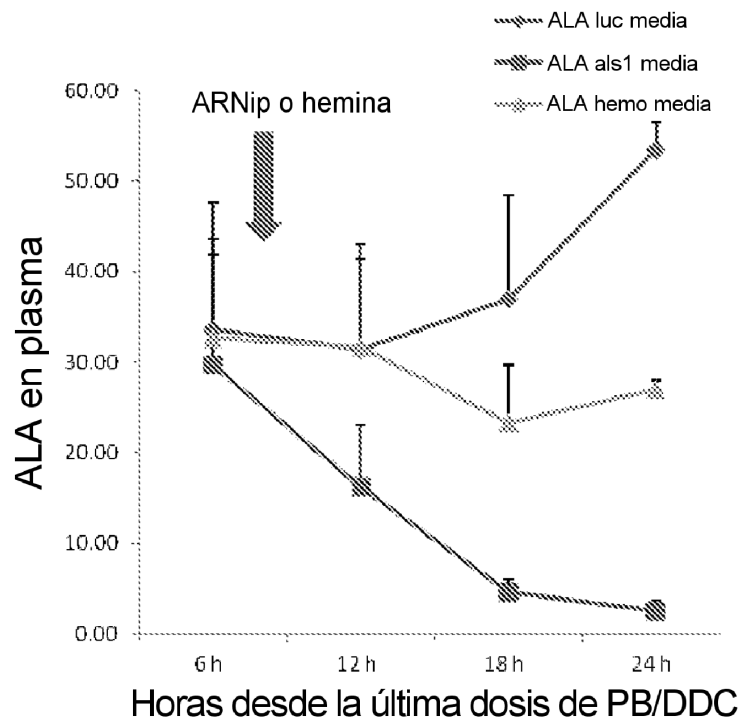
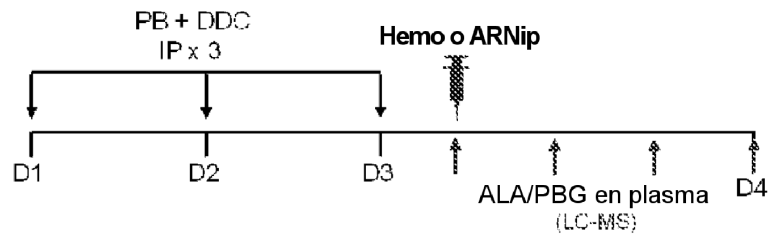


FIG. 19

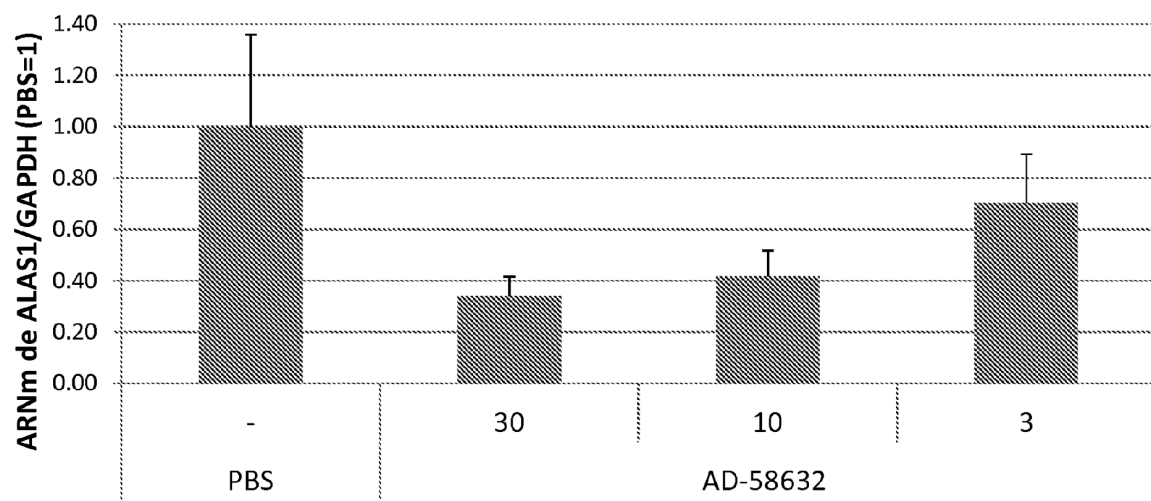


FIG. 20

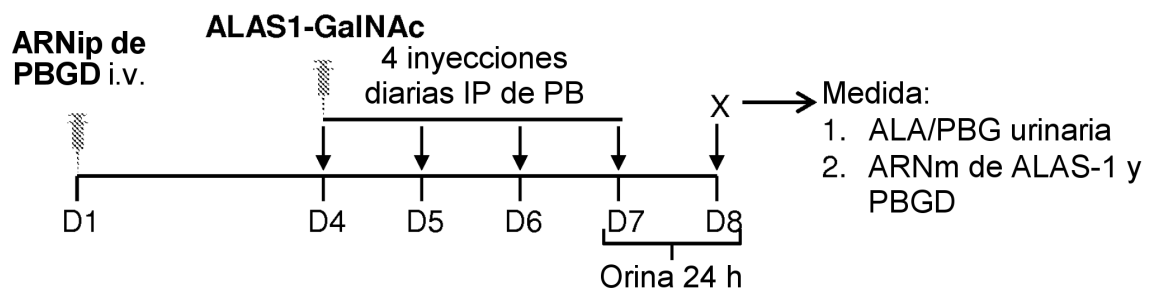


FIG. 21

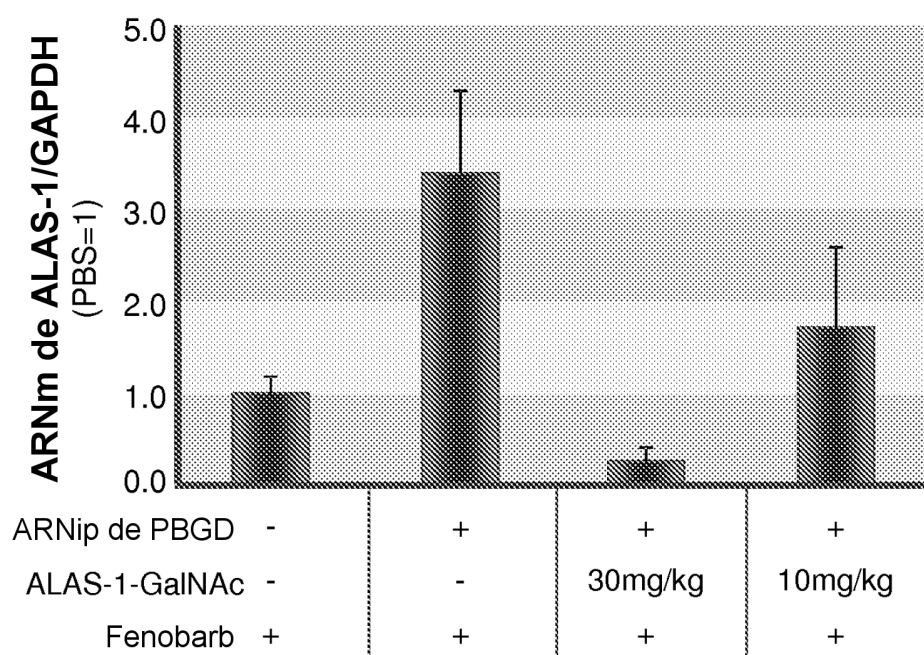
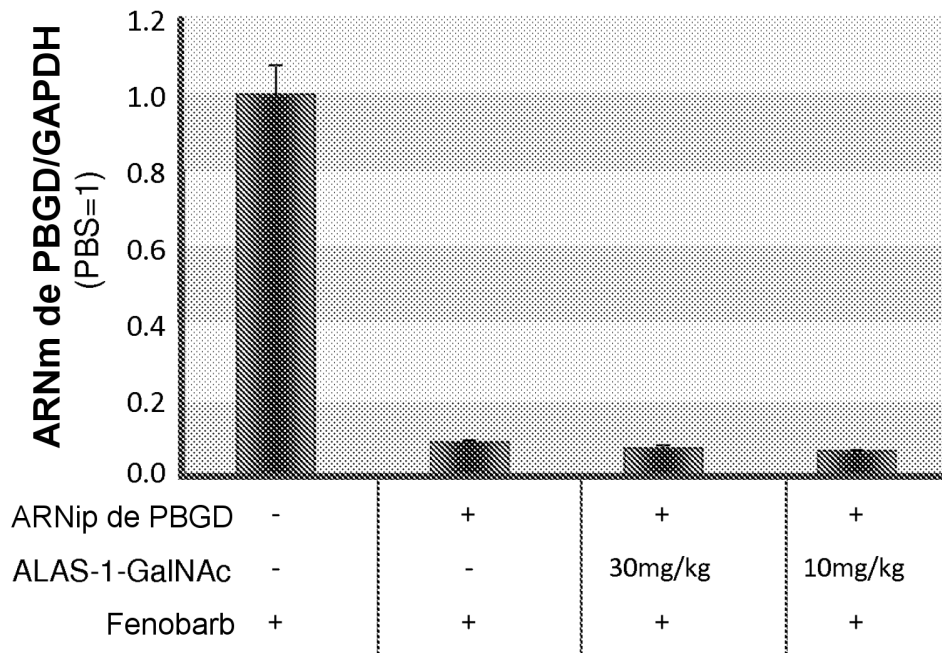


FIG. 22

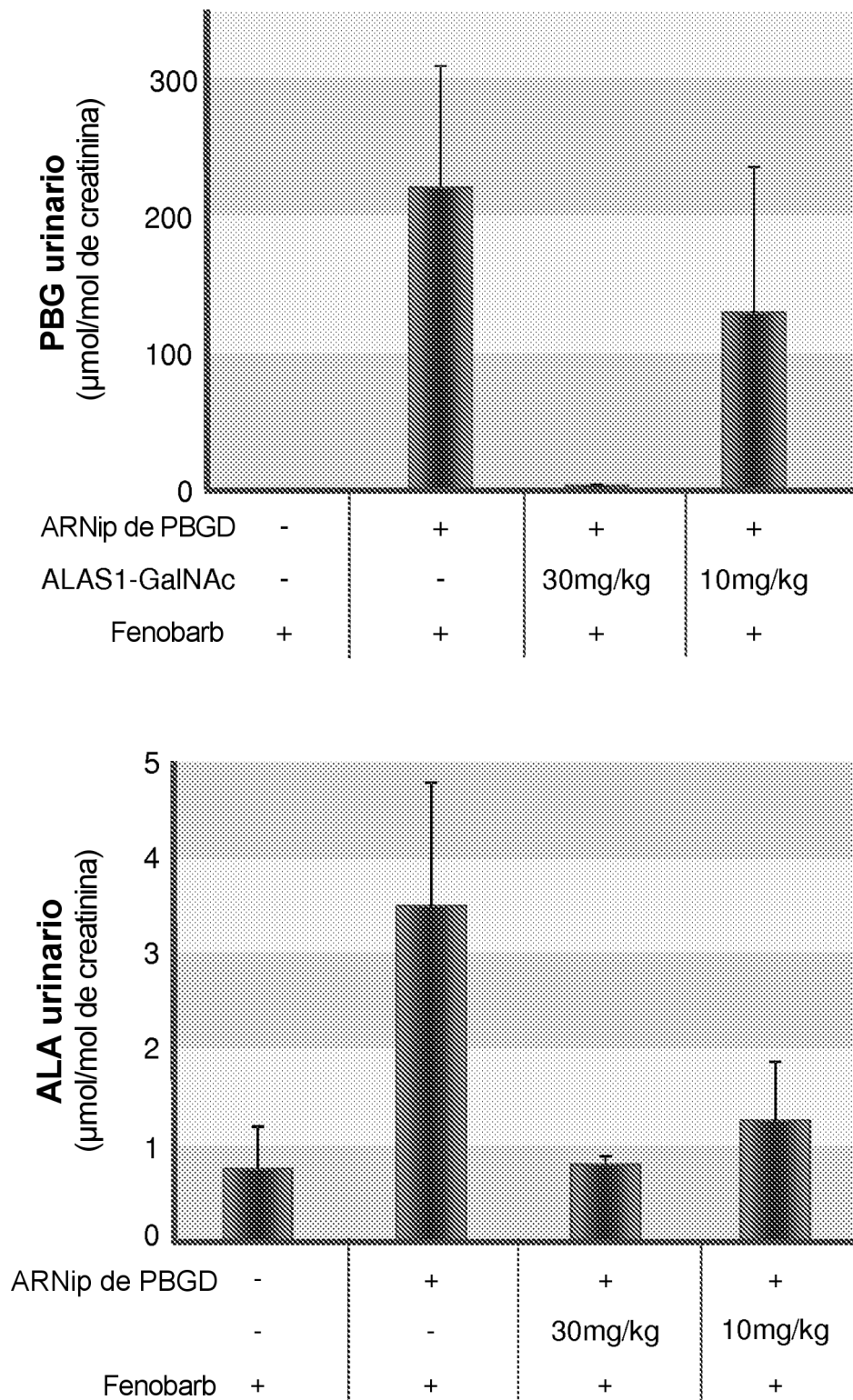


FIG. 23

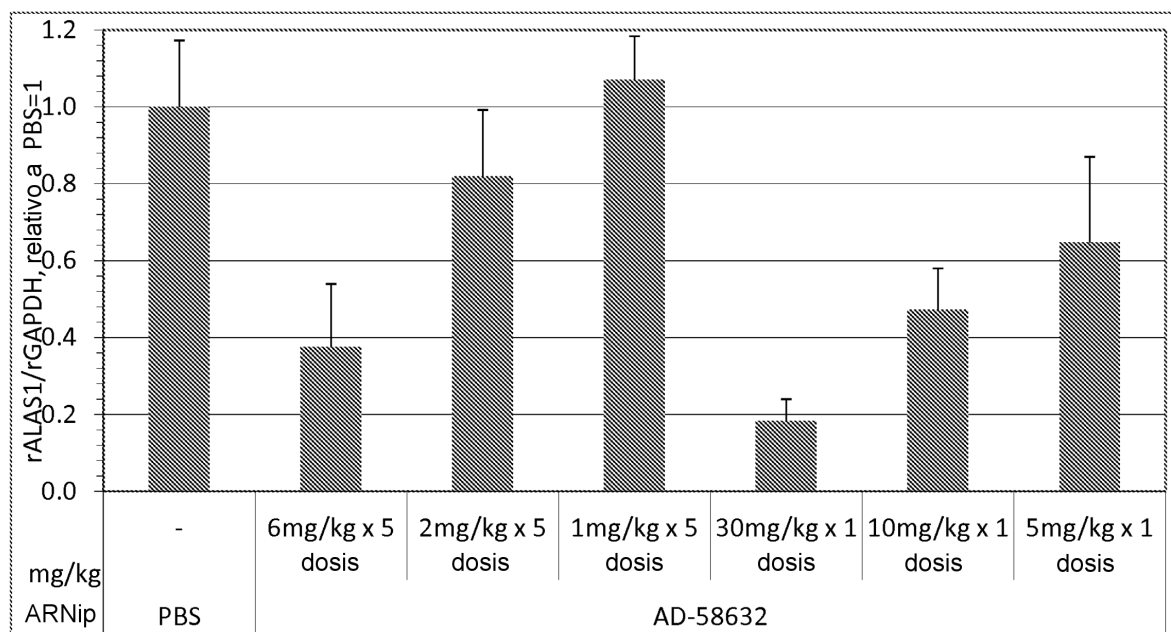


FIG. 24

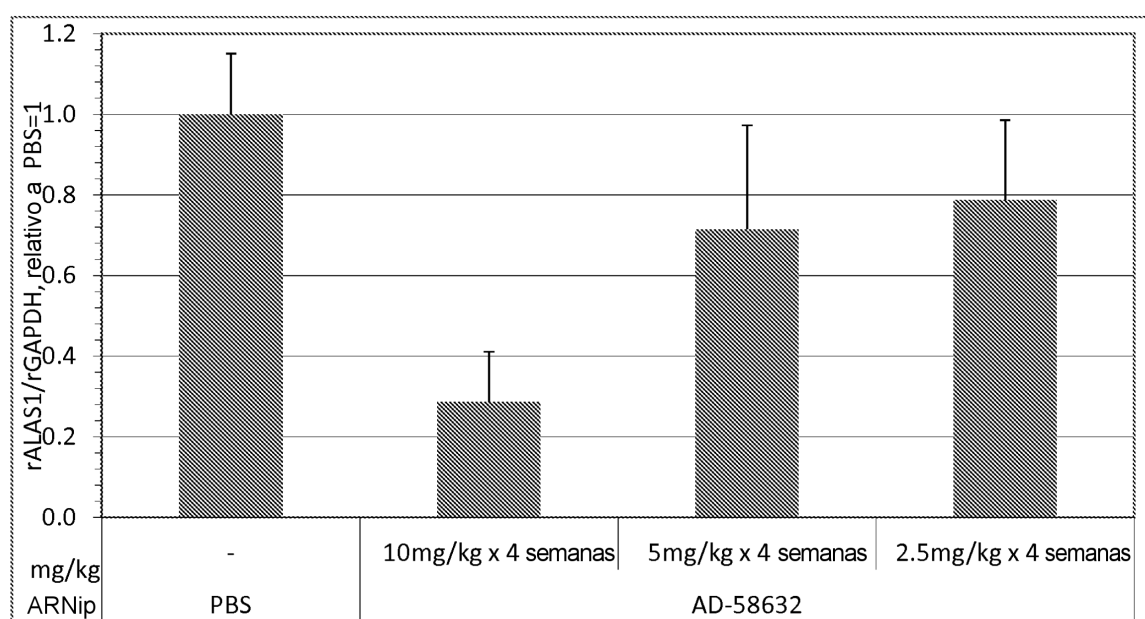


FIG. 25

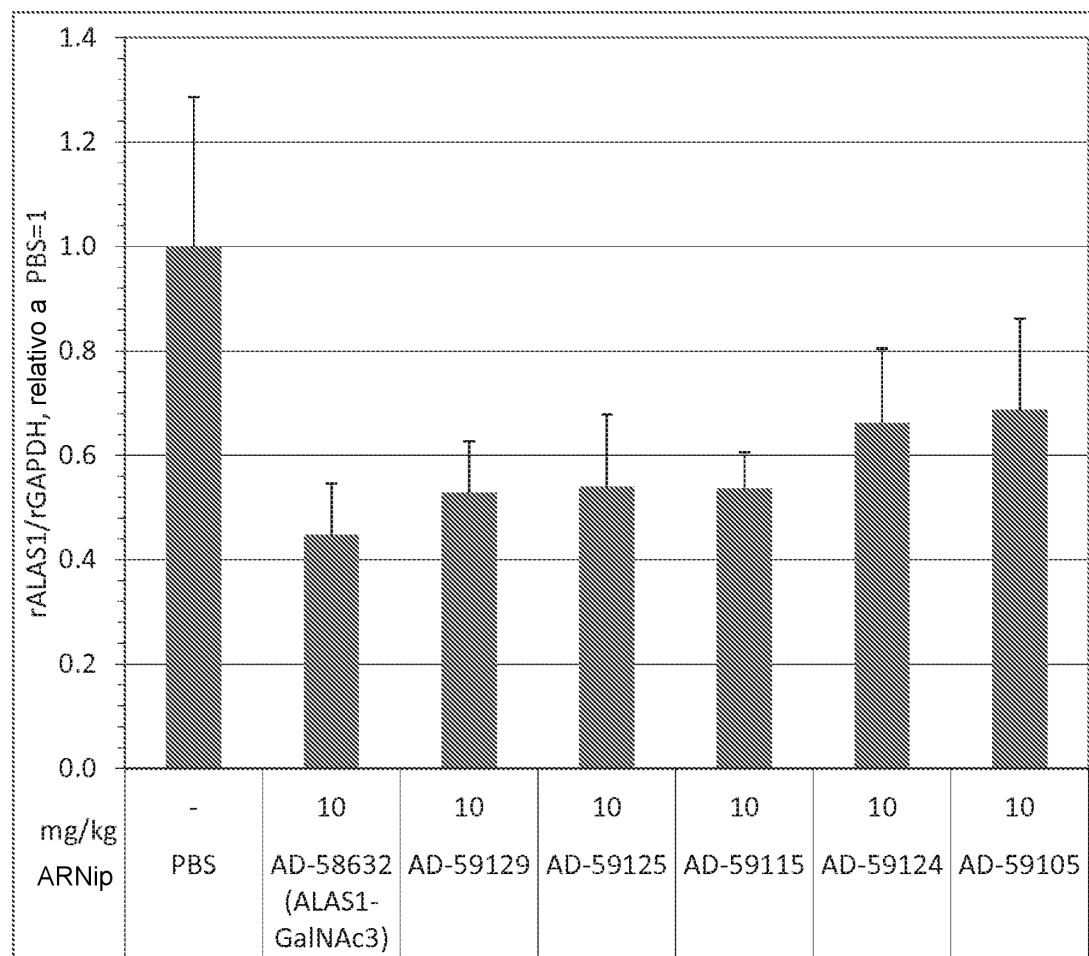
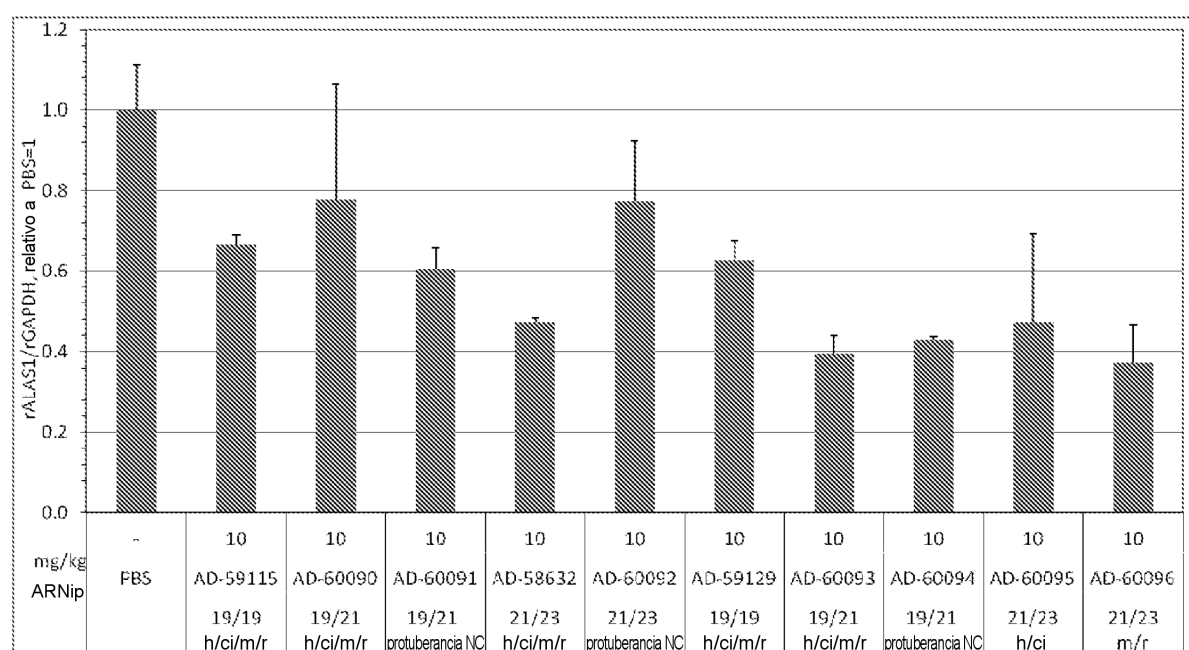


FIG. 26



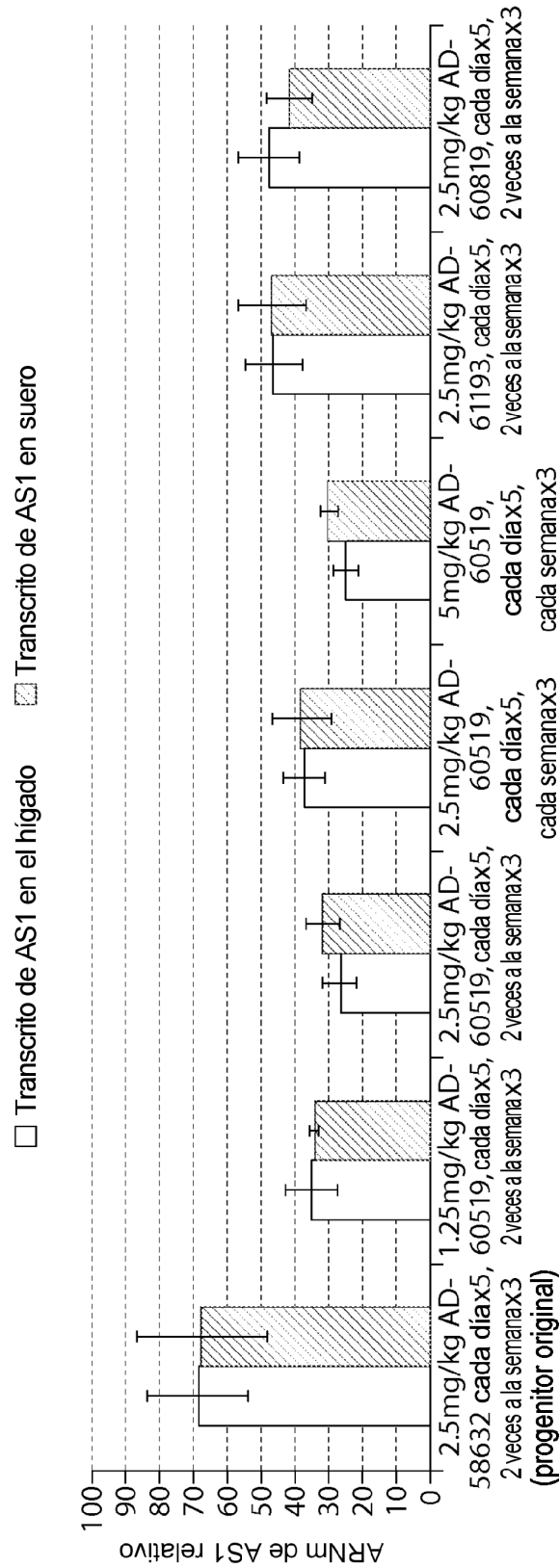


Fig. 27

FIG. 28

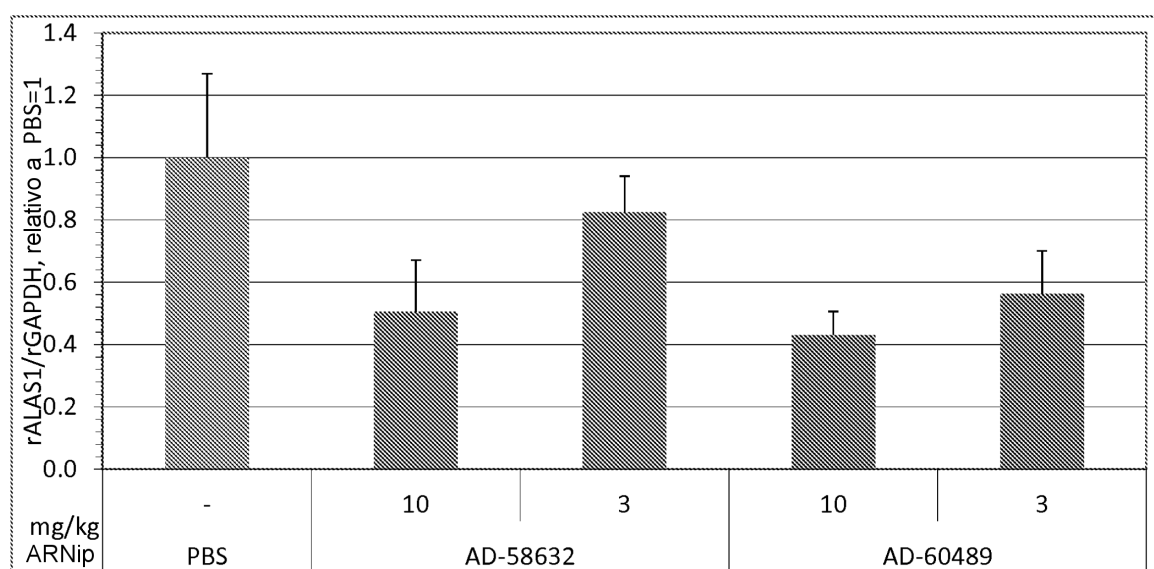
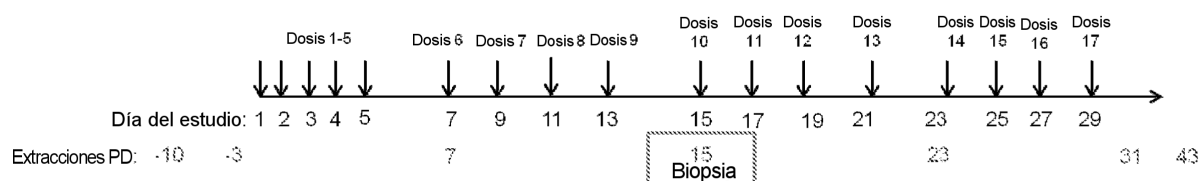
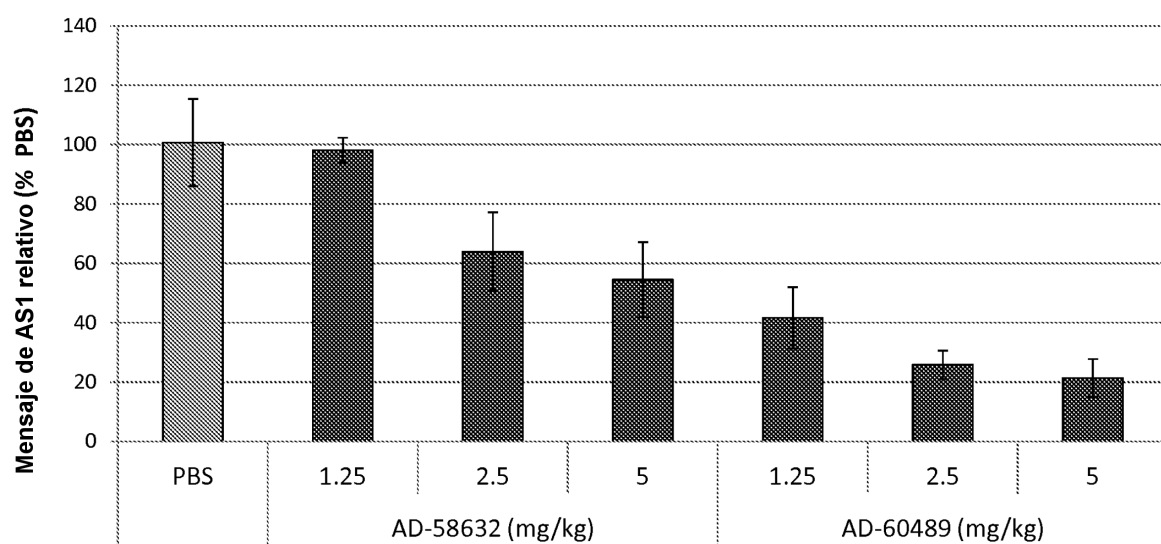


FIG. 29



Número de grupo	Número de machos	Artículo de prueba	Nivel de dosis (mg/kg)	Conc de la dosis (mg/mL)	Régimen de dosis	Volumen de dosis (mL/kg)	Ruta de la dosis
1	3	PBS	0	0	Cada día 5 seguido por cada 2 días durante 3 semanas	2	SC
2	3	AD-58632	5	2.5			
3	3	AD-58632	2.5	1.25			
4	3	AD-58632	1.25	0.625			
5	3	AD-60489	5	2.5			
6	3	AD-60489	2.5	1.25			
7	3	AD-60489	1.25	0.625			
Suero para la detección de ARNm exploratoria: Días -10, -3, 7*, 15*, 23*, 31, y 43 (*Todas las muestras de sangre se tomaron antes de la repetición de la dosis) Biopsia hepática para ARNm: Día 15** (Suero recogido antes de la biopsia) Suero para el panel de quim clín (ALT, AST, ALP): Días -3, 6, 30, 43 Necropsia: No Observación del sitio de inyección: SI							

FIG. 30



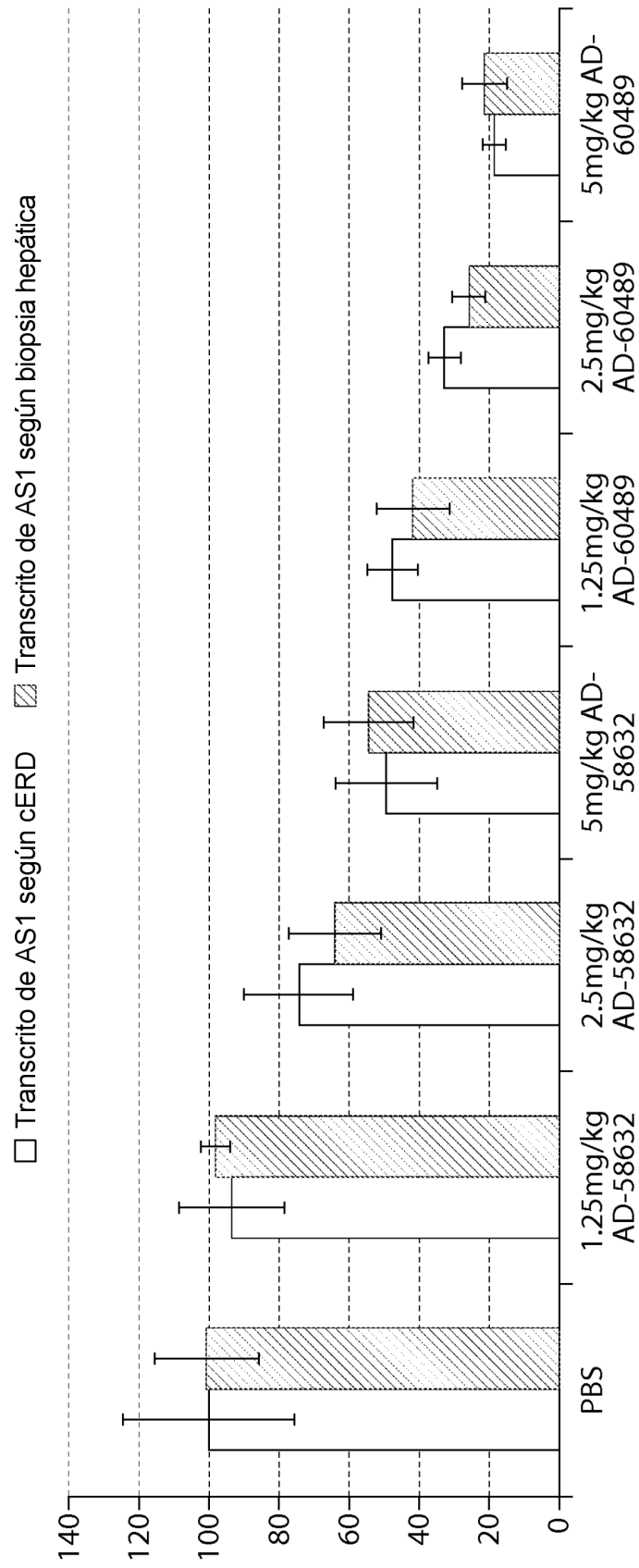


Fig. 31

FIG. 32

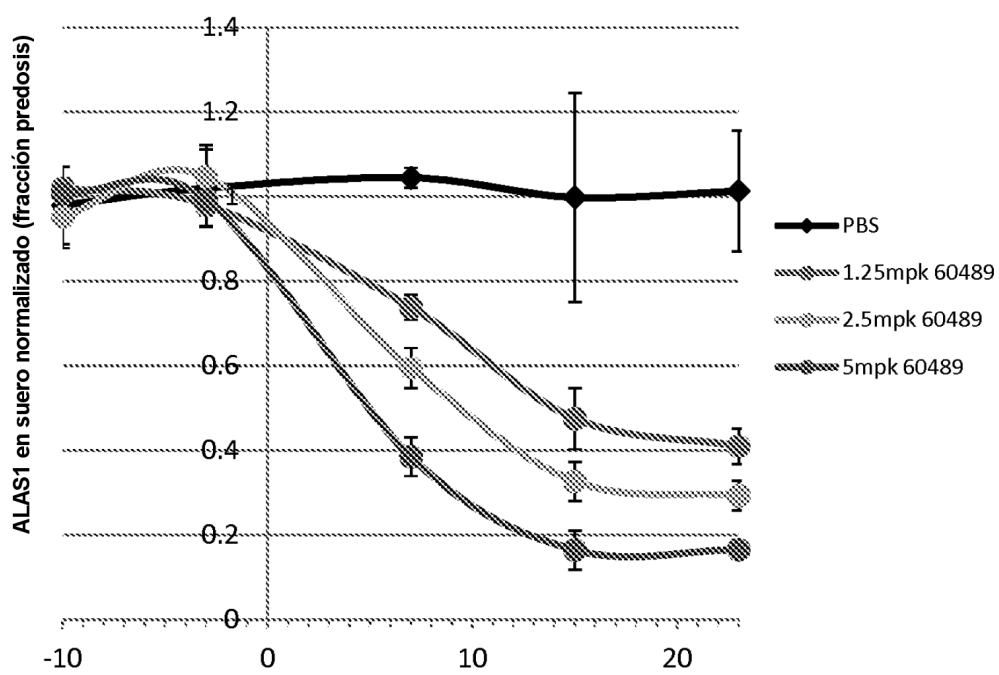
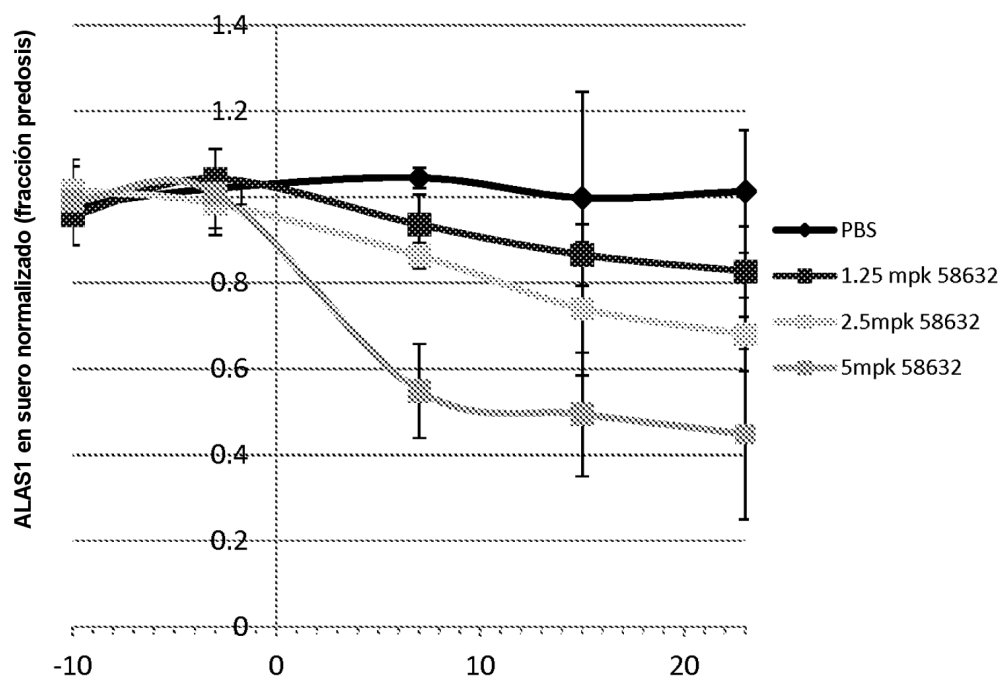


FIG. 33

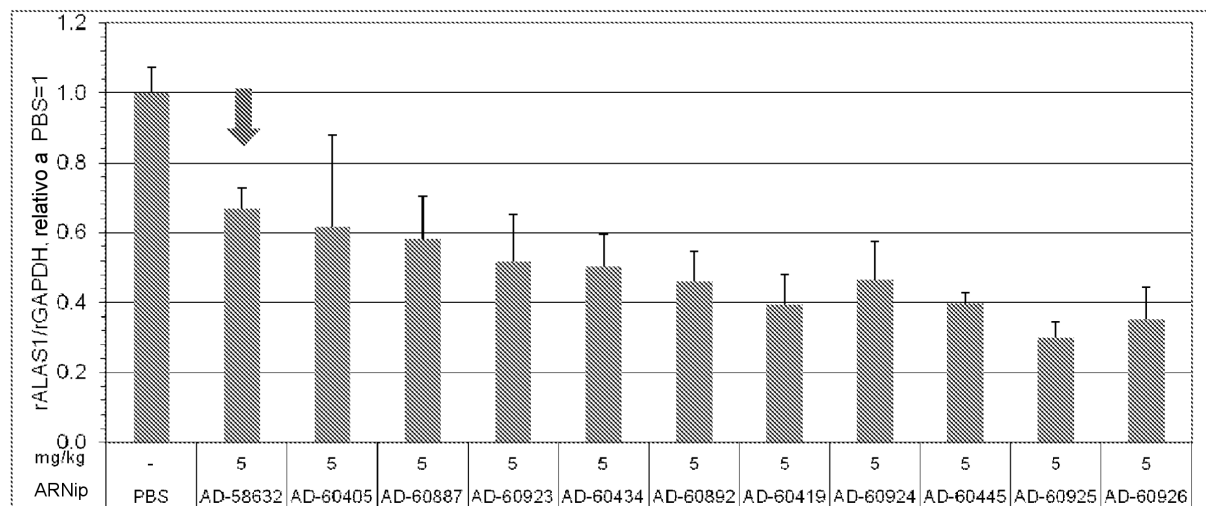


FIG. 34

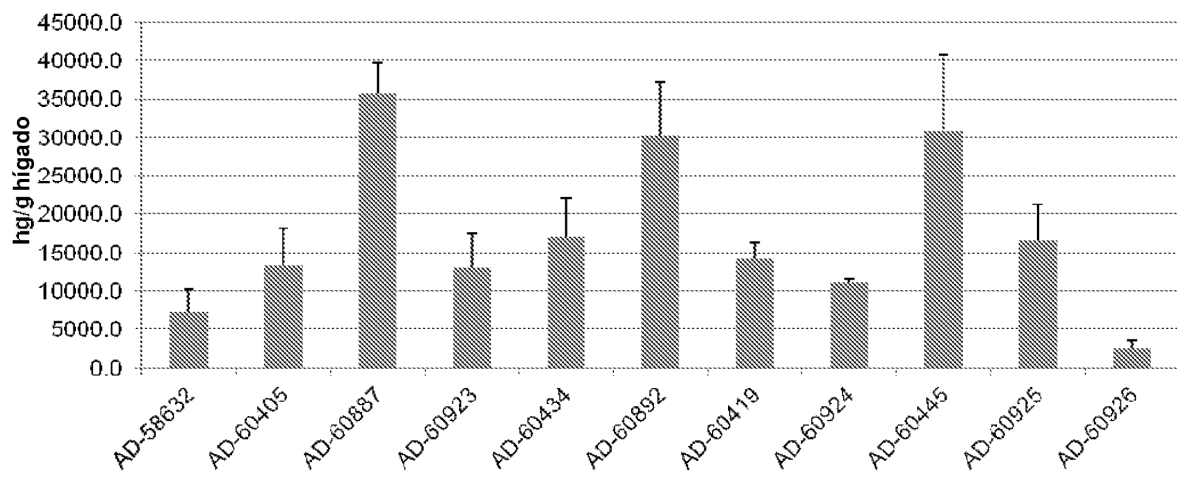


FIG. 35

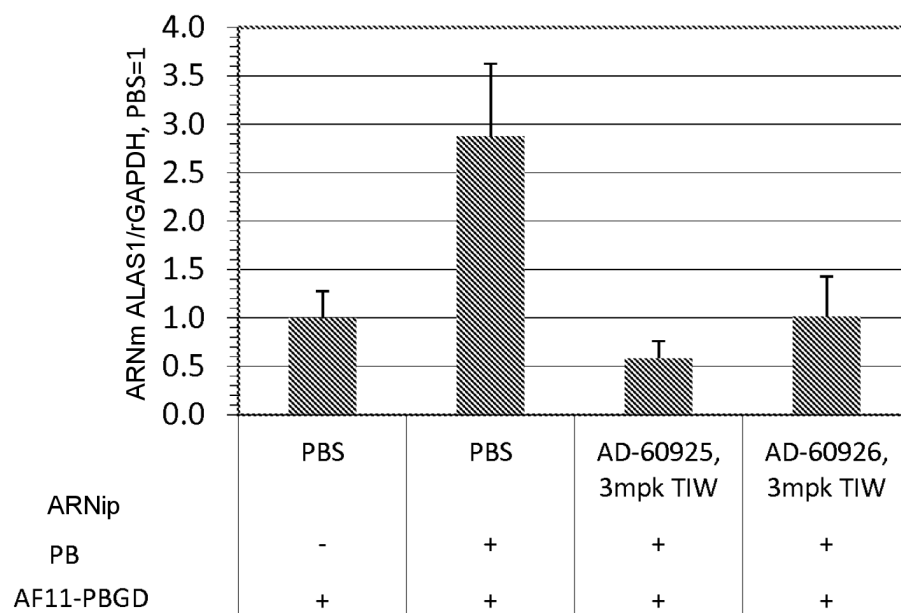
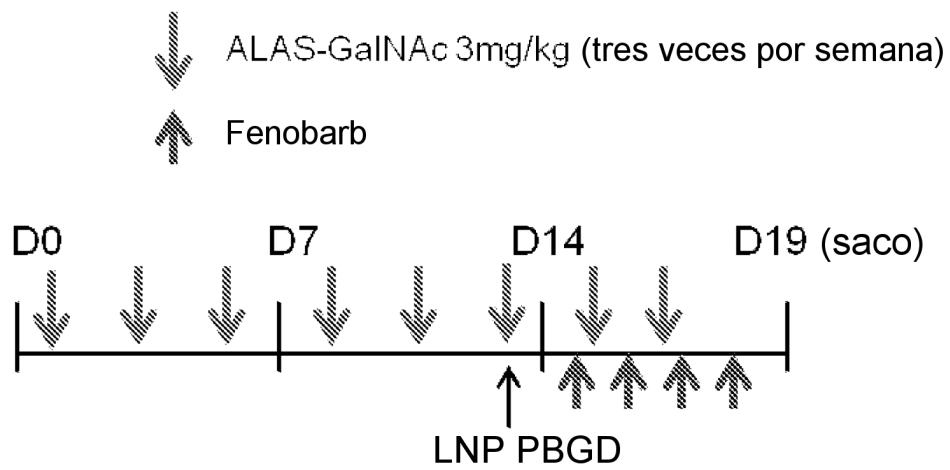


FIG. 36

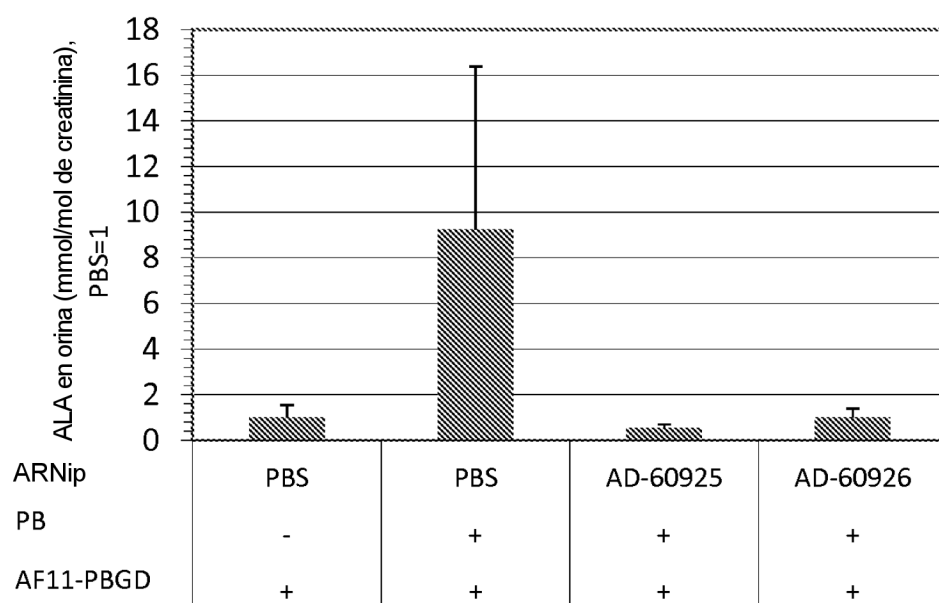
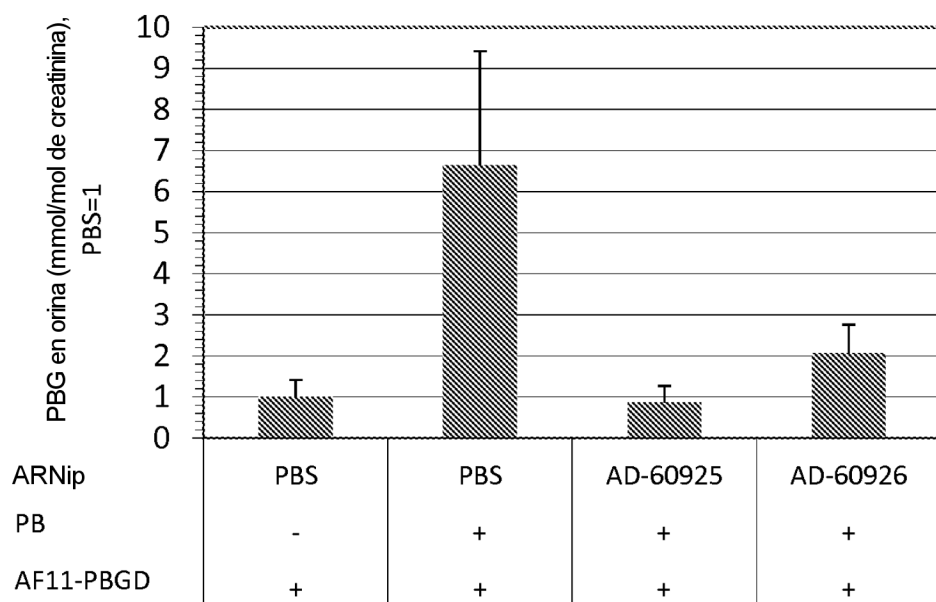


FIG. 37

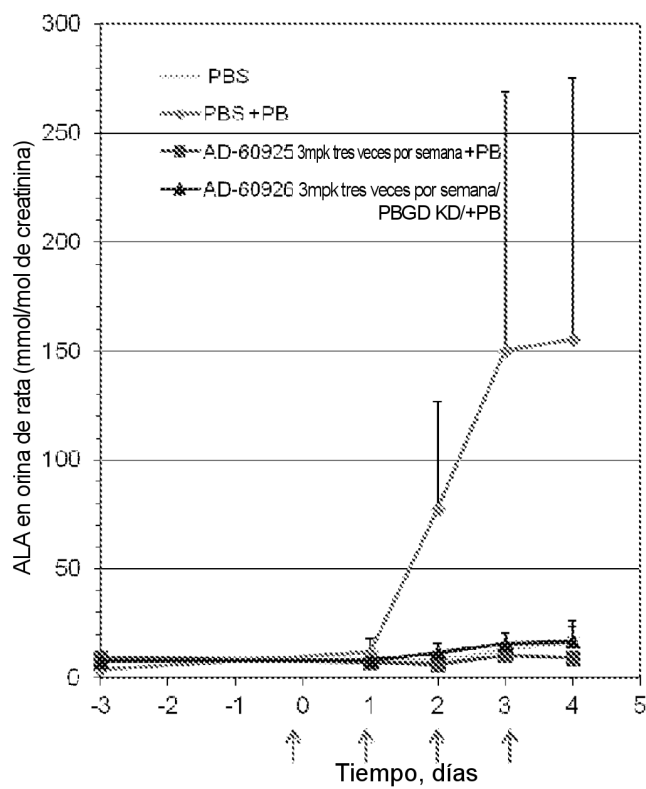
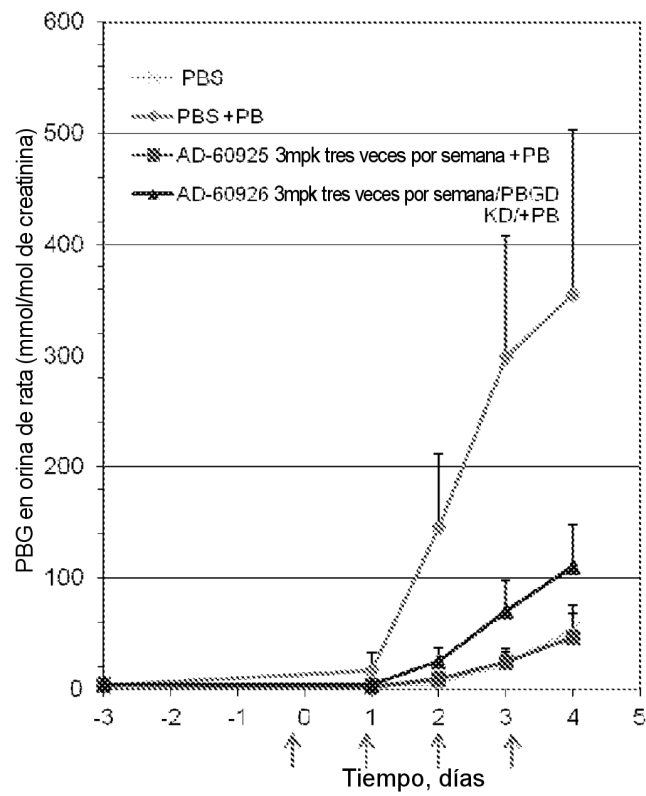


FIG. 38

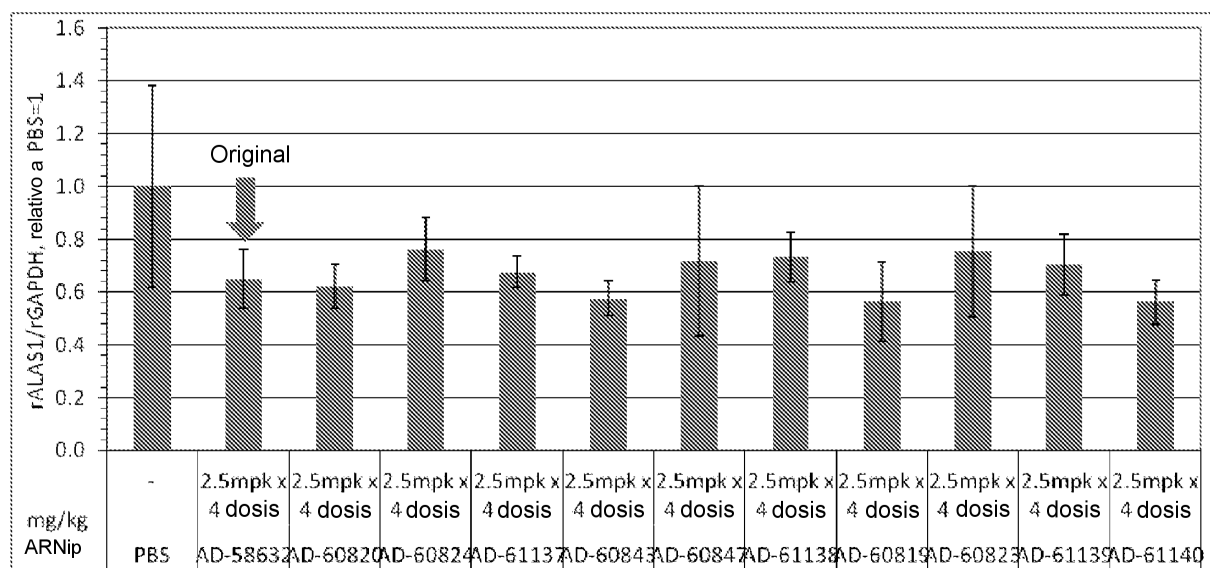


FIG. 39

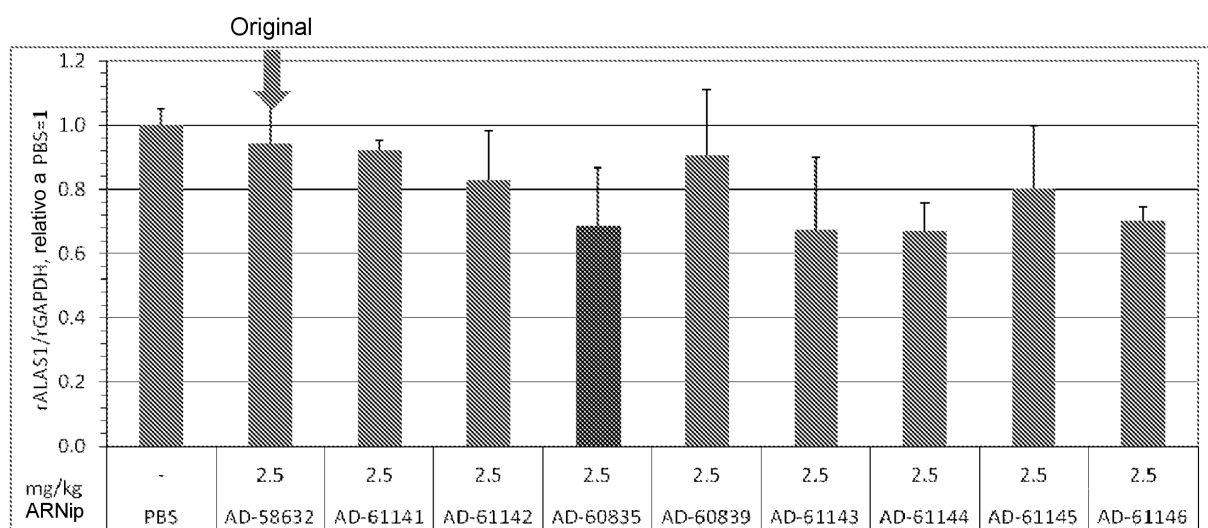


FIG. 40

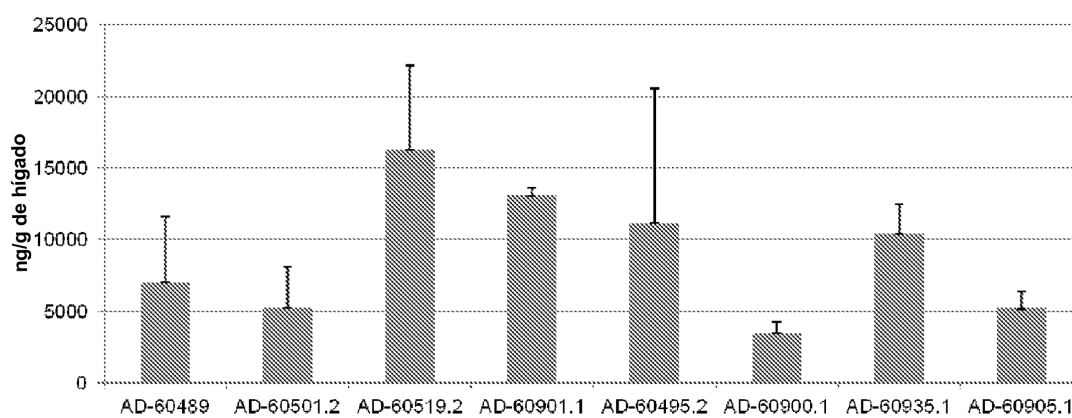
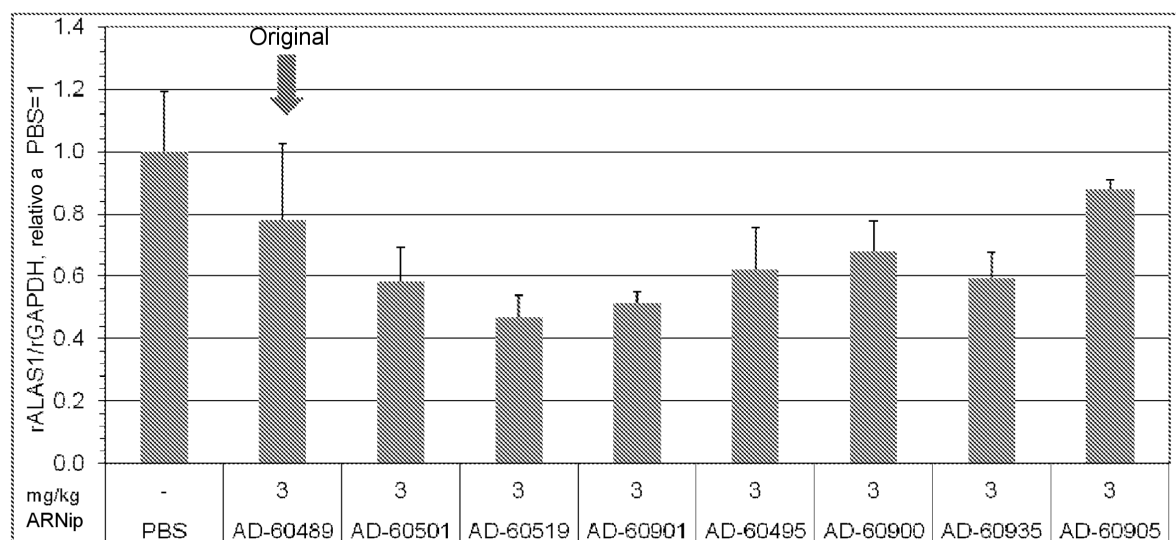


FIG. 41

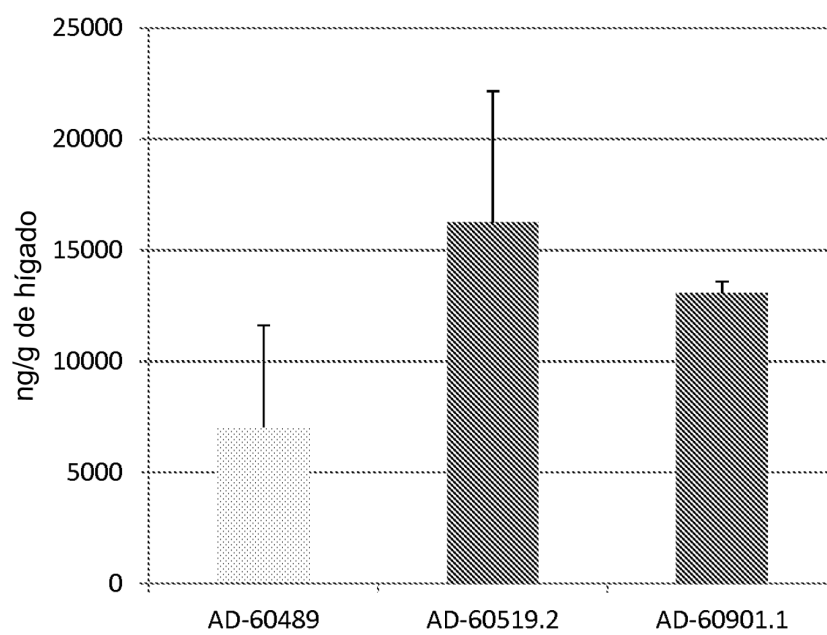
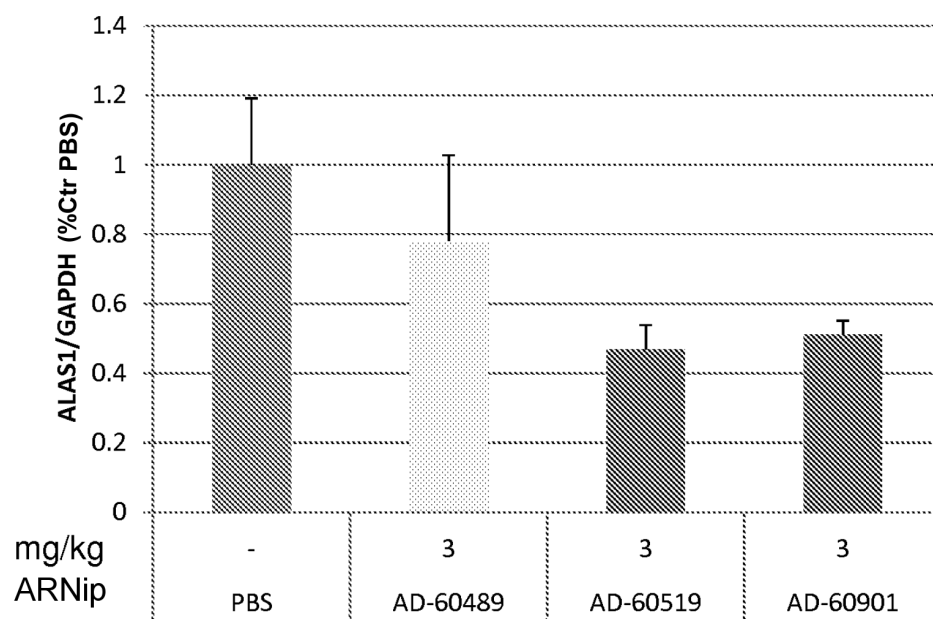


FIG. 42

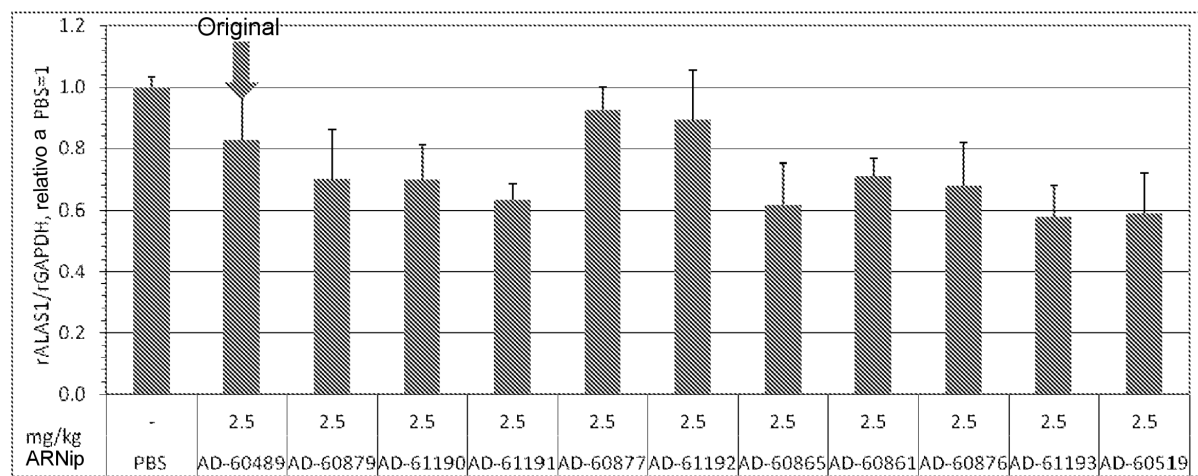


FIG. 43

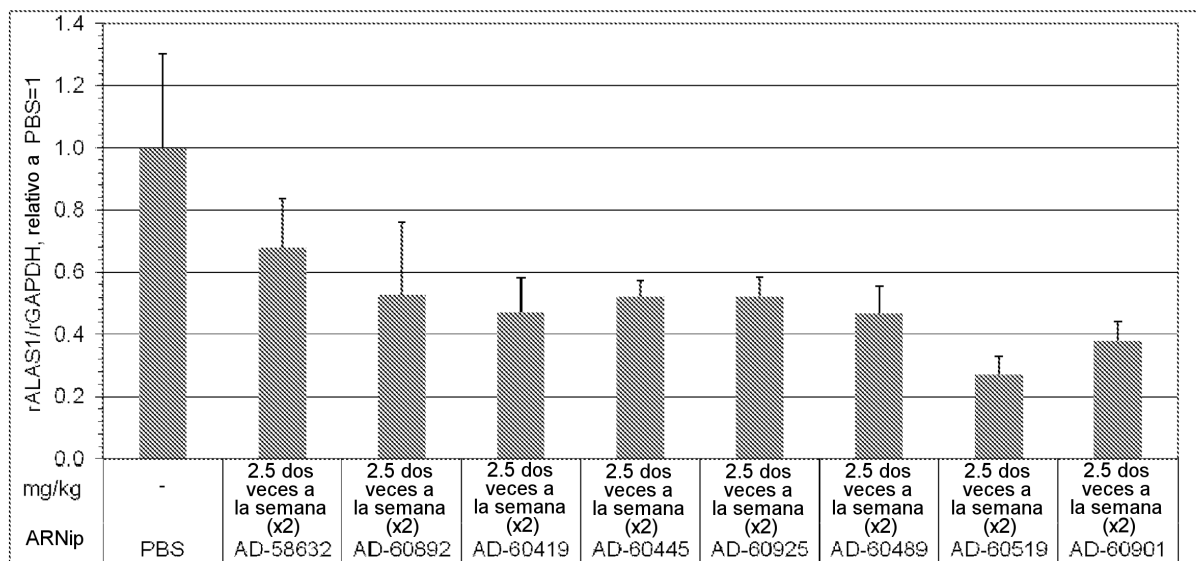


FIG. 44

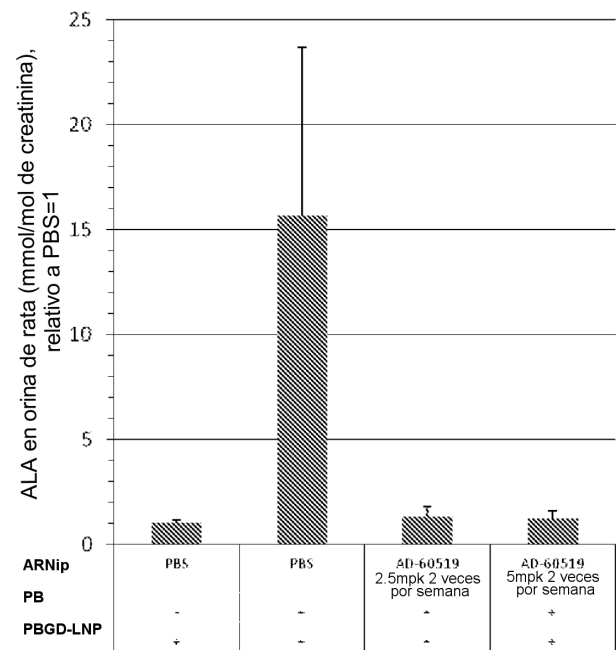
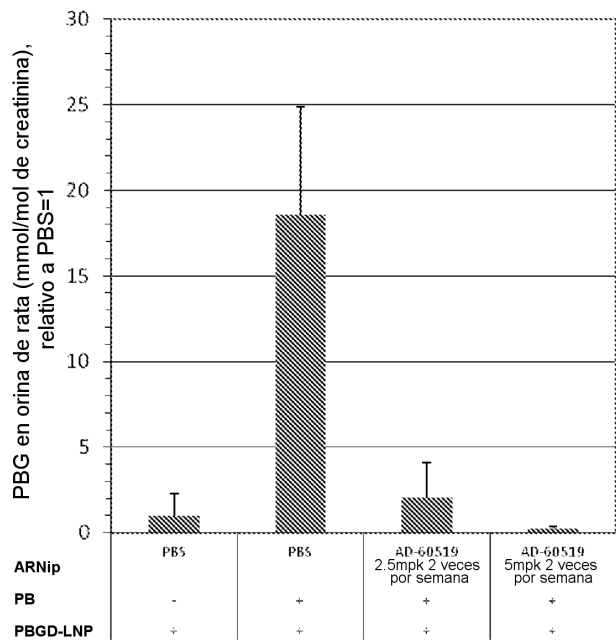
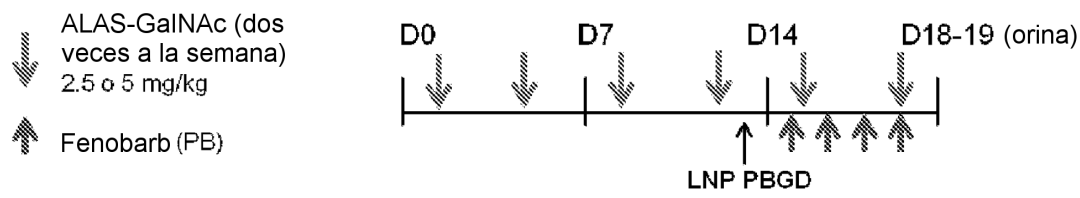


FIG. 45

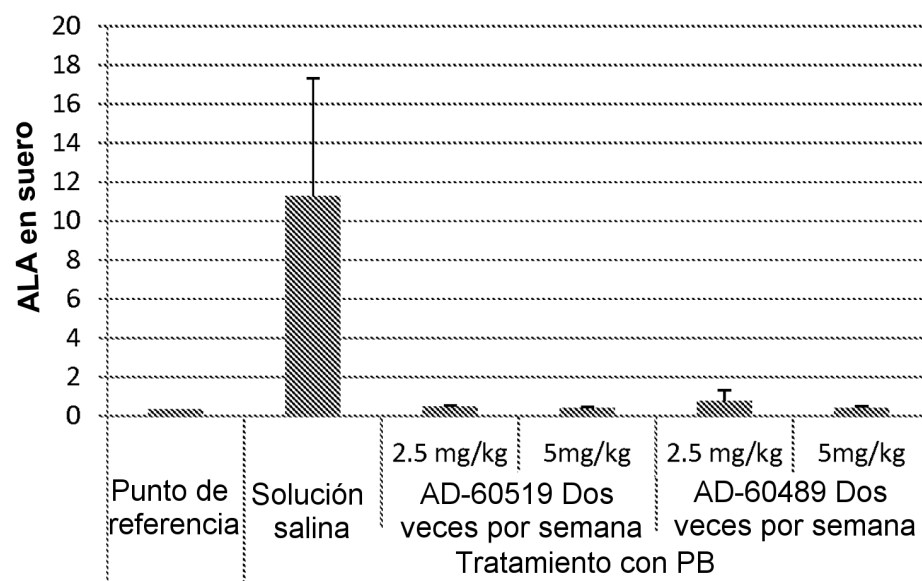
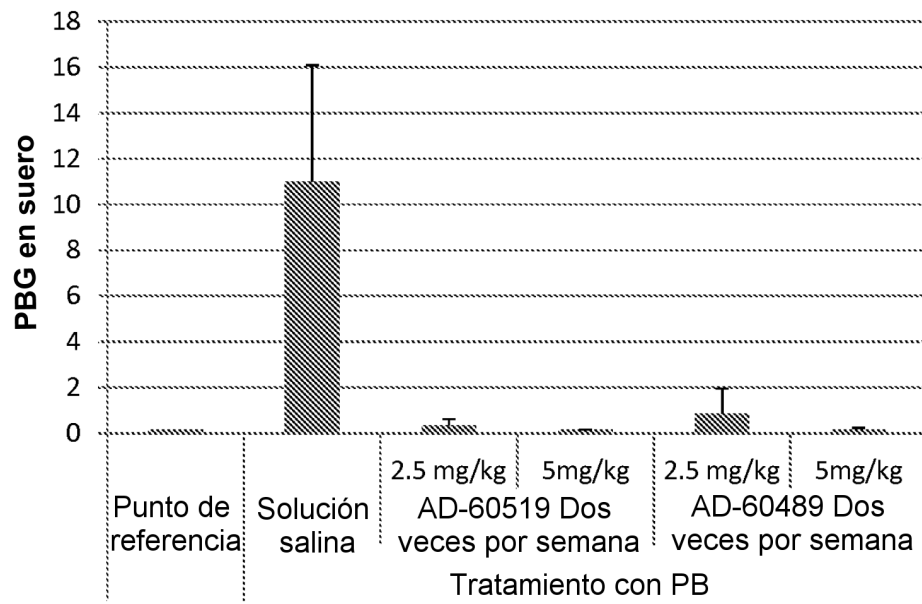


FIG. 46

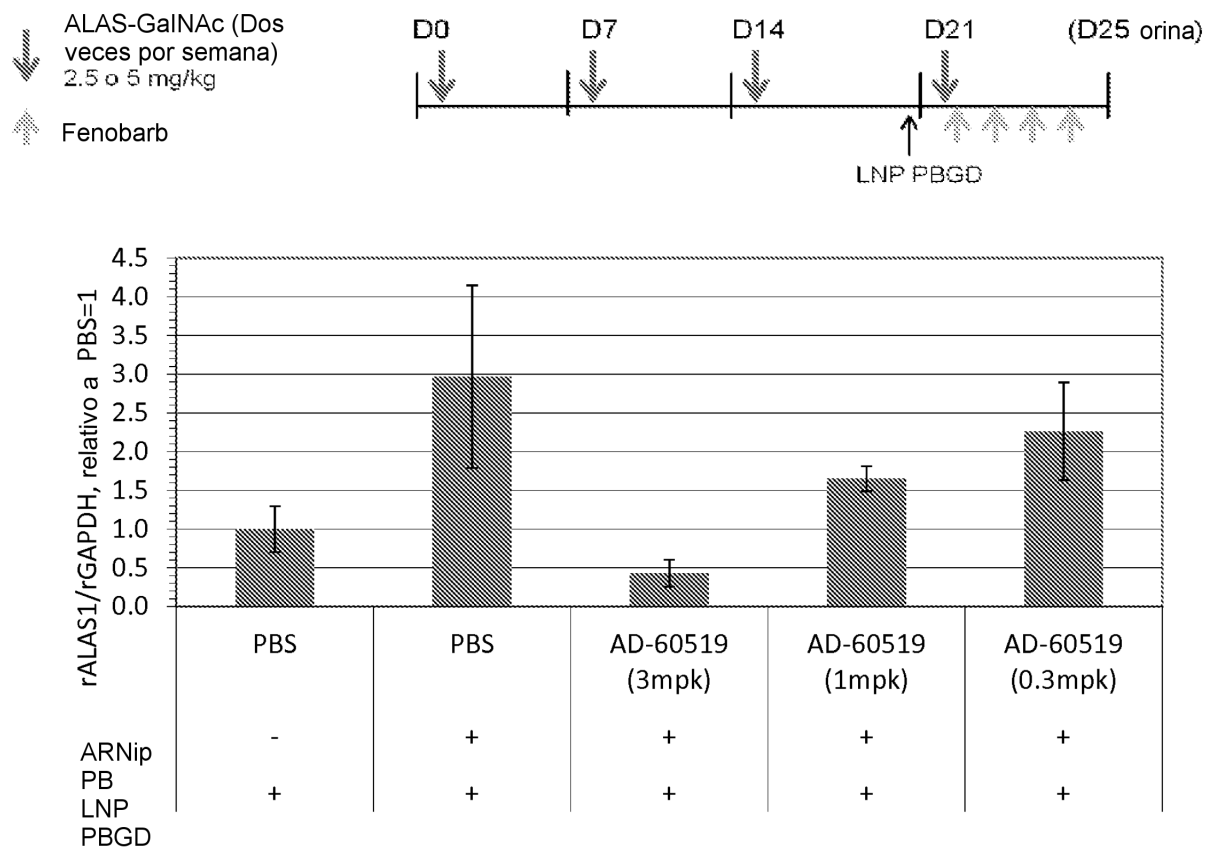


FIG. 47

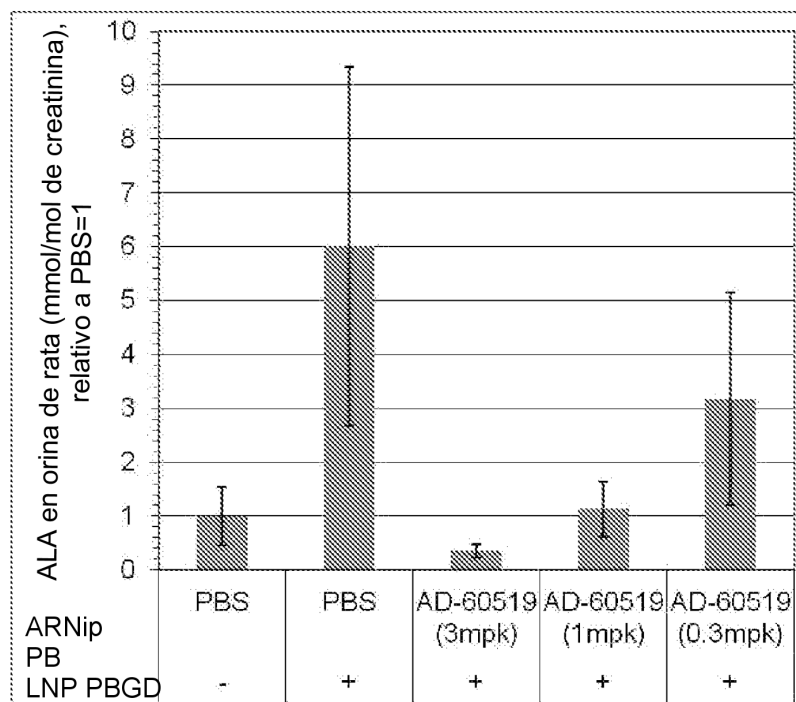
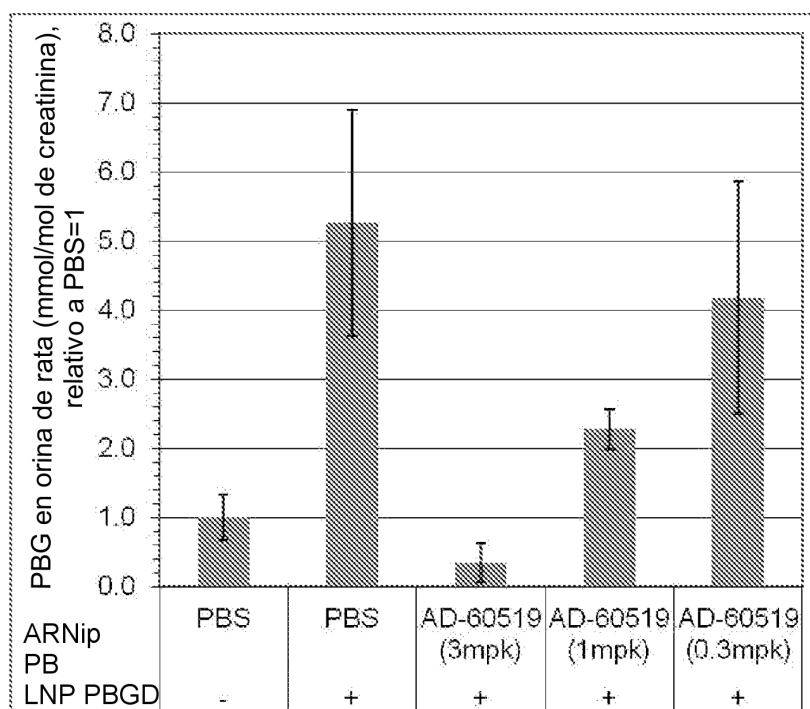


FIG. 48

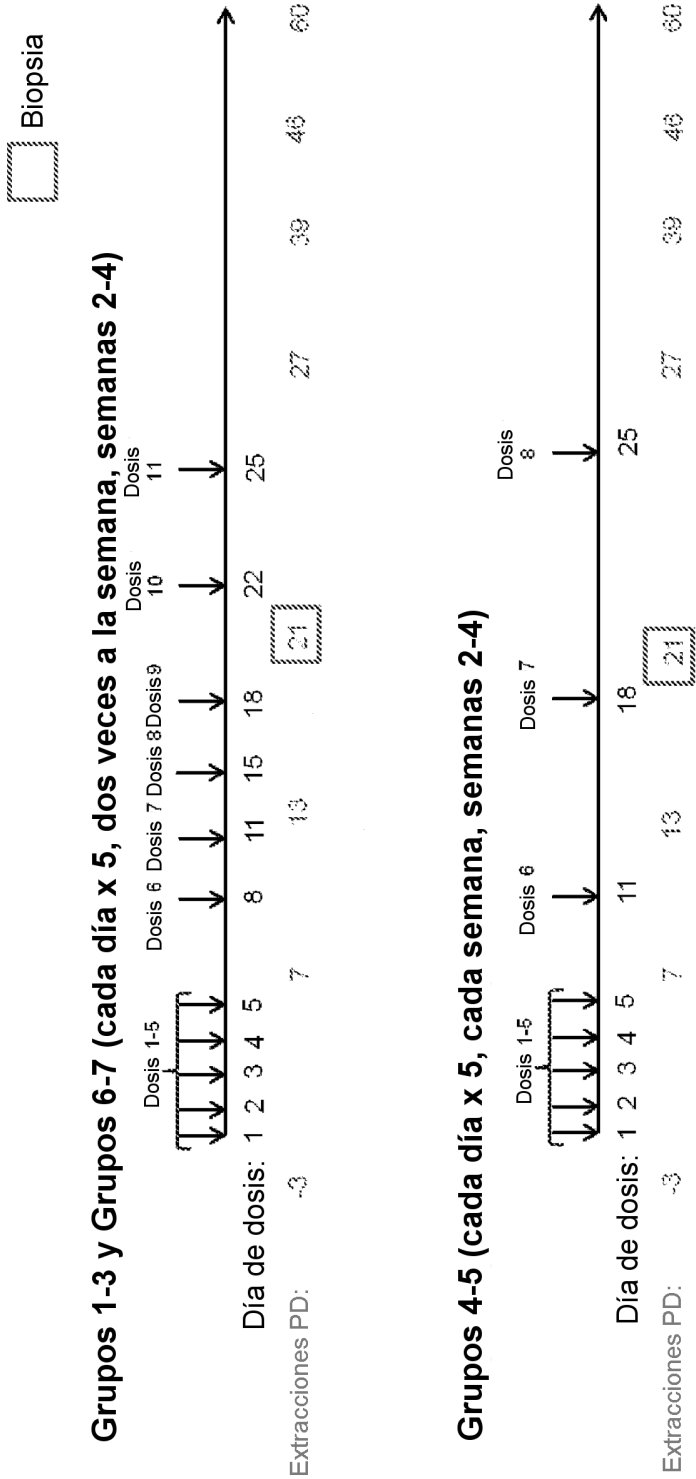
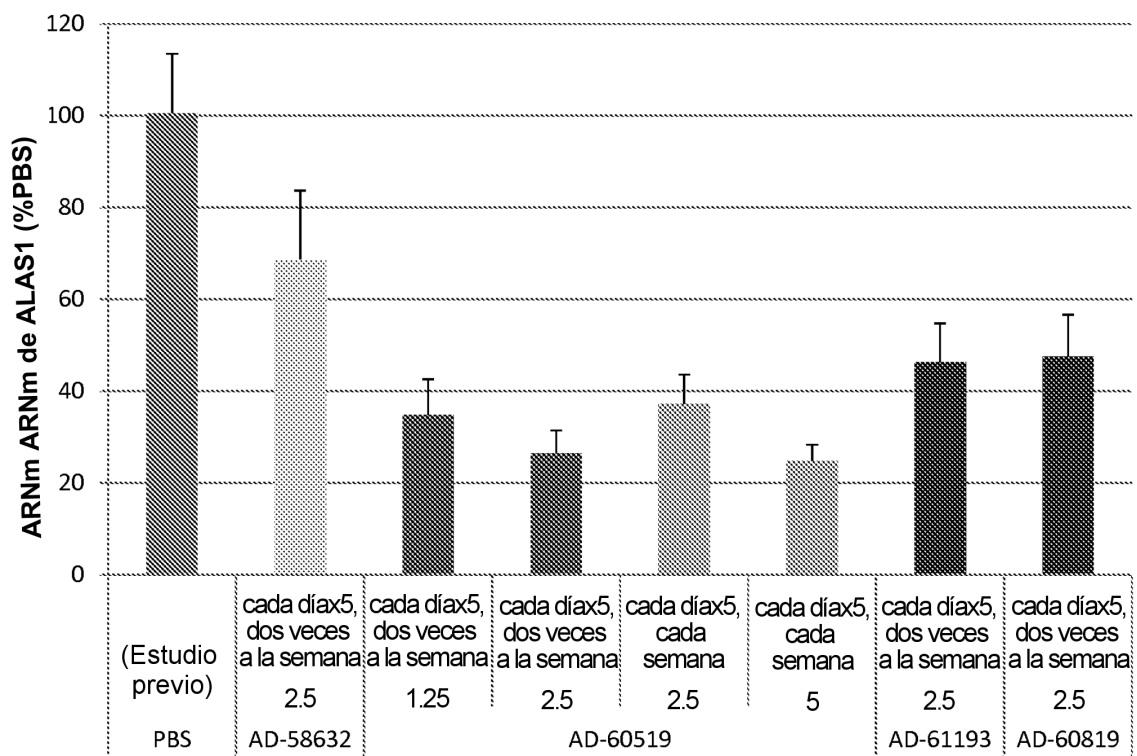


FIG. 49



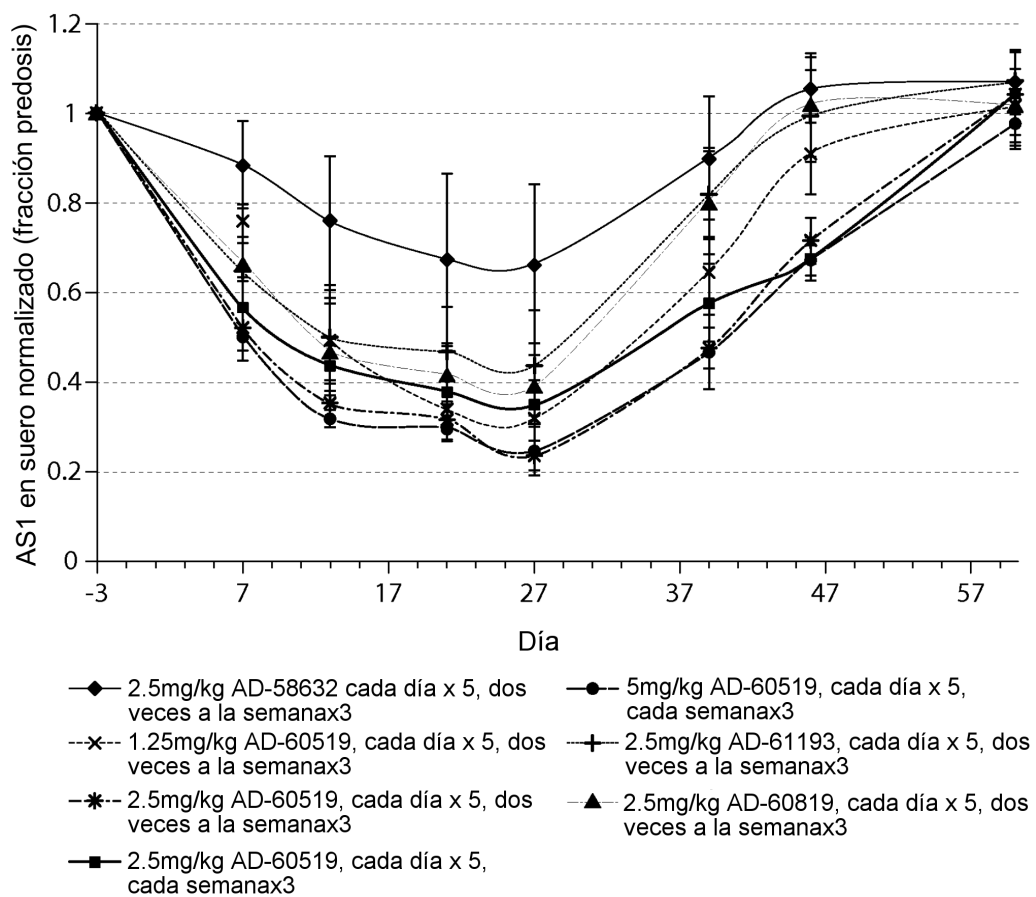
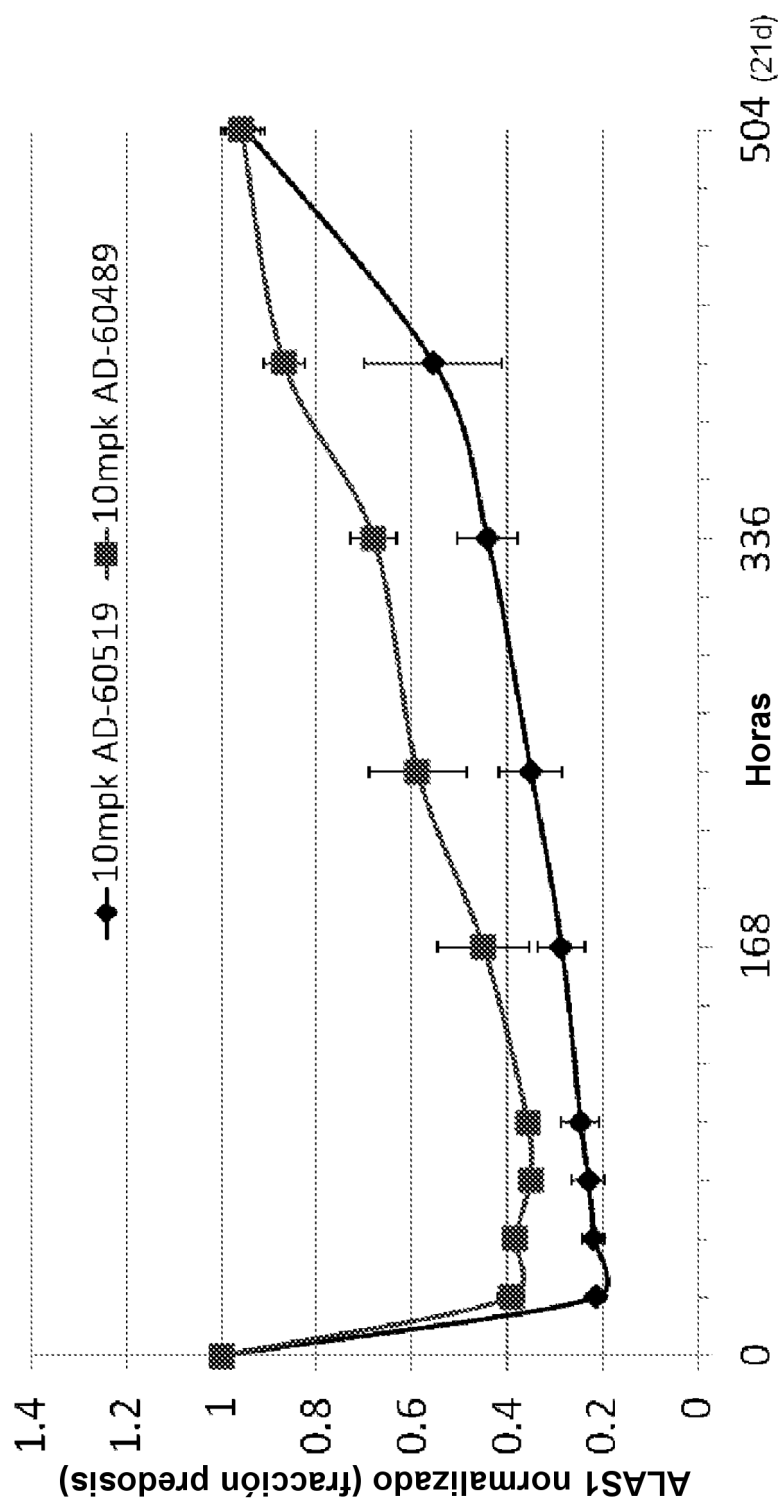
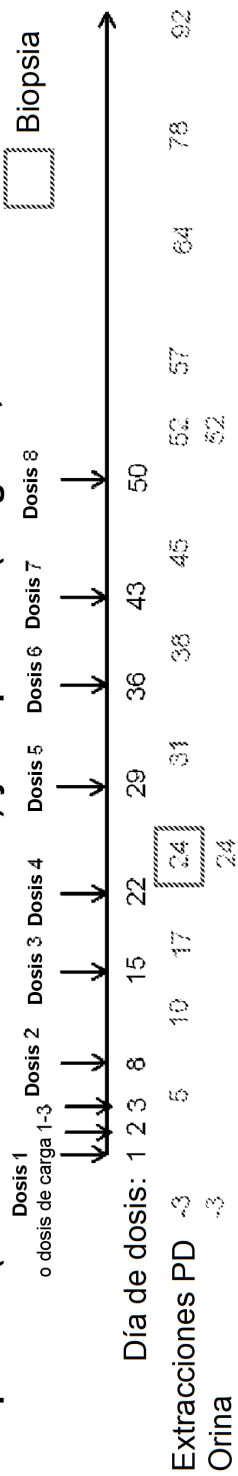


Fig. 50

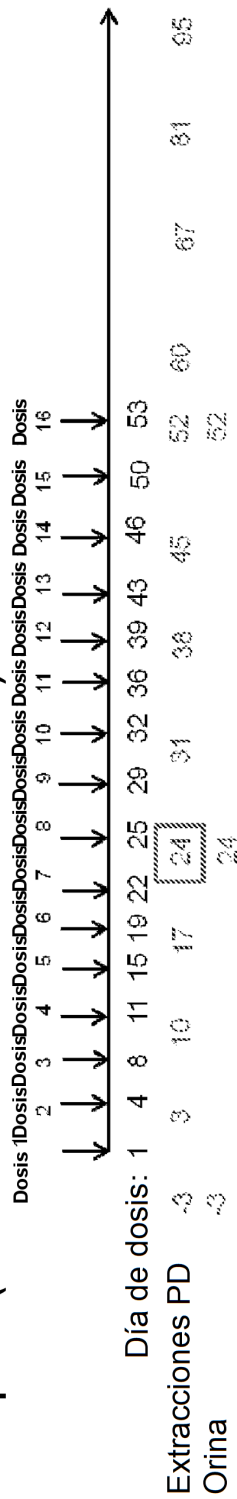
FIG. 51



Grupos 1-2 (cada semana x 8 semanas) y Grupos 3-4 (carga D1, cada semana x 7 semanas)



Grupos 5 (dos veces a la semana x 8 semanas)



Grupos 6-7 (dosis única)

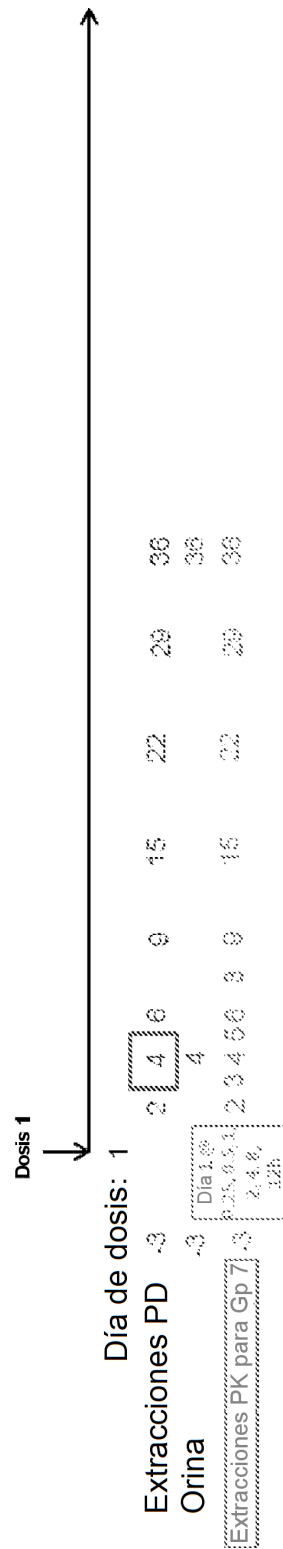
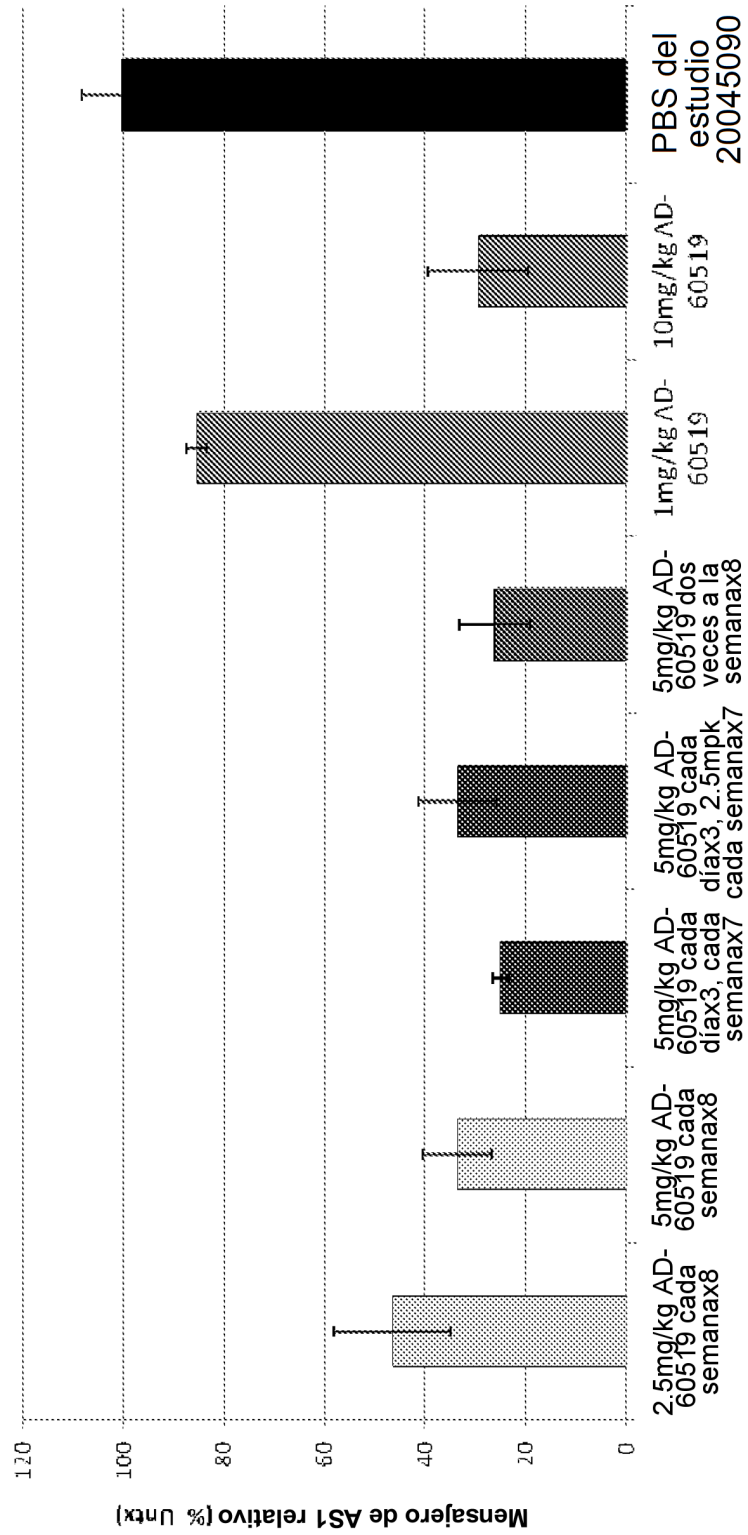


FIG. 53



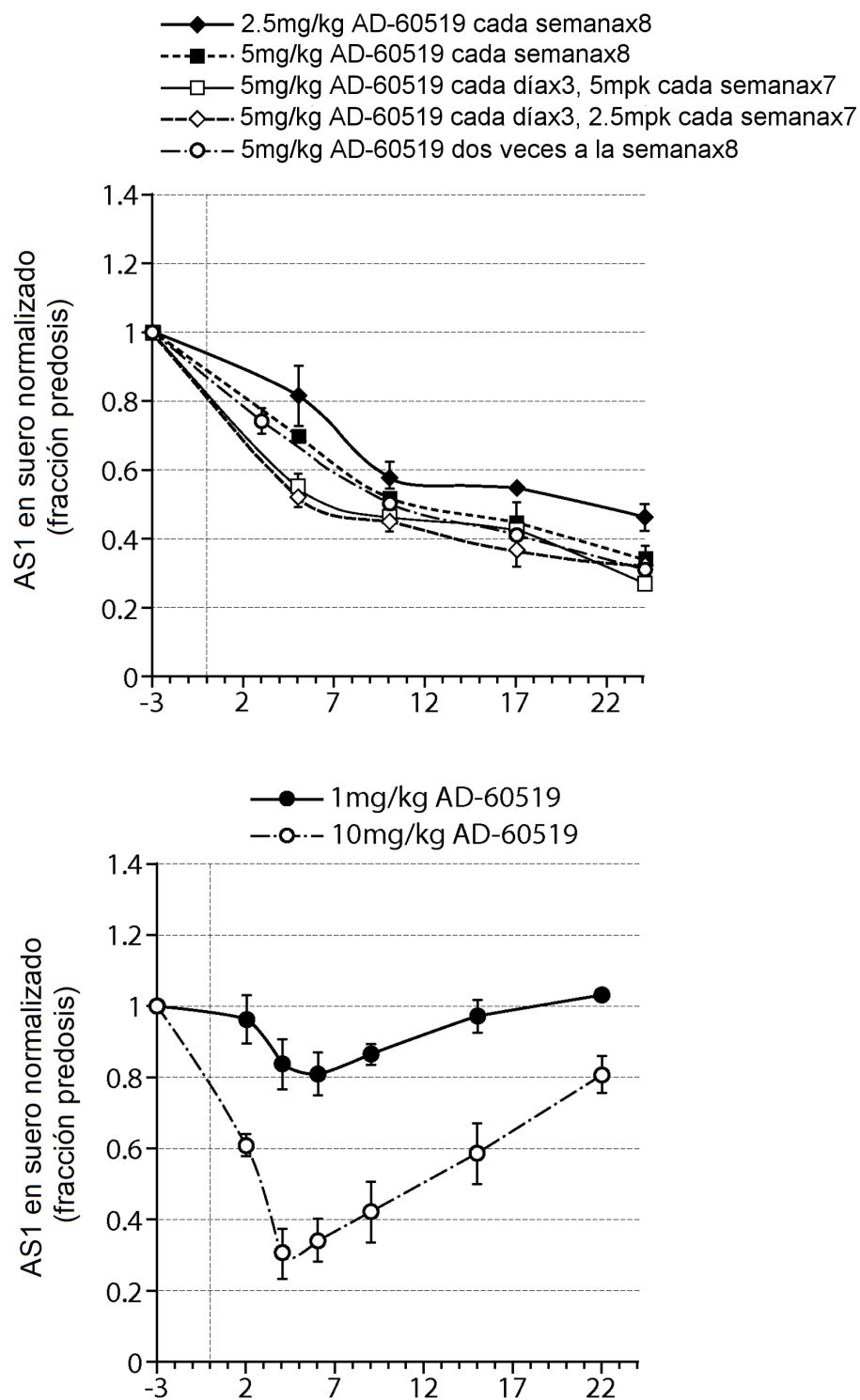
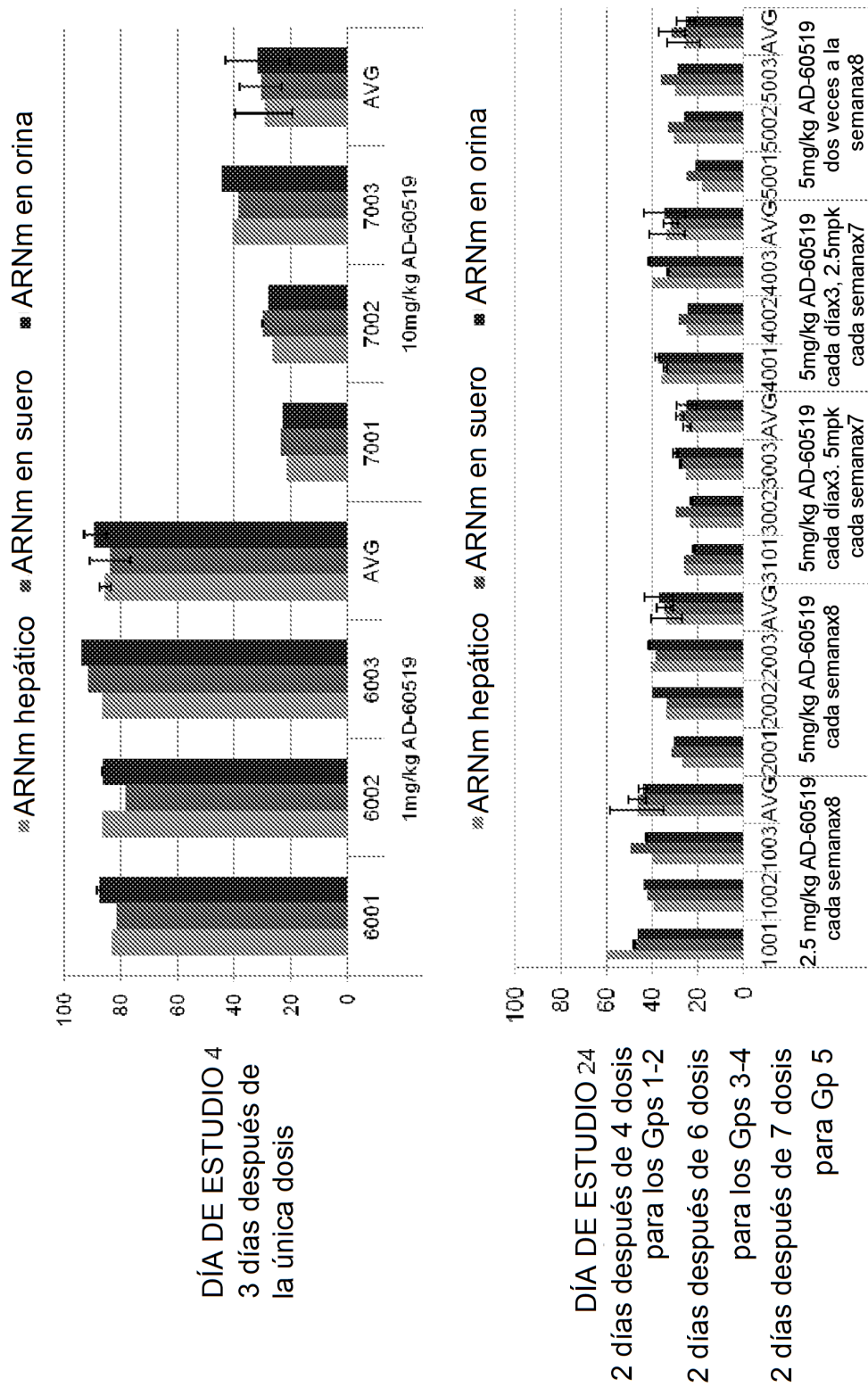
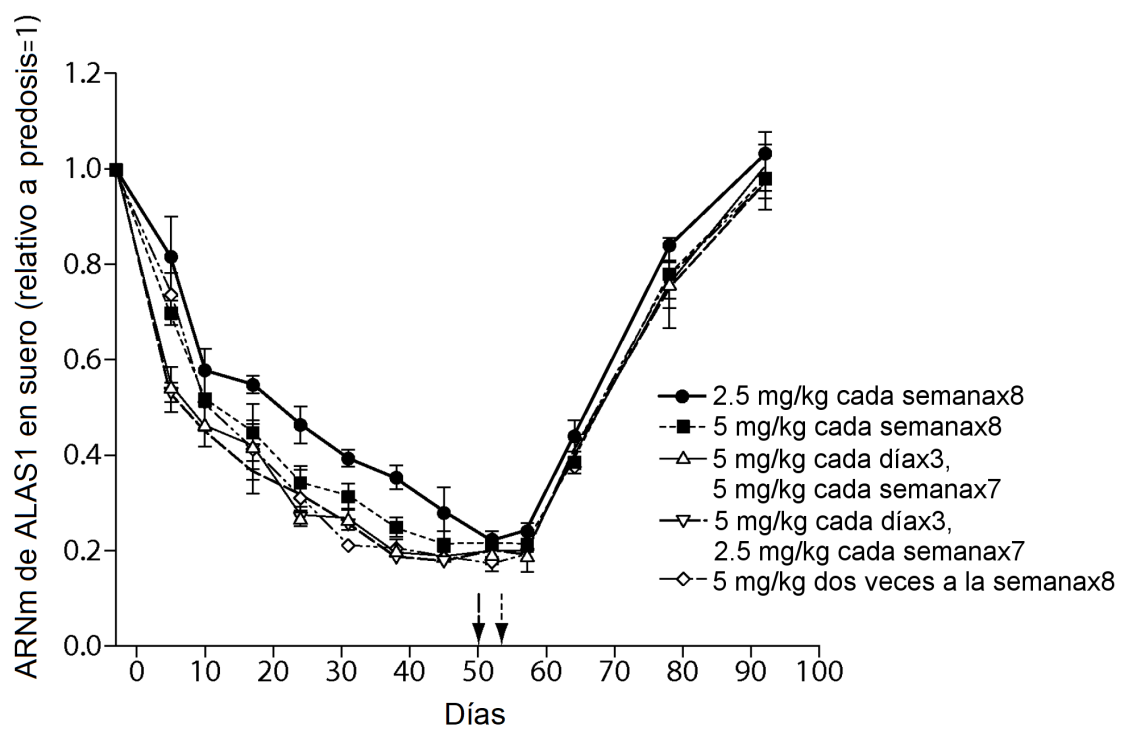
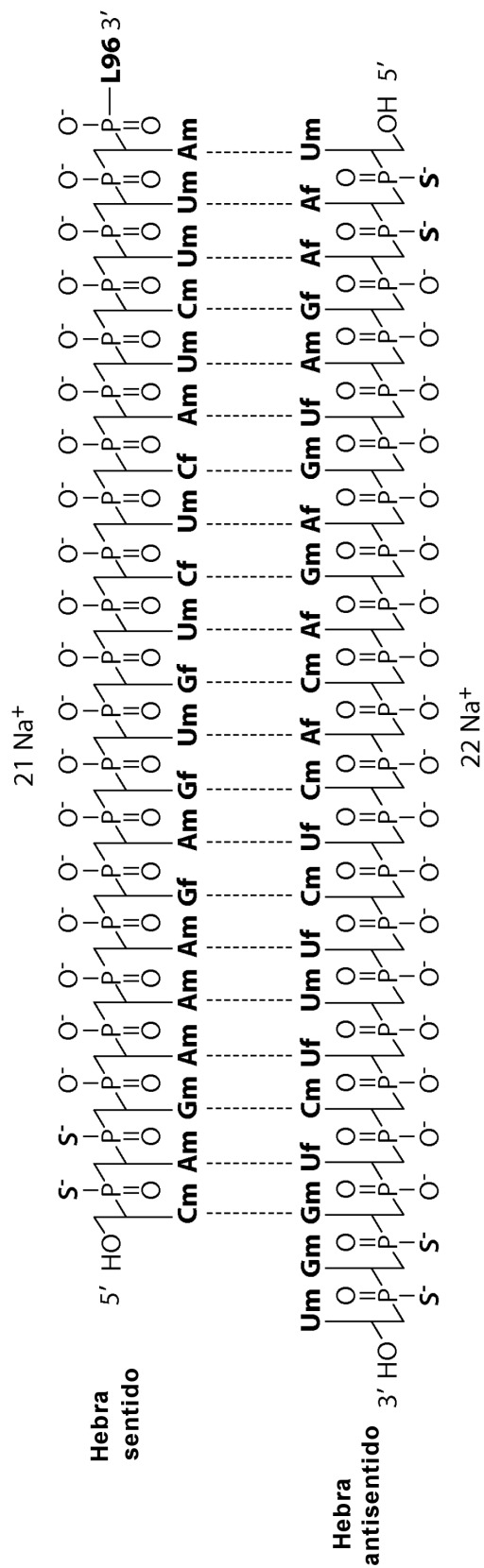


FIG. 54

FIG. 55







ALN-60519

Af, Cf, Gf, Uf = ribonucleósidos 2'-F

Am, Cm, Gm, Um = ribonucleósidos 2'-OMe

S = fosforotioato

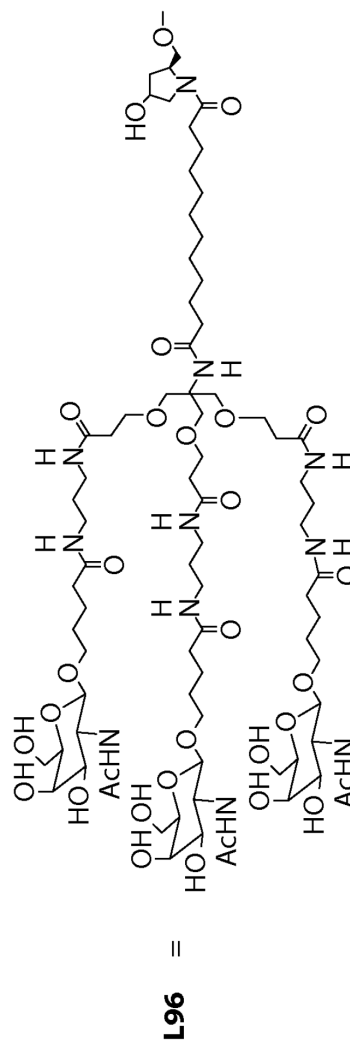


Fig. 57

FIG. 58

