

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 689 696**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/113** (2010.01)

**C12N 15/11** (2006.01)

**A61K 31/713** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.06.2012 E 16169874 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.08.2018 EP 3075855**

54 Título: **Liposomas de retinoide para potenciar la modulación de la expresión de hsp47**

30 Prioridad:

**08.06.2011 US 201161494832 P**

**15.06.2011 US 201161497447 P**

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

**15.11.2018**

73 Titular/es:

**NITTO DENKO CORPORATION (100.0%)**

**1-1-2, Shimohozumi**

**Ibaraki-shi, Osaka 567-8680, JP**

72 Inventor/es:

**AKOPIAN, VIOLETTA;**

**MINOMI, KENJIRO;**

**NIITSU, YOSHIRO;**

**PAYNE, JOSEPH E.;**

**KNOPOV, VICTOR;**

**WITTE, RICHARD P.;**

**AHMADIAN, MOHAMMAD;**

**PERELMAN, LOREN A.;**

**TANAKA, YASUNOBU;**

**FEINSTEIN, ELENA;**

**AVKIN-NACHUM, SHARON;**

**KALINSKI, HAGAR;**

**METT, IGOR;**

**YING, WENBIN y**

**LUI, YUN**

74 Agente/Representante:

**FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás**

**Observaciones :**

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

**ES 2 689 696 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

Liposomas de retinoide para potenciar la modulación de la expresión de hsp47

5 **Referencia cruzada a solicitudes relacionadas**

Esta solicitud reivindica el beneficio de la solicitud provisional estadounidense n.º 61/497.447 presentada el 15 de junio de 2011 y la solicitud provisional estadounidense n.º 61/494.832 presentada el 8 de junio de 2011.

10 **Campo técnico**

En el presente documento se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden liposomas de retinoide para potenciar la modulación de la expresión de hsp47 mediante ARNip.

15 **Antecedentes**

La fibrosis del hígado puede estar producida por células estrelladas hepáticas (HSC) activadas, que dan como resultado que se deposite una pluralidad de tipos de moléculas de colágeno y fibronectina sobre el tejido intersticial. Esto puede conducir a cirrosis hepática, insuficiencia hepática y/o carcinoma hepatocelular. Además, se desarrolla pancreatitis crónica como resultado de fibrosis pancreática mediante el mismo mecanismo que para la fibrosis hepática (Madro, *et al.*, 2004; Med Sci Monit. 10:RA166-70; Jaster, 2004, Mol Cancer. 6:26). Además, están presentes células estrelladas en trastornos de las cuerdas vocales y la laringe tales como cicatrización de las cuerdas vocal, fibrosis de la mucosa de las cuerdas vocales y fibrosis de la laringe. Para prevenir o tratar la fibrosis en estos órganos y en otras partes en el organismo, existe el deseo de desarrollar un portador de fármaco y un kit de portador de fármaco.

Las células estrelladas son uno de los candidatos de diana importantes para tratar la fibrosis (Fallowfield *et al.*, 2004, Expert Opin Ther Targets. 8:423-35; Pinzani, *et al.*, 2004, Dig Liver Dis.36:231-42). Durante la fibrosis, las células estrelladas se activan mediante citocinas a partir de células cercanas para producir muchos factores que provocan fibrosis hepática. Las células estrelladas almacenan vitamina A y pertenecen a la familia de los miofibroblastos.

Los métodos terapéuticos para prevenir o tratar la fibrosis intentan controlar el metabolismo del colágeno, la estimulación del sistema de degradación del colágeno y la inhibición de la activación de células estrelladas. Sin embargo, en todos estos casos, la baja especificidad de acción y/o la baja especificidad de órgano, la eficacia limitada y los efectos secundarios adversos crean problemas.

La inhibición de la síntesis de proteínas de colágeno no se ha establecido como método terapéutico. La potencia de moléculas que seleccionan como diana la producción de colágeno es limitada debido a la posibilidad de provocar efectos secundarios. Inhibir la producción de colágeno directamente proporciona otro método terapéutico para prevenir o tratar la fibrosis. Un método de este tipo requiere controlar uno o más de los diversos tipos de colágeno tipos I a IV. Un método para lograr esto puede ser a través de la proteína de choque térmico 47 (HSP47), una chaperona molecular específica del colágeno que es esencial para el transporte intracelular y la maduración molecular necesaria para diversos tipos de colágeno. Por tanto, si la función de HSP47 puede controlarse específicamente en células estrelladas, existe una posibilidad de inhibir la fibrosis hepática.

El documento EP1842557 se refiere a un portador de fármaco y a un kit de portador de fármaco para inhibir la fibrosis.

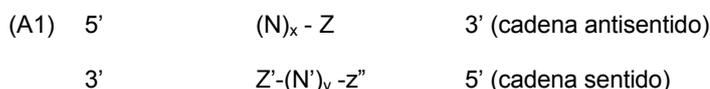
Sato *et al.* (Nature Biotechnology; volumen 26, número 4; abril de 2008; páginas 431 - 442) se refiere a resolver la cirrosis hepática usando liposomas acoplados a vitamina A para suministrar ARNip contra una chaperona específica del colágeno.

**Sumario**

55 La presente invención se define, entre otras cosas, por los siguientes puntos:

1. Composición farmacéutica que comprende

60 (i) una molécula de ácido nucleico bicatenario y un portador de fármaco que comprende una mezcla de un retinoide y un lípido, en la que la molécula de ácido nucleico bicatenario comprende la estructura (A1):



65 en la que cada uno de N y N' es un nucleótido que puede no estar modificado o estar modificado, o un resto no

convencional;

en la que cada uno de  $(N)_x$  y  $(N')_y$  es un oligonucleótido en el que cada N o N' consecutivo está unido al siguiente N o N' mediante un enlace covalente;

5 en la que cada uno de Z y Z' está independientemente presente o ausente, pero si está presente incluye independientemente 1-5 nucleótidos o restos distintos de nucleótidos consecutivos o una combinación de los mismos unidos covalentemente al extremo 3'-terminal de la cadena en la que está presente;

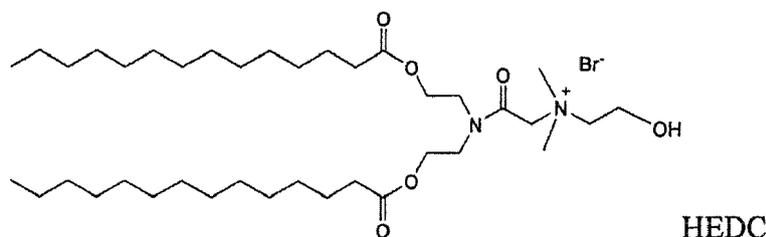
10 en la que  $z''$  puede estar presente o ausente, pero si está presente es un resto de ocupación de centros reactivos unido covalentemente al extremo 5'-terminal de  $(N')_y$ ;

en la que cada uno de x e y es independientemente un número entero de entre 18 y 40;

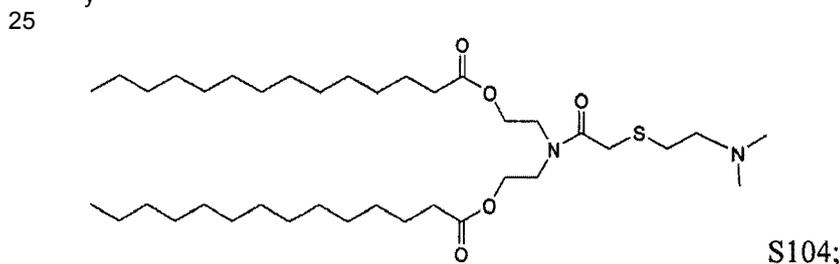
15 en la que la secuencia de  $(N')_y$  tiene complementariedad con respecto a la secuencia de  $(N)_x$ ;

en la que  $(N)_x$  incluye una secuencia antisentido con respecto a la secuencia codificante de ARNm para hsp47 humana mostrada a modo de ejemplo mediante SEQ ID NO: 1; y

20 en la que el lípido comprende un lípido seleccionado del grupo que consiste en

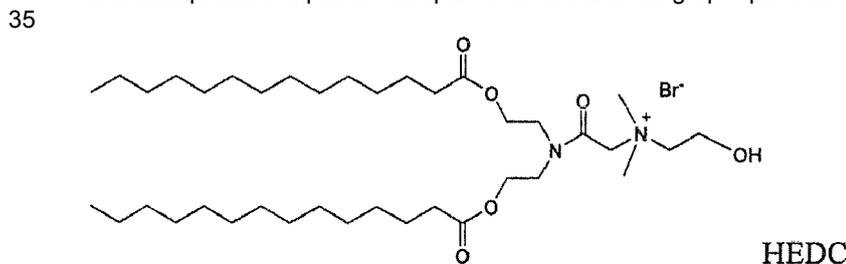


y

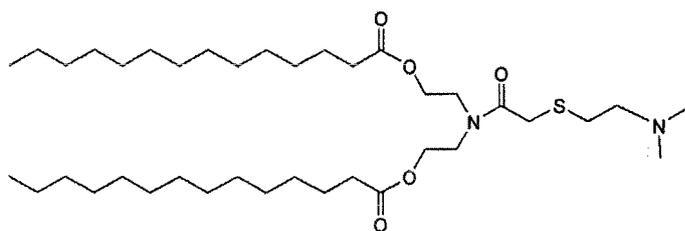


o

30 (ii) una molécula de ácido nucleico bicatenario que comprende una cadena sentido y una cadena antisentido en la que las cadenas sentido y antisentido se seleccionan de los oligonucleótidos descritos como SERPINH1\_2 (SEQ ID NO: 60 y 127), SERPINH1\_45a (SEQ ID NO: 98 y 165) y SERPINH1\_51 (SEQ ID NO: 101 y 168), y un portador de fármaco que comprende una mezcla de una vesícula lipídica y un retinoide o un conjugado de retinoide, en la que la vesícula lipídica comprende un lípido seleccionado del grupo que consiste en



y



S104.

2. Composición farmacéutica según el punto 1, en el que el conjugado de retinoide es un conjugado de PEG.

5 3. Composición farmacéutica según cualquiera de los puntos 1-2, en la que la cadena antisentido comprende SEQ ID NO: 127 y la cadena sentido comprende SEQ ID NO: 60; en la que la cadena antisentido comprende además ribonucleótidos modificados con 2'-O-metilo; un 2'-5'-ribonucleótido en al menos una de las posiciones 1, 5, 6 o 7; y un resto distinto de nucleótido unido covalentemente al extremo 3'-terminal; y en la que la cadena sentido comprende además al menos un 2'-5'-ribonucleótido o ribonucleótido modificado con 2'-O-metilo; un resto distinto de nucleótido unido covalentemente al extremo 3'-terminal; y un resto de ocupación de centros reactivos unido covalentemente al extremo 5'-terminal.

15 4. Composición farmacéutica según cualquiera de los puntos 1-2, en la que la cadena antisentido comprende SEQ ID NO: 127 y la cadena sentido comprende SEQ ID NO: 60; en la que la cadena antisentido comprende además ribonucleótidos modificados con 2'-O-metilo en las posiciones 1, 3, 5, 9, 11, 13, 15, 17 y 19; un 2'-5'-ribonucleótido en la posición 7; y un resto distinto de nucleótido unido covalentemente al extremo 3'-terminal; y en la que la cadena sentido comprende además cinco 2'-5'-ribonucleótidos consecutivos en las posiciones 3'-terminales 15, 16, 17, 18 y 19; un resto distinto de nucleótido unido covalentemente al extremo 3'-terminal; y un resto abásico invertido unido covalentemente al extremo 5'-terminal.

20 5. Composición farmacéutica según cualquiera de los puntos 1-2, en la que la cadena antisentido comprende SEQ ID NO: 127 y la cadena sentido comprende SEQ ID NO: 60; en la que la cadena antisentido comprende además ribonucleótidos modificados con 2'-O-metilo en las posiciones 1, 3, 5, 9, 11, 13, 15, 17 y 19; y un resto distinto de nucleótido C3C3 unido covalentemente al extremo 3'-terminal; y en la que la cadena sentido comprende además un resto distinto de nucleótido C3Pi unido covalentemente al extremo 3'-terminal; y un resto abásico invertido unido covalentemente al extremo 5'-terminal.

30 6. Composición farmacéutica según cualquiera de los puntos 1-2, en la que la cadena antisentido comprende SEQ ID NO: 127 y la cadena sentido comprende SEQ ID NO: 60; en la que la cadena antisentido comprende además ribonucleótidos modificados con 2'-O-metilo en las posiciones 1, 3, 5, 9, 11, 13, 15, 17 y 19; un 2'-5'-ribonucleótido en la posición 7; y un resto distinto de nucleótido C3Pi-C3OH unido covalentemente al extremo 3'-terminal; y en la que la cadena sentido comprende además cinco 2'-5'-ribonucleótidos consecutivos en las posiciones 3'-terminales 15, 16, 17, 18 y 19; un resto distinto de nucleótido C3Pi unido covalentemente al extremo 3'-terminal; y un resto abásico invertido unido covalentemente al extremo 5'-terminal.

35 7. Composición farmacéutica según cualquiera de los puntos 1-2, en la que la cadena antisentido comprende SEQ ID NO: 127 y la cadena sentido comprende SEQ ID NO: 60; en la que la cadena antisentido comprende además ribonucleótidos modificados con 2'-O-metilo en las posiciones 1, 3, 5, 9, 11, 13, 15, 17 y 19; un 2'-5'-ribonucleótido en la posición 7; y un resto distinto de nucleótido C3Pi-C3OH unido covalentemente al extremo 3'-terminal; y en la que la cadena sentido comprende además ribonucleótidos modificados con 2'-O-metilo en las posiciones 7, 13, 16 y 18; un 2'-5'-ribonucleótido en la posición 9; un resto distinto de nucleótido C3 unido covalentemente al extremo 3'-terminal; y un resto abásico invertido unido covalentemente al extremo 5'-terminal.

45 8. Composición farmacéutica según cualquiera de los puntos 1-2, en la que la cadena sentido comprende SEQ ID NO: 98 y la cadena antisentido comprende SEQ ID NO: 165; en la que la cadena sentido comprende además 2'-5'-ribonucleótidos en las posiciones en o cerca del extremo 3'-terminal; un resto distinto de nucleótido unido covalentemente al extremo 3'-terminal; y un resto de ocupación de centros reactivos unido covalentemente al extremo 5'-terminal; y en la que la cadena antisentido comprende además un ribonucleótido modificado con 2'-O-metilo; un 2'-5'-ribonucleótido en al menos una de las posiciones 5, 6 o 7; y un resto distinto de nucleótido unido covalentemente al extremo 3'-terminal.

50 9. Composición farmacéutica según cualquiera de los puntos 1-2, en la que la cadena sentido comprende SEQ ID NO: 98 y la cadena antisentido comprende SEQ ID NO: 165; en la que la cadena sentido comprende además 2'-5'-ribonucleótidos en las posiciones 15, 16, 17, 18 y 19; un resto C3-OH 3' unido covalentemente al extremo 3'-terminal; y un resto de desoxirribonucleótido abásico invertido unido covalentemente al extremo 5'-terminal; y en la que la cadena antisentido comprende además ribonucleótidos modificados con 2'-O-metilo en las posiciones 2, 4, 6, 8, 11, 13, 15, 17 y 19; un 2'-5'-ribonucleótido en la posición 7; y un resto C3Pi-C3OH unido covalentemente al extremo 3'-terminal.

5 10. Composición farmacéutica según cualquiera de los puntos 1-2, en la que la cadena sentido comprende SEQ ID NO: 101 y la cadena antisentido comprende SEQ ID NO: 168; en la que la cadena sentido comprende además ribonucleótidos de pirimidina modificados con 2'-O-metilo; un 2'-5'-ribonucleótido opcional en una de la posición 9 o 10; un resto distinto de nucleótido unido covalentemente al extremo 3'-terminal; y un resto de ocupación de centros reactivos unido covalentemente al extremo 5'-terminal; y en la que la cadena antisentido comprende además un ribonucleótido modificado con 2'-O-metilo; un 2'-5'-ribonucleótido en al menos una de las posiciones 5, 6 o 7; y un resto distinto de nucleótido unido covalentemente al extremo 3'-terminal.

10 11. Composición farmacéutica según cualquiera de los puntos 1-2, en la que la cadena sentido comprende SEQ ID NO: 101 y la cadena antisentido comprende SEQ ID NO: 168; en la que la cadena sentido comprende además ribonucleótidos modificados con 2'-O-metilo en las posiciones 4, 11, 13 y 17; un 2'-5'-ribonucleótido en la posición 9; un resto distinto de nucleótido C3OH unido covalentemente al extremo 3'-terminal; y un resto de desoxirribonucleótido abásico invertido unido covalentemente al extremo 5'-terminal; y en la que la cadena antisentido comprende además ribonucleótidos modificados con 2'-O-metilo en las posiciones 1, 4, 8, 11 y 15; un 2'-5'-ribonucleótido en la posición 6; y un resto C3Pi-C3OH unido covalentemente al extremo 3'-terminal.

20 12. Composición farmacéutica según cualquiera de los puntos 1-2, en la que la cadena sentido comprende SEQ ID NO: 101 y la cadena antisentido comprende SEQ ID NO: 168; en la que la cadena sentido comprende además ribonucleótidos modificados con 2'-O-metilo en las posiciones 4, 11, 13 y 17; un resto distinto de nucleótido C3OH unido covalentemente al extremo 3'-terminal; y un resto de desoxirribonucleótido abásico invertido unido covalentemente al extremo 5'-terminal; y en la que la cadena antisentido comprende además ribonucleótidos modificados con 2'-O-metilo en las posiciones 1, 4, 8, 13 y 15; un 2'-5'-ribonucleótido en la posición 6; y un resto C3Pi-C3OH unido covalentemente al extremo 3'-terminal.

25 13. Composición farmacéutica según cualquiera de los puntos 1-2, en la que la cadena sentido comprende SEQ ID NO: 101 y la cadena antisentido comprende SEQ ID NO: 168; en la que la cadena sentido comprende además ribonucleótidos modificados con 2'-O-metilo en las posiciones 2, 4, 11, 13 y 17; un resto distinto de nucleótido C3OH unido covalentemente al extremo 3'-terminal; y un resto de desoxirribonucleótido abásico invertido unido covalentemente al extremo 5'-terminal; y en la que la cadena antisentido comprende además ribonucleótidos modificados con 2'-O-metilo en las posiciones 1, 4, 8, 11 y 15; un 2'-5'-ribonucleótido en la posición 6; y un resto distinto de nucleótido C3Pi-C3OH unido covalentemente al extremo 3'-terminal.

35 La presente descripción se refiere a un portador de fármaco y un kit de portador de fármaco que permiten transportar específicamente un fármaco de diagnóstico y/o terapéutico a células estrelladas. El portador de fármaco en la presente descripción puede seleccionarse de formas de micelas poliméricas, liposomas, emulsiones, microesferas y nanoesfera, y uniendo al mismo o incluyendo en el mismo un retinoide o conjugado de retinoide y un fármaco terapéutico que puede transportarse específicamente a HSC. Los retinoides incluyen vitamina A, retinal, ácido retinoico, vitamina A saturada, tretinoína, adapaleno o palmitato de retinol y fenretinida (4-HPR). Además, preparando el portador de fármaco para incluir una molécula o una pluralidad de moléculas seleccionadas de inhibidores de la actividad de TGF $\beta$  tales como un receptor de TGF $\beta$  tipo II truncado y un receptor de TGF $\beta$  tipo II soluble, preparaciones de factores de crecimiento tales como HGF, promotores de la producción de MMP tales como un vector de adenovirus que contiene gen de MMP, inhibidores de la activación celular y/o inhibidores del crecimiento incluyendo un ligando de PPAR $\gamma$ , un antagonista de receptor de angiotensina-II tipo I, un inhibidor de tirosina cinasa de PDGF y un inhibidor de los canales de sodio tal como amilorida, e inductores de la apoptosis tales como compuesto 861 y agliotoxina; y administrándolo, por ejemplo, por vía oral, parenteral, intravenosa o intraperitoneal a un paciente que tiene riesgo de fibrosis o síntomas de fibrosis, o pacientes que tienen diversos trastornos relacionados con fibrosis tales como, por ejemplo, cirrosis hepática, insuficiencia hepática, cáncer de hígado o pancreatitis crónica, puede suprimirse la activación de células estrelladas, y de ese modo prevenir, inhibir o mejorar la fibrosis y/o los estados patológicos relacionados con fibrosis en dicho paciente. Alternativamente, o de manera adicional a lo mismo, usando el portador de fármaco que encierra en el mismo una ribozima, un ARN antisentido o un ARNip que inhibe específicamente HSP47 o TIMP, que es un inhibidor de MMP, puede inhibirse simultáneamente la secreción de colágenos de tipo I a IV, y como resultado puede inhibirse eficazmente la fibrogénesis.

55 Una realización de la descripción es una composición farmacéutica que comprende una molécula de ácido nucleico bicatenario que comprende una cadena sentido y una cadena antisentido en la que las cadenas sentido y antisentido se seleccionan de los oligonucleótidos descritos como SERPINH1\_2 (SEQ ID NO: 60 y 127), SERPINH1\_45a (SEQ ID NO: 98 y 165) y SERPINH1\_51 (SEQ ID NO: 101 y 168) en la tabla 4, a continuación, y un portador de fármaco que comprende una mezcla de una vesícula lipídica y un retinoide o un conjugado de retinoide. El retinoide puede ser uno o más de los siguientes: vitamina A, ácido retinoico, vitamina A saturada, retinal, tretinoína, adapaleno, palmitato de retinol o fenretinida. Preferiblemente, el retinoide comprende un conjugado de ácido retinoico, lo más preferiblemente un conjugado de retinoide-PEG. La vesícula lipídica puede comprender una bicapa de moléculas lipídicas, y puede comprender además el retinoide. El retinoide está preferiblemente a una concentración del 0,2 al 20 % en peso en el portador de fármaco. La vesícula lipídica puede comprender una superficie interior que encapsula el interior de la vesícula lipídica, y una superficie exterior que es accesible para un medio acuoso fuera de la vesícula lipídica. El retinoide puede estar asociado con la bicapa lipídica. El ácido nucleico bicatenario puede estar

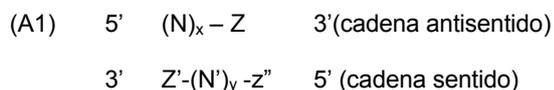
expuesto en la superficie exterior de la vesícula lipídica.

En algunas realizaciones, la molécula de ácido nucleico bicatenario incluye una cadena antisentido que tiene SEQ ID NO: 127 y que comprende ribonucleótidos modificados con azúcar de 2'-O-metilo (2'OMe); un 2'-5'-ribonucleótido en al menos una de las posiciones 1, 5, 6 o 7; y un resto distinto de nucleótido 3'-terminal unido covalentemente al extremo 3'-terminal; y una cadena sentido que tiene SEQ ID NO: 60 y que comprende al menos un 2'-5'-ribonucleótido o ribonucleótido modificado con 2'OMe; un resto distinto de nucleótido unido covalentemente al extremo 3'-terminal; y un resto abásico invertido unido covalentemente al extremo 5'-terminal. En realizaciones preferidas, la cadena antisentido es SEQ ID NO: 127 y comprende ribonucleótidos modificados con 2'OMe en las posiciones 3, 5, 9, 11, 13, 15, 17 y 19; un 2'-5'-ribonucleótido en la posición 7; y un resto distinto de nucleótido unido covalentemente al extremo 3'-terminal; y la cadena sentido es SEQ ID NO: 60 y comprende cinco 2'-5'-ribonucleótidos consecutivos en las posiciones 3'-terminales 15, 16, 17, 18 y 19; un resto distinto de nucleótido unido covalentemente al extremo 3'-terminal; y un resto abásico invertido unido covalentemente al extremo 5'-terminal. En algunas realizaciones, la molécula de ácido nucleico bicatenario incluye además un ribonucleótido modificado con 2'OMe o un 2'-5'-ribonucleótido en la posición 1 de la cadena antisentido. (Todas las referencias en el presente documento a posiciones de nucleótido se expresan basándose en el sentido 5'>3' del oligonucleótido para las cadenas tanto sentido como antisentido de la molécula de ácido nucleico bicatenario).

En diversas realizaciones, la cadena sentido es SEQ ID NO: 98 y comprende 2'-5'-ribonucleótidos en las posiciones en el extremo 3'-terminal; un resto distinto de nucleótido unido covalentemente al extremo 3'-terminal; y un resto abásico invertido unido covalentemente al extremo 5'-terminal; y la cadena antisentido es SEQ ID NO: 165 y comprende ribonucleótidos modificados con 2'OMe; un 2'-5'-ribonucleótido en al menos una de las posiciones 5, 6 o 7; y un resto distinto de nucleótido unido covalentemente al extremo 3'-terminal. En realizaciones preferidas, la cadena sentido es SEQ ID NO: 98 y comprende 2'-5'-ribonucleótidos en las posiciones 15, 16, 17, 18 y 19; un resto C3-OH 3' unido covalentemente al extremo 3'-terminal; y un resto de desoxirribonucleótido abásico invertido unido covalentemente al extremo 5'-terminal; y la cadena antisentido es SEQ ID NO: 165 y comprende ribonucleótidos modificados con 2'OMe en las posiciones 4, 6, 8, 11, 13, 15, 17 y 19; un 2'-5'-ribonucleótido en la posición 7; y un resto C3Pi-C3OH unido covalentemente al extremo 3'-terminal. En algunas realizaciones, el ácido nucleico bicatenario comprende además un ribonucleótido modificado con 2'OMe en la posición 2.

En diversas realizaciones, la cadena sentido es SEQ ID NO: 101 y comprende ribonucleótidos modificados con 2'OMe; un 2'-5'-ribonucleótido opcional en una de la posición 9 o 10; un resto distinto de nucleótido unido covalentemente al extremo 3'-terminal; y un resto abásico invertido unido covalentemente al extremo 5'-terminal; y la cadena antisentido es SEQ ID NO: 168 y comprende ribonucleótidos modificados con 2'OMe; un 2'-5'-ribonucleótido en al menos una de las posiciones 5, 6 o 7; y un resto distinto de nucleótido unido covalentemente al extremo 3'-terminal. En realizaciones preferidas, la cadena sentido es SEQ ID NO: 101 y comprende ribonucleótidos modificados con 2'OMe en las posiciones 4, 11, 13 y 17; un 2'-5'-ribonucleótido en la posición 9; un resto distinto de nucleótido C3OH unido covalentemente al extremo 3'-terminal; y resto de desoxirribonucleótido abásico invertido unido covalentemente al extremo 5'-terminal; y la cadena antisentido es SEQ ID NO: 168 y comprende ribonucleótidos modificados con 2'OMe en las posiciones 1, 4, 8, 11 y 15; un 2'-5'-ribonucleótido en la posición 6; y un resto C3Pi-C3OH unido covalentemente al extremo 3'-terminal. En determinadas realizaciones, la molécula de ácido nucleico bicatenario comprende además un ribonucleótido modificado con 2'OMe en la posición 13 en la cadena antisentido y/o en la posición 2 en la cadena sentido.

Otro aspecto es una composición farmacéutica que comprende una molécula de ácido nucleico bicatenario y portador de fármaco que comprende una mezcla de un retinoide y un lípido, en la que el compuesto de oligonucleótido bicatenario comprende la estructura (A1):



en la que cada uno de N y N' es un nucleótido que puede no estar modificado o estar modificado, o un resto no convencional;

en la que cada uno de (N)<sub>x</sub> y (N')<sub>y</sub> es un oligonucleótido en el que cada N o N' consecutivo está unido al siguiente N o N' mediante un enlace covalente;

en la que cada uno de Z y Z' está independientemente presente o ausente, pero si está presente incluye independientemente 1-5 nucleótidos o restos distintos de nucleótidos consecutivos o una combinación de los mismos unidos covalentemente al extremo 3'-terminal de la cadena en la que está presente;

en la que z'' puede estar presente o ausente, pero si está presente es un resto de ocupación de centros reactivos unido covalentemente al extremo 5'-terminal de (N')<sub>y</sub>;

en la que cada uno de x e y es independientemente un número entero de entre 18 y 40;

en la que la secuencia de (N')<sub>y</sub> tiene complementariedad con respecto a la secuencia de (N)<sub>x</sub>; y

5 en la que (N)<sub>x</sub> incluye una secuencia antisentido con respecto a la secuencia codificante de ARNm para hsp47 humana mostrada a modo de ejemplo mediante SEQ ID NO: 1, que se muestra de la siguiente manera.

ucuuuggcuu	uuuuuggcgg	agcuggggcg	cccuccggaa	gcuuuuccaa	cuuuccagaa	60
guuucucggg	acgggcagga	gggggugggg	acugccauau	auagaucccg	ggagcagggg	120
agcgggcuaa	gaguagaauc	gugucgcggc	ucgagagcga	gagucacguc	ccggcgcuag	180
cccagcccga	cccaggccca	ccguggugca	cgcaaacac	uuccuggcca	ugcgcucccu	240
ccugcuucuc	agcgcuuucu	gccuccugga	ggcgcccug	gccgccgagg	ugàagaacc	300
ugcagccgca	gcagcuccug	gcacucggga	gaaguugagc	ccaaggcgg	ccacgcuugc	360
cgagcgcagc	gccggccugg	ccuucagcuu	guaccaggcc	auggccaagg	accàggcagu	420
ggagaacauc	cuggugucac	ccgugguggu	ggccucgucg	cuagggcucg	ugucgcuggg	480
cggcaaggcg	accacggcgu	cgcaggccaa	ggcagucguc	agcgcggagc	agcugcggga	540
cgagagggug	cagcggccg	ugggcgagcu	gcucgcuca	cucàgcaacu	ccacggcgcg	600
caacgugacc	uggaagcugg	gcagccgacu	guaccggacc	agcucaguga	gcuucgcuga	660
ugacuucgug	cgcagcagca	agcagcacua	caacugcgag	cacuccaaga	ucaacuuccg	720
cgacaagcgc	agcgcgcugc	aguccaucaa	cgaguggggc	gcgcagacca	ccgacggcaa	780
gcugcccag	guaccaagg	acguggagcg	caggcagggc	gccucgcuag	ucaacggccau	840
guucuucaag	ccacacuggg	augagaaauu	ccaccacaag	augguggaca	accguggcuu	900
cauggugacu	cgguccuaua	ccgugggugu	caugaugaug	caccggacag	gcucuacaa	960
cuacuacgac	gacgagaagg	aaaagcugca	aaucguggag	augcccucgg	cccacaagcu	1020
cuccagccuc	aucauccuca	ugccccauca	cguggagccu	cucgagcgcc	uugaaaagcu	1080
gcuuaccaaa	gagcagcuga	agaucuggau	ggggaagaug	cagaagaagg	cuguugccau	1140
uccuuugccc	aagggugugg	uggaggugac	ccaugaccug	cagaaacacc	uggcugggcu	1200
gggcccugacu	gaggccauug	acaagaacaa	ggccgacuug	ucacgcaugu	caggcaagaa	1260
ggaccugvac	cuggccagcg	uguuccacgc	caccgccuuu	gaguuggaca	cagauggcaa	1320
ccccuuugac	caggacauc	acgggcgcga	ggàgucgcg	agccccagc	uguuucacgc	1380
cgaccucccc	uucaucucc	uagucgggga	cacccaaagc	ggcucccugc	uaaucauugg	1440
gcgccugguc	cggccuaagg	gugacaagau	gcgagacgag	uuauagggcc	ucagggugca	1500
cacaggaugg	caggaggcau	ccaaaggcuc	cugagacaca	ugggugcuau	uggggguuggg	1560
ggggagguga	gguaccagcg	uuggauacuc	cauggggugg	ggguggaaaa	acagaccggg	1620
guucccgugu	gccugagcgg	accuucccag	cuagaauuca	cuccacuugg	acaugggccc	1680
cagauaccau	gaugcugagc	ccggaaacuc	cacauccugu	gggaccuggg	ccauagucan	1740
ucugccugcc	cugaaagucc	cagaucagc	cugcucucau	caguauucau	auuuauagcc	1800
agguaccuuc	ucaccuguga	gaccaaaauug	agcuaggggg	gucagccagc	ccucuucuga	1860
cacuaaaaca	ccuccàgcu	cuccccagcu	cuaucccaac	cucucccaac	uauaaaacua	1920
ggugcugcag	cccugggac	caggcacccc	cagaaugacc	uggcccgagu	gaggcggaau	1980
gagaaggagc	ucccaggagg	ggcuucuggg	cagacucugg	ucaagaagca	ucgugucugg	2040
cguugggggg	augaacuuuu	uguuuuguuu	cuuccuuuuu	uaguucuuca	aagauagggg	2100
gggaaggggg	aacaugagcc	uuuguugcua	ucaauccaag	aacuuuuuug	uacuuuuuuu	2160
uuuucaaaua	aacuuuucca	augacauuuu	guuggagcgu	ggaaaaaa		2208

10 En el presente documento se proporcionan composiciones, métodos y kits para modular la expresión de genes diana. En diversos aspectos y realizaciones, las composiciones, métodos y kits proporcionados en el presente documento modulan la expresión de la proteína de choque térmico 47 (hsp47), también conocida como SERPINH1 (SEQ ID NO: 1). Las composiciones, los métodos y los kits pueden implicar el uso de moléculas de ácido nucleico (por ejemplo, ácido nucleico de interferencia pequeño (ANip), ARN de interferencia pequeño (ARNip), ARN bicatenario (ARNbc), micro-ARN (miARN) o ARN de horquilla corta (ARNhc)) que se unen a una secuencia de nucleótidos (tal como una secuencia de ARNm) que codifica hsp47, SEQ ID NO: 1. En determinadas realizaciones preferidas, las composiciones, los métodos y los kits divulgados en el presente documento inhiben la expresión de hsp47. Por ejemplo, se proporcionan moléculas de ANip (por ejemplo, moléculas de ANbc con tramo de complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC) o moléculas de ANbc con tramo de Dicer) que reducen o inhiben la expresión de hsp47. También se proporcionan composiciones, métodos y kits para tratar y/o prevenir enfermedades, estados o trastornos asociados con hsp47, tales como fibrosis hepática, cirrosis, fibrosis pulmonar incluyendo fibrosis de pulmón (incluyendo fibrosis de pulmón intersticial (ILF)), fibrosis renal que resulta de cualquier estado (por ejemplo, enfermedad renal crónica (CKD) incluyendo enfermedad renal en estadio terminal (ESRD)), fibrosis peritoneal, daño hepático crónico, fibrillogénesis, enfermedades fibróticas en otros órganos, cicatrización anómala (queloides) asociada con todos los posibles tipos de lesión cutánea por accidente y yatrogénica (operaciones); esclerodermia; cardiofibrosis, insuficiencia de la operación de filtrado de glaucoma; y adhesiones intestinales.

30 En un aspecto, se proporcionan las composiciones farmacéuticas, anteriores, que comprenden moléculas de ácido nucleico (por ejemplo, moléculas de ANip) como componente de una formulación farmacéutica en la que la molécula de ácido nucleico incluye una cadena sentido y una cadena antisentido; cada cadena de la molécula de ácido nucleico tiene independientemente de 15 a 49 nucleótidos de longitud; una secuencia de 15 a 49 nucleótidos de la cadena antisentido es complementaria a una secuencia de un ARNm que codifica hsp47 humana (por ejemplo, SEQ ID NO: 1); y una secuencia de 15 a 49 nucleótidos de la cadena sentido es complementaria a la secuencia de la cadena antisentido e incluye una secuencia de 15 a 49 nucleótidos de un ARNm que codifica hsp47 humana (por

ejemplo, SEQ ID NO: 1).

En determinadas realizaciones, la secuencia de la cadena antisentido que es complementaria a una secuencia de un ARNm que codifica hsp47 humana incluye una secuencia complementaria a una secuencia entre los nucleótidos 600-800; u 801-899; o 900-1000; o 1001-1300 de SEQ ID NO: 1; o entre los nucleótidos 650-730; o 900-975 de SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, la cadena antisentido incluye una secuencia que es complementaria a una secuencia de un ARNm que codifica hsp47 humana correspondiente a los nucleótidos 674-693 de SEQ ID NO: 1 o una parte de los mismos; o nucleótidos 698-716 de SEQ ID NO: 1 o una parte de los mismos; o nucleótidos 698-722 de SEQ ID NO: 1 o una parte de los mismos; o nucleótidos 701-720 de SEQ ID NO: 1 o una parte de los mismos; o nucleótidos 920-939 de SEQ ID NO: 1 o una parte de los mismos; o nucleótidos 963-982 de SEQ ID NO: 1 o una parte de los mismos; o nucleótidos 947-972 de SEQ ID NO: 1 o una parte de los mismos; o nucleótidos 948-966 de SEQ ID NO: 1 o una parte de los mismos; o nucleótidos 945-969 de SEQ ID NO: 1 o una parte de los mismos; o nucleótidos 945-963 de SEQ ID NO: 1 o una parte de los mismos.

En determinadas realizaciones, la cadena antisentido de una molécula de ácido nucleico (por ejemplo, una molécula de ANip) tal como se divulga en el presente documento como componente de una formulación farmacéutica incluye una secuencia correspondiente a SEQ ID NO: 4 o una parte de la misma; o SEQ ID NO: 6 o una parte de la misma; o SEQ ID NO: 8 o una parte de la misma; o SEQ ID NO: 10 o una parte de la misma; o SEQ ID NO: 12 o una parte de la misma; o SEQ ID NO: 14 o una parte de la misma; o SEQ ID NO: 16 o una parte de la misma; o SEQ ID NO: 18 o una parte de la misma; o SEQ ID NO: 20 o una parte de la misma; o SEQ ID NO: 22 o una parte de la misma; o SEQ ID NO: 24 o una parte de la misma; o SEQ ID NO: 26 o una parte de la misma; o SEQ ID NO: 28 o una parte de la misma; o SEQ ID NO: 30 o una parte de la misma; o SEQ ID NO: 32 o una parte de la misma; o SEQ ID NO: 34 o una parte de la misma; o SEQ ID NO: 36 o una parte de la misma; o SEQ ID NO: 38 o una parte de la misma; o SEQ ID NO: 40 o una parte de la misma; o SEQ ID NO: 42 o una parte de la misma; o SEQ ID NO: 44 o una parte de la misma; o SEQ ID NO: 46 o una parte de la misma; o SEQ ID NO: 48 o una parte de la misma; o SEQ ID NO: 50 o una parte de la misma; o SEQ ID NO: 52 o una parte de la misma; o SEQ ID NO: 54 o una parte de la misma; o SEQ ID NO: 56 o una parte de la misma; o SEQ ID NO: 58 o una parte de la misma. En determinadas realizaciones, la cadena sentido de una molécula de ácido nucleico (por ejemplo, una molécula de ANip) tal como se divulga en el presente documento incluye una secuencia correspondiente a SEQ ID NO: 3 o una parte de la misma; o SEQ ID NO: 5 o una parte de la misma; o SEQ ID NO: 7 o una parte de la misma; o SEQ ID NO: 9 o una parte de la misma; o SEQ ID NO: 11 o una parte de la misma; o SEQ ID NO: 13 o una parte de la misma; o SEQ ID NO: 15 o una parte de la misma; o SEQ ID NO: 17 o una parte de la misma; o SEQ ID NO: 19 o una parte de la misma; o SEQ ID NO: 21 o una parte de la misma; o SEQ ID NO: 23 o una parte de la misma; o SEQ ID NO: 25 o una parte de la misma; o SEQ ID NO: 27 o una parte de la misma; o SEQ ID NO: 29 o una parte de la misma; o SEQ ID NO: 31 o una parte de la misma; o SEQ ID NO: 33 o una parte de la misma; o SEQ ID NO: 35 o una parte de la misma; o SEQ ID NO: 37 o una parte de la misma; o SEQ ID NO: 39 o una parte de la misma; o SEQ ID NO: 41 o una parte de la misma; o SEQ ID NO: 43 o una parte de la misma; o SEQ ID NO: 45 o una parte de la misma; o SEQ ID NO: 47 o una parte de la misma; o SEQ ID NO: 49 o una parte de la misma; o SEQ ID NO: 51 o una parte de la misma; o SEQ ID NO: 53 o una parte de la misma; o SEQ ID NO: 55 o una parte de la misma; o SEQ ID NO: 57 o una parte de la misma.

En determinadas realizaciones preferidas, la cadena antisentido de una molécula de ácido nucleico (por ejemplo, una molécula de ANip) tal como se divulga en el presente documento como componente de una formulación farmacéutica incluye una secuencia correspondiente a una cualquiera de las secuencias antisentido mostradas en la tabla 4. En determinadas realizaciones preferidas, la cadena antisentido y la cadena sentido se seleccionan de los pares de secuencias mostrados en la tabla 4. En algunas realizaciones, las cadenas antisentido y sentido se seleccionan de los pares de secuencias expuestos en SERPINH1\_4, SERPINH1\_12, SERPINH1\_18, SERPINH1\_30, SERPINH1\_58 y SERPINH1\_88. En algunas realizaciones, las cadenas antisentido y sentido se seleccionan de los pares de secuencias expuestos en SERPINH1\_4 (SEQ ID NO: 195 y 220), SERPINH1\_12 (SEQ ID NO: 196 y 221), SERPINH1\_30 (SEQ ID NO: 199 y 224) y SERPINH1\_58 (SEQ ID NO: 208 y 233).

En algunas realizaciones, las cadenas antisentido y sentido de una molécula de ácido nucleico (por ejemplo, una molécula de ANip) tal como se divulga en el presente documento como componente de una formulación farmacéutica incluye los pares de secuencias expuestos en SERPINH1\_4 (SEQ ID NO: 195 y 220). En algunas realizaciones de una molécula de ácido nucleico (por ejemplo, una molécula de ANip) tal como se divulga en el presente documento incluye las cadenas antisentido y sentido de los pares de secuencias expuestos en SERPINH1\_12 (SEQ ID NO: 196 y 221). En algunas realizaciones, las cadenas antisentido y sentido de una molécula de ácido nucleico (por ejemplo, una molécula de ANip) tal como se divulga en el presente documento incluye los pares de secuencias expuestos en SERPINH1\_30 (SEQ ID NO: 199 y 224). En algunas realizaciones de una molécula de ácido nucleico (por ejemplo, una molécula de ANip) tal como se divulga en el presente documento incluye las cadenas antisentido y sentido de los pares de secuencias expuestos en SERPINH1\_58 (SEQ ID NO: 208 y 233).

En determinadas realizaciones, la cadena antisentido de una molécula de ácido nucleico (por ejemplo, una molécula de ANip) tal como se divulga en el presente documento como componente de una formulación farmacéutica incluye una secuencia correspondiente a una cualquiera de las secuencias antisentido mostradas en una cualquiera de las tablas B o C.

En determinadas realizaciones preferidas, la cadena antisentido de una molécula de ácido nucleico (por ejemplo, una molécula de ANip) tal como se divulga en el presente documento como componente de una formulación farmacéutica incluye una secuencia correspondiente a una cualquiera de las secuencias antisentido mostradas en la tabla 5. En determinadas realizaciones preferidas, la cadena antisentido y la cadena se seleccionan de los pares de secuencias mostrados en la tabla 5. En algunas realizaciones de una molécula de ácido nucleico (por ejemplo, una molécula de ANip) tal como se divulga en el presente documento incluye las cadenas antisentido y sentido seleccionadas de los pares de secuencias expuestos en

- SERPINH1\_2 (SEQ ID NO: 60 y 127),
- SERPINH1\_6 (SEQ ID NO: 63 y 130),
- SERPINH1\_11 (SEQ ID NO: 68 y 135),
- SERP1NH1\_13 (SEQ ID NO: 69 y 136),
- SERPINH1\_45 (SEQ ID NO: 97 y 164),
- SERPINH1\_45a (SEQ ID NO: 98 y 165),
- SERPINH1\_51 (SEQ ID NO: 101 y 168),
- SERPINH1\_52 (SEQ ID NO: 102 y 169) o
- SERPINH1\_86 (SEQ ID NO: 123 y 190).

En algunas realizaciones preferidas, las cadenas antisentido y sentido se seleccionan de los pares de secuencias expuestos en

- SERPINH1\_2 (SEQ ID NO: 60 y 127),
- SERPINH1\_6 (SEQ ID NO: 63 y 130),
- SERPINH1\_45a (SEQ ID NO: 98 y 165), y
- SERPINH1\_51 (SEQ ID NO: 101 y 168).

En algunas realizaciones preferidas de una molécula de ácido nucleico (por ejemplo, una molécula de ANip) tal como se divulga en el presente documento como componente de una formulación farmacéutica incluye las cadenas antisentido y sentido seleccionadas de los pares de secuencias expuestos en SERPINH1\_2 (SEQ ID NO: 60 y 127). En algunas realizaciones, las cadenas antisentido y sentido incluyen los pares de secuencias expuestos en SERPINH1\_6 (SEQ ID NO: 63 y 130). En algunas realizaciones de una molécula de ácido nucleico (por ejemplo, una molécula de ANip) tal como se divulga en el presente documento incluye las cadenas antisentido y sentido de los pares de secuencias expuestos en SERPINH1\_11 (SEQ ID NO: 68 y 135). En algunas realizaciones, las cadenas antisentido y sentido son los pares de secuencias expuestos en SERPINH1\_13 (SEQ ID NO: 69 y 136). En algunas realizaciones, las cadenas antisentido y sentido son los pares de secuencias expuestos en SERPINH1\_45 (SEQ ID NO: 97 y 164). En algunas realizaciones, las cadenas antisentido y sentido son los pares de secuencias expuestos en SERPINH1\_45a (SEQ ID NO: 98 y 165). En algunas realizaciones, las cadenas antisentido y sentido son los pares de secuencias expuestos en SERPINH1\_51 (SEQ ID NO: 101 y 168).

En determinadas realizaciones, la cadena antisentido de una molécula de ácido nucleico (por ejemplo, una molécula de ANip) tal como se divulga como componente de una formulación farmacéutica en el presente documento incluye una secuencia correspondiente a una cualquiera de las secuencias antisentido mostradas en una cualquiera de las tablas D o E.

En diversas realizaciones de moléculas de ácido nucleico (por ejemplo, moléculas de ANip) tal como se divulga en el presente documento como componente de una formulación farmacéutica, la cadena antisentido puede tener de 15 a 49 nucleótidos de longitud (por ejemplo, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48 o 49 nucleótidos de longitud); o 17-35 nucleótidos de longitud; o 17-30 nucleótidos de longitud; o 15-25 nucleótidos de longitud; o 18-25 nucleótidos de longitud; o 18-23 nucleótidos de longitud; o 19-21 nucleótidos de longitud; o 25-30 nucleótidos de longitud; o 26-28 nucleótidos de longitud. En algunas realizaciones de moléculas de ácido nucleico (por ejemplo, moléculas de ANip) tal como se divulga en el presente documento, la cadena antisentido puede tener 19 nucleótidos de longitud. De manera similar, la cadena sentido de moléculas de ácido nucleico (por ejemplo, moléculas de ANip) tal como se divulga en el presente documento puede tener de 15 a 49 nucleótidos de longitud (por ejemplo, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25,

26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48 o 49 nucleótidos de longitud); o 17-35 nucleótidos de longitud; o 17-30 nucleótidos de longitud; o 15-25 nucleótidos de longitud; o 18-25 nucleótidos de longitud; o 18-23 nucleótidos de longitud; o 19-21 nucleótidos de longitud; o 25-30 nucleótidos de longitud; o 26-28 nucleótidos de longitud. En algunas realizaciones de moléculas de ácido nucleico (por ejemplo, moléculas de ANip) tal como se divulga en el presente documento, la cadena sentido puede tener 19 nucleótidos de longitud. En algunas realizaciones de moléculas de ácido nucleico (por ejemplo, moléculas de ANip) tal como se divulga en el presente documento, la cadena antisentido y la cadena sentido pueden tener 19 nucleótidos de longitud. La región de dúplex de las moléculas de ácido nucleico (por ejemplo, moléculas de ANip) tal como se divulga en el presente documento puede tener de 15-49 nucleótidos de longitud (por ejemplo, aproximadamente 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48 o 49 nucleótidos de longitud), 15-35 nucleótidos de longitud; o 15-30 nucleótidos de longitud; o aproximadamente 15-25 nucleótidos de longitud; o 17-25 nucleótidos de longitud; o 17-23 nucleótidos de longitud; o 17-21 nucleótidos de longitud; o 25-30 nucleótidos de longitud; o 25-28 nucleótidos de longitud. En diversas realizaciones de moléculas de ácido nucleico (por ejemplo, moléculas de ANip) tal como se divulga en el presente documento, la región de dúplex puede tener 19 nucleótidos de longitud.

En determinadas realizaciones, las cadenas sentido y antisentido de un ácido nucleico (por ejemplo, una molécula de ácido nucleico ANip) tal como se proporciona en el presente documento como componente de una formulación farmacéutica son cadenas polinucleotídicas separadas. En algunas realizaciones, las cadenas antisentido y sentido separadas forman una estructura bicatenaria a través de puentes de hidrógeno, por ejemplo, formación de pares de bases de Watson-Crick. En algunas realizaciones, las cadenas sentido y antisentido son dos cadenas separadas que están unidas covalentemente entre sí. En otras realizaciones, las cadenas sentido y antisentido son parte de una única cadena polinucleotídica que tienen una región tanto sentido como antisentido; en algunas realizaciones preferidas, la cadena polinucleotídica tiene una estructura de horquilla.

En determinadas realizaciones, la molécula de ácido nucleico (por ejemplo, molécula de ANip) es una molécula de ácido nucleico bicatenario (ANbc) que es simétrica con respecto a las proyecciones, y tiene un extremo romo en ambos extremos. En otras realizaciones, la molécula de ácido nucleico (por ejemplo, molécula de ANip) es una molécula de ANbc que es simétrica con respecto a las proyecciones, y tiene una proyección en ambos extremos de la molécula de ANbc; preferiblemente la molécula tiene proyecciones de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 nucleótidos; preferiblemente la molécula tiene proyecciones de 2 nucleótidos. En algunas realizaciones, las proyecciones son proyecciones en 5'; en realizaciones alternativas, las proyecciones son proyecciones en 3'. En determinadas realizaciones, los nucleótidos de la proyección se modifican con modificaciones tal como se divulga en el presente documento. En algunas realizaciones, los nucleótidos de la proyección son 2'-desoxinucleótidos.

En determinadas realizaciones preferidas, la molécula de ácido nucleico (por ejemplo, molécula de ANip) como componente de una formulación farmacéutica es una molécula de ANbc que es asimétrica con respecto a las proyecciones, y tiene un extremo romo en un extremo de la molécula y una proyección en el otro extremo de la molécula. En determinadas realizaciones, la proyección tiene 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 nucleótidos; preferiblemente la proyección tiene 2 nucleótidos. En algunas realizaciones preferidas, una molécula de ANbc asimétrica tiene una proyección en 3' (por ejemplo, una proyección en 3' de dos nucleótidos) en un lado de un dúplex que se produce en la cadena sentido; y un extremo romo en el otro lado de la molécula. En algunas realizaciones preferidas, una molécula de ANbc asimétrica tiene una proyección en 5' (por ejemplo, una proyección en 5' de dos nucleótidos) en un lado de un dúplex que se produce en la cadena sentido; y un extremo romo en el otro lado de la molécula. En otras realizaciones preferidas, una molécula de ANbc asimétrica tiene una proyección en 3' (por ejemplo, una proyección en 3' de dos nucleótidos) en un lado de un dúplex que se produce en la cadena antisentido; y un extremo romo en el otro lado de la molécula. En algunas realizaciones preferidas, una molécula de ANbc asimétrica tiene una proyección en 5' (por ejemplo, una proyección en 5' de dos nucleótidos) en un lado de un dúplex que se produce en la cadena antisentido; y un extremo romo en el otro lado de la molécula. En determinadas realizaciones preferidas, las proyecciones son 2'-desoxinucleótidos.

En algunas realizaciones, la molécula de ácido nucleico (por ejemplo, molécula de ANip) como componente de una formulación farmacéutica tiene una estructura de horquilla (que tiene la cadena sentido y la cadena antisentido en un polinucleótido), con una estructura de bucle en un extremo y un extremo romo en el otro extremo. En algunas realizaciones, la molécula de ácido nucleico tiene una estructura de horquilla, con una estructura de bucle en un extremo y un extremo de proyección en el otro extremo (por ejemplo, una proyección de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 nucleótidos); en determinadas realizaciones, la proyección es una proyección en 3'; en determinadas realizaciones, la proyección es una proyección en 5'; en determinadas realizaciones, la proyección está en la cadena sentido; en determinadas realizaciones, la proyección está en la cadena antisentido.

En algunas realizaciones preferidas, la molécula de ácido nucleico se selecciona de las moléculas de ácido nucleico mostradas en la tabla 3.

Las moléculas de ácido nucleico (por ejemplo, molécula de ANip) divulgadas en el presente documento como componente de una formulación farmacéutica pueden incluir una o más modificaciones o nucleótidos modificados tal como se describe en el presente documento. Por ejemplo, una molécula de ácido nucleico (por ejemplo, molécula de

ANip) tal como se proporciona en el presente documento puede incluir un nucleótido modificado que tiene un azúcar modificado; un nucleótido modificado que tiene una nucleobase modificada; o un nucleótido modificado que tiene un grupo fosfato modificado. De manera similar, una molécula de ácido nucleico (por ejemplo, molécula de ANip) tal como se proporciona en el presente documento puede incluir una estructura principal de fosfodiéster y/o puede incluir un grupo fosfato terminal modificado.

Las moléculas de ácido nucleico (por ejemplo, moléculas de ANip) tal como se proporcionan como componente de una formulación farmacéutica pueden tener uno o más nucleótidos que incluyen un resto de azúcar modificado, por ejemplo, tal como se describe en el presente documento. En algunas realizaciones preferidas, el resto de azúcar modificado se selecciona del grupo que consiste en 2'OMe, 2'-metoxietoxilo, 2'-desoxilo, 2'-fluoro, 2'-alilo, 2'-O-(2-(metilamino)-2-oxoetilo), 4'-tio, 4'-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O-2'-puente, 2'-ANB (el resto de ribosa de un nucleótido de ANB está modificado con un puente adicional que conecta el oxígeno en 2' y el carbono en 4') y 2'-O-(N-metilcarbamato).

Las moléculas de ácido nucleico (por ejemplo, moléculas de ANip) tal como se proporcionan como componente de una formulación farmacéutica pueden tener una o más nucleobase(s) modificada(s), por ejemplo, tal como se describe en el presente documento, que preferiblemente pueden ser una seleccionada del grupo que consiste en xantina, hipoxantina, 2-aminoadenina, 6-metil- y otros derivados de alquilo de adenina y guanina, 2-propil- y otros derivados de alquilo de adenina y guanina, 5-halo-uracilo y citosina, 5-propinil-uracilo y citosina, 6-azo-uracilo, citosina y timina, 5-uracilo (pseudouracilo), 4-tiouracilo, 8-halo, amino, tiol, tioalquil-, hidroxi- y otras adeninas y guaninas sustituidas en 8, 5-trifluorometil- y otros uracilos y citosinas sustituidos en 5, 7-metilguanina, y aciclonucleótidos.

Las moléculas de ácido nucleico (por ejemplo, moléculas de ANip) tal como se proporcionan como componente de una formulación farmacéutica pueden tener una o más modificaciones en la estructura principal de fosfodiéster, por ejemplo, tal como se describe en el presente documento. En algunas realizaciones preferidas, el enlace fosfodiéster se modifica sustituyendo el enlace fosfodiéster con un fosforotioato, 3'-(o 5'-)desoxi-3'-(o 5'-)tio-fosforotioato, fosforoditioato, fosforoselenatos, 3'-(o -5')desoxifosfinatos, boranofosfatos, 3'-(o 5'-)desoxi-3'-(o 5'-)aminofosforamidatos, hidrogenofosfonatos, ésteres de boranofosfato, fosforamidatos, alquil- o aril-fosfonatos y fosfotriéster o uniones con fósforo.

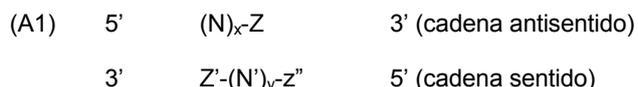
En diversas realizaciones, las moléculas de ácido nucleico proporcionadas (por ejemplo, moléculas de ANip) como componente de una formulación farmacéutica pueden incluir una o modificaciones en la cadena sentido pero no en la cadena antisentido. En algunas realizaciones, las moléculas de ácido nucleico proporcionadas (por ejemplo, moléculas de ANip) incluyen una o más modificaciones en la cadena antisentido pero no en la cadena sentido. En algunas realizaciones, las moléculas de ácido nucleico proporcionadas (por ejemplo, moléculas de ANip) incluyen una o más modificaciones tanto en la cadena sentido como en la cadena antisentido.

En algunas realizaciones en las que las moléculas de ácido nucleico proporcionadas (por ejemplo, moléculas de ANip) como componente de una formulación farmacéutica tienen modificaciones, la cadena sentido incluye un patrón de nucleótidos modificados y no modificados alternantes, y/o la cadena antisentido incluye un patrón de nucleótidos modificados y no modificados alternantes; en algunas versiones preferidas de tales realizaciones, la modificación es un resto 2'OMe. El patrón de nucleótidos modificados y no modificados alternantes puede comenzar con un nucleótido modificado en el extremo 5' o el extremo 3' de una de las cadenas; por ejemplo, el patrón de nucleótidos modificados y no modificados alternantes puede comenzar con un nucleótido modificado en el extremo 5' o el extremo 3' de la cadena sentido y/o el patrón de nucleótidos modificados y no modificados alternantes puede comenzar con un nucleótido modificado en el extremo 5' o el extremo 3' de la cadena antisentido. Cuando tanto la cadena antisentido como la sentido incluyen un patrón de nucleótidos modificados alternantes, el patrón de nucleótidos modificados puede estar configurado de tal manera que los nucleótidos modificados en la cadena sentido son opuestos a nucleótidos modificados opuestos en la cadena antisentido; o puede haber un desplazamiento de fase en el patrón de tal manera que los nucleótidos modificados de la cadena sentido son opuestos a nucleótidos no modificados en la cadena antisentido y viceversa.

Las moléculas de ácido nucleico (por ejemplo, moléculas de ANip) tal como se proporciona en el presente documento como componente de una formulación farmacéutica pueden incluir de uno a tres (es decir, 1, 2 o 3) desoxinucleótidos en el extremo 3' de la cadena sentido y/o antisentido.

Las moléculas de ácido nucleico (por ejemplo, moléculas de ANip) tal como se proporciona en el presente documento como componente de una formulación farmacéutica pueden incluir un grupo fosfato en el extremo 5' de la cadena sentido y/o antisentido.

En un aspecto, como componente de una formulación farmacéutica se proporcionan moléculas de ácido nucleico bicatenario que tienen la estructura (A1):



en la que cada uno de N y N' es un nucleótido que puede no estar modificado o estar modificado, o un resto no convencional;

5 en la que cada uno de (N)<sub>x</sub> y (N')<sub>y</sub> es un oligonucleótido en el que cada N o N' consecutivo está unido al siguiente N o N' mediante un enlace covalente;

10 en la que cada uno de Z y Z' está independientemente presente o ausente, pero si está presente incluye independientemente 1-5 nucleótidos o restos distintos de nucleótidos consecutivos o una combinación de los mismos unidos covalentemente al extremo 3'-terminal de la cadena en la que está presente;

en la que z'' puede estar presente o ausente, pero si está presente es un resto de ocupación de centros reactivos unido covalentemente al extremo 5'-terminal de (N')<sub>y</sub>;

15 en la que cada uno de x e y es independientemente un número entero de entre 18 y 40;

en la que la secuencia de (N')<sub>y</sub> tiene complementariedad con respecto a la secuencia de (N)<sub>x</sub>; y

20 en la que (N)<sub>x</sub> incluye una secuencia antisentido con respecto a SEQ ID NO: 1.

En algunas realizaciones, (N)<sub>x</sub> incluye un oligonucleótido antisentido presente en la tabla 4. En otras realizaciones, (N)<sub>x</sub> se selecciona de un oligonucleótido antisentido presente en las tablas B o C.

25 En algunas realizaciones, el enlace covalente que une cada N o N' consecutivo es un enlace fosfodiéster.

En algunas realizaciones, x = y, y cada uno de x e y es 19, 20, 21, 22 o 23. En diversas realizaciones, x = y = 19.

30 En algunas realizaciones de moléculas de ácido nucleico (por ejemplo, moléculas de ANip) tal como se divulga en el presente documento, la molécula de ácido nucleico bicatenario es un ARNip, ANip o un miARN.

En algunas realizaciones, las cadenas antisentido y sentido se seleccionan de los pares de secuencias expuestas en

- SERPINH1\_4 (SEQ ID NO: 195 y 220),
- 35 • SERPINH1\_12 (SEQ ID NO: 196 y 221),
- SERPINH1\_30 (SEQ ID NO: 199 y 224), y
- 40 • SERPINH1\_58 (SEQ ID NO: 208 y 233).

45 En algunas realizaciones, las cadenas antisentido y sentido son los pares de secuencias expuestas en SERPINH1\_4 (SEQ ID NO: 195 y 220). En algunas realizaciones, las cadenas antisentido y sentido son los pares de secuencias expuestas en SERPINH1\_12 (SEQ ID NO: 196 y 221). En algunas realizaciones, las cadenas antisentido y sentido son los pares de secuencias expuestas en SERPINH1\_30 (SEQ ID NO: 199 y 224). En algunas realizaciones, las cadenas antisentido y sentido son los pares de secuencias expuestas en SERPINH1\_58 (SEQ ID NO: 208 y 233).

50 En algunas realizaciones, las moléculas de ácido nucleico bicatenario como componente de una formulación farmacéutica comprenden un resto de ADN o un apareamiento erróneo con la diana en la posición 1 de la cadena antisentido (extremo 5'-terminal). Una estructura de este tipo se describe en el presente documento. Según una realización, se proporcionan moléculas de ácido nucleico modificadas que tienen una estructura (A2) expuesta a continuación:

(A2) 5' N'-(N)<sub>x</sub>-Z 3' (cadena antisentido)

55 3' Z'-N<sup>2</sup>-(N')<sub>y</sub>-z'' 5' (cadena sentido)

en la que cada uno de N<sup>2</sup>, N y N' es un ribonucleótido no modificado o modificado, o un resto no convencional;

60 en la que cada uno de (N)<sub>x</sub> y (N')<sub>y</sub> es un oligonucleótido en el que cada N o N' consecutivo está unido al N o N' adyacente mediante un enlace covalente;

en la que cada uno de x e y es independientemente un número entero de entre 17 y 39;

65 en la que la secuencia de (N')<sub>y</sub> tiene complementariedad con respecto a la secuencia de (N)<sub>x</sub> y (N)<sub>x</sub> tiene complementariedad con respecto a una secuencia consecutiva en un ARN diana;

- en la que  $N^1$  está unido covalentemente a  $(N)_x$  y presenta apareamiento erróneo con respecto al ARN diana o es un resto de ADN complementario al ARN diana;
- 5 en la que  $N^1$  es un resto seleccionado del grupo que consiste en uridina natural o modificada, desoxirribouridina, ribotimidina, desoxirribotimidina, adenosina o desoxiadenosina;
- en la que  $z'$  puede estar presente o ausente, pero si está presente es un resto de ocupación de centros reactivos unido covalentemente al extremo 5'-terminal de  $N^2-(N')_y$ ;
- 10 en la que cada uno de  $Z$  y  $Z'$  está independientemente presente o ausente, pero si está presente es independientemente 1-5 nucleótidos consecutivos, restos distintos de nucleótidos consecutivos o una combinación de los mismos unidos covalentemente al extremo 3'-terminal de la cadena en la que está presente.
- 15 En algunas realizaciones, la secuencia de  $(N')_y$  es completamente complementaria a la secuencia de  $(N)_x$ . En diversas realizaciones, la secuencia de  $N^2-(N')_y$  es complementaria a la secuencia de  $N^1-(N)_x$ . En algunas realizaciones,  $(N)_x$  comprende un fragmento antisentido que es completamente complementario a de aproximadamente 17 a aproximadamente 39 nucleótidos consecutivos en un ARN diana. En otras realizaciones,  $(N)_x$  comprende un fragmento antisentido que es sustancialmente complementario a de aproximadamente 17 a aproximadamente 39 nucleótidos consecutivos en un ARN diana.
- 20 En algunas realizaciones,  $N^1$  y  $N^2$  forman un par de bases de Watson-Crick. En algunas realizaciones,  $N^1$  y  $N^2$  forman un par de bases distinto de Watson-Crick. En algunas realizaciones, se forma un par de bases entre un ribonucleótido y un desoxirribonucleótido.
- 25 En algunas realizaciones,  $x=y=18$ ,  $x=y=19$  o  $x=y=20$ . En realizaciones preferidas,  $x=y=18$ . Cuando  $x=18$  en  $N^1-(N)_x$ ,  $N^1$  se refiere a la posición 1 y las posiciones 2-19 se incluyen en  $(N)_{18}$ . Cuando  $y=18$  en  $N^2-(N')_y$ ,  $N^2$  se refiere a la posición 19 y las posiciones 1-18 se incluyen en  $(N')_{18}$ .
- 30 En algunas realizaciones,  $N^1$  está unido covalentemente a  $(N)_x$  y presenta apareamiento erróneo con respecto al ARN diana. En diversas realizaciones,  $N^1$  está unido covalentemente a  $(N)_x$  y es un resto de ADN complementario al ARN diana.
- 35 En algunas realizaciones, una uridina en la posición 1 de la cadena antisentido está sustituida con un  $N^1$  seleccionado de adenosina, desoxiadenosina, desoxiuridina (dU), ribotimidina o desoxitimidina. En diversas realizaciones,  $N^1$  se selecciona de adenosina, desoxiadenosina o desoxiuridina.
- 40 En algunas realizaciones, guanosina en la posición 1 de la cadena antisentido está sustituida con un  $N^1$  seleccionado de adenosina, desoxiadenosina, uridina, desoxiuridina, ribotimidina o desoxitimidina. En diversas realizaciones,  $N^1$  se selecciona de adenosina, desoxiadenosina, uridina o desoxiuridina.
- 45 En algunas realizaciones, citidina en la posición 1 de la cadena antisentido está sustituida con un  $N^1$  seleccionado de adenosina, desoxiadenosina, uridina, desoxiuridina, ribotimidina o desoxitimidina. En diversas realizaciones,  $N^1$  se selecciona de adenosina, desoxiadenosina, uridina o desoxiuridina.
- 50 En algunas realizaciones, adenosina en la posición 1 de la cadena antisentido está sustituida con un  $N^1$  seleccionado de desoxiadenosina, desoxiuridina, ribotimidina o desoxitimidina. En diversas realizaciones,  $N^1$  se selecciona de desoxiadenosina o desoxiuridina.
- 55 En algunas realizaciones,  $N^1$  y  $N^2$  forman un par de bases entre uridina o desoxiuridina, y adenosina o desoxiadenosina. En otras realizaciones,  $N^1$  y  $N^2$  forman un par de bases entre desoxiuridina y adenosina.
- En algunas realizaciones, la molécula de ácido nucleico bicatenario como componente de una formulación farmacéutica es un ARNip, ANip o un miARN. Las moléculas de ácido nucleico bicatenario tal como se proporciona en el presente documento también se denominan "dúplex".
- 60 En algunas realizaciones,  $(N)_x$  incluye un oligonucleótido antisentido presente en la tabla 5. En algunas realizaciones,  $x=y=18$  y  $N^1-(N)_x$  incluye un oligonucleótido antisentido presente en la tabla 4. En algunas realizaciones,  $x=y=19$  o  $x=y=20$ . En determinadas realizaciones preferidas,  $x=y=18$ . En algunas realizaciones,  $x=y=18$  y las secuencias de  $N^1-(N)_x$  y  $N^2-(N')_y$  se seleccionan del par de oligonucleótidos expuestos en la tabla 4. En algunas realizaciones,  $x=y=18$  y las secuencias de  $N^1-(N)_x$  y  $N^2-(N')_y$  se seleccionan del par de oligonucleótidos expuestos en las tablas D y E. En algunas realizaciones, las cadenas antisentido y sentido se seleccionan de los pares de secuencias expuestos en
- SERPINH1\_2 (SEQ ID NO: 60 y 127),
  - SERPINH1-6 (SEQ ID NO: 63 y 130),
- 65

- SERPINH1\_11 (SEQ ID NO: 68 y 135),
- SERPINH1\_13 (SEQ ID NO: 69 y 136),
- SERPINH1\_45 (SEQ ID NO: 97 y 164),
- SERPINH1\_45a (SEQ ID NO: 98 y 165),
- SERPINH1\_51 (SEQ ID NO: 101 y 168),
- SERPINH1\_51a (SEQ ID NO: 105 y 172),
- SERPINH1\_52 (SEQ ID NO: 102 y 169), y
- SERPINH1\_86 (SEQ ID NO: 123 y 190).

En algunas realizaciones preferidas, las cadenas antisentido y sentido se seleccionan de los pares de secuencias expuestos en

- SERPINH1\_2 (SEQ ID NO: 60 y 127),
- SERPINH1\_6 (SEQ ID NO: 63 y 130),
- SERPINH14\_45a (SEQ ID NO: 98 y 165),
- SERPINH1\_51 (SEQ ID NO: 101 y 168), y
- SERPINH1\_51a (SEQ ID NO: 105 y 172).

En algunas realizaciones preferidas, las cadenas antisentido y sentido se seleccionan de los pares de secuencias expuestos en SERPINH1\_2 (SEQ ID NO: 60 y 127). En algunas realizaciones, las cadenas antisentido y sentido son los pares de secuencias expuestos en SERPINH1\_6 (SEQ ID NO: 63 y 130). En algunas realizaciones, las cadenas antisentido y sentido son los pares de secuencias expuestos en SERPINH1\_11 (SEQ ID NO: 68 y 135). En algunas realizaciones, las cadenas antisentido y sentido son los pares de secuencias expuestos en SERPINH1\_13 (SEQ ID NO: 69 y 136). En algunas realizaciones, las cadenas antisentido y sentido son los pares de secuencias expuestos en SERPINH1\_45 (SEQ ID NO: 97 y 164). En algunas realizaciones, las cadenas antisentido y sentido son los pares de secuencias expuestos en SERPINH1\_45a (SEQ ID NO: 98 y 165). En algunas realizaciones, las cadenas antisentido y sentido son los pares de secuencias expuestos en SERPINH1\_51 (SEQ ID NO: 101 y 168). En algunas realizaciones, las cadenas antisentido y sentido son los pares de secuencias expuestos en SERPINH1\_51a (SEQ ID NO: 105 y 172). En algunas realizaciones, las cadenas antisentido y sentido son los pares de secuencias expuestos en SERPINH1\_52 (SEQ ID NO: 102 y 169). En algunas realizaciones, las cadenas antisentido y sentido son los pares de secuencias expuestos en (SEQ ID NO: 123 y 190). En algunas realizaciones preferidas, las cadenas antisentido y sentido se seleccionan de los pares de secuencias expuestos en SERPINH1\_2 (SEQ ID NO: 60 y 127), SERPINH1\_6 (SEQ ID NO: 63 y 130), SERPINH1\_45a (SEQ ID NO: 98 y 165), SERPINH1\_51 (SEQ ID NO: 101 y 168) y SERPINH1\_51a (SEQ ID NO: 105 y 172).

En algunas realizaciones, N<sup>1</sup> y N<sup>2</sup> forman un par de bases de Watson-Crick. En otras realizaciones, N<sup>1</sup> y N<sup>2</sup> forman un par de bases distinto de Watson-Crick. En algunas realizaciones, N<sup>1</sup> es una riboadenosina modificada o una ribouridina modificada.

En algunas realizaciones, N<sup>1</sup> y N<sup>2</sup> forman un par de bases de Watson-Crick. En otras realizaciones, N<sup>1</sup> y N<sup>2</sup> forman un par de bases distinto de Watson-Crick. En determinadas realizaciones, N<sup>1</sup> se selecciona del grupo que consiste en riboadenosina, riboadenosina modificada, desoxirriboadenosina, desoxirriboadenosina modificada. En otras realizaciones, N<sup>1</sup> se selecciona del grupo que consiste en ribouridina, desoxirribouridina, ribouridina modificada y desoxirribouridina modificada.

En determinadas realizaciones, la posición 1 en la cadena antisentido (extremo 5'-terminal) incluye desoxirribouridina (dU) o adenosina. En algunas realizaciones, N<sup>1</sup> se selecciona del grupo que consiste en riboadenosina, riboadenosina modificada, desoxirriboadenosina, desoxirriboadenosina modificada y N<sup>2</sup> se selecciona del grupo que consiste en ribouridina, desoxirribouridina, ribouridina modificada y desoxirribouridina modificada. En determinadas realizaciones, N<sup>1</sup> se selecciona del grupo que consiste en riboadenosina y riboadenosina modificada y N<sup>2</sup> se selecciona del grupo que consiste en ribouridina y ribouridina modificada.

En determinadas realizaciones, N<sup>1</sup> se selecciona del grupo que consiste en ribouridina, desoxirribouridina, ribouridina modificada y desoxirribouridina modificada y N<sup>2</sup> se selecciona del grupo que consiste en riboadenosina,

riboadenosina modificada, desoxirriboadenosina y desoxirriboadenosina modificada. En determinadas realizaciones, N<sup>1</sup> se selecciona del grupo que consiste en ribouridina y desoxirribouridina y N<sup>2</sup> se selecciona del grupo que consiste en riboadenosina y riboadenosina modificada. En determinadas realizaciones, N<sup>1</sup> es ribouridina y N<sup>2</sup> es riboadenosina. En determinadas realizaciones, N<sup>1</sup> es desoxirribouridina y N<sup>2</sup> es riboadenosina.

5 En algunas realizaciones de la estructura (A2), N<sup>1</sup> incluye ribouracilo modificado con 2'OMe o riboadenosina modificada con 2'OMe. En determinadas realizaciones de la estructura (A2), N<sup>2</sup> incluye un ribonucleótido o desoxirribonucleótido modificado con 2'OMe.

10 En algunas realizaciones de la estructura (A2), N<sup>1</sup> incluye ribouracilo modificado con 2'OMe o ribocitosina modificada con 2'OMe. En determinadas realizaciones de la estructura (A2), N<sup>2</sup> incluye un ribonucleótido modificado con 2'OMe.

15 En algunas realizaciones, cada uno de N y N' es un nucleótido no modificado. En algunas realizaciones, al menos uno de N o N' incluye un nucleótido modificado químicamente o un resto no convencional. En algunas realizaciones, el resto no convencional se selecciona de un nucleótido especular, un resto de ribosa abásico y un resto de desoxirribosa abásico. En algunas realizaciones, el resto no convencional es un nucleótido especular, preferiblemente un resto de L-ADN. En algunas realizaciones, al menos uno de N o N' incluye un ribonucleótido modificado con 2'OMe.

20 En algunas realizaciones, la secuencia de (N')<sub>y</sub> es completamente complementaria a la secuencia de (N)<sub>x</sub>. En otras realizaciones, la secuencia de (N')<sub>y</sub> es sustancialmente complementaria a la secuencia de (N)<sub>x</sub>.

25 En algunas realizaciones, (N)<sub>x</sub> incluye una secuencia antisentido que es completamente complementaria a de aproximadamente 17 a aproximadamente 39 nucleótidos consecutivos en un ARNm diana. En otras realizaciones, (N)<sub>x</sub> incluye un fragmento antisentido que es sustancialmente complementario a de aproximadamente 17 a aproximadamente 39 nucleótidos consecutivos en un ARNm diana.

30 En algunas realizaciones de la estructura A1 y la estructura A2, el compuesto tiene extremos romos, por ejemplo, en el que tanto Z como Z' están ausentes. En una realización alternativa, al menos uno de Z o Z' está presente. Z y Z' incluyen independientemente uno o más nucleótidos modificados y/o no modificados unidos covalentemente, incluyendo desoxirribonucleótidos y ribonucleótidos, o un resto no convencional, por ejemplo, resto de desoxirribosa abásico invertido o resto de ribosa abásico; un resto distinto de nucleótido C3, C4 o C5, un resto amino-6, un nucleótido especular, y similares. En algunas realizaciones, cada uno de Z y Z' incluye independientemente un resto C3 o un resto amino-C6. En algunas realizaciones, Z' está ausente y Z está presente e incluye un resto distinto de nucleótido C3. En algunas realizaciones, Z está ausente y Z' está presente e incluye un resto distinto de nucleótido C3.

35 En algunas realizaciones de la estructura A1 y la estructura A2, cada N consiste en un ribonucleótido no modificado. En algunas realizaciones de la estructura A1 y la estructura A2, cada N' consiste en un nucleótido no modificado. En realizaciones preferidas, al menos uno de N y N' es un ribonucleótido modificado o un resto no convencional.

40 En otras realizaciones, el compuesto de la estructura A1 o la estructura A2 incluye al menos un ribonucleótido modificado en el residuo de azúcar. En algunas realizaciones, el compuesto incluye una modificación en la posición 2' del residuo de azúcar. En algunas realizaciones, la modificación en la posición 2' incluye la presencia de un resto amino, uno fluoro, uno alcoxilo o uno alquilo. En determinadas realizaciones, la modificación en 2' incluye un resto alcoxilo. En realizaciones preferidas, el resto alcoxilo es un resto metoxilo (2'OMe). En algunas realizaciones, el compuesto de ácido nucleico incluye ribonucleótidos alternantes modificados con 2'OMe en una o ambas de las cadenas antisentido y sentido. En otras realizaciones, el compuesto incluye ribonucleótidos modificados con 2'OMe en la cadena antisentido, (N)<sub>x</sub> o N<sup>1</sup>-(N)<sub>x</sub>, únicamente. En determinadas realizaciones, el ribonucleótido central de la cadena antisentido; por ejemplo, el ribonucleótido en la posición 10 en una cadena de 19 meros, no está modificado. En diversas realizaciones, el compuesto de ácido nucleico incluye al menos 5 ribonucleótidos no modificados y modificados con 2'OMe alternantes. En realizaciones adicionales, el compuesto de la estructura A1 o la estructura A2 incluye ribonucleótidos modificados en posiciones alternantes en las que cada ribonucleótido en los extremos 5' y 3'-terminales de (N)<sub>x</sub> o N<sup>1</sup>-(N)<sub>x</sub> están modificados en sus residuos de azúcar, y cada ribonucleótido en los extremos 55 5' y 3'-terminales de (N')<sub>y</sub> o N<sup>2</sup>-(N)<sub>y</sub> no están modificados en sus residuos de azúcar.

En algunas realizaciones, la molécula bicatenaria como componente de una formulación farmacéutica incluye una o más de las siguientes modificaciones

60 • N en al menos una de las posiciones 5, 6, 7, 8 o 9 de la cadena antisentido se selecciona de un 2'-5'-nucleótido o un nucleótido especular;

• N' en al menos una de las posiciones 9 o 10 de la cadena sentido se selecciona de un 2'-5'-nucleótido y una pseudo-uridina; y

65 • N' en 4, 5 o 6 posiciones consecutivas en las posiciones del extremo 3'-terminal de (N')<sub>y</sub> comprende un 2'-5'-

nucleótido.

En algunas realizaciones, la molécula bicatenaria incluye una combinación de las siguientes modificaciones

- 5
- la cadena antisentido incluye un 2'-5'-nucleótido o un nucleótido especular en al menos una de las posiciones 5, 6, 7, 8 o 9; y
  - la cadena sentido incluye al menos uno de un 2'-5'-nucleótido y una pseudo-uridina en las posiciones 9 o 10.

10 En algunas realizaciones, la molécula bicatenaria incluye una combinación de las siguientes modificaciones

- la cadena antisentido incluye un 2'-5'-nucleótido o un nucleótido especular en al menos una de las posiciones 5, 6, 7, 8 o 9; y

15 • la cadena sentido incluye 4, 5 o 6 2'-5'-nucleótidos consecutivos en las posiciones penúltima en 3' o 3'-terminal.

En algunas realizaciones, la cadena sentido ((N)<sub>x</sub> o N<sup>1</sup>-(N)<sub>x</sub>) incluye 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 ribonucleótidos modificados con 2'OMe. En algunas realizaciones, la cadena antisentido incluye ribonucleótidos modificados con 2'OMe en las posiciones 2, 4, 6, 8, 11, 13, 15, 17 y 19. En otras realizaciones, la cadena antisentido incluye ribonucleótidos modificados con 2'OMe en las posiciones 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17 y 19. En otras realizaciones, la cadena antisentido incluye ribonucleótidos modificados con 2'OMe en las posiciones 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17 y 19. En algunas realizaciones, la cadena antisentido incluye una o más pirimidinas modificadas con 2'OMe. En algunas realizaciones, todos los nucleótidos de pirimidina en la cadena antisentido están modificados con 2'OMe. En algunas realizaciones, la cadena sentido incluye pirimidinas modificadas con 2'OMe.

20

25 En algunas realizaciones de la estructura A1 y la estructura A2, ni la cadena sentido ni la cadena antisentido está fosforilada en los extremos 3' y 5'-terminales. En otras realizaciones, una o ambas de la cadena sentido o la cadena antisentido están fosforiladas en los extremos 3'.

30 En algunas realizaciones de la estructura A1 y la estructura A2, (N)<sub>y</sub> incluye al menos un resto no convencional seleccionado de un nucleótido especular, un 2'-5'-nucleótido y un ANT. En algunas realizaciones, el resto no convencional es un nucleótido especular. En diversas realizaciones, el nucleótido especular se selecciona de un L-ribonucleótido (L-ARN) y un L-desoxirribonucleótido (L-ADN). En realizaciones preferidas, el nucleótido especular es L-ADN. En determinadas realizaciones, la cadena sentido comprende un resto no convencional en la posición 9 o 10 (desde el extremo 5'-terminal). En realizaciones preferidas, la cadena sentido incluye un resto no convencional en la posición 9 (desde el extremo 5'-terminal). En algunas realizaciones, la cadena sentido tiene 19 nucleótidos de longitud y comprende 4, 5 o 6 restos no convencionales consecutivos en las posiciones 15 (desde el extremo 5'-terminal). En algunas realizaciones, la cadena sentido incluye 4 2'-5'-ribonucleótidos consecutivos en las posiciones 15, 16, 17 y 18. En algunas realizaciones, la cadena sentido incluye 5 2'-5'-ribonucleótidos consecutivos en las posiciones 15, 16, 17, 18 y 19. En diversas realizaciones, la cadena sentido comprende además Z'. En algunas realizaciones, Z' incluye un resto C3OH o un resto C3Pi.

45 En algunas realizaciones de la estructura A1 (N')<sub>y</sub> incluye al menos un resto de L-ADN. En algunas realizaciones, x=y=19 y (N')<sub>y</sub> consiste en ribonucleótidos no modificados en las posiciones 1-17 y 19 y un L-ADN en la penúltima posición en 3' (posición 18). En otras realizaciones, x=y=19 y (N')<sub>y</sub> consiste en ribonucleótidos no modificados en las posiciones 1-16 y 19 y dos L-ADN consecutivos en la penúltima posición en 3' (posiciones 17 y 18). En diversas realizaciones, el resto no convencional es un nucleótido unido a un nucleótido adyacente mediante una unión fosfato internucleotídica 2'-5'. Según diversas realizaciones, (N')<sub>y</sub> incluye 2, 3, 4, 5 o 6 ribonucleótidos consecutivos en el extremo 3'-terminal unidos mediante enlaces internucleotídicos 2'-5'. En una realización, cuatro nucleótidos consecutivos en el extremo 3'-terminal de (N')<sub>y</sub> están unidos mediante tres enlaces fosfodiéster 2'-5', en los que uno o más de los 2'-5' nucleótidos que forman los enlaces fosfodiéster 2'-5' incluye además una modificación de azúcar con 3'-O-metilo (3'OMe). Preferiblemente, el nucleótido 3'-terminal de (N')<sub>y</sub> incluye una modificación con 2'OMe. En determinadas realizaciones, x=y=19 y (N')<sub>y</sub> incluye dos o más nucleótidos consecutivos en las posiciones 15, 16, 17, 18 y 19 incluyen un nucleótido unido a un nucleótido adyacente mediante un enlace internucleotídico 2'-5' (2'-5' nucleótido). En diversas realizaciones, el nucleótido que forma el enlace internucleotídico 2'-5' incluye un nucleótido de 3'-desoxirribosa o un nucleótido de 3'-metoxilo (3' H o 3'OMe en lugar de 3' OH). En algunas realizaciones, x=y=19 y (N')<sub>y</sub> incluye 2'-5' nucleótidos en las posiciones 15, 16 y 17 de tal manera que nucleótidos adyacentes están unidos mediante un enlace internucleotídico 2'-5' entre las posiciones 15-16, 16-17 y 17-18; o en las posiciones 15, 16, 17, 18 y 19 de tal manera que nucleótidos adyacentes están unidos mediante un enlace internucleotídico 2'-5' entre las posiciones 15-16, 16-17, 17-18 y 18-19 y un 3'OH está disponible en el nucleótido 3'-terminal o en las posiciones 16, 17 y 18 de tal manera que nucleótidos adyacentes están unidos mediante un enlace internucleotídico 2'-5' entre las posiciones 16-17, 17-18 y 18-19. En algunas realizaciones, x=y=19 y (N')<sub>y</sub> incluye 2'-5'-nucleótidos en las posiciones 16 y 17 o en las posiciones 17 y 18 o en las posiciones 15 y 17 de tal manera que nucleótidos adyacentes están unidos mediante un enlace internucleotídico 2'-5' entre las posiciones 16-17 y 17-18 o entre las posiciones 17-18 y 18-19 o entre las posiciones 15-16 y 17-18, respectivamente. En otras realizaciones, los ribonucleótidos de pirimidina (rU, rC) en (N')<sub>y</sub> están sustituidos con nucleótidos unidos al nucleótido adyacente

mediante un enlace internucleotídico 2'-5'. En algunas realizaciones, las cadenas antisentido y sentido se seleccionan de los pares de secuencias expuestas en SERPINH1\_4, SERPINH1\_12, SERPINH1\_18, SERPINH1\_30, SERPINH1\_58 o SERPINH1\_88, y  $x=y=19$  y  $(N')_y$  comprende cinco nucleótidos consecutivos en el extremo 3'-terminal unidos mediante cuatro uniones 2'-5', específicamente las uniones entre los nucleótidos en la posición 15-16, 16-17, 17-18 y 18-19.

En algunas realizaciones, las uniones incluyen enlaces fosfodiéster. En algunas realizaciones, las cadenas antisentido y sentido se seleccionan de los pares de secuencias expuestas en SERPINH1\_4, SERPINH1\_12, SERPINH1\_18, SERPINH1\_30, SERPINH1\_58 o SERPINH1\_88 y  $x=y=19$  y  $(N')_y$  comprende cinco nucleótidos consecutivos en el extremo 3'-terminal unidos mediante cuatro uniones 2'-5' y opcionalmente incluye además  $Z'$  y  $z'$  seleccionados independientemente de un resto abásico invertido y un grupo de ocupación de centros reactivos alquilo C3 [C3; mono(dihidrogenofosfato) de 1,3-propanodiol]. El grupo de ocupación de centros reactivos alquilo C3 está unido covalentemente al nucleótido 3' o 5' terminal. En algunas realizaciones, el grupo de ocupación de centros reactivos C3 3'-terminal comprende además un 3'-fosfato. En algunas realizaciones, el grupo de ocupación de centros reactivos C3 3'-terminal comprende además un grupo hidroxilo 3'-terminal.

En algunas realizaciones, las cadenas antisentido y sentido como componentes de una formulación farmacéutica se seleccionan de los pares de secuencias expuestas en SERPINH1\_4, SERPINH1\_12, SERPINH1\_18, SERPINH1\_30, SERPINH1\_58 o SERPINH1\_88 y  $x=y=19$  y  $(N')_y$  incluye un L-ADN en la posición 18; y  $(N')_y$  opcionalmente incluye además  $Z'$  y  $z'$  seleccionados independientemente de un resto abásico invertido y un grupo de ocupación de centros reactivos alquilo C3 [C3; mono(dihidrogenofosfato) de 1,3-propanodiol].

En algunas realizaciones,  $(N')_y$  incluye un fosfato 3'-terminal. En algunas realizaciones,  $(N')_y$  incluye un hidroxilo 3'-terminal.

En algunas realizaciones, las cadenas antisentido y sentido como componentes de una formulación farmacéutica se seleccionan de los pares de secuencias expuestas en SERPINH1\_4, SERPINH1\_12, SERPINH1\_18, SERPINH1\_30, SERPINH1\_58 o SERPINH1\_88 y  $x=y=19$  y  $(N)_x$  incluye ribonucleótidos modificados con 2'OMe en las posiciones 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 o en las posiciones 2, 4, 6, 8, 11, 13, 15, 17, 19. En algunas realizaciones, las cadenas antisentido y sentido se seleccionan de los pares de secuencias expuestas en SERPINH1\_4, SERPINH1\_12, SERPINH1\_18, SERPINH1\_30, SERPINH1\_58 y SERPINH1\_88 y  $x=y=19$  y  $(N)_x$  incluye pirimidinas modificadas con 2'OMe. En algunas realizaciones, todas las pirimidinas en  $(N)_x$  incluyen la modificación con 2'OMe.

En algunas realizaciones, las cadenas antisentido y sentido se seleccionan de los pares de secuencias expuestas en SERPINH1\_2, SERPINH1\_6; SERPINH1\_11, SERPINH1\_13, SERPINH1\_45, SERPINH1\_45a, SERPINH1\_51, SERPINH1\_51a, SERPINH1\_52 o SERPINH1\_86 y  $x=y=18$  y  $N^2$  es un resto de riboadenosina.

En algunas realizaciones, las cadenas antisentido y sentido se seleccionan de los pares de secuencias expuestas en SERPINH1\_2, SERPINH1\_6, SERPINH1\_11, SERPINH1\_13, SERPINH1\_45, SERPINH1\_45a, SERPINH1\_51, SERPINH1\_51a, SERPINH1\_52 o SERPINH1\_86 y  $x=y=18$ , y  $N^2-(N')_y$  incluye cinco nucleótidos consecutivos en el extremo 3'-terminal unidos mediante cuatro uniones 2'-5', específicamente las uniones entre los nucleótidos en la posición 15-16, 16-17, 17-18 y 18-19. En algunas realizaciones, las uniones incluyen enlaces fosfodiéster.

En algunas realizaciones, las cadenas antisentido y sentido se seleccionan de los pares de secuencias expuestas en SERPINH1\_2, SERPINH1\_6, SERPINH1\_11, SERPINH1\_13, SERPINH1\_45, SERPINH1\_45a, SERPINH1\_51, SERPINH1\_51a, SERPINH1\_52 o SERPINH1\_86 y  $x=y=18$  y  $N^2-(N')_y$  incluye cinco nucleótidos consecutivos en el extremo 3'-terminal unidos mediante cuatro uniones 2'-5' y opcionalmente incluye además  $Z'$  y  $z'$  seleccionados independientemente de un resto abásico invertido y un grupo de ocupación de centros reactivos alquilo C3 [C3; mono(dihidrogenofosfato) de 1,3-propanodiol].

En algunas realizaciones, las cadenas antisentido y sentido se seleccionan de los pares de secuencias expuestas en SERPINH1\_2, SERPINH1\_6, SERPINH1\_11, SERPINH1\_13, SERPINH1\_45, SERPINH1\_45a, SERPINH1\_51, SERPINH1\_51a, SERPINH1\_52 o SERPINH1\_86 y  $x=y=18$  y  $N^2-(N')_y$  incluye un L-ADN en la posición 18; y  $(N')_y$  opcionalmente incluye además  $Z'$  y  $z'$  seleccionados independientemente de un resto abásico invertido y un grupo de ocupación de centros reactivos alquilo C3 [C3; mono(dihidrogenofosfato) de 1,3-propanodiol].

En algunas realizaciones,  $N^2-(N')_y$  comprende un fosfato 3'-terminal. En algunas realizaciones,  $N^2-(N')_y$  comprende un hidroxilo 3'-terminal.

En algunas realizaciones, las cadenas antisentido y sentido como componentes de una formulación farmacéutica se seleccionan de los pares de secuencias expuestas en SERPINH1\_2, SERPINH1\_6, SERPINH1\_11, SERPINH1\_13, SERPINH1\_45, SERPINH1\_45a, SERPINH1\_51, SERPINH1\_51a, SERPINH1\_52 o SERPINH1\_86 y  $x=y=18$  y  $N^1-(N)_x$  incluye ribonucleótidos modificados con 2'OMe en las posiciones 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 o en las posiciones 1, 3, 5, 9, 11, 13, 15, 17, 19, o en las posiciones 3, 5, 9, 11, 13, 15, 17, o en las posiciones 2, 4, 6, 8, 11, 13, 15, 17, 19. En algunas realizaciones, las cadenas antisentido y sentido se seleccionan de los pares de



en la que z' puede estar presente o ausente, pero si está presente es un resto de ocupación de centros reactivos unido covalentemente al extremo 5'-terminal de N<sup>2</sup>-(N')

5 En algunas realizaciones, se proporciona una molécula de ácido nucleico bicatenario en la que la cadena antisentido (SEQ ID NO: 127) incluye una o más pirimidinas y/o purinas modificadas con 2'OMe, un 2'-5'-ribonucleótido en la posición 5, 6, 7 u 8, y una proyección de nucleótido o distinta de nucleótido 3'-terminal. En algunas realizaciones, la cadena sentido (SEQ ID NO: 60) incluye 4 o 5 2'-5'-nucleótidos consecutivos en las posiciones 3'-terminal o penúltima en 3', un nucleótido o resto distinto de nucleótido unido covalentemente al extremo 3'-terminal y un resto de ocupación de centros reactivos unido covalentemente al extremo 5'-terminal. En otras realizaciones, la cadena sentido (SEQ ID NO: 60) incluye una o más 2'OMe-pirimidina, un nucleótido o resto distinto de nucleótido unido covalentemente al extremo 3'-terminal y un resto de ocupación de centros reactivos unido covalentemente al extremo 5'-terminal.

15 En algunas realizaciones, se proporciona una molécula de ácido nucleico bicatenario en la que la cadena antisentido (SEQ ID NO: 127) incluye ribonucleótidos modificados con 2'OMe en las posiciones 1, 3, 5, 9, 11, 15, 17 y 19; un 2'-5'-ribonucleótido en la posición 7; y un resto C3Pi-C3OH unido covalentemente al extremo 3'-terminal; y la cadena sentido (SEQ ID NO: 60) se selecciona de una cadena sentido que incluye

20 • 2'-5'-ribonucleótidos en las posiciones 15, 16, 17, 18 y 19; una proyección distinta de nucleótido de C3OH 3'-terminal; y un resto de desoxirribonucleótido abásico invertido unido covalentemente al extremo 5'-terminal; o

• 2'-5'-ribonucleótidos en las posiciones 15, 16, 17, 18 y 19; un fosfato 3'-terminal; y un resto de desoxirribonucleótido abásico invertido unido covalentemente al extremo 5'-terminal; o

25 • ribonucleótidos modificados con 2'OMe en las posiciones 5, 7, 13 y 16; un 2'-5'-ribonucleótido en la posición 18; un resto C3-OH unido covalentemente al extremo 3'-terminal; y un resto de desoxirribonucleótido abásico invertido unido covalentemente al extremo 5'-terminal; o

30 • ribonucleótidos modificados con 2'OMe en las posiciones 7, 13, 16 y 18; un 2'-5'-ribonucleótido en la posición 9; un resto C3OH unido covalentemente al extremo 3'-terminal; y un resto de desoxirribonucleótido abásico invertido unido covalentemente al extremo 5'-terminal; o

35 • 2'-5'-ribonucleótidos en las posiciones 15, 16, 17, 18 y 19; un resto C3-Pi unido covalentemente al extremo 3'-terminal; y un resto de desoxirribonucleótido abásico invertido unido covalentemente al extremo 5'-terminal.

En el presente documento se proporciona una molécula de ácido nucleico bicatenario en la que la cadena antisentido (SEQ ID NO: 127) incluye ribonucleótidos modificados con 2'OMe en las posiciones 1, 3, 5, 9, 11, 15, 17, 19; un 2'-5'-ribonucleótido en la posición 7; y un resto C3Pi-C3OH unido covalentemente al extremo 3'-terminal; y la cadena sentido (SEQ ID NO: 60) incluye 2'-5'-ribonucleótidos en las posiciones 15, 16, 17, 18 y 19; una proyección de C3 3'-terminal; y un resto de desoxirribonucleótido abásico invertido unido covalentemente al extremo 5'-terminal.

45 En el presente documento se proporciona una molécula de ácido nucleico bicatenario en la que la cadena antisentido (SEQ ID NO: 127) incluye ribonucleótidos modificados con 2'OMe en las posiciones 1, 3, 5, 9, 11, 15, 17, 19; un 2'-5'-ribonucleótido en la posición 7; y una proyección de C3Pi-C3OH 3'-terminal; y la cadena sentido (SEQ ID NO: 60) incluye 2'-5'-ribonucleótidos en las posiciones 15, 16, 17, 18 y 19; un fosfato 3'-terminal; y un resto de desoxirribonucleótido abásico invertido unido covalentemente al extremo 5'-terminal.

50 En el presente documento se proporciona una molécula de ácido nucleico bicatenario en la que la cadena antisentido (SEQ ID NO: 127) incluye ribonucleótidos modificados con 2'OMe en las posiciones 1, 3, 5, 9, 11, 15, 17, 19; un 2'-5'-ribonucleótido en la posición 7 y un resto C3Pi-C3OH unido covalentemente al extremo 3'-terminal; y la cadena sentido (SEQ ID NO: 60) incluye ribonucleótidos modificados con 2'OMe en las posiciones 5, 7, 13 y 16; un 2'-5'-ribonucleótido en la posición 18; un resto C3-OH unido covalentemente al extremo 3'-terminal; y un resto de desoxirribonucleótido abásico invertido unido covalentemente al extremo 5'-terminal.

55 En el presente documento se proporciona una molécula de ácido nucleico bicatenario en la que la cadena antisentido (SEQ ID NO: 127) incluye ribonucleótidos modificados con 2'OMe en las posiciones 1, 3, 5, 9, 11, 15, 17, 19; un 2'-5'-ribonucleótido en la posición 7 y un resto C3Pi-C3OH unido covalentemente al extremo 3'-terminal; y la cadena sentido (SEQ ID NO: 60) incluye ribonucleótidos modificados con 2'OMe en las posiciones 7, 13, 16 y 18; un 2'-5'-ribonucleótido en la posición 9; un resto C3-OH unido covalentemente al extremo 3'-terminal; y un resto de desoxirribonucleótido abásico invertido unido covalentemente al extremo 5'-terminal.

60 En el presente documento se proporciona una molécula de ácido nucleico bicatenario en la que la cadena antisentido (SEQ ID NO: 127) incluye ribonucleótidos modificados con 2'OMe en las posiciones 1, 3, 5, 9, 11, 15, 17, 19; un 2'-5'-ribonucleótido en la posición 7; y un resto C3Pi-C3OH unido covalentemente al extremo 3'-terminal; y la cadena sentido (SEQ ID NO: 60) incluye 2'-5'-ribonucleótidos en las posiciones 15, 16, 17, 18 y 19; un resto C3-Pi

unido covalentemente al extremo 3'-terminal; y un resto de desoxirribonucleótido abásico invertido unido covalentemente al extremo 5'-terminal.

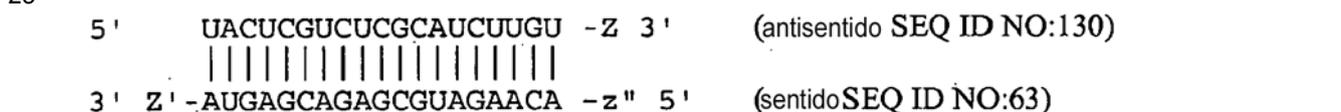
5 En algunas realizaciones en el presente documento se proporciona una molécula de ácido nucleico bicatenario en la que la cadena antisentido (SEQ ID NO: 127) incluye ribonucleótidos modificados con 2'OMe en las posiciones 1, 3, 5, 9, 11, 13, 15, 17, 19; y una proyección de C3-C3 3'-terminal; y la cadena sentido (SEQ ID NO: 60) incluye ribonucleótidos modificados con 2'OMe en las posiciones 7, 9, 13, 16 y 18; y un resto de desoxirribonucleótido abásico invertido unido covalentemente al extremo 5'-terminal.

10 En algunas realizaciones en el presente documento se proporciona una molécula de ácido nucleico bicatenario en la que la cadena sentido (SEQ ID NO: 60) incluye 2'-5'-ribonucleótidos en las posiciones 15, 16, 17, 18 y 19; un fosfato 3'-terminal; y un resto de desoxirribonucleótido abásico invertido unido covalentemente al extremo 5'-terminal; y la cadena antisentido (SEQ ID NO: 127) incluye una cadena antisentido seleccionada de uno de

15 • ribonucleótidos modificados con 2'OMe en las posiciones 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19; y un resto C3Pi-C3OH unido covalentemente al extremo 3'-terminal; o

• ribonucleótidos modificados con 2'OMe en las posiciones 1, 3, 6, 8, 10, 12, 14, 17, 18; y un resto C3Pi-C3OH unido covalentemente al extremo 3'-terminal.

20 En algunas realizaciones en el presente documento se proporciona una molécula de ácido nucleico bicatenario como componente de una formulación farmacéutica que incluye la cadena antisentido expuesta en SEQ ID NO: 130 y la cadena sentido expuesta en SEQ ID NO: 63; identificada en el presente documento como SERPINH1\_6. En algunas realizaciones el dúplex comprende la estructura



en la que cada "||" representa formación de pares de bases entre los ribonucleótidos;

30 en la que cada uno de A, C, G, U es independientemente un ribonucleótido no modificado o modificado, o un resto no convencional;

35 en la que cada uno de Z y Z' está independientemente presente o ausente, pero si está presente es independientemente 1-5 nucleótidos o restos distintos de nucleótidos consecutivos o una combinación de los mismos unidos covalentemente al extremo 3'-terminal de la cadena en la que está presente; y

en la que z'' puede estar presente o ausente, pero si está presente es un resto de ocupación de centros reactivos unido covalentemente al extremo 5'-terminal de N<sup>2</sup>-(N')

40 En algunas realizaciones en el presente documento se proporciona una molécula de ácido nucleico bicatenario en la que la cadena sentido (SEQ ID NO: 63) incluye una o más pirimidinas modificadas con 2'OMe; una proyección de nucleótido o distinta de nucleótido 3'-terminal; y resto de ocupación de centros reactivos unido covalentemente al extremo 5'-terminal. En algunas realizaciones, la cadena antisentido (SEQ ID NO: 130) incluye una o más pirimidinas modificadas con 2'OMe; un nucleótido o resto distinto de nucleótido unido covalentemente al extremo 3'-terminal; y un resto de ocupación de centros reactivos unido covalentemente al extremo 5'-terminal.

45 En algunas realizaciones en el presente documento se proporciona una molécula de ácido nucleico bicatenario en la que la cadena sentido (SEQ ID NO: 63) incluye ribonucleótidos modificados con 2'OMe en las posiciones 2, 14 y 18; un resto C3OH o C3Pi unido covalentemente al extremo 3'-terminal; y un resto de desoxirribonucleótido abásico invertido unido covalentemente al extremo 5'-terminal; y la cadena antisentido (SEQ ID NO: 130) se selecciona de una cadena antisentido que incluye

50 • ribonucleótidos modificados con 2'OMe en las posiciones 1, 3, 5, 9, 11, 13, 15 y 17; un 2'-5'-ribonucleótido en la posición 7; y un resto C3Pi-C3OH unido covalentemente al extremo 3'-terminal; o

55 • ribonucleótidos modificados con 2'OMe en las posiciones 1, 3, 5, 7, 9, 12, 13 y 17; un 2'-5'-ribonucleótido en la posición 7; y un resto C3Pi-C3OH unido covalentemente al extremo 3'-terminal; o

60 • ribonucleótidos modificados con 2'OMe en las posiciones 3, 5, 9, 11, 13, 15 y 17; un 2'-5'-ribonucleótido en la posición 7; y un resto C3Pi-C3OH unido covalentemente al extremo 3'-terminal; o

• ribonucleótidos modificados con 2'OMe en las posiciones 3, 5, 9, 11, 13, 15 y 17; un dU en la posición 1; un 2'-5'-ribonucleótido en la posición 7; y un resto C3Pi-C3OH unido covalentemente al extremo 3'-terminal.

En algunas realizaciones en el presente documento se proporciona una molécula de ácido nucleico bicatenario en la que la cadena sentido (SEQ ID NO: 63) incluye ribonucleótidos modificados con 2'OMe en las posiciones 2, 14 y 18; un resto C3-OH unido covalentemente al extremo 3'-terminal; y un resto de desoxirribonucleótido abásico invertido unido covalentemente al extremo 5'-terminal; y la cadena antisentido (SEQ ID NO: 130) incluye ribonucleótidos modificados con 2'OMe en las posiciones 1, 3, 5, 9, 11, 13, 15 y 17; un 2'-5'-ribonucleótido en la posición 7; y un resto C3Pi-C3OH unido covalentemente al extremo 3'-terminal.

En algunas realizaciones en el presente documento se proporciona una molécula de oligonucleótido en dúplex en la que la cadena sentido (SEQ ID NO: 63) incluye ribonucleótidos modificados con 2'OMe en las posiciones 14 y 18 y opcionalmente en la posición 2; un resto C3-OH unido covalentemente al extremo 3'-terminal; y un resto de desoxirribonucleótido abásico invertido unido covalentemente al extremo 5'-terminal; y la cadena antisentido (SEQ ID NO: 130) incluye ribonucleótidos modificados con 2'OMe en las posiciones 1, 3, 5, 7, 9, 12, 13 y 17; un 2'-5'-ribonucleótido en la posición 7; y un resto C3Pi-C3OH unido covalentemente al extremo 3'-terminal.

En algunas realizaciones en el presente documento se proporciona una molécula de oligonucleótido en dúplex en la que la cadena sentido (SEQ ID NO: 63) incluye ribonucleótidos modificados con 2'OMe en las posiciones 14 y 18; un resto C3-OH unido covalentemente al extremo 3'-terminal; y un resto de desoxirribonucleótido abásico invertido unido covalentemente al extremo 5'-terminal; y la cadena antisentido (SEQ ID NO: 130) se selecciona de una cadena antisentido que incluye

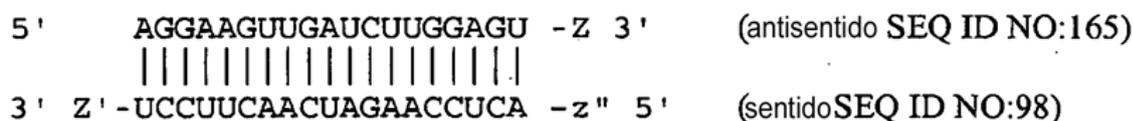
- ribonucleótidos modificados con 2'OMe en las posiciones 1, 3, 5, 9, 11, 13, 15 y 17; un 2'-5'-ribonucleótido en la posición 7; y un resto C3Pi-C3Pi o C3Pi-C3OH unido covalentemente al extremo 3'-terminal; o

- ribonucleótidos modificados con 2'OMe en las posiciones 1, 3, 5, 7, 9, 12, 13 y 17; un 2'-5'-ribonucleótido en la posición 7; y un resto C3Pi-C3Pi o C3Pi-C3OH unido covalentemente al extremo 3'-terminal.

En el presente documento se proporciona una molécula de ácido nucleico bicatenario en la que la cadena sentido (SEQ ID NO: 63) incluye ribonucleótidos modificados con 2'OMe en las posiciones 14 y 18; un resto C3-OH unido covalentemente al extremo 3'-terminal; y un resto de desoxirribonucleótido abásico invertido unido covalentemente al extremo 5'-terminal; y la cadena antisentido (SEQ ID NO: 130) incluye ribonucleótidos modificados con 2'OMe en las posiciones 1, 3, 5, 9, 11, 13, 15 y 17; un 2'-5'-ribonucleótido en la posición 7; y un resto C3Pi-C3OH unido covalentemente al extremo 3'-terminal.

En el presente documento se proporciona una molécula de ácido nucleico bicatenario en la que la cadena sentido (SEQ ID NO: 63) incluye ribonucleótidos modificados con 2'OMe en las posiciones 14 y 18; un resto C3-OH unido covalentemente al extremo 3'-terminal; y un resto de desoxirribonucleótido abásico invertido unido covalentemente al extremo 5'-terminal; y la cadena antisentido (SEQ ID NO: 130) incluye ribonucleótidos modificados con 2'OMe en las posiciones 1, 3, 5, 7, 9, 12, 13 y 17; un 2'-5'-ribonucleótido en la posición 7; y una proyección de C3Pi-C3OH 3'-terminal.

En algunas realizaciones, el dúplex como componente de una formulación farmacéutica incluye la cadena antisentido expuesta en SEQ ID NO: 165 y la cadena sentido expuesta en SEQ ID NO: 98; identificado en el presente documento como SERPINH1\_45a. En algunas realizaciones, el dúplex comprende la estructura



en la que cada "||" representa formación de pares de bases entre los ribonucleótidos;

en la que cada uno de A, C, G, U es independientemente un ribonucleótido no modificado o modificado, o un resto no convencional;

en la que cada uno de Z y Z' está independientemente presente o ausente, pero si está presente es independientemente 1-5 nucleótidos o restos distintos de nucleótidos consecutivos o una combinación de los mismos unidos covalentemente al extremo 3'-terminal de la cadena en la que está presente; y

en la que z" puede estar presente o ausente, pero si está presente es un resto de ocupación de centros reactivos unido covalentemente al extremo 5'-terminal de N<sup>2</sup>-(N').

En algunas realizaciones, la cadena sentido (SEQ ID NO: 98) incluye 2'-5'-ribonucleótidos en las posiciones 15, 16, 17 y 18 o 15, 16, 17, 18 y 19; un nucleótido o resto distinto de nucleótido unido covalentemente al extremo 3'-terminal; y un resto de ocupación de centros reactivos unido covalentemente al extremo 5'-terminal. En algunas realizaciones, la cadena antisentido (SEQ ID NO: 165) incluye pirimidina y/o purinas modificadas con 2'OMe; un 2'-5'

nucleótido en la posición 5, 6, 7 u 8; y un nucleótido o resto distinto de nucleótido unido covalentemente al extremo 3'-terminal.

5 En algunas realizaciones, la cadena sentido (SEQ ID NO: 98) incluye 2'-5'-ribonucleótidos en las posiciones 15, 16, 17, 18 y 19; un resto distinto de nucleótido C3Pi o C3-OH 3'-terminal; y un resto de desoxirribonucleótido abásico invertido unido covalentemente al extremo 5'-terminal; y la cadena antisentido (SEQ ID NO: 165) incluye una cadena antisentido seleccionada de uno de

10 • ribonucleótidos modificados con 2'OMe en las posiciones 2, 4, 6, 8, 11, 13, 15, 17 y 19; un 2'-5'-ribonucleótido en la posición 7; y una proyección de C3Pi-C3Pi o C3Pi-C3OH 3'-terminal; o

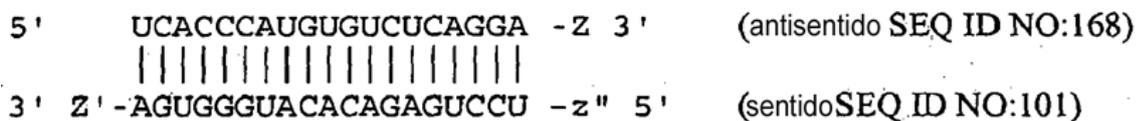
• ribonucleótidos modificados con 2'OMe en las posiciones 2, 4, 6, 8, 11, 13, 15, 17 y 19; y una proyección de C3Pi-C3Pi o C3Pi-C3OH 3'-terminal;

15 • ribonucleótidos modificados con 2'OMe en las posiciones 1, 3, 5, 9, 11, 13, 15, 17 y 19; un 2'-5'-ribonucleótido en la posición 7; y una proyección de C3Pi-C3Pi o C3Pi-C3OH 3'-terminal; o

• ribonucleótidos modificados con 2'OMe en las posiciones 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17 y 19; y una proyección de C3Pi-C3Pi o C3Pi-C3OH 3'-terminal.

20 En el presente documento se proporciona una molécula de ácido nucleico bicatenario en la que la cadena sentido (SEQ ID NO: 98) incluye 2'-5'-ribonucleótidos en las posiciones 15, 16, 17, 18 y 19; un resto C3-OH 3'-terminal; y un resto de desoxirribonucleótido abásico invertido unido covalentemente al extremo 5'-terminal; y la cadena antisentido (SEQ ID NO: 165) incluye ribonucleótidos modificados con 2'OMe en las posiciones 2, 4, 6, 8, 11, 13, 15, 17 y 19; un 2'-5'-ribonucleótido en la posición 7; y una proyección de C3Pi-COH 3'-terminal.

25 En algunas realizaciones, la molécula de ácido nucleico bicatenario como componente de una formulación farmacéutica incluye la cadena antisentido expuesta en SEQ ID NO: 168 y la cadena sentido expuesta en SEQ ID NO: 101; identificada en el presente documento como SERPINH1\_51. En algunas realizaciones, el dúplex comprende la estructura



35 en la que cada "||" representa formación de pares de bases entre los ribonucleótidos;

en la que cada uno de A, C, G, U es independientemente un ribonucleótido no modificado o modificado, o un resto no convencional;

40 en la que cada uno de Z y Z' está independientemente presente o ausente, pero si está presente es independientemente 1-5 nucleótidos o restos distintos de nucleótidos consecutivos o una combinación de los mismos unidos covalentemente al extremo 3'-terminal de la cadena en la que está presente; y

45 en la que z" puede estar presente o ausente, pero si está presente es un resto de ocupación de centros reactivos unido covalentemente al extremo 5'-terminal de N<sup>2</sup>-(N').

50 En algunas realizaciones en el presente documento se proporciona una molécula de ácido nucleico bicatenario en la que la cadena sentido (SEQ ID NO: 101) incluye pirimidinas modificadas con 2'OMe, opcionalmente un 2'-5'-ribonucleótido en la posición 9 o 10; un nucleótido o resto distinto de nucleótido unido covalentemente al extremo 3'-terminal; y opcionalmente un resto de ocupación de centros reactivos unido covalentemente al extremo 5'-terminal.

En algunas realizaciones, la cadena antisentido (SEQ ID NO: 168) incluye pirimidinas y/o purinas modificadas con 2'OMe; un 2'-5' nucleótido en la posición 5, 6, 7 u 8; y un nucleótido o resto distinto de nucleótido unido covalentemente al extremo 3'-terminal.

55 En algunas realizaciones en el presente documento se proporciona una molécula de ácido nucleico bicatenario en la que la cadena sentido (SEQ ID NO: 101) incluye pirimidinas modificadas con 2'OMe en las posiciones 4, 11, 13 y 17; opcionalmente un 2'-5'-ribonucleótido en la posición 9 o 10; un resto distinto de nucleótido C3Pi o C3OH unido covalentemente al extremo 3'-terminal; y un resto de desoxirribonucleótido abásico invertido unido covalentemente al extremo 5'-terminal; y la cadena antisentido (SEQ ID NO: 168) se selecciona de una cadena antisentido que incluye

60 a) ribonucleótidos modificados con 2'OMe en las posiciones 1, 8 y 15; un 2'-5'-ribonucleótido en la posición 6 o 7; y una proyección de C3Pi-C3OH unida covalentemente al extremo 3'-terminal; o

b) ribonucleótidos modificados con 2'OMe en las posiciones 1, 4, 8, 13 y 15; un 2'-5'-ribonucleótido en la posición 6 o 7; y una proyección de C3Pi-C3OH unida covalentemente al extremo 3'-terminal; o

5 c) ribonucleótidos modificados con 2'OMe en las posiciones 1, 4, 8, 11 y 15; un 2'-5'-ribonucleótido en la posición 6; y una proyección de C3Pi-C3OH unida covalentemente al extremo 3'-terminal; o

d) ribonucleótidos modificados con 2'OMe en las posiciones 1, 3, 8, 12, 13 y 15; un 2'-5'-ribonucleótido en la posición 6; y un resto C3Pi-C3OH unido covalentemente al extremo 3'-terminal.

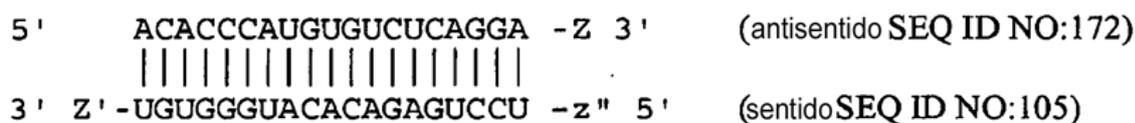
10 En el presente documento se proporciona una molécula de ácido nucleico bicatenario en la que la cadena sentido (SEQ ID NO: 101) incluye ribonucleótidos modificados con 2'OMe en las posiciones 4, 11, 13 y 17; opcionalmente un 2'-5'-ribonucleótido en la posición 9; un resto distinto de nucleótido C3-OH unido covalentemente al extremo 3'-terminal; y un resto de desoxirribonucleótido abásico invertido unido covalentemente al extremo 5'-terminal; y la cadena antisentido (SEQ ID NO: 168) incluye ribonucleótidos modificados con 2'OMe en las posiciones 1, 8 y 15; un 2'-5'-ribonucleótido en la posición 6; y un resto C3Pi-C3OH unido covalentemente al extremo 3'-terminal.

20 En el presente documento se proporciona una molécula de ácido nucleico bicatenario en la que la cadena sentido (SEQ ID NO: 101) incluye ribonucleótidos modificados con 2'OMe en las posiciones 4, 11, 13 y 17; opcionalmente un 2'-5'-ribonucleótido en la posición 9; un resto distinto de nucleótido C3-OH unido covalentemente al extremo 3'-terminal; y un resto de desoxirribonucleótido abásico invertido unido covalentemente al extremo 5'-terminal; y la cadena antisentido (SEQ ID NO: 168) incluye ribonucleótidos modificados con 2'OMe en las posiciones 1, 4, 8, 13 y 15; un 2'-5'-ribonucleótido en la posición 6; y un resto C3Pi-C3OH unido covalentemente al extremo 3'-terminal.

25 En el presente documento se proporciona una molécula de ácido nucleico bicatenario en la que la cadena sentido (SEQ ID NO: 101) incluye ribonucleótidos modificados con 2'OMe en las posiciones 4, 11, 13 y 17; un 2'-5'-ribonucleótido en la posición 9; un resto distinto de nucleótido C3OH unido covalentemente al extremo 3'-terminal; y un resto de desoxirribonucleótido abásico invertido unido covalentemente al extremo 5'-terminal; y la cadena antisentido (SEQ ID NO: 168) incluye ribonucleótidos modificados con 2'OMe en las posiciones 1, 4, 8, 11 y 15; un 2'-5'-ribonucleótido en la posición 6; y un resto C3Pi-C3OH unido covalentemente al extremo 3'-terminal.

30 En el presente documento se proporciona una molécula de ácido nucleico bicatenario en la que la cadena sentido (SEQ ID NO: 101) incluye ribonucleótidos modificados con 2'OMe en las posiciones 4, 11, 13; y 17; un 2'-5'-ribonucleótido en la posición 9; un resto distinto de nucleótido C3OH unido covalentemente al extremo 3'-terminal; y un resto de desoxirribonucleótido abásico invertido unido covalentemente al extremo 5'-terminal; y la cadena antisentido (SEQ ID NO: 168) incluye ribonucleótidos modificados con 2'OMe en las posiciones 1, 3, 8, 12, 13 y 15; un 2'-5'-ribonucleótido en la posición 6; y un resto C3Pi-C3OH unido covalentemente al extremo 3'-terminal.

40 En algunas realizaciones, la molécula de ácido nucleico bicatenario es un componente de una formulación farmacéutica que incluye la cadena antisentido expuesta en SEQ ID NO: 168 y la cadena sentido expuesta en SEQ ID NO: 101; identificada en el presente documento como SERPINH1\_51a. En algunas realizaciones, el dúplex comprende la estructura



45 en la que cada "||" representa formación de pares de bases entre los ribonucleótidos;

en la que cada uno de A, C, G, U es independientemente un ribonucleótido no modificado o modificado, o un resto no convencional;

50 en la que cada uno de Z y Z' está independientemente presente o ausente, pero si está presente es independientemente 1-5 nucleótidos o restos distintos de nucleótidos consecutivos o una combinación de los mismos unidos covalentemente al extremo 3'-terminal de la cadena en la que está presente; y

55 en la que z" puede estar presente o ausente, pero si está presente es un resto de ocupación de centros reactivos unido covalentemente al extremo 5'-terminal de N<sup>2</sup>-(N').

60 En algunas realizaciones en el presente documento se proporciona una molécula de ácido nucleico bicatenario en la que la cadena sentido (SEQ ID NO: 105) incluye pirimidinas modificadas con 2'OMe; opcionalmente un 2'-5'-ribonucleótido en la posición 9 o 10; un nucleótido o resto distinto de nucleótido unido covalentemente al extremo 3'-terminal; y opcionalmente un resto de ocupación de centros reactivos unido covalentemente al extremo 5'-terminal. En algunas realizaciones, la cadena antisentido (SEQ ID NO: 172) incluye pirimidina y/o purinas modificadas con 2'OMe; un 2'-5' nucleótido en la posición 5, 6, 7 u 8; y un nucleótido o resto distinto de nucleótido unido covalentemente al extremo 3'-terminal.



en la que cada uno de Z y Z' está independientemente presente o ausente, pero si está presente es independientemente 1-5 nucleótidos o restos distintos de nucleótidos consecutivos o una combinación de los mismos unidos covalentemente al extremo 3'-terminal de la cadena en la que está presente; y

- 5 en la que z" puede estar presente o ausente, pero si está presente es un resto de ocupación de centros reactivos unido covalentemente al extremo 5'-terminal de N<sup>2</sup>-(N')

En algunas realizaciones se proporciona una molécula de ácido nucleico bicatenario en la que la cadena antisentido (SEQ ID NO: 220) incluye ribonucleótidos modificados con 2'OMe en las posiciones 3, 5, 9, 11, 15, 17 y 19, un 2'-5'-ribonucleótido en la posición 7, y un resto C3Pi-C3OH unido covalentemente al extremo 3'-terminal; y la cadena sentido (SEQ ID NO: 195) se selecciona de una cadena sentido que incluye

- 10 a) 2'-5'-ribonucleótidos en las posiciones 15, 16, 17, 18 y 19, un resto C3OH unido covalentemente al extremo 3'-terminal; y un resto de desoxirribonucleótido abásico invertido unido covalentemente al extremo 5'-terminal; o
- 15 b) 2'-5'-ribonucleótidos en las posiciones 15, 16, 17, 18 y 19, un fosfato 3'-terminal; y un resto de desoxirribonucleótido abásico invertido unido covalentemente al extremo 5'-terminal; o
- 20 c) ribonucleótidos modificados con 2'OMe en las posiciones 5, 7, 13 y 16; un 2'-5'-ribonucleótido en la posición 18; un resto C3OH unido covalentemente al extremo 3'-terminal; y un resto de desoxirribonucleótido abásico invertido unido covalentemente al extremo 5'-terminal; o
- 25 d) ribonucleótidos modificados con 2'OMe en las posiciones 7, 13, 16 y 18; un 2'-5'-ribonucleótido en la posición 9; un resto C3OH unido covalentemente al extremo 3'-terminal; y un resto de desoxirribonucleótido abásico invertido unido covalentemente al extremo 5'-terminal; o
- e) 2'-5'-ribonucleótidos en las posiciones 15, 16, 17, 18 y 19; un resto C3Pi unido covalentemente al extremo 3'-terminal; y un resto de desoxirribonucleótido abásico invertido unido covalentemente al extremo 5'-terminal.

30 En el presente documento se proporciona una molécula de ácido nucleico bicatenario en la que la cadena antisentido (SEQ ID NO: 220) incluye ribonucleótidos modificados con 2'OMe en las posiciones 3, 5, 9, 11, 15, 17, 19; un 2'-5'-ribonucleótido en la posición 7; y un resto C3Pi-C3OH unido covalentemente al extremo 3'-terminal; y la cadena sentido (SEQ ID NO: 195) incluye 2'-5'-ribonucleótidos en las posiciones 15, 16, 17, 18 y 19; un resto C3 unido covalentemente al extremo 3'-terminal; y un resto de desoxirribonucleótido abásico invertido unido covalentemente al extremo 5'-terminal.

40 En el presente documento se proporciona una molécula de ácido nucleico bicatenario en la que la cadena antisentido (SEQ ID NO: 220) incluye ribonucleótidos modificados con 2'OMe en las posiciones 3, 5, 9, 11, 15, 17, 19; un 2'-5'-ribonucleótido en la posición 7; y un resto C3Pi-C3OH unido covalentemente al extremo 3'-terminal; y la cadena sentido (SEQ ID NO: 195) incluye 2'-5'-ribonucleótidos en las posiciones 15, 16, 17, 18 y 19; un fosfato 3'-terminal; y un resto de desoxirribonucleótido abásico invertido unido covalentemente al extremo 5'-terminal.

45 En el presente documento se proporciona una molécula de ácido nucleico bicatenario en la que la cadena antisentido (SEQ ID NO: 220) incluye ribonucleótidos modificados con 2'OMe en las posiciones 3, 5, 9, 11, 15, 17, 19; un 2'-5'-ribonucleótido en la posición 7; y un resto C3Pi-C3OH unido covalentemente al extremo 3'-terminal; y la cadena sentido (SEQ ID NO: 195) incluye ribonucleótidos modificados con 2'OMe en las posiciones 5, 7, 13 y 16; un 2'-5'-ribonucleótido en la posición 18; un resto C3OH unido covalentemente al extremo 3'-terminal; y un resto de desoxirribonucleótido abásico invertido unido covalentemente al extremo 5'-terminal.

50 En el presente documento se proporciona una molécula de ácido nucleico bicatenario en la que la cadena antisentido (SEQ ID NO: 220) incluye ribonucleótidos modificados con 2'OMe en las posiciones 3, 5, 9, 11, 15, 17, 19; un 2'-5'-ribonucleótido en la posición 7; y un resto C3Pi-C3OH unido covalentemente al extremo 3'-terminal; y la cadena sentido (SEQ ID NO: 195) incluye ribonucleótidos modificados con 2'OMe en las posiciones 7, 13, 16 y 18; un 2'-5'-ribonucleótido en la posición 9; un resto C3OH unido covalentemente al extremo 3'-terminal; y un resto de desoxirribonucleótido abásico invertido unido covalentemente al extremo 5'-terminal.

60 En el presente documento se proporciona una molécula de ácido nucleico bicatenario en la que la cadena antisentido (SEQ ID NO: 220) incluye ribonucleótidos modificados con 2'OMe en las posiciones 3, 5, 9, 11, 15, 17, 19; un 2'-5'-ribonucleótido en la posición 7; y un resto C3Pi-C3OH unido covalentemente al extremo 3'-terminal; y la cadena sentido (SEQ ID NO: 195) incluye 2'-5'-ribonucleótidos en las posiciones 15, 16, 17, 18 y 19; un resto C3Pi unido covalentemente al extremo 3'-terminal; y un resto de desoxirribonucleótido abásico invertido unido covalentemente al extremo 5'-terminal.

65 En algunas realizaciones en el presente documento se proporciona una molécula de ácido nucleico bicatenario en la que la cadena antisentido (SEQ ID NO: 220) incluye ribonucleótidos modificados con 2'OMe en las posiciones 1, 3, 5, 9, 11, 13, 15, 17, 19; y un resto C3Pi-C3OH unido covalentemente al extremo 3'-terminal; y la cadena sentido

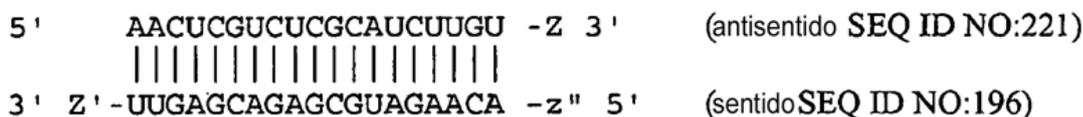
(SEQ ID NO: 195) incluye ribonucleótidos modificados con 2'OMe en las posiciones 7, 9, 13, 16 y 18; y un resto de desoxirribonucleótido abásico invertido unido covalentemente al extremo 5'-terminal.

5 En algunas realizaciones en el presente documento se proporciona una molécula de ácido nucleico bicatenario en la que la cadena sentido (SEQ ID NO: 195) incluye 2'-5'-ribonucleótidos en las posiciones 15, 16, 17, 18 y 19; un fosfato 3'-terminal y un resto de desoxirribonucleótido abásico invertido unido covalentemente al extremo 5'-terminal; y la cadena antisentido (SEQ ID NO: 220) incluye una cadena antisentido seleccionada de uno de

10 a) ribonucleótidos modificados con 2'OMe en las posiciones 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19; y un resto C3Pi-C3OH unido covalentemente al extremo 3'-terminal; o

b) ribonucleótidos modificados con 2'OMe en las posiciones 1, 3, 6, 8, 10, 12, 14, 17, 18; y un resto C3Pi-C3OH unido covalentemente al extremo 3'-terminal.

15 En algunas realizaciones en el presente documento se proporciona una molécula de ácido nucleico bicatenario como componente de una formulación farmacéutica que incluye la cadena antisentido expuesta en SEQ ID NO: 130 y la cadena sentido expuesta en SEQ ID NO: 63; identificada en el presente documento como SERPINH1\_12. En algunas realizaciones, el dúplex comprende la estructura



20 en la que cada "||" representa formación de pares de bases entre los ribonucleótidos;

25 en la que cada uno de A, C, G, U es independientemente un ribonucleótido no modificado o modificado, o un resto no convencional;

30 en la que cada uno de Z y Z' está independientemente presente o ausente, pero si está presente es independientemente 1-5 nucleótidos o restos distintos de nucleótidos consecutivos o una combinación de los mismos unidos covalentemente al extremo 3'-terminal de la cadena en la que está presente; y

en la que z'' puede estar presente o ausente, pero si está presente es un resto de ocupación de centros reactivos unido covalentemente al extremo 5'-terminal de N<sup>2</sup>-(N').

35 En algunas realizaciones se proporciona una molécula de ácido nucleico bicatenario en la que la cadena sentido (SEQ ID NO: 196) incluye una o más pirimidinas modificadas con 2'OMe; una proyección de nucleótido o distinta de nucleótido 3'-terminal; y un resto de ocupación de centros reactivos unido covalentemente al extremo 5'-terminal. En algunas realizaciones, la cadena antisentido (SEQ ID NO: 221) incluye una o más pirimidinas modificadas con 2'OMe; un nucleótido o resto distinto de nucleótido unido covalentemente al extremo 3'-terminal; y un resto de ocupación de centros reactivos unido covalentemente al extremo 5'-terminal.

40 En algunas realizaciones, se proporciona una molécula de ácido nucleico bicatenario en la que la cadena sentido (SEQ ID NO: 196) incluye ribonucleótidos modificados con 2'OMe en las posiciones 2, 14 y 18; un resto C3OH unido covalentemente al extremo 3'-terminal; y un resto de desoxirribonucleótido abásico invertido unido covalentemente al extremo 5'-terminal; y la cadena antisentido (SEQ ID NO: 221) se selecciona de una cadena antisentido que incluye

45 a) ribonucleótidos modificados con 2'OMe en las posiciones 3, 5, 9, 11, 13, 15 y 17; un 2'-5'-ribonucleótido en la posición 7; y un resto C3Pi-C3OH unido covalentemente al extremo 3'-terminal; o

50 b) ribonucleótidos modificados con 2'OMe en las posiciones 3, 5, 7, 9, 12, 13 y 17; un 2'-5'-ribonucleótido en la posición 7; y un resto C3Pi-C3OH unido covalentemente al extremo 3'-terminal.

55 En algunas realizaciones se proporciona una molécula de ácido nucleico bicatenario en la que la cadena sentido (SEQ ID NO: 196) incluye ribonucleótidos modificados con 2'OMe en las posiciones 2, 14 y 18; un resto C3-OH unido covalentemente al extremo 3'-terminal; y un resto de desoxirribonucleótido abásico invertido unido covalentemente al extremo 5'-terminal; y la cadena antisentido (SEQ ID NO: 221) incluye ribonucleótidos modificados con 2'OMe en las posiciones 3, 5, 9, 11, 13, 15 y 17; un 2'-5'-ribonucleótido en la posición 7; y un resto C3Pi-C3OH unido covalentemente al extremo 3'-terminal.

60 En algunas realizaciones se proporciona una molécula de oligonucleótido en dúplex en la que la cadena sentido (SEQ ID NO: 196) incluye ribonucleótidos modificados con 2'OMe en las posiciones 14 y 18 y opcionalmente en la posición 2; un resto C3-OH unido covalentemente al extremo 3'-terminal; y un resto de desoxirribonucleótido abásico invertido unido covalentemente al extremo 5'-terminal; y la cadena antisentido (SEQ ID NO: 221) incluye

ribonucleótidos modificados con 2'OMe en las posiciones 3, 5, 7, 9, 12, 13 y 17; un 2'-5'-ribonucleótido en la posición 7; y un resto C3Pi-C3OH unido covalentemente al extremo 3'-terminal.

5 En algunas realizaciones se proporciona una molécula de oligonucleótido en dúplex en la que la cadena sentido (SEQ ID NO: 196) incluye ribonucleótidos modificados con 2'OMe en las posiciones 14 y 18; un resto C3-OH unido covalentemente al extremo 3'-terminal; y un resto de desoxirribonucleótido abásico invertido unido covalentemente al extremo 5'-terminal; y la cadena antisentido (SEQ ID NO: 221) se selecciona de una cadena antisentido que incluye

10 a) ribonucleótidos modificados con 2'OMe en las posiciones 3, 5, 9, 11, 13, 15 y 17; un 2'-5'-ribonucleótido en la posición 7; y un resto C3Pi-C3OH unido covalentemente al extremo 3'-terminal; o

b) ribonucleótidos modificados con 2'OMe en las posiciones 3, 5, 7, 9, 12, 13 y 17; un 2'-5'-ribonucleótido en la posición 7; y un resto C3Pi-C3OH unido covalentemente al extremo 3'-terminal.

15 En el presente documento se proporciona una molécula de ácido nucleico bicatenario en la que la cadena sentido (SEQ ID NO: 196) incluye ribonucleótidos modificados con 2'OMe en las posiciones 14 y 18; un resto C3-OH unido covalentemente al extremo 3'-terminal; y un resto de desoxirribonucleótido abásico invertido unido covalentemente al extremo 5'-terminal; y la cadena antisentido (SEQ ID NO: 220) incluye ribonucleótidos modificados con 2'OMe en las posiciones 1, 3, 5, 9, 11, 13, 15 y 17; un 2'-5'-ribonucleótido en la posición 7; y un resto C3Pi-C3OH unido covalentemente al extremo 3'-terminal.

20 En el presente documento se proporciona una molécula de ácido nucleico bicatenario en la que la cadena sentido (SEQ ID NO: 196) incluye ribonucleótidos modificados con 2'OMe en las posiciones 14 y 18; un resto C3-OH unido covalentemente al extremo 3'-terminal; y un resto de desoxirribonucleótido abásico invertido unido covalentemente al extremo 5'-terminal; y la cadena antisentido (SEQ ID NO: 220) incluye ribonucleótidos modificados con 2'OMe en las posiciones 1, 3, 5, 7, 9, 12, 13 y 17; un 2'-5'-ribonucleótido en la posición 7; y un resto C3Pi-C3OH unido covalentemente al extremo 3'-terminal.

25 En realizaciones adicionales de las estructuras A1 y A2, (N')<sub>y</sub> incluye 1-8 ribonucleótidos modificados en las que el ribonucleótido modificado es un nucleótido de ADN. En determinadas realizaciones (N')<sub>y</sub> incluye 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o hasta 8 restos de ADN.

30 En algunas realizaciones, o bien Z o bien Z' está presente e incluye independientemente dos restos distintos de nucleótidos.

35 En realizaciones adicionales, Z y Z' están presentes y cada uno incluye independientemente dos restos distintos de nucleótidos.

40 En algunas realizaciones, cada uno de Z y Z' incluye un resto abásico, por ejemplo, un resto desoxirribo-abásico (denominado en el presente documento "dAb") o resto ribo-abásico (denominado en el presente documento "rAb"). En algunas realizaciones, cada uno de Z y/o Z' incluye dos restos abásicos unidos covalentemente y es, por ejemplo, dAb-dAb o rAb-rAb o dAb-rAb o rAb-dAb, en los que cada resto está unido covalentemente a un resto adyacente, preferiblemente a través de un enlace basado en fosfo. En algunas realizaciones, el enlace basado en fosfo incluye un enlace fosforotioato, uno fosfonoacetato o uno fosfodiéster. En realizaciones preferidas, el enlace basado en fosfo incluye un enlace fosfodiéster.

45 En algunas realizaciones, cada uno de Z y/o Z' incluye independientemente un resto alquilo, opcionalmente resto propano ((CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>) ("C3") o un derivado del mismo incluyendo propanodiol (C3OH) y derivado de fosfo de propanodiol ("C3Pi"). En algunas realizaciones, cada uno de Z y/o Z' incluye dos restos alquilo unidos covalentemente al extremo 3'-terminal de la cadena antisentido o cadena sentido a través de una unión fosfodiéster o fosforotioato y unidos covalentemente entre sí a través de una unión fosfodiéster o fosforotioato y en algunos ejemplos es C3Pi-C3Pi o C3Pi-C3OH. El extremo 3'-terminal de la cadena antisentido y/o el extremo 3'-terminal de la cadena sentido está unido covalentemente a un resto C3 a través de un enlace basado en fosfo y el resto C3 está conjugado covalentemente a un resto C3OH a través de un enlace basado en fosfo. En algunas realizaciones, los enlaces basados en fosfo incluyen un enlace fosforotioato, uno fosfonoacetato o uno fosfodiéster. En realizaciones preferidas el enlace basado en fosfo incluye un enlace fosfodiéster.

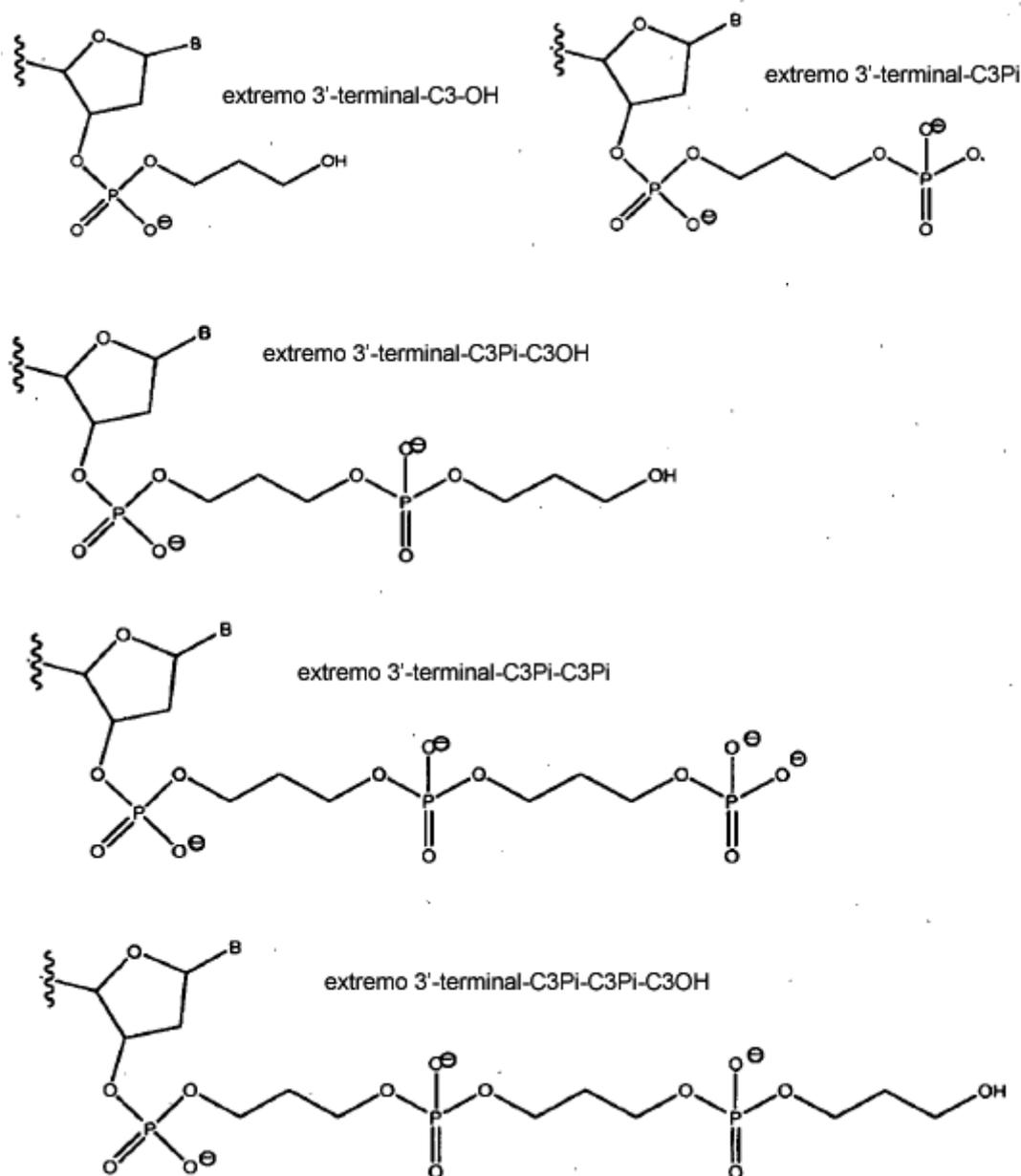
50 En diversas realizaciones de la estructura A1 o la estructura A2, Z y Z' están ausentes. En otras realizaciones, Z o Z' está presente. En algunas realizaciones, cada uno de Z y/o Z' incluye independientemente un resto alquilo C2, C3, C4, C5 o C6, opcionalmente un resto C3 o un derivado del mismo incluyendo propanol (C3OH/C3OH), propanodiol, y derivado de fosfodiéster de propanodiol (C3Pi). En realizaciones preferidas, cada uno de Z y/o Z' incluye dos restos hidrocarbonados y en algunos ejemplos es C3Pi-C3OH o C3Pi-C3Pi. Cada C3 está conjugado covalentemente a un C3 adyacente a través de un enlace covalente, preferiblemente un enlace basado en fosfo. En algunas realizaciones, el enlace basado en fosfo es un enlace fosforotioato, uno fosfonoacetato o uno fosfodiéster.

65 En realizaciones específicas, x=y=19 y Z comprende al menos una proyección de alquilo C3. En algunas

realizaciones, la proyección de C3-C3 está unida covalentemente al extremo 3'-terminal de (N)<sub>x</sub> o (N')<sub>y</sub> a través de una unión covalente, preferiblemente una unión fosfodiéster. En algunas realizaciones, la unión entre un primer C3 y un segundo C3 es una unión fosfodiéster. En algunas realizaciones, la proyección distinta de nucleótido en 3' es C3Pi-C3Pi. En algunas realizaciones, la proyección distinta de nucleótido en 3' es C3Pi-C3OH.

En diversas realizaciones, el resto alquilo comprende un derivado de alquilo incluyendo un resto alquilo C3, alquilo C4, alquilo C5 o alquilo C6 que comprende un grupo hidroxilo terminal, uno amino terminal o uno fosfato terminal. En algunas realizaciones, el resto alquilo es un resto alquilo C3 o derivado de alquilo C3. En algunas realizaciones, el resto alquilo C3 comprende propanol, fosfato de propilo, fosforotioato de propilo o una combinación de los mismos. El resto alquilo C3 está unido covalentemente al extremo 3'-terminal de (N')<sub>y</sub> y/o al extremo 3'-terminal de (N)<sub>x</sub> a través de un enlace fosfodiéster. En algunas realizaciones, el resto alquilo comprende propanol, fosfato de propilo o fosforotioato de propilo. En algunas realizaciones, cada uno de Z y Z' se selecciona independientemente de propanol, fosfato de propilo, fosforotioato de propilo, combinaciones de los mismos o múltiplos de los mismos en particular 2 o 3 propanoles, fosfatos de propilo, fosforotioatos de propilo o combinaciones de los mismos unidos covalentemente. En algunas realizaciones, cada uno de Z y Z' se selecciona independientemente de fosfato de propilo, fosforotioato de propilo, propilfosfopropanol; fosforotioato de propilfosfo-propilo; fosfato de propilfosfo-propilo; (fosfato de propilo)<sub>3</sub>, (fosfato de propilo)<sub>2</sub>-propanol, (fosfato de propilo)<sub>2</sub>-fosforotioato de propilo. Cualquier resto conjugado de propano o propanol puede incluirse en Z o Z'.

Las estructuras de restos distintos de nucleótidos 3'-terminales a modo de ejemplo son de la siguiente manera:



En algunas realizaciones, cada uno de Z y Z' se selecciona independientemente de propanol, fosfato de propilo, fosforotioato de propilo, combinaciones de los mismos o múltiplos de los mismos.

5 En algunas realizaciones, cada uno de Z y Z' se selecciona independientemente de fosfato de propilo, fosforotioato de propilo, propilfosfo-propanol; fosforotioato de propilfosfo-propilo; fosfato de propilfosfo-propilo; (fosfato de propilo)<sub>3</sub>, (fosfato de propilo)<sub>2</sub>-propanol, (fosfato de propilo)<sub>2</sub>-fosforotioato de propilo. Cualquier resto conjugado de propano o propanol puede incluirse en Z o Z'.

10 En realizaciones adicionales, cada uno de Z y/o Z' incluye una combinación de un resto abásico y un desoxirribonucleótido o ribonucleótido no modificado o una combinación de un resto hidrocarbonado y un desoxirribonucleótido o ribonucleótido no modificado o una combinación de un resto abásico (desoxirribo o ribo) y un resto hidrocarbonado. En tales realizaciones, cada uno de Z y/o Z' incluye C3-rAb o C3-dAb en los que cada resto está unido covalentemente al resto adyacente a través de un enlace basado en fosfo, preferiblemente una unión fosfodiéster, fosforotioato o fosfonoacetato.

15 En determinadas realizaciones, las moléculas de ácido nucleico tal como se divulga en el presente documento incluyen una secuencia oligonucleotídica sentido seleccionada de uno cualquiera de los oligonucleótidos mostrados a continuación en las tablas 4 y 5 (SEQ ID NO: 60-126 y 194-218).

20

En determinadas realizaciones preferidas, los compuestos proporcionados incluyen Compuesto\_1, Compuesto\_2, Compuesto\_3, Compuesto\_4, Compuesto\_5, Compuesto\_6, Compuesto\_7, Compuesto\_8 y Compuesto\_9, descritos a continuación.

5 En algunas realizaciones, (tales como, por ejemplo, Compuesto\_1, Compuesto\_5 y Compuesto\_6) se proporcionan moléculas de ácido nucleico bicatenario de 19 meros en las que la cadena antisentido es SEQ ID NO: 127 y la  
 10 cadena sentido es SEQ ID NO: 60. En determinadas realizaciones, se proporcionan moléculas de ácido nucleico bicatenario de 19 meros en las que la cadena antisentido es SEQ ID NO: 127 e incluye ribonucleótidos modificados con 2'OMe; un 2'-5'-ribonucleótido en al menos una de las posiciones 1, 5, 6 o 7; y un resto distinto de nucleótido  
 15 unido covalentemente al extremo 3'-terminal; y la cadena sentido es SEQ ID NO: 60 e incluye al menos un 2'-5'-ribonucleótido o ribonucleótido modificado con 2'OMe; un resto distinto de nucleótido unido covalentemente al extremo 3'-terminal; y un resto de ocupación de centros reactivos unido covalentemente al extremo 5'-terminal. En algunas realizaciones, se proporcionan una molécula de ácido nucleico bicatenario de 19 meros en la que la cadena  
 antisentido es SEQ ID NO: 127; e incluye ribonucleótidos modificados con 2'OMe en las posiciones 3, 5, 9, 11, 13, 15, 17 y 19; un 2'-5'-ribonucleótido en la posición 7; y un resto distinto de nucleótido C3OH unido covalentemente al  
 extremo 3'-terminal; y la cadena sentido es SEQ ID NO: 60 e incluye cinco 2'-5'-ribonucleótidos consecutivos en las  
 posiciones 3'-terminales 15, 16, 17, 18 y 19; un resto distinto de nucleótido C3Pi unido covalentemente al extremo  
 3'-terminal; y un resto abásico invertido unido covalentemente al extremo 5'-terminal.

20 En una realización, se proporciona Compuesto\_1 que es una molécula de ácido nucleico bicatenario de 19 meros en la que la cadena antisentido es SEQ ID NO: 127 e incluye ribonucleótidos modificados con 2'OMe en las posiciones  
 3, 5, 9, 11, 13, 15, 17 y 19; un 2'-5'-ribonucleótido en la posición 7; y un resto distinto de nucleótido C3Pi-C3OH  
 unido covalentemente al extremo 3'-terminal; y la cadena sentido es SEQ ID NO: 60 e incluye cinco 2'-5'-  
 25 ribonucleótidos consecutivos en las posiciones 3'-terminales 15, 16; 17, 18 y 19; un resto distinto de nucleótido C3Pi  
 unido covalentemente al extremo 3'-terminal; y un resto abásico invertido unido covalentemente al extremo 5'-  
 terminal; y que incluye además un ribonucleótido modificado con 2'OMe en la posición 1 de la cadena antisentido.

En una realización, se proporciona Compuesto\_6 que es una molécula de ácido nucleico bicatenario de 19 meros en  
 la que la cadena antisentido es SEQ ID NO: 127 e incluye ribonucleótidos modificados con 2'OMe en las posiciones  
 30 3, 5, 9, 11, 13, 15, 17 y 19; un 2'-5'-ribonucleótido en la posición 7; y un resto distinto de nucleótido C3Pi-C3OH  
 unido covalentemente al extremo 3'-terminal; y la cadena sentido es (SEQ ID NO: 60) e incluye cinco 2'-5'-  
 ribonucleótidos consecutivos en las posiciones 3'-terminales 15, 16, 17, 18 y 19; un resto distinto de nucleótido C3Pi  
 unido covalentemente al extremo 3'-terminal; y un resto abásico invertido unido covalentemente al extremo 5'-  
 35 terminal; y que incluye además un 2'-5'-ribonucleótido en la posición 1 de la cadena antisentido.

En una realización, se proporciona Compuesto\_5 que es una molécula de ácido nucleico bicatenario de 19 meros en  
 la que la cadena antisentido es SEQ ID NO: 127 e incluye ribonucleótidos modificados con 2'OMe en las posiciones  
 1, 3, 5, 9, 11, 13, 15, 17 y 19; un 2'-5'-ribonucleótido en la posición 7; y un resto distinto de nucleótido C3Pi-C3OH  
 unido covalentemente al extremo 3'-terminal; y la cadena sentido es SEQ ID NO: 60 e incluye ribonucleótidos  
 40 modificados con 2'OMe en las posiciones 7, 13, 16 y 18; un 2'-5'-ribonucleótido en la posición 9; un resto distinto de  
 nucleótido C3OH unido covalentemente al extremo 3'-terminal; y un resto abásico invertido unido covalentemente al  
 extremo 5'-terminal.

En algunas realizaciones, (tales como, por ejemplo, Compuesto\_2 y Compuesto\_7, descritos a continuación) se  
 45 proporcionan moléculas de ácido nucleico bicatenario de 19 meros en las que la cadena sentido es SEQ ID NO: 63 y  
 la cadena antisentido es SEQ ID NO: 130. En algunas realizaciones, se proporcionan moléculas de ácido nucleico  
 bicatenario de 19 meros en las que la cadena sentido es SEQ ID NO: 63 e incluye ribonucleótidos de pirimidina  
 modificada con 2'OMe; un resto distinto de nucleótido unido covalentemente al extremo 3'-terminal; y un resto de  
 ocupación de centros reactivos unido covalentemente al extremo 5'-terminal; y la cadena antisentido es SEQ ID NO:  
 50 130 e incluye ribonucleótidos modificados con 2'OMe; un 2'-5'-ribonucleótido en la posición 7; y un resto distinto de  
 nucleótido unido covalentemente al extremo 3'-terminal. En algunas realizaciones se proporcionan moléculas de  
 ácido nucleico bicatenario de 19 meros en las que la cadena sentido es SEQ ID NO: 63 e incluye ribonucleótidos  
 modificados con 2'OMe; un resto distinto de nucleótido unido covalentemente al extremo 3'-terminal; y un resto de  
 ocupación de centros reactivos unido covalentemente al extremo 5'-terminal; y la cadena antisentido es SEQ ID NO:  
 55 130 e incluye ribonucleótidos modificados con 2'OMe; un 2'-5'-ribonucleótido en al menos una de las posiciones 5, 6  
 o 7; y un resto distinto de nucleótido unido covalentemente al extremo 3'-terminal.

En una realización, se proporciona Compuesto\_2 que es una molécula de ácido nucleico bicatenario de 19 meros en  
 la que la cadena sentido es SEQ ID NO: 63 e incluye ribonucleótidos modificados con 2'OMe en las posiciones 2, 14  
 60 y 18; un resto C3OH unido covalentemente al extremo 3'-terminal; y un resto de desoxirribonucleótido abásico  
 invertido unido covalentemente al extremo 5'-terminal; y la cadena antisentido es SEQ ID NO: 130 e incluye  
 ribonucleótidos modificados con 2'OMe en las posiciones 1, 3, 5, 9, 12, 13 y 17; un 2'-5'-ribonucleótido en al menos  
 una de las posiciones 5, 6 o 7; y resto distinto de nucleótido C3Pi-C3OH unido covalentemente al extremo 3'-  
 terminal.

65 En una realización, se proporciona Compuesto\_7 que es una molécula de ácido nucleico bicatenario de 19 meros en

la que la cadena sentido es SEQ ID NO: 63 e incluye ribonucleótidos modificados con 2'OMe en las posiciones 2, 14 y 18; un resto C3OH unido covalentemente al extremo 3'-terminal; y un resto de desoxirribonucleótido abásico invertido unido covalentemente al extremo 5'-terminal; y la cadena antisentido es SEQ ID NO: 130 e incluye ribonucleótidos modificados con 2'OMe en las posiciones 1, 3, 5, 9, 11, 13 y 17; un 2'-5'-ribonucleótido en la posición 7; y un resto distinto de nucleótido C3Pi-C3OH unido covalentemente al extremo 3'-terminal.

En algunas realizaciones, (tales como, por ejemplo, Compuesto\_3, descrito a continuación) se proporcionan moléculas de ácido nucleico bicatenario de 19 meros en las que la cadena sentido es SEQ ID NO: 98 y la cadena antisentido es SEQ ID NO: 165. En algunas realizaciones, se proporcionan moléculas de ácido nucleico bicatenario de 19 meros en las que la cadena sentido es SEQ ID NO: 98 e incluye 2'-5'-ribonucleótidos en las posiciones en el extremo 3'-terminal; un resto distinto de nucleótido unido covalentemente al extremo 3'-terminal; y un resto de ocupación de centros reactivos unido covalentemente al extremo 5'-terminal; y la cadena antisentido es SEQ ID NO: 165 e incluye ribonucleótidos modificados con 2'OMe; un 2'-5'-ribonucleótido en al menos una de las posiciones 5, 6 o 7; y un resto distinto de nucleótido unido covalentemente al extremo 3'-terminal. En una realización, se proporciona Compuesto\_3 que es una molécula de ácido nucleico bicatenario de 19 meros en la que la cadena sentido es SEQ ID NO: 98 e incluye 2'-5'-ribonucleótidos en las posiciones 15, 16, 17, 18 y 19; un resto C3-OH 3' unido covalentemente al extremo 3'-terminal; y un resto de desoxirribonucleótido abásico invertido unido covalentemente al extremo 5'-terminal; y la cadena antisentido es SEQ ID NO: 165 e incluye ribonucleótidos modificados con 2'OMe en las posiciones 2, 4, 6, 8, 11, 13, 15, 17 y 19; un 2'-5'-ribonucleótido en la posición 7; y un C3Pi-C3OH unido covalentemente al extremo 3'-terminal.

En algunas realizaciones, (tales como, por ejemplo, Compuesto\_4, Compuesto\_8 y Compuesto\_9, descritos a continuación) se proporcionan moléculas de ácido nucleico bicatenario de 19 meros en las que la cadena sentido es SEQ ID NO: 101 y la cadena antisentido es SEQ ID NO: 168. En algunas realizaciones se proporcionan moléculas de ácido nucleico bicatenario de 19 meros en las que la cadena sentido es SEQ ID NO: 101 e incluye ribonucleótidos de pirimidina modificada con 2'OMe; un 2'-5'-ribonucleótido opcional en una de la posición 9 o 10; un resto distinto de nucleótido unido covalentemente al extremo 3'-terminal; y un resto de ocupación de centros reactivos unido covalentemente al extremo 5'-terminal; y la cadena antisentido es SEQ ID NO: 168 e incluye ribonucleótidos modificados con 2'OMe; un 2'-5'-ribonucleótido, en al menos una de las posiciones 5, 6 o 7; y un resto distinto de nucleótido unido covalentemente al extremo 3'-terminal.

En una realización, se proporciona Compuesto\_4 que es una molécula de ácido nucleico bicatenario de 19 meros en la que la cadena sentido es SEQ ID NO: 101 e incluye ribonucleótidos modificados con 2'OMe en las posiciones 4, 11, 13 y 17; un 2'-5'-ribonucleótido en la posición 9; un resto distinto de nucleótido C3OH unido covalentemente al extremo 3'-terminal; y un resto de desoxirribonucleótido abásico invertido unido covalentemente al extremo 5'-terminal; y la cadena antisentido es SEQ ID NO: 168 e incluye ribonucleótidos modificados con 2'OMe en las posiciones 1, 4, 8, 11 y 15; un 2'-5'-ribonucleótido en la posición 6; una proyección de C3Pi-C3OH unida covalentemente al extremo 3'-terminal.

En una realización, se proporciona Compuesto\_8 que es una molécula de ácido nucleico bicatenario de 19 meros en la que la cadena sentido es SEQ ID NO: 101 e incluye ribonucleótidos modificados con 2'OMe en las posiciones 4, 11, 13 y 17; un resto distinto de nucleótido C3OH unido covalentemente al extremo 3'-terminal; y un resto de desoxirribonucleótido abásico invertido unido covalentemente al extremo 5'-terminal; y la cadena antisentido es SEQ ID NO: 168 e incluye ribonucleótidos modificados con 2'OMe en las posiciones 1, 4, 8, 13 y 15; un 2'-5'-ribonucleótido en la posición 6; y una proyección de C3Pi-C3OH unida covalentemente al extremo 3'-terminal.

En una realización, se proporciona Compuesto\_9 que es una molécula de ácido nucleico bicatenario de 19 meros en la que la cadena sentido es SEQ ID NO: 101 e incluye ribonucleótidos modificados con 2'OMe en las posiciones 2, 4, 11, 13 y 17; un resto distinto de nucleótido C3OH unido covalentemente al extremo 3'-terminal; y un resto de desoxirribonucleótido abásico invertido unido covalentemente al extremo 5'-terminal; y la cadena antisentido es SEQ ID NO: 168 e incluye ribonucleótidos modificados con 2'OMe en las posiciones 1, 4, 8, 11 y 15; un 2'-5'-ribonucleótido en la posición 6; y un resto C3Pi-C3OH unido covalentemente al extremo 3'-terminal.

En otro aspecto, se proporcionan métodos para reducir la expresión de hsp47 en una célula introduciendo en una célula una molécula de ácido nucleico tal como se proporciona en el presente documento en una cantidad suficiente para reducir la expresión de hsp47. En una realización, la célula es una célula estrellada hepatocelular. En otra realización, la célula es una célula estrellada en tejido renal o pulmonar. En determinada realización, el método se realiza *in vitro*. En otra realización, el método se realiza *in vivo*.

En otro aspecto, se proporcionan métodos para tratar a un individuo que padece una enfermedad asociada con hsp47. Los métodos incluyen administrar al individuo una molécula de ácido nucleico tal como se proporciona en el presente documento en una cantidad suficiente para reducir la expresión de hsp47. En determinadas realizaciones, la enfermedad asociada con hsp47 es una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en fibrosis hepática, cirrosis, fibrosis pulmonar incluyendo fibrosis de pulmón (incluyendo ILF), cualquier estado que provoque fibrosis renal (por ejemplo, CKD incluyendo ESRD), fibrosis peritoneal, daño hepático crónico, fibrillogénesis; enfermedades fibróticas en otros órganos; cicatrización anómala (queloides) asociada con todos los posibles tipos de lesión

cutánea, por accidente y yatrogénica (operaciones), esclerodermia, cardiofibrosis, insuficiencia de la operación de filtrado de glaucoma y adhesiones intestinales. En algunas realizaciones, los compuestos pueden ser útiles en el tratamiento de indicaciones específicas de órgano, por ejemplo, indicaciones que incluyen las mostradas en la tabla 1 a continuación, que enumera órganos e indicaciones respectivas:

5

TABLA 1

<p>Piel</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Cicatrización patológica tal como queloide y cicatriz hipertrófica</li> <li>• Cicatrización quirúrgica</li> <li>• Cicatrización de lesión</li> <li>• Queloide, o dermopatía fibrosante nefrógena</li> </ul>
<p>Peritoneo</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Fibrosis peritoneal</li> <li>• Adhesiones</li> <li>• Esclerosis peritoneal asociada con diálisis peritoneal ambulatoria continua (CAPD)</li> </ul>
<p>Hígado</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Cirrosis incluyendo cirrosis tras hepatitis C, cirrosis biliar primaria</li> <li>• Fibrosis hepática, por ejemplo, prevención de fibrosis hepática en portadores de hepatitis C</li> <li>• Esquistosomiasis</li> <li>• Colangitis</li> <li>• Cirrosis hepática debida a Hepatitis C tras trasplante de hígado o esteatohepatitis no alcohólica (NASH)</li> </ul>
<p>Páncreas</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Fibrosis inter(per)lobular (por ejemplo, pancreatitis crónica alcohólica), fibrosis periductal (por ejemplo, pancreatitis hereditaria), fibrosis periductal e interlobular (por ejemplo, pancreatitis autoinmunitaria), fibrosis inter e intralobular difusa (por ejemplo, pancreatitis crónica obstructiva)</li> </ul>
<p>Riñón</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Enfermedad renal crónica (CKD) de cualquier etiología. El tratamiento de CKD de fase temprana (SCr elevada) en pacientes diabéticos (previene el deterioro adicional en la función renal)</li> <li>• Fibrosis renal asociada con lupus glomeruloesclerosante</li> <li>• Nefropatía diabética</li> </ul>
<p>Corazón</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Insuficiencia cardiaca congestiva,</li> <li>• Fibrosis endomiocárdica,</li> <li>• Cardiofibrosis</li> <li>• Fibrosis asociada con infarto de miocardio</li> </ul>
<p>Pulmón</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Asma, fibrosis pulmonar idiopática (IPF);</li> <li>• Fibrosis de pulmón intersticial (ILF)</li> <li>• Neumonía por radiación que conduce a fibrosis pulmonar (por ejemplo, debido a radiación para el tratamiento de cáncer)</li> </ul>
<p>Médula ósea</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Trastornos mieloproliferativos: mielofibrosis (MF), policitemia vera (PV), trombocitemia esencial (ET)</li> <li>• Mielofibrosis idiopática</li> <li>• Mielofibrosis inducida por fármacos.</li> </ul>
<p>Ojo</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Segmento anterior: opacificación de la córnea, por ejemplo, tras distrofias heredadas, queratitis herpética o pterigiones; glaucoma</li> <li>• Segmento posterior: fibrosis y desprendimiento de retina por tracción, una complicación de retinopatía diabética avanzada (DR); cicatrización fibrovascular y gliosis en la retina;</li> <li>• Bajo la retina: fibrosis, por ejemplo, tras hemorragia subretiniana asociada con AMD neovascular</li> <li>• Fibrosis retro-orbital, cirugía poscataratas, vitreoretinopatía proliferativa.</li> <li>• Penfigoide cicatricial ocular</li> </ul>
<p>Intestino</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Fibrosis intestinal,</li> <li>• Enfermedad de Crohn</li> </ul>
<p>Cuerdas vocales</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Cicatrización de las cuerdas vocales,</li> <li>• Fibrosis de la mucosa de las cuerdas vocales,</li> <li>• Fibrosis de la laringe</li> </ul>
<p>Vasculatura</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Aterosclerosis,</li> <li>• Reestenosis arterial posangioplástica</li> </ul>
<p>Multisistémico</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Esclerodermia, esclerosis sistémica;</li> </ul>

<ul style="list-style-type: none"> <li>• Fibroesclerosis multifocal;</li> <li>• Enfermedad injerto contra huésped esclerodermatosa en receptores de trasplante de médula ósea, y</li> <li>• Fibrosis sistémica nefrógica (exposición a agentes de contraste basados en gadolinio (GBCA), el 30 % de MRI)</li> </ul>
<p>Tumores malignos de diversos orígenes</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Cáncer metastásico e invasivo inhibiendo la función de miofibroblastos asociados con tumor activados</li> </ul>

Otra realización de la descripción es un método para tratar un trastorno relacionado con células estrelladas, comprendiendo el método administrar una cantidad eficaz de la composición farmacéutica descrita a continuación a un sujeto que lo necesita. El trastorno incluye hepatitis, fibrosis hepática, cirrosis hepática, cáncer de hígado, pancreatitis, fibrosis pancreática, cáncer pancreático, cicatrización de las cuerdas vocales, fibrosis de la mucosa de las cuerdas vocales y fibrosis de la laringe. En algunas realizaciones, las indicaciones preferidas incluyen cirrosis hepática debida a hepatitis C tras trasplante de hígado; cirrosis hepática debida a esteatohepatitis no alcohólica (NASH); fibrosis pulmonar idiopática; neumonía por radiación que conduce a fibrosis pulmonar; nefropatía diabética; esclerosis peritoneal asociada con diálisis peritoneal ambulatoria continua (CAPD) y penfigoide cicatricial ocular.

Las indicaciones de hígado fibrótico incluyen cirrosis alcohólica, cirrosis por hepatitis B, cirrosis por hepatitis C, cirrosis por hepatitis C (Hep C) tras trasplante de hígado ortotópico (OLT), esteatohepatitis no alcohólica / enfermedad de hígado graso no alcohólica (NASH/NAFLD), cirrosis biliar primaria (PBC), colangitis esclerosante primaria (PSC), atresia biliar, deficiencia de antitripsina alfa-1 (A1AD), enfermedades de acumulación de cobre (enfermedad de Wilson), fructosemia, galactosemia, enfermedades de almacenamiento de glucógeno (especialmente tipos III, IV, VI, IX y X), síndromes de sobrecarga de hierro (hemocromatosis), anomalías de lípidos (por ejemplo, enfermedad de Gaucher), trastornos peroxisomales (por ejemplo, síndrome de Zellweger), tirosinemia, fibrosis hepática congénita, infecciones bacterianas (por ejemplo, brucelosis), enfermedades parasitarias (por ejemplo, equinococosis), síndrome de Budd-Chiari (enfermedad venooclusiva hepática).

Las indicaciones pulmonares incluyen fibrosis pulmonar idiopática, silicosis, neumoconiosis, displasia broncopulmonar en recién nacidos tras síndrome de dificultad respiratoria neonatal, lesión pulmonar por bleomicina/quimioterapia, bronquiolitis obliterante (BOS) tras trasplante de pulmón, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), fibrosis quística y asma.

Las indicaciones cardíacas incluyen miocardiopatía, aterosclerosis (enfermedad de Bergers, etc.), fibrosis endomiocárdica, fibrilación auricular, cicatrización tras infarto de miocardio (MI).

Otras indicaciones torácicas incluyen reacciones de tejido de la cápsula inducidas por radiación alrededor de implantes de mama texturizados, y fibrosis submucosa oral.

Las indicaciones renales incluyen enfermedad renal poliquística dominante autosómica (ADPKD), nefropatía diabética (glomeruloesclerosis diabética), glomeruloesclerosis segmental focal (FSGS) (colapsante frente a otras variantes histológicas), nefropatía de IgA (enfermedad de Berger), lupus nefrítico, enfermedad de Wegner, esclerodermia, síndrome de Goodpasture, fibrosis tubulointersticial: inducida por fármacos (protectores) penicilinas, cefalosporinas, nefropatía por analgésicos, glomerulonefritis membranoproliferativa (MPGN), púrpura de Henoch-Schonlein, nefropatías congénitas: enfermedad quística medular, síndrome de uña-rótula y síndrome de Alport.

Las indicaciones de la médula ósea incluyen linfangioliomiositosis (LAM), enfermedad injerto contra huésped crónica, policitemia vera, trombocitemia esencial y mielofibrosis.

Las indicaciones oculares incluyen retinopatía del prematuro (RoP), penfigoide cicatricial ocular, fibrosis de glándula lacrimal, cirugía por desprendimiento de retina, opacidad de la córnea, queratitis herpética, pterigiones, glaucoma, degeneración macular relacionada con la edad (AMD/ARMD), retinopatía por diabetes mellitus asociada con fibrosis retiniana (DM).

Las indicaciones ginecológicas incluyen endometriosis, adición a terapia hormonal para prevenir la cicatrización, fibrosis/salpingitis tras ETS.

Las indicaciones sistémicas incluyen enfermedad de Dupuytren, fibromatosis palmar, enfermedad de Peyronie, enfermedad de Ledderhose, queloides, fibroesclerosis multifocal, fibrosis sistémica nefrógica y mielofibrosis (anemia).

Las enfermedades fibróticas asociadas con lesiones incluyen cicatrización y contracción de piel y tejido blando inducida por quemadura (incluidas las químicas), cicatrización de piel y órganos inducida por radiación, tras tratamiento con radiación terapéutica para el cáncer, queloide (piel).

Las indicaciones quirúrgicas incluyen fibrosis peritoneal tras catéter de diálisis peritoneal, implante de córnea, implante coclear, otros implantes, implantes de silicona en la mama, sinusitis crónica; adhesiones, hiperplasia pseudoíntima de injertos de diálisis.

Otras indicaciones incluyen pancreatitis crónica.

5 En algunas realizaciones, se proporciona un método para el tratamiento de un sujeto que padece fibrosis hepática que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de una molécula de ácido nucleico divulgada en el presente documento, tratando de ese modo la fibrosis hepática. En algunas realizaciones, el sujeto padece cirrosis del hígado debido a hepatitis. En algunas realizaciones, el sujeto padece cirrosis del hígado debido a NASH.

10 En algunas realizaciones, se proporciona el uso de una molécula de ácido nucleico divulgada en el presente documento para la fabricación de un medicamento para tratar la fibrosis hepática. En algunas realizaciones, la fibrosis hepática se debe a hepatitis. En algunas realizaciones, la fibrosis hepática se debe a NASH.

15 En algunas realizaciones, se proporciona un método para el remodelado de tejido cicatricial que comprende administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad eficaz de una molécula de ácido nucleico divulgada en el presente documento, realizando de ese modo el remodelado de tejido cicatricial. En algunas realizaciones, el tejido cicatricial está en el hígado. En algunas realizaciones, el sujeto padece cirrosis del hígado debido a hepatitis. En algunas realizaciones, el sujeto padece cirrosis del hígado debido a NASH.

20 En algunas realizaciones, se proporciona un método para modular la regresión de la fibrosis que comprende administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad eficaz de una molécula de ácido nucleico divulgada en el presente documento, realizando de ese modo la regresión de la fibrosis.

25 En algunas realizaciones, se proporciona un método para la reducción de tejido cicatricial en un sujeto que comprende la etapa de administrar al sujeto una cantidad eficaz de una molécula de ácido nucleico divulgada en el presente documento para reducir el tejido cicatricial. En algunas realizaciones, se proporciona un método para reducir tejido cicatricial en un sujeto que comprende la etapa de aplicar por vía tópica al tejido cicatricial una cantidad eficaz de una molécula de ácido nucleico divulgada en el presente documento para reducir el tejido cicatricial.

30 En algunas realizaciones, se proporciona un método para mejorar el aspecto de tejido cicatricial que comprende la etapa de aplicar por vía tópica al tejido cicatricial una cantidad eficaz de una molécula de ácido nucleico divulgada en el presente documento para mejorar el aspecto del tejido cicatricial.

35 En algunas realizaciones, se proporciona un método para el tratamiento de un sujeto que padece fibrosis de pulmón que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de una molécula de ácido nucleico divulgada en el presente documento, tratando de ese modo la fibrosis de pulmón. En algunas realizaciones, el sujeto padece fibrosis de pulmón intersticial (ILF). En algunas realizaciones, el sujeto padece neumonía por radiación que conduce a fibrosis pulmonar. En algunas realizaciones, el sujeto padece fibrosis de pulmón inducida por fármacos.

40 En algunas realizaciones, se proporciona el uso de una molécula de ácido nucleico divulgada en el presente documento para la fabricación de un medicamento para tratar la fibrosis de pulmón. En algunas realizaciones, la fibrosis de pulmón es ILF. En algunas realizaciones, la fibrosis de pulmón es fibrosis de pulmón inducida por fármacos o radiación.

45 En un aspecto, se proporcionan composiciones farmacéuticas que incluyen una molécula de ácido nucleico (por ejemplo, una molécula de ANip) tal como se describe en el presente documento en un portador farmacéuticamente aceptable. En determinadas realizaciones, la formulación farmacéutica incluye, o implica, un sistema de suministro adecuado para suministrar moléculas de ácido nucleico (por ejemplo, moléculas de ANip) a un individuo tal como un paciente; por ejemplo, sistemas de suministro descritos con más detalle a continuación.

50 En un aspecto relacionado, se proporcionan composiciones o kits que incluyen una molécula de ácido nucleico (por ejemplo, una molécula de ANip) envasada para su uso por un paciente. El envase puede estar etiquetado o incluir una etiqueta de envase o prospecto que indique el contenido del envase y proporcione cierta información referente a cómo debe o puede usarse la molécula de ácido nucleico (por ejemplo, una molécula de ANip) por un paciente, por ejemplo, la etiqueta puede incluir información de dosificación y/o indicaciones de uso. En determinadas realizaciones, el contenido de la etiqueta incluirá un aviso en una forma recomendada por una agencia gubernamental, por ejemplo, la Food and Drug Administration (FDA) de los Estados Unidos. En determinadas realizaciones, la etiqueta puede indicar que la molécula de ácido nucleico (por ejemplo, una molécula de ANip) es adecuada para su uso en el tratamiento de un paciente que padece una enfermedad asociada con hsp47; por ejemplo, la etiqueta puede indicar que la molécula de ácido nucleico (por ejemplo, una molécula de ANip) es adecuada para su uso en el tratamiento de fibroides; o, por ejemplo, la etiqueta puede indicar que la molécula de ácido nucleico (por ejemplo, una molécula de ANip) es adecuada para su uso en el tratamiento de una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en fibrosis, fibrosis hepática, cirrosis, fibrosis pulmonar, fibrosis renal, fibrosis peritoneal, daño hepático crónico y fibrillogénesis.

65 Tal como se usa en el presente documento, el término "proteína de choque térmico 47" o "hsp47" o "HSP47" se usan de manera intercambiable y se refieren a cualquier proteína de choque térmico 47, péptido, o polipéptido que tiene cualquier actividad de proteína hsp47. La proteína de choque térmico 47 es un inhibidor de serina proteinasa

(serpina) también conocido, por ejemplo, como inhibidor de serpina peptidasa, clado H, miembro 1 (SERPINH1), SERPINH2, proteína de unión a colágeno 1 (CBP1), CBP2, gp46; proteína transactivada por arsénico 3 (AsTP3); HSP47; gen de inducción de la proliferación 14 (PIG 14); PPROM; antígeno de artritis reumatoide A-47 (RA-A47); coligina 1; y coligina 2. En determinadas realizaciones preferidas, "hsp47" se refiere a hsp47 humana. La proteína de choque térmico 47 (o más particularmente hsp47 humana) puede tener una secuencia de aminoácidos que es la misma, o sustancialmente la misma, que SEQ ID NO. 2.

Tal como se usa en el presente documento, el término "secuencia de nucleótidos que codifica hsp47" significa una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína hsp47, o parte de la misma. También se pretende que el término "secuencia de nucleótidos que codifica hsp47" incluya secuencias codificantes de hsp47 tales como isoformas de hsp47, genes de hsp47 mutantes, variantes de corte y empalme de genes de hsp47, y polimorfismos de genes de hsp47. Una secuencia de ácido nucleico que codifica hsp47 incluye secuencias de ARNm que codifican hsp47, que también pueden denominarse "ARNm de hsp47." Una secuencia a modo de ejemplo de ARNm de hsp47 humana es SEQ ID NO: 1.

Tal como se usa en el presente documento, el término "molécula de ácido nucleico" o "ácido nucleico" se usa de manera intercambiable y se refieren a un oligonucleótido, nucleótido o polinucleótido. Se describen variaciones de "molécula de ácido nucleico" con más detalle en el presente documento. Una molécula de ácido nucleico abarca tanto moléculas de ácido nucleico modificadas como moléculas de ácido nucleico no modificadas tal como se describe en el presente documento. Una molécula de ácido nucleico puede incluir desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos, nucleótidos modificados o análogos de nucleótido en cualquier combinación.

Tal como se usa en el presente documento, el término "nucleótido" se refiere a un resto químico que tiene un azúcar (o un análogo del mismo, o un azúcar modificado), una base de nucleótido (o un análogo de la misma, o una base modificada) y un grupo fosfato (o análogo del mismo, o un grupo fosfato modificado). Un nucleótido abarca nucleótidos modificados o nucleótidos no modificados tal como se describe en el presente documento. Tal como se usa en el presente documento, los nucleótidos pueden incluir desoxirribonucleótidos (por ejemplo, desoxirribonucleótidos no modificados), ribonucleótidos (por ejemplo, ribonucleótidos no modificados), y análogos de nucleótido modificados incluyendo, entre otros, ANB y ANNB, ácidos nucleicos peptídicos, L-nucleótidos (también denominados nucleótidos especulares), ácido nucleico con puente de etileno (ANE), arabinósido, PACE, nucleótidos con un azúcar de 6 carbonos, así como análogos de nucleótido (incluyendo nucleótidos abásicos) que con frecuencia se considera que son distintos de nucleótidos. En algunas realizaciones, los nucleótidos pueden estar modificados en el azúcar, la base de nucleótido y/o en el grupo fosfato con cualquier modificación conocida en la técnica, tal como modificaciones descritas en el presente documento. Un "polinucleótido" u "oligonucleótido" tal como se usa en el presente documento, se refiere a una cadena de nucleótidos unidos; los polinucleótidos y oligonucleótidos también pueden tener modificaciones en el azúcar de nucleótido, las bases de nucleótido y las estructuras principales de fosfato tal como se conoce bien en la técnica y/o se divulgan en el presente documento.

Tal como se usa en el presente documento, el término "ácido nucleico de interferencia pequeño", "ANip", o "molécula de ácido nucleico de interferencia pequeño" se refiere a cualquier molécula de ácido nucleico capaz de modular la expresión génica o la replicación vírica. Preferiblemente, el ANip inhibe o regula por disminución la expresión génica o la replicación vírica. El ANip incluye sin limitación moléculas de ácido nucleico que son capaces de mediar en iARN específica de secuencia, por ejemplo, ARN de interferencia pequeño (ARNip), ARN bicatenario (ARNbc), micro-ARN (miARN), ARN de horquilla corta (ARNhc), oligonucleótido de interferencia pequeño, ácido nucleico de interferencia pequeño, oligonucleótido modificado de interferencia pequeño, ARNip químicamente modificado, ARN de silenciamiento génico postranscripcional (ARNsgpt), y otros. Tal como se usa en el presente documento, "ácido nucleico de interferencia pequeño", "ANip", o "molécula de ácido nucleico de interferencia pequeño" tiene el significado descrito con más detalle en otra parte en el presente documento.

Tal como se usa en el presente documento, el término "complementario" significa que un ácido nucleico puede formar puente(s) de hidrógeno con otra secuencia de ácido nucleico mediante tipos o bien tradicional de Watson-Crick o bien otros no tradicionales. En referencia a las moléculas nucleicas divulgadas en el presente documento, la energía libre de unión para una molécula de ácido nucleico con su secuencia complementaria es suficiente para permitir que avance la función relevante del ácido nucleico, por ejemplo, actividad de iARN. La determinación de energías libres de unión para moléculas de ácido nucleico se conoce bien en la técnica (véase, por ejemplo, Turner *et al.*, 1987, CSH Symp. Quant. Biol. LII págs. 123-133; Frier *et al.*, 1986, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 83:9373-9377; Turner *et al.*, 1987, J. Am. Chem. Soc. 109:3783-3785). Un porcentaje de complementariedad indica el porcentaje de residuos contiguos en una molécula de ácido nucleico que pueden formar puentes de hidrógeno (por ejemplo, formación de pares de bases de Watson-Crick) con una segunda secuencia de ácido nucleico (por ejemplo, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 nucleótidos de un total de 10 nucleótidos en el primer oligonucleótido que forman formación de pares de bases con una segunda secuencia de ácido nucleico que tiene 10 nucleótidos representa el 50 %, el 60 %, el 70 %, el 80 %, el 90 %, y el 100 % de complementariedad, respectivamente). "Completamente complementario" significa que todos los residuos contiguos de una secuencia de ácido nucleico formarán puentes de hidrógeno con el mismo número de residuos contiguos en una segunda secuencia de ácido nucleico. En una realización, una molécula de ácido nucleico divulgada en el presente documento incluye de aproximadamente 15 a aproximadamente 35 o más (por ejemplo, aproximadamente 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34 o 35 o

más) nucleótidos que son complementarios con una o más moléculas de ácido nucleico diana o una parte de las mismas.

5 Tal como se usa en el presente documento, el término “región sentido” se refiere a una secuencia de nucleótidos de una molécula de ANip complementaria (parcial o completamente) a una región antisentido de la molécula de ANip. La cadena sentido de una molécula de ANip puede incluir una secuencia de ácido nucleico que tiene homología con una secuencia de ácido nucleico diana. Tal como se usa en el presente documento, “cadena sentido” se refiere a una molécula de ácido nucleico que incluye una región sentido y también puede incluir nucleótidos adicionales. Las posiciones de nucleótido de la cadena sentido se numeran en el presente documento 5'>3'.

10 Tal como se usa en el presente documento, el término “región antisentido” se refiere a una secuencia de nucleótidos de una molécula de ANip complementaria (parcial o completamente) a una secuencia de ácido nucleico diana. La cadena antisentido de una molécula de ANip puede incluir opcionalmente una secuencia de ácido nucleico complementaria a una región sentido de la molécula de ANip. Tal como se usa en el presente documento, “cadena antisentido” se refiere a una molécula de ácido nucleico que incluye una región antisentido y también puede incluir nucleótidos adicionales. Las posiciones de nucleótido de la cadena antisentido se numeran en el presente documento 5'>3'.

15 Tal como se usa en el presente documento, el término “ARN” se refiere a una molécula que incluye al menos un residuo de ribonucleótido.

20 Tal como se usa en el presente documento, el término “región de dúplex” se refiere a la región en dos oligonucleótidos complementarios o sustancialmente complementarios que forman pares de bases entre sí, o bien mediante formación de pares de bases de Watson-Crick o bien de cualquier otra manera que permite formar un dúplex entre cadenas oligonucleotídicas que son complementarias o sustancialmente complementarias. Por ejemplo, una cadena oligonucleotídica que tiene 21 unidades de nucleótido puede formar pares de bases con otro oligonucleótido de 21 unidades de nucleótido, aunque solo 19 bases en cada cadena sean complementarias o sustancialmente complementarias, de tal manera que la “región de dúplex” consiste en 19 pares de bases. Los pares de bases restantes pueden existir, por ejemplo, como proyecciones en 5' y 3'. Además, dentro de la región de dúplex, no se requiere el 100 % de complementariedad; puede permitirse complementariedad sustancial dentro de una región de dúplex. La complementariedad sustancial se refiere a complementariedad entre las cadenas de tal manera que son capaces de hibridarse en condiciones biológicas. En la técnica se conocen bien técnicas para determinar empíricamente si dos cadenas son capaces de hibridarse en condiciones biológicas. Alternativamente, dos cadenas pueden sintetizarse y añadirse juntas en condiciones biológicas para determinar si se hibridan entre sí.

25 Tal como se usa en el presente documento, los términos “análogo de nucleótido sin formación de pares” significa un análogo de nucleótido que incluye un resto sin formación de pares de bases incluyendo, pero sin limitarse a: 6-des-amino-adenosina (nebularina), 4-Me-indol, 3-nitropirrol, 5-nitroindol, Ds, Pa, N3-Me-ribo-U, N3-Me-riboT, N3-Me-dC, N3-Me-dT, N1-Me-dG, N1-Me-dA, N3-etil-dC, N3-Me dC. En algunas realizaciones, el análogo de nucleótido sin formación de pares de bases es un ribonucleótido. En otras realizaciones es un desoxirribonucleótido.

30 Tal como se usa en el presente documento, el término “grupo funcional terminal” incluye sin limitación grupos halógeno, alcohol, amina, carboxílico, éster, amida, aldehído, cetona, éter.

35 Un “nucleótido abásico” o “análogo de nucleótido abásico”, tal como se usa en el presente documento, también puede denominarse con frecuencia en el presente documento y en la técnica pseudo-nucleótido o un resto no convencional. Mientras que un nucleótido es una unidad monomérica de ácido nucleico, que consiste generalmente en un azúcar de ribosa o desoxirribosa, un fosfato y una base (adenina, guanina, timina o citosina en el ADN; adenina, guanina, uracilo o citosina en el ARN), un nucleótido abásico o pseudo-nucleótido carece de una base, y por tanto no es estrictamente un nucleótido tal como se usa generalmente en la técnica. Los restos de desoxirribosa abásicos incluyen, por ejemplo, 3'-fosfato de desoxirribosa abásica; 3-fosfato de 1,2-didesoxi-D-ribofuranosa; 3-fosfato de 1,4-anhidro-2-desoxi-D-ribitol. Los restos de desoxirribosa abásicos invertidos incluyen desoxirriboabásicos invertidos; 5'-fosfato desoxiabásico invertido en 3',5'.

40 El término “resto de ocupación de centros reactivos (z”) tal como se usa en el presente documento incluye un resto que puede unirse covalentemente al extremo 5'-terminal de (N')<sub>y</sub> e incluye restos de ribosa abásica, resto de desoxirribosa abásica, modificaciones de restos de ribosa abásica y desoxirribosa abásica incluyendo modificaciones con 2'O-alkilo; restos de ribosa abásica y desoxirribosa abásica invertidos y modificaciones de los mismos; C6-imino-Pi; un nucleótido especular incluyendo L-ADN y L-ARN; 5'OMe-nucleótido; y análogos de nucleótido incluyendo 4',5'-metilen-nucleótido; 1-(β-D-eritrofuranosil)nucleótido; 4'-tio-nucleótido, nucleótido carbocíclico; fosfato de 5'-amino-alkilo; fosfato de 1,3-diamino-2-propilo, fosfato de 3-amino-propilo; fosfato de 6-aminohexilo; fosfato de 12-aminododecilo; fosfato de hidroxipropilo; 1,5-anhidrohexitol-nucleótido; alfa-nucleótido; treo-pentofuranosil-nucleótido; 3',4'-seco-nucleótido acíclico; 3,4-dihidroxitil-nucleótido; 3,5-dihidroxipentil-nucleótido, 5'-5'-resto abásico invertido; fosfato de 1,4-butanodiol; 5'-amino; y restos fosfonato de metilo y 5'-mercapto con formación de puentes o sin formación de puentes.

Determinados restos de ocupación de centros reactivos pueden ser restos de ribosa abásica o desoxirribosa abásica; restos de ribosa abásica o desoxirribosa abásica invertidos; C6-amino-Pi; un nucleótido especular incluyendo L-ADN y L-ARN. Las moléculas de ácido nucleico tal como se divulga en el presente documento pueden sintetizarse usando uno o más nucleótidos invertidos, por ejemplo, timidina invertida o adenina invertida (por ejemplo, véase Takei, *et al.*, 2002. JBC 277(26):23800-06).

El término "resto no convencional" tal como se usa en el presente documento se refiere a restos distintos de nucleótidos que incluyen un resto abásico, un resto abásico invertido, un resto hidrocarbonado (alquilo) y derivados de los mismos, e incluye además un desoxirribonucleótido, un desoxirribonucleótido modificado, un nucleótido especular (L-ADN o L-ARN), un análogo de nucleótido sin formación de pares de bases y un nucleótido unido a un nucleótido adyacente mediante un enlace de fosfato internucleotídico 2'-5'; ácidos nucleicos con unión en puente incluyendo ANB y ácidos nucleicos con unión en puente de etileno, nucleótidos con uniones modificadas (por ejemplo, PACE) y con bases modificadas así como restos adicionales explícitamente divulgados en el presente documento como restos no convencionales.

Tal como se usa en el presente documento, el término "inhibir", "regular por disminución" o "reducir" con respecto a la expresión génica significa que la expresión del gen, o el nivel de moléculas de ARN o moléculas de ARN equivalentes que codifican una o más proteínas o subunidades de proteína (por ejemplo, ARNm), o actividad de una o más proteínas o subunidades de proteína, se reduce por debajo de lo observado en ausencia de un factor inhibidor (tal como una molécula de ácido nucleico, por ejemplo, un ANip, por ejemplo, que tenga características estructurales tal como se describe en el presente documento); por ejemplo, la expresión puede reducirse hasta el 90 %, el 80 %, el 70 %, el 60 %, el 50 %, el 40 %, el 30 %, el 20 %, el 10 %, el 5 % o menos de lo observado en ausencia de un inhibidor.

#### **Breve descripción de los dibujos**

La figura 1 es un diagrama que muestra un protocolo con respecto a la evaluación del efecto de gp46-ARNip *in vitro* usando células NRK, y la determinación de la secuencia, el tiempo y la concentración óptimos.

La figura 2 es un diagrama fotográfico que muestra el resultado de inmunotransferencia de tipo Western de gp46 y actina (cultivo de 24 horas, examen de la secuencia óptima).

La figura 3 es un diagrama fotográfico que muestra el resultado de inmunotransferencia de tipo Western de gp46 y actina (cultivo de 24 horas, examen de la concentración óptima).

La figura 4 es un diagrama fotográfico que muestra el resultado de inmunotransferencia de tipo Western de gp46 y actina (concentración 50 nM, examen del tiempo de cultivo óptimo).

La figura 5 es un diagrama que muestra un protocolo para evaluar la inhibición de la expresión de colágeno mediante gp46-ARNip en células NRK.

La figura 6 es un gráfico que muestra la inhibición de la síntesis de colágeno mediante ARNip.

La figura 7 es un diagrama fotográfico que muestra la transfección de ARNip específica de HSC.

La figura 8 es un diagrama fotográfico para evaluar el porcentaje de transfección de ARNip específica de HSC.

La figura 9 es un diagrama fotográfico para evaluar la inhibición de la expresión de gp46 mediante ARNip.

La figura 10 es un diagrama fotográfico que muestra la tinción con azán de hígado de rata a la que se le había administrado DMN.

La figura 11 es un diagrama que muestra un protocolo de tratamiento de ratas de LC.

La figura 12 es un diagrama fotográfico que muestra la tinción con azán de hígado de rata de LC a la que se le había administrado VA-Lip-ARNip de gp46.

La figura 13 es un diagrama que muestra un método para extraer una parte teñida por medio de imagen de NIH (tomándose 6 posiciones al azar de una imagen teñida con azán).

La figura 14 es un gráfico que muestra la proporción en área ocupada por partes fibróticas en histología de hígado (proporción de colágeno en área, %).

La figura 15 es un gráfico que muestra la cantidad de hidroxiprolina en tejido hepático.

La figura 16 es un gráfico que muestra una curva de supervivencia para rata con cirrosis hepática a la que se le

había administrado por vía intraportal VA-Lip-ARNip de gp46.

La figura 17 es un diagrama fotográfico que muestra tinción con azán de tejido hepático de rata con cirrosis hepática a la que se le había administrado por vía intraportal VA-Lip-ARNip de gp46.

5 La figura 18 es un gráfico que muestra una curva de supervivencia para rata con cirrosis hepática a la que se le había administrado por vía intraportal VA-Lip-ARNip de gp46.

10 La figura 19 es un diagrama fotográfico que muestra tinción con azán de tejido hepático de rata con cirrosis hepática a la que se le había administrado por vía intraportal VA-Lip-ARNip de gp46.

La figura 20 es un gráfico que muestra una curva de supervivencia para rata con cirrosis hepática a la que se le había administrado por vía intravenosa VA-Lip-ARNip de gp46.

15 La figura 21 es un gráfico que muestra una curva de supervivencia para rata con cirrosis hepática a la que se le había administrado por vía intravenosa VA-Lip-ARNip de gp46.

La figura 22 es un diagrama fotográfico que muestra tinción con azán de tejido hepático de rata con cirrosis hepática a la que se le había administrado por vía intravenosa VA-Lip-ARNip de gp46.

20 La figura 23 es un diagrama que muestra la mejora de la eficacia de transfección de VA-Lip-ARNip de gp46 mediante RBP.

25 La figura 24 es un diagrama que muestra la inhibición de la transfección de VA-Lip-ARNip de gp46 mediante anticuerpo anti-RBP.

La figura 25 es un gráfico de barras que muestra el efecto de ANip de GFP sobre diversas líneas de células indicadoras. Se establecieron líneas celulares mediante inducción por lentivirus de constructo de ADNc de HSP47 humana-GFP o ADNc de GP46 de rata-GFP en HEK293, línea celular de fibrosarcoma humano HT1080, línea de HSC humano hTERT o línea de células NRK. Se introdujo ANip de control negativo o ANip frente a GFP en las células y se midió la fluorescencia de GFP. Los resultados mostraron que ANip frente a GFP atenúa la fluorescencia en un grado diferente en diferentes líneas celulares. Se seleccionaron las líneas celulares 293\_HSP47-GFP y 293\_GP46-GFP para el examen de siHsp47 debido a su facilidad para transfectarse y sensibilidad a la atenuación de la fluorescencia.

35 Las figuras 26A, 26B, 26C y 26D son una serie de gráficos de barras que muestran la citotoxicidad y eficacia de atenuación de diversos siHsp47 en líneas celulares 293\_HSP47-GFP y 293\_GP46-GFP. El resultado mostró que siHsp47-C, siHsp47-2 y siHsp47-2d atenuaban eficazmente tanto HSP47 humana como GP46 de rata (el homólogo de hsp47 humana) sin citotoxicidad sustancial. siGp46A frente a GP46 no atenúa la HSP47 humana. Adicionalmente, los siHsp47 recién diseñados funcionaron mejor que siGp46A en la atenuación de GP46 de rata.

40 La figura 27 es un gráfico de barras que muestra el efecto de atenuación de diversos siHsp47 sobre ARNm de hsp47, medido mediante qPCR de TaqMan® usando la línea celular de HSC humano hTERT. El eje de las Y representa el nivel de ARNm restante de hsp47. HSP47-C fue el más eficaz entre todos los ANip de hsp47 sometidos a prueba.

45 La figura 28 es un gráfico de barras que muestra el efecto de diferentes ANip de hsp47 sobre la expresión de colágeno I en células hTERT. El nivel de los niveles de ARNm de colágeno I se midió mediante PCR cuantitativa en tiempo real usando una sonda TaqMan®. El eje de las Y representa el nivel de expresión de ARNm restante de colágeno I. El resultado mostró que el nivel de ARNm de colágeno I se reduce significativamente en las células tratadas con algunos de los candidatos (siHsp47-2, siHsp47-2d, y su combinación con siHsp47-1).

50 La figura 29 es un gráfico que muestra una disminución en las áreas fibróticas del hígado en animales tratados con siHSP47.

55 La figura 30 es un esquema del calendario de tratamiento y el método de evaluación usados en el ejemplo 22.

60 La figura 31 muestra los resultados de la tinción histológica con azán en el campo pulmonar. Las imágenes presentan el campo de pulmón representativo de secciones teñidas con azán de cada grupo con un aumento de 80X. (a) Tratamiento previo (BLM IT -2W); (b) Rata con enfermedad (BLM IT-5W+PBS i.v.); y (c) Tratamiento (BLM IT +ARNip i.v.), (d) Simulado (solución salina-IT+PBS i.v.).

65 La figura 32 muestra la puntuación de fibrosis, que muestra los resultados de la evaluación de veinte campos de pulmón seleccionados al azar con un aumento de 80X para cada rata. El gráfico de barras resume la puntuación de fibrosis de la sección teñida con azán para cada grupo. Se usaron análisis estadísticos de ANOVA de un factor, prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni usando el software Prism5.

## Descripción detallada de realizaciones ilustrativas

### Interferencia de ARN y moléculas de ácido nucleico de ANip

La interferencia de ARN se refiere al proceso de silenciamiento génico postranscripcional específico de secuencia en animales mediado por ARN de interferencia pequeños (ARNip) (Zamore *et al.*, 2000, *Cell*, 101, 25-33; Fire *et al.*, 1998, *Nature*, 391, 806; Hamilton *et al.*, 1999, *Science*, 286, 950-951; Lin *et al.*, 1999, *Nature*, 402, 128-129; Sharp, 1999, *Genes & Dev.*, 13:139-141; y Strauss, 1999, *Science*, 286, 886). La presencia de ARNbc en células desencadena la respuesta de iARN mediante un mecanismo que aún no se ha caracterizado completamente.

Dicer está implicada en el procesamiento del ARNbc para dar fragmentos pequeños de ARNbc conocidos como ARN de interferencia pequeños (ARNip) (Zamore *et al.*, 2000, *Cell*, 101, 25-33; Bass, 2000, *Cell*, 101, 235; Berstein *et al.*, 2001, *Nature*, 409, 363). Los ARNip derivados de la actividad de Dicer pueden tener de aproximadamente 21 a aproximadamente 23 nucleótidos de longitud e incluyen aproximadamente 19 dúplex de pares de bases (Zamore *et al.*, 2000, *Cell*, 101, 25-33; Elbashir *et al.*, 2001, *Genes Dev.*, 15, 188). Dicer también se ha implicado en la escisión de ARN temporales pequeños (ARNtp) de 21 y 22 nucleótidos a partir de ARN precursor de estructura conservada que están implicados en el control de la traducción (Hutvagner *et al.*, 2001, *Science*, 293, 834). La respuesta de iARN también presenta un complejo de endonucleasa, comúnmente denominado complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC), que media en la escisión de ARN monocatenario que tiene una secuencia complementaria a la cadena antisentido del dúplex de ARNip. La escisión del ARN diana tiene lugar en el centro de la región complementaria a la cadena antisentido del dúplex de ARNip (Elbashir *et al.*, 2001, *Genes Dev.*, 15, 188).

Se ha estudiado la iARN en una variedad de sistemas. Fire *et al.*, 1998, *Nature*, 391, 806, fueron los primeros en observar iARN en *C. elegans*. Bahramian y Zarbl, 1999, *Molecular and Cellular Biology*, 19, 274-283 y Wianny y Goetz, 1999, *Nature Cell Biol.*, 2, 70, describen la iARN mediada por ARNbc en sistemas de mamíferos. Elbashir *et al.*, 2001, *Nature*, 411, 494 y Tuschl *et al.*, documento WO0175164, describen la iARN inducida mediante introducción de dúplex de ARN de 21 nucleótidos sintéticos en células de mamífero en cultivo incluyendo células HeLa y de riñón embrionario humano. Un trabajo reciente (Elbashir *et al.*, 2001, *EMBO J.*, 20, 6877 y Tuschl *et al.*, documento WO0175164) ha revelado determinados requisitos para la longitud, estructura, composición química y secuencia de ARNip que son esenciales para mediar en una actividad de iARN eficaz.

Las moléculas de ácido nucleico (por ejemplo, que comprenden características estructurales tal como se divulga en el presente documento) pueden inhibir o regular por disminución la expresión génica o la replicación vírica mediando en la interferencia de ARN "iARN" o el silenciamiento génico de una manera específica de secuencia. (Véase, por ejemplo, Zamore *et al.*, 2000, *Cell*, 101, 25-33; Bass, 2001, *Nature*, 411, 428-429; Elbashir *et al.*, 2001, *Nature*, 411, 494-498; y Kreutzer *et al.*, documento WO0044895; Zernicka-Goetz *et al.*, documento WO0136646; Fire, documento WO9932619; Plaetinck *et al.*, documento WO0001846; Mello y Fire, documento WO0129058; Deschamps-Depaillette, documento WO9907409; y Li *et al.*, documento WO0044914; Allshire, 2002, *Science*, 297, 1818-1819; Volpe *et al.*, 2002, *Science*, 297, 1833-1837; Jenuwein, 2002, *Science*, 297, 2215-2218; y Hall *et al.*, 2002, *Science*, 297, 2232-2237; Hutvagner y Zamore, 2002, *Science*, 297, 2056-60; McManus *et al.*, 2002, *ARN*, 8, 842-850; Reinhart *et al.*, 2002, *Gene & Dev.*, 16, 1616-1626; y Reinhart & Bartel, 2002, *Science*, 297, 1831)

Una molécula de ácido nucleico ANip puede ensamblarse a partir de dos cadenas polinucleotídicas separadas, en las que una cadena es la cadena sentido y la otra es la cadena antisentido en las que las cadenas antisentido y sentido son complementarias entre sí (es decir cada cadena incluye una secuencia de nucleótidos que es complementaria a la secuencia de nucleótidos en la otra cadena); tal como en las que la cadena antisentido y la cadena sentido forman un dúplex o una estructura bicatenaria que tiene cualquier longitud y estructura tal como se describe en el presente documento para moléculas de ácido nucleico tal como se proporcionan, por ejemplo, en las que la región bicatenaria (región de dúplex) tiene de aproximadamente 15 a aproximadamente 49 (por ejemplo, aproximadamente 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48 o 49 pares de bases); la cadena antisentido incluye una secuencia de nucleótidos que es complementaria a la secuencia de nucleótidos en una molécula de ácido nucleico diana (es decir, ARNm de hsp47) o una parte de la misma y la cadena sentido incluye una secuencia de nucleótidos correspondiente a la secuencia de ácido nucleico diana o una parte de la misma (por ejemplo, de aproximadamente 17 a aproximadamente 49 o más nucleótidos de las moléculas de ácido nucleico en el presente documento son complementarios al ácido nucleico diana o una parte del mismo).

En determinados aspectos y realizaciones, una molécula de ácido nucleico (por ejemplo, una molécula de ANip) proporcionada en el presente documento puede ser una molécula de "longitud de RISC" o puede ser un sustrato de Dicer tal como se describe con más detalle a continuación.

Una molécula de ácido nucleico ANip puede incluir secuencias o regiones sentido y antisentido separadas, en la que las regiones sentido y antisentido están unidas covalentemente mediante moléculas de unión de nucleótidos o distintos de nucleótidos tal como se conoce en la técnica, o alternativamente están unidas de manera no covalente mediante interacciones iónicas, puentes de hidrógeno, interacciones de van der Waals, interacciones hidrófobas y/o

interacciones de apilamiento. Las moléculas de ácido nucleico pueden incluir una secuencia de nucleótidos que es complementaria a la secuencia de nucleótidos de un gen diana. Las moléculas de ácido nucleico pueden interactuar con la secuencia de nucleótidos de un gen diana de una manera que provoca la inhibición de la expresión del gen diana.

5 Alternativamente, una molécula de ácido nucleico ANip se ensambla a partir de un único polinucleótido, en la que las regiones sentido y antisentido complementarias entre sí de las moléculas de ácido nucleico están unidas por medio de un(os) grupo(s) de unión basado(s) en ácido nucleico o no basado(s) en ácido nucleico, es decir, la cadena antisentido y la cadena sentido son parte de un único polinucleótido que tiene una región antisentido y región sentido que se pliegan para formar una región de dúplex (por ejemplo, para formar una estructura de "horquilla" tal como se conoce bien en la técnica). Tales moléculas de ácido nucleico ANip pueden ser un polinucleótido con un estructura secundaria de dúplex, dúplex asimétrico, horquilla u horquilla asimétrica, que tiene regiones sentido y antisentido complementarias entre sí, en las que la región antisentido incluye una secuencia de nucleótidos que es complementaria a la secuencia de nucleótidos en una molécula de ácido nucleico diana separada o una parte de la misma y la región sentido tiene una secuencia de nucleótidos correspondiente a la secuencia de ácido nucleico diana (por ejemplo, una secuencia de ARNm de hsp47). Tales moléculas de ácido nucleico ANip pueden ser un polinucleótido monocatenario circular que tiene dos o más estructuras de bucle y un tallo que comprende regiones sentido y antisentido complementarias entre sí, en las que la región antisentido incluye una secuencia de nucleótidos que es complementaria a una secuencia de nucleótidos en una molécula de ácido nucleico diana o una parte de la misma y la región sentido tiene una secuencia de nucleótidos correspondiente a la secuencia de ácido nucleico diana o una parte de la misma, y en las que el polinucleótido circular puede procesarse o bien *in vivo* o bien *in vitro* para generar una molécula de ácido nucleico activa capaz de mediar en iARN.

Con frecuencia se usa la siguiente nomenclatura en la técnica para describir longitudes y proyecciones de moléculas de ANip y puede usarse a lo largo de toda la memoria descriptiva y los ejemplos. En todas las descripciones de oligonucleótidos en el presente documento, la identificación de nucleótidos en una secuencia se facilita en el sentido de 5' a 3' para cadenas tanto sentido como antisentido. Los nombres facilitados a los dúplex indican la longitud de los oligómeros y la presencia o ausencia de proyecciones. Por ejemplo, un dúplex "21+2" contiene dos cadenas de ácido nucleico, teniendo ambas 21 nucleótidos de longitud, también denominado dúplex de ARNip de 21 meros o ácido nucleico de 21 meros y que tiene una proyección de 2 nucleótidos en 3'. Un diseño "21-2" se refiere a un dúplex de ácido nucleico de 21 meros con una proyección de 2 nucleótidos en 5'. Un diseño 21-0 es un dúplex de ácido nucleico de 21 meros sin proyecciones (romo). Un "21+2UU" es un dúplex de 21 meros con una proyección de 2 nucleótidos en 3' y los 2 nucleótidos terminales en los extremos 3' son ambos residuos de U (lo cual puede dar como resultado apareamiento erróneo con la secuencia diana). La nomenclatura mencionada anteriormente puede aplicarse a moléculas de ANip de diversas longitudes de cadenas, dúplex y proyecciones (tal como 19-0, 21+2, 27+2, y similares). En una nomenclatura alternativa pero similar, un "25/27" es un dúplex asimétrico que tiene una cadena sentido de 25 bases y una cadena antisentido de 27 bases con una proyección de 2 nucleótidos en 3'. Un "27/25" es un dúplex asimétrico que tiene una cadena sentido de 27 bases y una cadena antisentido de 25 bases.

#### 40 Modificaciones químicas

En determinados aspectos y realizaciones, las moléculas de ácido nucleico (por ejemplo, moléculas de ANip) tal como se proporcionan en el presente documento incluyen una o más modificaciones (o modificaciones químicas). En determinadas realizaciones, tales modificaciones incluyen cualquier cambio a una molécula de ácido nucleico o polinucleótido que hará que la molécula sea diferente de un ribonucleótido o molécula de ARN convencional (es decir, que incluye restos de adenosina, citosina, uracilo o guanosina convencionales); que puede denominarse ribonucleótido "no modificado" o ácido ribonucleico no modificado. Las bases y los polinucleótidos de ADN tradicionales que tienen un 2'-desoxi-azúcar representado por restos de adenosina, citosina, timina o guanosina pueden denominarse "desoxirribonucleótido no modificado" o "ácido desoxirribonucleico no modificado"; por consiguiente, el término "nucleótido no modificado" o "ácido nucleico no modificado" tal como se usa en el presente documento se refiere a un "ribonucleótido no modificado" o "ácido ribonucleico no modificado" a menos que se indique claramente lo contrario. Tales modificaciones pueden ser en el azúcar de nucleótido, base de nucleótido, grupo fosfato de nucleótido y/o la estructura principal de fosfato de un polinucleótido.

55 En determinadas realizaciones, pueden usarse modificaciones tal como se divulga en el presente documento para aumentar la actividad de iARN de una molécula y/o para aumentar la estabilidad *in vivo* de las moléculas, particularmente la estabilidad en suero, y/o para aumentar la biodisponibilidad de las moléculas. Los ejemplos no limitativos de modificaciones incluyen uniones internucleotídicas o internucleosídicas; desoxinucleótidos o didesoxirribonucleótidos en cualquier posición y cadena de la molécula de ácido nucleico; ácido nucleico (por ejemplo, ácido ribonucleico) con una modificación en la posición 2' seleccionada preferiblemente de un amino, fluoro, metoxilo, alcoxilo y alquilo; 2'-desoxirribonucleótidos, 2'OMe-ribonucleótidos, 2'-desoxi-2'-fluoro-ribonucleótidos, nucleótidos de "base universal", nucleótidos "acíclicos", 5-C-metil-nucleótidos, grupo biotina, e incorporación de residuo abásico desoxilo invertido y/o glicerilo terminal, moléculas con impedimento estérico, tales como moléculas fluorescentes y similares. Otros modificadores de nucleótidos pueden incluir 3'-desoxiadenosina (cordicepina), 3'-azido-3'-desoxitimidina (AZT), 2',3'-didesoxiinosina (ddl), 2',3'-didesoxi-3'-tiacitidina (3TC), 2',3'-dideshidro-2',3'-didesoxitimidina (d4T) y los nucleótidos de monofosfato de 3'-azido-3'-desoxitimidina (AZT), 2',3'-

didesoxi-3'-tiacitidina (3TC) y 2',3'-dideshidro-2',3'-didesoxitimidina (d4T). A continuación, se describen más detalladamente detalles adicionales sobre diversas modificaciones.

Los nucleótidos modificados incluyen aquellos que tienen una conformación de tipo Northern (por ejemplo, ciclo de pseudorrotación de tipo Northern, véase, por ejemplo, Sanger, Principles of Nucleic Acid Structure, Springer-Verlag ed., 1984). Los ejemplos no limitativos de nucleótidos que tienen una configuración de tipo Northern incluyen nucleótidos de ANB (por ejemplo, 2'-O,4'-C-metilen-(D-ribofuranosil)-nucleótidos); 2'-metoxietoxi(MOE)-nucleótidos; 2'-metil-tio-etilo, 2'-desoxi-2'-fluoro-nucleótidos, 2'-desoxi-2'-cloro-nucleótidos, 2'-azido-nucleótidos y 2'OMe-nucleótidos. Se describen ANB, por ejemplo, en Elman *et al.*, 2005; Kurreck *et al.*, 2002; Crinelli *et al.*, 2002; Braasch y Corey, 2001; Bondensgaard *et al.*, 2000; Wahlestedt *et al.*, 2000; y los documentos WO0047599, WO9914226, WO9839352 y WO04083430. En una realización, se incorpora un ANB en el extremo 5'-terminal de la cadena sentido.

Las modificaciones químicas también incluyen ANNB, que son análogos acíclicos distintos de nucleótidos, en los que la unión C2'-C3' no está presente (aunque los ANNB no son realmente nucleótidos, se incluyen expresamente en el alcance de "nucleótidos "modificados" o ácidos nucleicos modificados tal como se contempla en el presente documento). En realizaciones particulares, pueden modificarse moléculas de ácido nucleico con una proyección para tener ANNB en las posiciones de proyección (es decir, proyección de 2 nucleótidos). En otras realizaciones, se incluyen ANNB en los extremos 3' o 5'. Un ANNB puede estar ubicado en cualquier parte a lo largo de una cadena de ácido nucleico, es decir en la posición 7. Las moléculas de ácido nucleico pueden contener uno o más ANNB. Se divulgan ANNB a modo de ejemplo en Nucleic Acids Symposium Series n.º 52 págs. 133-134 (2008). En determinadas realizaciones, las moléculas de ácido nucleico (por ejemplo, moléculas de ANip) tal como se describe en el presente documento, incluyen uno o más ANNB; o un ANNB. En algunas realizaciones, una molécula de ácido nucleico (por ejemplo, una molécula de ANip) tal como se describe en el presente documento que tiene una proyección en 3' incluye uno o dos ANNB en la proyección en 3'. En algunas realizaciones, una molécula de ácido nucleico (por ejemplo, una molécula de ANip) tal como se describe en el presente documento incluye un ANNB (por ejemplo, un UNA) en la cadena antisentido; por ejemplo, en la posición 6 o la posición 7 de la cadena antisentido. Las modificaciones químicas también incluyen análogos de nucleótido que no forman pares, por ejemplo, tal como se divulga en el presente documento. Las modificaciones químicas incluyen además restos no convencionales tal como se divulga en el presente documento.

Las modificaciones químicas también incluyen modificaciones terminales en la parte 5' y/o 3' de los oligonucleótidos y también se conocen como restos de ocupación de centros reactivos. Tales modificaciones terminales se seleccionan de un nucleótido, un nucleótido modificado, un lípido, un péptido y un azúcar.

Las modificaciones químicas también incluyen los "análogos de nucleótido de anillo de seis miembros" de seis miembros. Se divulgan ejemplos de análogos de nucleótido de anillo de seis miembros en Allart, *et al* (Nucleosides & Nucleotides, 1998, 17:1523-1526; y Perez-Perez, *et al.*, 1996, Bioorg. and Medicinal Chem Letters 6:1457-1460). En el documento WO2006047842 se divulgan oligonucleótidos que incluyen análogos de nucleótido de anillo de 6 miembros, incluyendo monómeros de nucleótidos de hexitol y altritol.

Las modificaciones químicas también incluyen nucleótidos "especulares" que tienen una quiralidad inversa en comparación con el nucleótido normal que se produce de manera natural; es decir, un nucleótido especular puede ser un análogo de "L-nucleótido" de D-nucleótido que se produce de manera natural (véase el documento US6602858). Los nucleótidos especulares pueden incluir además al menos una modificación de azúcar o base y/o una modificación de estructura principal, por ejemplo, tal como se describe en el presente documento, tal como un resto fosforotioato o fosfonato. El documento US6602858 divulga catalizadores de ácido nucleico que incluyen al menos una sustitución de L-nucleótido. Los nucleótidos especulares incluyen, por ejemplo, L-ADN (3'-fosfato de L-desoxirriboadenosina (dA especular); 3'-fosfato de L-desoxirribocitidina (dC especular); 3'-fosfato de L-desoxirriboguanosina (dG especular); 3'-fosfato de L-desoxirribotimidina (dT de imagen especular)) y L-ARN (3'-fosfato de L-riboadenosina (rA especular); 3'-fosfato de L-ribocitidina (rC especular); 3'-fosfato de L-riboguanosina (rG especular); 3'-fosfato de L-riboouracilo (dU especular)).

En algunas realizaciones, los ribonucleótidos modificados incluyen desoxirribonucleótidos modificados, por ejemplo, 5'OMe-ADN (3'-fosfato de 5-metil-desoxirriboguanosina) que pueden ser útiles como nucleótido en la posición 5'-terminal (posición número 1); PACE (3'-fosfonoacetato de desoxirriboadenosina, 3'-fosfonoacetato de desoxirribocitidina, 3'-fosfonoacetato de desoxirriboguanosina, 3'-fosfonoacetato de desoxirribotimidina).

Las modificaciones pueden estar presentes en una o más cadenas de una molécula de ácido nucleico divulgada en el presente documento, por ejemplo, en la cadena sentido, la cadena antisentido o ambas cadenas. En determinadas realizaciones, la cadena antisentido puede incluir modificaciones y la cadena sentido puede incluir solo ARN no modificado.

#### Nucleobases

Las nucleobases del ácido nucleico divulgado en el presente documento pueden incluir ribonucleótidos no

modificados (purinas y pirimidinas) tales como adenina, guanina, citosina, uracilo. Las nucleobases en una o ambas cadenas pueden modificarse con nucleobases naturales y sintéticas tales como, timina, xantina, hipoxantina, inosina, 2-aminoadenina, 6-metilo y otros derivados de alquilo de adenina y guanina, cualquier nucleótido de "base universal"; 2-propilo y otros derivados de alquilo de adenina y guanina, 5-halo-uracilo y citosina, 5-propinil-uracilo y citosina, 6-azo-uracilo, citosina y timina, 5-uracilo (pseudo-uracilo), 4-tiouracilo, 8-halo, amino, tiol, tioalquilo, hidroxilo y otras adeninas y guaninas sustituidas en 8, 5-trifluorometilo y otros uracilos y citosinas sustituidos en 5, 7-metilguanina, desazapurinas, análogos de purinas y pirimidinas sustituidos heterocíclicos, por ejemplo, aminoetiloxifenoxazina, derivados de purinas y pirimidinas (por ejemplo, derivados de 1-alquilo, 1-alquenoilo, heteroaromáticos y 1-alquinoilo) y tautómeros de los mismos, 8-oxo-N6-metiladenina, 7-diazaxantina, 5-metilcitosina, 5-metiluracilo, 5-(1-propinil)uracilo, 5-(1-propinil)citosina y 4,4-etanocitosina). Otros ejemplos de bases adecuadas incluyen bases distintas de purinilo y distintas de pirimidinilo tales como 2-aminopiridina y triazinas.

#### Restos de azúcar

Los restos de azúcar en un ácido nucleico divulgado en el presente documento pueden incluir resto de azúcar de 2'-hidroxi-pentofuranosilo sin ninguna modificación. Alternativamente, los restos de azúcar pueden estar modificados tales como, resto de azúcar de 2'-desoxi-pentofuranosilo, D-ribosa, hexosa, modificación en la posición 2' del resto de azúcar de pentofuranosilo tal como 2'-O-alquilo (incluyendo 2'OMe y 2'-O-etilo), es decir, 2'-alcoxilo, 2'-amino, 2'-O-alilo, 2'-S-alquilo, 2'-halógeno (incluyendo 2'-fluro, cloro, y bromo), 2'-metoxietoxilo, 2'-O-metoxietilo, 2'-O-2-metoxietilo, 2'-aliloxilo (-OCH<sub>2</sub>CH=CH<sub>2</sub>), 2'-propargilo, 2'-propilo, etinilo, etenilo, propenilo, CF, ciano, imidazol, carboxilato, tioato, alquilo inferior de C<sub>1</sub> a C<sub>10</sub>, alquilo inferior sustituido, alcarilo o aralquilo, OCF<sub>3</sub>, OCN, O-, S- o N-alquilo; O-, S- o N-alquenoilo; SOCH<sub>3</sub>; SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>; ONO<sub>2</sub>; NO<sub>2</sub>, N<sub>3</sub>; heterocicloalquilo; heterocicloalcarilo; aminoalquilamino; polialquilamino o sililo sustituido, tal como se describe, entre otros, por ejemplo, en las patentes europeas EP0586520 o EP0618925.

El grupo alquilo incluye grupos alifáticos saturados, incluyendo grupos alquilo de cadena lineal (por ejemplo, metilo, etilo, propilo, butilo, pentilo, hexilo, heptilo, octilo, nonilo, decilo, etc.), grupos alquilo de cadena ramificada (isopropilo, terc-butilo, isobutilo, etc.), grupos cicloalquilo (alíclicos) (ciclopropilo, ciclohexilo, cicloheptilo, ciclooctilo), grupos cicloalquilo sustituidos con alquilo, y grupos alquilo sustituidos con cicloalquilo. En determinadas realizaciones, un alquilo de cadena lineal o cadena ramificada tiene seis o menos átomos de carbono en su estructura principal (por ejemplo, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> para cadena lineal, C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> para cadena ramificada), y más preferiblemente cuatro o menos. Asimismo, los cicloalquilos preferidos pueden tener desde tres hasta ocho átomos de carbono en su estructura de anillo, y más preferiblemente tienen cinco o seis carbonos en la estructura de anillo. El término C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> incluye grupos alquilo que contienen de uno a seis átomos de carbono. El grupo alquilo puede ser un grupo alquilo sustituido tal como restos alquilo que tienen sustituyentes que sustituyen a un hidrógeno en uno o más carbonos de la estructura principal hidrocarbonada. Tales sustituyentes pueden incluir, por ejemplo, alquenoilo, alquinilo, halógeno, hidroxilo, alquilcarboniloxilo, arilcarboniloxilo, alcoxycarboniloxilo, ariloxycarboniloxilo, carboxilato, alquilcarbonilo, arilcarbonilo, alcoxycarbonilo, aminocarbonilo, alquilaminocarbonilo, dialquilaminocarbonilo, alquiltiocarbonilo, alcoxilo, fosfato, fosfonato, fosfinato, ciano, amino (incluyendo alquilamino, dialquilamino, arilamino, diarilamino y alquilarilamino), acilamino (incluyendo alquilcarbonilamino, arilcarbonilamino, carbamoilo y ureido), amidino, imino, sulfhidrilo, alquiltio, ariltio, tiocarboxilato, sulfatos, alquilsulfino, sulfonato, sulfamoilo, sulfonamido, nitro, trifluorometilo, ciano, azido, heterociclilo, alquilarilo, o un resto aromático o heteroaromático.

El grupo alcoxilo incluye grupos alquilo, alquenoilo y alquinilo sustituidos y no sustituidos unidos covalentemente a un átomo de oxígeno. Los ejemplos de grupos alcoxilo incluyen grupos metoxilo, etoxilo, isopropiloxilo, propoxilo, butoxilo y pentoxilo. Los ejemplos de grupos alcoxilo sustituidos incluyen grupos alcoxilo halogenados. Los grupos alcoxilo pueden estar sustituidos con grupos tales como alquenoilo, alquinilo, halógeno, hidroxilo, alquilcarboniloxilo, arilcarboniloxilo, alcoxycarboniloxilo, ariloxycarboniloxilo, carboxilato, alquilcarbonilo, arilcarbonilo, alcoxycarbonilo, aminocarbonilo, alquilaminocarbonilo, dialquilaminocarbonilo, alquiltiocarbonilo, alcoxilo, fosfato, fosfonato, fosfinato, ciano, amino (incluyendo alquilamino, dialquilamino, arilamino, diarilamino y alquilarilamino), acilamino (incluyendo alquilcarbonilamino, arilcarbonilamino, carbamoilo y ureido), amidino, imino, sulfhidrilo, alquiltio, ariltio, tiocarboxilato, sulfatos, alquilsulfino, sulfonato, sulfamoilo, sulfonamido, nitro, trifluorometilo, ciano, azido, heterociclilo, alquilarilo, o restos aromáticos o heteroaromáticos. Los ejemplos de grupos alcoxilo sustituidos con halógeno incluyen, pero no se limitan a, fluorometoxilo, difluorometoxilo, trifluorometoxilo, clorometoxilo, diclorometoxilo, triclorometoxilo, etc.

En algunas realizaciones, el anillo de pentafuranosilo puede sustituirse con derivados acíclicos que carecen de la unión C2'-C3' del anillo de pentafuranosilo. Por ejemplo, los aciclonucleótidos pueden sustituir el azúcar 2'-desoxirribofuranosilo normalmente presente en dNMP por un grupo 2-hidroxietoximetilo.

Los halógenos incluyen flúor, bromo, cloro, yodo.

#### Estructura principal

Las subunidades nucleosídicas del ácido nucleico divulgado en el presente documento pueden estar unidas entre sí mediante un enlace fosfodiéster. El enlace fosfodiéster puede sustituirse opcionalmente por otras uniones. Por ejemplo, fosforotioato, entidades de tiofosfato-D-ribosa, triéster, tioato, estructura principal con puente en 2'-5'

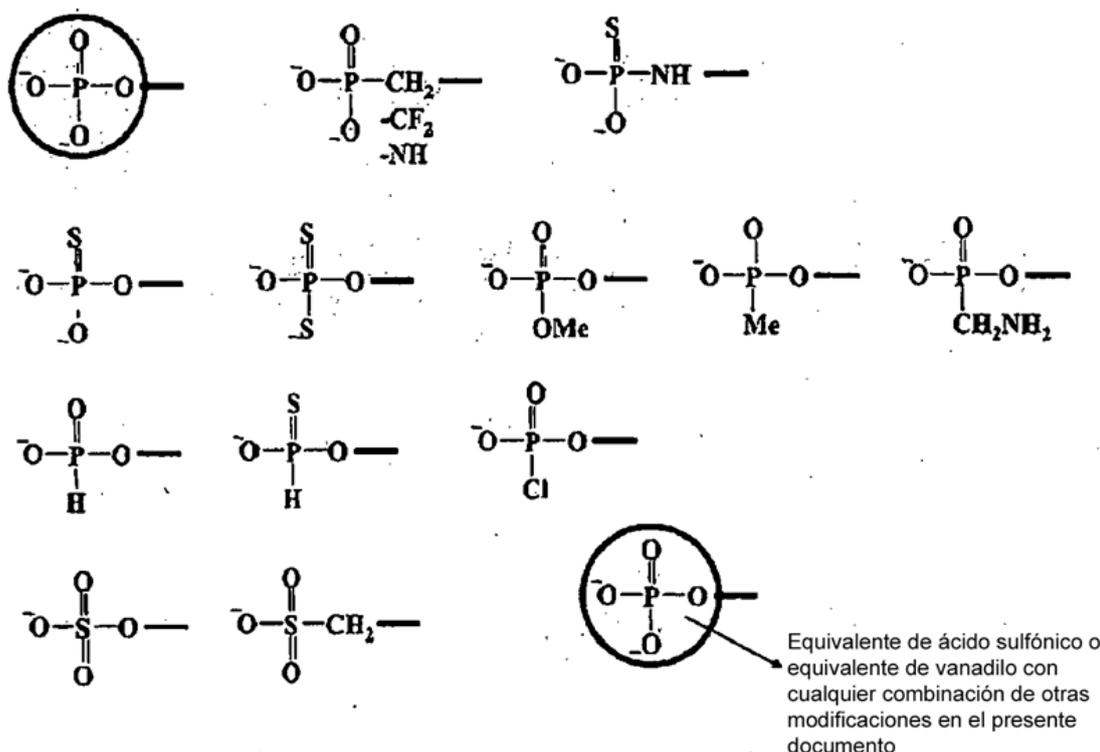
(también puede denominarse 5'-2' o 2'-5'-nucleótido o 2'-5'-ribonucleótido), PACE, 3'(o -5')-desoxi-3'(o -5')-tiofosforotioato, fosforoditioato, fosforoselenatos, 3'(o -5')-desoxifosfinatos, boranofosfatos, 3'(o -5')-desoxi-3'(o 5'-)aminofosforamidatos, hidrogenofosfonatos, fosfonatos, ésteres de boranofosfato, fosforamidatos, fosfonatos de alquilo o arilo y modificaciones de fosfotriéster tales como alquilfosfotriésteres, fosfotriéster, uniones con fósforo, 5'-etoxifosfodiéster, P-alquiloxifosfotriéster, metilfosfonato y uniones que no contienen fósforo, por ejemplo, uniones de carbonato, carbamato, sililo, azufre, sulfonato, sulfonamida, formacetal, tioformacetal, oxima, metilenoimino, metilenoetilimino, metilenoimidazolo, metilendimetilhidrazo y metilenoximetilimino.

Las moléculas de ácido nucleico divulgadas en el presente documento pueden incluir una estructura principal de ácido nucleico peptídico (ANP). La estructura principal de ANP incluye unidades de N-(2-aminoetil)-glicina de repetición unidas mediante enlaces peptídicos. Las diversas bases tales como purina, pirimidina, bases naturales y sintéticas están unidas a la estructura principal mediante enlaces de metilencarbonilo.

### Fosfatos terminales

Pueden realizarse modificaciones en los grupos fosfato terminales. Pueden usarse ejemplos no limitativos de diferentes químicas de estabilización, por ejemplo, para estabilizar el extremo 3' de secuencias de ácido nucleico, incluyendo desoxirribosa invertida (3'-3'); desoxirribonucleótido; (5'-3')-3'-desoxirribonucleótido; (5'-3')-ribonucleótido; (5'-3')-3'-O-metil-ribonucleótido; 3'-glicerilo; (3'-5')-3'-desoxirribonucleótido; (3'-3')-desoxirribonucleótido; (5'-2')-desoxirribonucleótido; y (5'-3')-didesoxirribonucleótido. Además, pueden combinarse químicas de estructura principal no modificada con una o más modificaciones de estructura principal diferentes descritas en el presente documento.

Los grupos fosfato terminales químicamente modificados a modo de ejemplo incluyen los mostrados a continuación:



### Conjugados

Los nucleótidos y las moléculas de ácido nucleico (por ejemplo, moléculas de ANip) modificados tal como se proporciona en el presente documento pueden incluir conjugados, por ejemplo, un conjugado unido covalentemente a la molécula de ácido nucleico químicamente modificada. Los ejemplos no limitativos de conjugados incluyen conjugados y ligandos descritos en Vargeese *et al.*, documento estadounidense con n.º de serie 10/427.160. El conjugado puede estar unido covalentemente a una molécula de ácido nucleico (tal como una molécula de ANip) mediante un grupo de unión biodegradable. La molécula de conjugado puede estar unida al extremo 3' de cualquiera de la cadena sentido, la cadena antisentido, o ambas cadenas de la molécula de ácido nucleico químicamente modificada. La molécula de conjugado puede estar unida al extremo 5' de cualquiera de la cadena sentido, la cadena antisentido, o ambas cadenas de la molécula de ácido nucleico químicamente modificada. La molécula de conjugado puede estar unida tanto al extremo 3' como al extremo 5' de cualquiera de la cadena sentido, la cadena antisentido, o ambas cadenas de la molécula de ácido nucleico químicamente modificada, o cualquier combinación

de las mismas. En una realización, una molécula de conjugado puede incluir una molécula que facilita el suministro de una molécula de ácido nucleico químicamente modificada en un sistema biológico, tal como una célula. En otra realización, la molécula de conjugado unida a la molécula de ácido nucleico químicamente modificada es un polietilenglicol, seroalbúmina humana, o un ligando para un receptor celular que puede mediar en la captación celular. En Vargeese *et al.*, documento estadounidense con n.º de serie 10201394 se describen ejemplos de moléculas de conjugado específicas contempladas por la presente descripción que pueden unirse a moléculas de ácido nucleico químicamente modificadas.

#### Grupos de unión

Una molécula de ácido nucleico proporcionada en el presente documento (por ejemplo, un ANip) puede incluir un grupo de unión de nucleótido, distinto de nucleótido, o mixto de nucleótido/distinto de nucleótido que une la región sentido del ácido nucleico con la región antisentido del ácido nucleico. Un grupo de unión de nucleótido puede ser un grupo de unión de  $\geq 2$  nucleótidos de longitud, por ejemplo, de aproximadamente 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 nucleótidos de longitud. El grupo de unión de nucleótido puede ser un aptámero de ácido nucleico. Por "aptámero" o "aptámero de ácido nucleico" tal como se usa en el presente documento se hace referencia a una molécula de ácido nucleico que se une específicamente a una molécula diana en la que la molécula de ácido nucleico tiene una secuencia que incluye una secuencia reconocida por la molécula diana en su entorno natural. Alternativamente, un aptámero puede ser una molécula de ácido nucleico que se une a una molécula diana (tal como ARNm de hsp47) en la que la molécula diana no se une de manera natural a un ácido nucleico. Por ejemplo, el aptámero puede usarse para unirse a un dominio de unión a ligando de una proteína, impidiendo de ese modo la interacción del ligando que se produce de manera natural con la proteína. Este es un ejemplo no limitativo y los expertos en la técnica reconocerán que pueden generarse fácilmente otras realizaciones usando técnicas generalmente conocidas en la técnica. Véase, por ejemplo, Gold *et al.*; 1995, Annu. Rev. Biochem., 64, 763; Brody y Gold, 2000, J. Biotechnol., 74, 5; Sun, 2000, Curr. Opin. Mol. Ther., 2, 100; Kusser, 2000, J. Biotechnol., 74, 27; Hermann y Patel, 2000, Science, 287, 820; y Jayasena, 1999, Clinical Chemistry, 45, 1628.

Un grupo de unión distinto de nucleótido puede incluir un nucleótido abásico, poliéter, poliamina, poliamida, péptido, hidrato de carbono, lípido, polihidrocarbano, u otros compuestos poliméricos (por ejemplo, polietilenglicoles tales como los que tienen entre 2 y 100 unidades de etilenglicol). Los ejemplos específicos incluyen los descritos por Seela y Kaiser, Nucleic Acids Res. 1990, 18:6353 y Nucleic Acids Res. 1987, 15:3113; Cload y Schepartz, J. Am. Chem. Soc. 1991, 113:6324; Richardson y Schepartz, J. Am. Chem. Soc. 1991, 113:5109; Ma *et al.*, Nucleic Acids Res. 1993, 21:2585 y Biochemistry 1993, 32:1751; Durand *et al.*, Nucleic Acids Res. 1990, 18:6353; McCurdy *et al.*, Nucleosides & Nucleotides 1991, 10:287; Jsckke *et al.*, Tetrahedron Lett. 1993, 34:301; Ono *et al.*, Biochemistry 1991, 30:9914; Arnold *et al.*, WO8902439; Usman *et al.*, documento WO9506731; Dudycz *et al.*, documento WO9511910 y Ferentz y Verdine, J. Am. Chem. Soc. 1991, 113:4000.

#### Extremos 5', extremos 3' y proyecciones

Las moléculas de ácido nucleico divulgadas en el presente documento (por ejemplo, moléculas de ANip) pueden tener extremos romos en ambos lados, tener proyecciones en ambos lados, o una combinación de extremos romos y con proyección. Pueden producirse proyecciones en el extremo o bien 5' o bien 3' de la cadena sentido o antisentido.

Los extremos 5' y/o 3' de moléculas de ácido nucleico bicatenario (por ejemplo, ANip) pueden ser extremos romos o tener una proyección. El extremo 5' puede ser un extremo romo y el extremo 3' tener una proyección o bien en la cadena sentido o bien en la cadena antisentido. En otras realizaciones, el extremo 3' puede ser un extremo romo y el extremo 5' tener una proyección o bien en la cadena sentido o bien en la cadena antisentido. En aún otras realizaciones, los extremos tanto 5' como 3' son extremos romos o los extremos tanto 5' como 3' tienen proyecciones.

El extremo 5' y/o 3' de una o ambas cadenas del ácido nucleico puede incluir un grupo hidroxilo libre. El extremo 5' y/o 3' de cualquier cadena de molécula de ácido nucleico puede estar modificado para incluir una modificación química. Tal modificación puede estabilizar moléculas de ácido nucleico, por ejemplo, el extremo 3' puede tener una estabilidad aumentada debido a la presencia de la modificación de la molécula de ácido nucleico. Los ejemplos de modificaciones de extremos (por ejemplo, grupos de ocupación de centros reactivos terminales) incluyen, pero no se limitan a, abásico, abásico desoxilo, abásico (desoxilo) invertido, glicerilo, dinucleótido, nucleótido acíclico, amino, fluoro, cloro, bromo, CN, CF, metoxilo, imidazol, carboxilato, tioato, alquilo inferior de C<sub>1</sub> a C<sub>10</sub>, alquilo inferior sustituido, alcarilo o aralquilo, OCF<sub>3</sub>, OCN, O-, S- o N-alquilo; O-, S- o N-alquenilo; SOCH<sub>3</sub>; SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>; ONO<sub>2</sub>; NO<sub>2</sub>, N<sub>3</sub>; heterocicloalquilo; heterocicloalcarilo; aminoalquilamino; polialquilamino o sililo sustituido, tal como se describe, entre otros, en las patentes europeas EP586520 y EP618925 y otras modificaciones divulgadas en el presente documento.

Las moléculas de ácido nucleico incluyen aquellas con extremos romos, es decir, extremos que no incluyen ningún nucleótido de proyección. Una molécula de ácido nucleico puede incluir uno o más extremos romos. La molécula de ácido nucleico con extremos romos tiene un número de pares de bases igual al número de nucleótidos presentes en

cada cadena de la molécula de ácido nucleico. La molécula de ácido nucleico puede incluir un extremo romo, por ejemplo, en la que el extremo 5' de la cadena antisentido y el extremo 3' de la cadena sentido no tienen ningún nucleótido de proyección. La molécula de ácido nucleico puede incluir un extremo romo, por ejemplo, en la que el extremo 3' de la cadena antisentido y el extremo 5' de la cadena sentido no tienen ningún nucleótido de proyección. Una molécula de ácido nucleico puede incluir dos extremos romos, por ejemplo, en la que el extremo 3' de la cadena antisentido y el extremo 5' de la cadena sentido así como el extremo 5' de la cadena antisentido y extremo 3' de la cadena sentido no tienen ningún nucleótido de proyección. Otros nucleótidos presentes en una molécula de ácido nucleico con extremos romos pueden incluir, por ejemplo, apareamientos erróneos, abombamientos, bucles, o pares de bases con titubeo para modular la actividad de la molécula de ácido nucleico para mediar en la interferencia de ARN.

En determinadas realizaciones de las moléculas de ácido nucleico (por ejemplo, moléculas de ANip) proporcionadas en el presente documento, al menos un extremo de la molécula tiene una proyección de al menos un nucleótido (por ejemplo, de uno a ocho nucleótidos de proyección). Por ejemplo, una o ambas cadenas de una molécula de ácido nucleico bicatenario divulgada en el presente documento pueden tener una proyección en el extremo 5' o en el extremo 3' o ambos. Puede estar presente una proyección en cualquiera o ambas de la cadena sentido y la cadena antisentido de la molécula de ácido nucleico. La longitud de la proyección puede ser de tan solo un nucleótido y de hasta uno a ocho o más nucleótidos (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 nucleótidos; en algunas realizaciones preferidas, una proyección tiene 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 nucleótidos; por ejemplo, una proyección puede tener 2 nucleótidos). El/los nucleótido(s) que forma(n) la proyección puede(n) incluir desoxirribonucleótido(s), ribonucleótido(s), nucleobases naturales y no naturales o cualquier nucleótido modificado en el azúcar, la base o el grupo fosfato tal como se divulga en el presente documento. Una molécula de ácido nucleico bicatenario puede tener proyecciones tanto 5' como 3'. Las proyecciones en el extremo 5' y 3' pueden tener diferentes longitudes. Una proyección puede incluir al menos una modificación de ácido nucleico que puede ser un desoxirribonucleótido. Puede haber uno o más desoxirribonucleótidos en el extremo 5'-terminal. El extremo 3' de la cadena contraria respectiva de la molécula de ácido nucleico puede no tener una proyección, más preferiblemente no una proyección de desoxirribonucleótidos. El uno o más desoxirribonucleótidos pueden estar en el extremo 3'-terminal. El extremo 5' de la cadena contraria respectiva del ARNbc puede no tener una proyección, más preferiblemente no una proyección de desoxirribonucleótidos. La proyección en el extremo o bien 5' o bien 3' de una cadena puede tener de uno a ocho (por ejemplo, aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8) nucleótidos que no forman pares, preferiblemente, la proyección tiene de dos a tres nucleótidos que no forman pares; más preferiblemente dos nucleótidos que no forman pares. Las moléculas de ácido nucleico pueden incluir moléculas de ácido nucleico de dúplex con extremos con proyección de aproximadamente 1 a aproximadamente 20 (por ejemplo, aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20); preferiblemente de uno a ocho (por ejemplo, aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8) nucleótidos, por ejemplo, dúplex de aproximadamente 21 nucleótidos con aproximadamente 19 pares de bases y proyecciones de mononucleótidos, dinucleótidos o trinucleótidos 3'-terminales. Las moléculas de ácido nucleico en el presente documento pueden incluir moléculas de ácido nucleico de dúplex con extremos romos, en las que ambos extremos son romos, o alternativamente, en las que uno de los extremos es romo. Las moléculas de ácido nucleico divulgadas en el presente documento pueden incluir uno o más extremos romos, es decir en las que un extremo romo no tiene ningún nucleótido de proyección. En una realización, la molécula de ácido nucleico con extremos romos tiene un número de pares de bases igual al número de nucleótidos presentes en cada cadena de la molécula de ácido nucleico. La molécula de ácido nucleico puede incluir un extremo romo, por ejemplo, en la que el extremo 5' de la cadena antisentido y el extremo 3' de la cadena sentido no tienen ningún nucleótido de proyección. La molécula de ácido nucleico puede incluir un extremo romo, por ejemplo, en la que el extremo 3' de la cadena antisentido y el extremo 5' de la cadena sentido no tienen ningún nucleótido de proyección. Una molécula de ácido nucleico puede incluir dos extremos romos, por ejemplo, en la que el extremo 3' de la cadena antisentido y el extremo 5' de la cadena sentido así como el extremo 5' de la cadena antisentido y extremo 3' de la cadena sentido no tienen ningún nucleótido de proyección. En determinadas realizaciones preferidas los compuestos de ácido nucleico tienen extremos romos. Otros nucleótidos presentes en una molécula de ANip con extremos romos pueden incluir, por ejemplo, apareamientos erróneos, abombamientos, bucles o pares de bases con titubeo para modular la actividad de la molécula de ácido nucleico para mediar en la interferencia de ARN.

En muchas realizaciones uno o más, o todos, de los nucleótidos de proyección de una molécula de ácido nucleico (por ejemplo, una molécula de ANip) tal como se describe en el presente documento están modificados tal como se describe en el presente documento; por ejemplo, uno o más, o todos, de los nucleótidos pueden ser 2'-desoxinucleótidos.

#### Cantidad, ubicación y patrones de modificaciones

Las moléculas de ácido nucleico (por ejemplo, moléculas de ANip) divulgadas en el presente documento pueden incluir nucleótidos modificados como porcentaje del número total de nucleótidos presentes en la molécula de ácido nucleico. Como tal, una molécula de ácido nucleico puede incluir de aproximadamente el 5 % a aproximadamente el 100 % de nucleótidos modificados (por ejemplo, aproximadamente el 5 %, el 10 %, el 15 %, el 20 %, el 25 %, el 30 %, el 35 %, el 40 %, el 45 %, el 50 %, el 55 %, el 60 %, el 65 %, el 70 %, el 75 %, el 80 %, el 85 %, el 90 %, el 95 % o el 100 % de nucleótidos modificados). El porcentaje real de nucleótidos modificados presentes en una molécula de ácido nucleico dada dependerá del número total de nucleótidos presentes en el ácido nucleico. Si la

molécula de ácido nucleico es monocatenaria, el porcentaje de modificación puede basarse en el número total de nucleótidos presentes en la molécula de ácido nucleico monocatenaria. Asimismo, si la molécula de ácido nucleico es bicatenaria, el porcentaje de modificación puede basarse en el número total de nucleótidos presentes en la cadena sentido, cadena antisentido, o las cadenas tanto sentido como antisentido.

5 Las moléculas de ácido nucleico divulgadas en el presente documento pueden incluir ARN no modificado como porcentaje de los nucleótidos totales en la molécula de ácido nucleico. Como tal, una molécula de ácido nucleico puede incluir de aproximadamente el 5 % a aproximadamente el 100 % de nucleótidos modificados (por ejemplo, aproximadamente el 5 %, el 10 %, el 15 %, el 20 %, el 25 %, el 30 %, el 35 %, el 40 %, el 45 %, el 50 %, el 55 %, el 60 %, el 65 %, el 70 %, el 75 %, el 80 %, el 85 %, el 90 %, el 95 % o el 100 % de los nucleótidos totales presentes en una molécula de ácido nucleico).

15 Una molécula de ácido nucleico (por ejemplo, una molécula de ANip) puede incluir una cadena sentido que incluye de aproximadamente una a aproximadamente cinco, de manera específica aproximadamente 1, 2, 3, 4 o 5 uniones internucleotídicas de fosforotioato, y/o uno o más (por ejemplo, aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, o más) 2'-desoxilo, 2'OMe, 2'-desoxi-2'-fluoro, y/o uno o más (por ejemplo, aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, o más) nucleótidos universales con bases modificadas, y opcionalmente una molécula de ocupación de centros reactivos terminal en el extremo 3', el extremo 5', o los extremos tanto 3' como 5' de la cadena sentido; y en la que la cadena antisentido incluye de aproximadamente una a aproximadamente cinco o más, de manera específica aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, o más uniones internucleotídicas de fosforotioato, y/o uno o más (por ejemplo, aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más) 2'-desoxilo, 2'OMe, 2'-desoxi-2'-fluoro, y/o uno o más (por ejemplo, aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más) nucleótidos universales con bases modificadas, y opcionalmente una molécula de ocupación de centros reactivos terminal en el extremo 3', el extremo 5', o los extremos tanto 3' como 5' de la cadena antisentido. Una molécula de ácido nucleico puede incluir aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, o más, nucleótidos de pirimidina de la cadena de ácido nucleico sentido y/o antisentido que están químicamente modificados con 2'-desoxi, 2'OMe y/o 2'-desoxi-2'-fluoro-nucleótidos, con o sin de aproximadamente una a aproximadamente cinco o más, por ejemplo, aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, o más uniones internucleotídicas de fosforotioato y/o una molécula de ocupación de centros reactivos terminal en el extremo 3', el extremo 5', o los extremos tanto 3' como 5', que está presente en la misma cadena o una cadena diferente.

30 Una molécula de ácido nucleico puede incluir de aproximadamente una a aproximadamente cinco o más (de manera específica aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, o más) uniones internucleotídicas de fosforotioato en cada cadena de la molécula de ácido nucleico.

35 Una molécula de ácido nucleico puede incluir uniones internucleotídicas 2'-5', por ejemplo, en el extremo 3', el extremo 5', o los extremos tanto 3' como 5' de una o ambas cadenas de secuencia de ácido nucleico. Además, la(s) unión/uniones internucleotídica(s) 2'-5' puede(n) estar presente(s) en diversas otras posiciones dentro de una o ambas cadenas de secuencia de ácido nucleico, por ejemplo, aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, o más incluyendo cada unión internucleotídica de un nucleótido de pirimidina en una o ambas cadenas de la molécula de ANip puede incluir una unión internucleotídica 2'-5', o aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, o más incluyendo cada unión internucleotídica de un nucleótido de purina en una o ambas cadenas de la molécula de ANip puede incluir una unión internucleotídica 2'-5'.

45 Una molécula de ácido nucleico de interferencia pequeño (ANip) químicamente modificada puede incluir una región antisentido, en la que cualquier (por ejemplo, uno o más o todos) nucleótido de pirimidina presente en la región antisentido es nucleótido de 2'-desoxi-2'-fluoro-pirimidina (por ejemplo, en la que todos los nucleótidos de pirimidina son nucleótidos de 2'-desoxi-2'-fluoro-pirimidina o alternativamente una pluralidad de nucleótidos de pirimidina son nucleótidos de 2'-desoxi-2'-fluoro-pirimidina), y en la que cualquier (por ejemplo, uno o más o todos) nucleótido de purina presente en la región antisentido es nucleótido de 2'-desoxi-purina (por ejemplo, en la que todos los nucleótidos de purina son nucleótidos de 2'-desoxi-purina o alternativamente una pluralidad de nucleótidos de purina son nucleótidos de 2'-desoxi-purina).

50 Una molécula de ácido nucleico de interferencia pequeño (ANip) químicamente modificada puede incluir una región antisentido, en la que cualquier (por ejemplo, uno o más o todos) nucleótido de pirimidina presente en la región antisentido es nucleótido de 2'-desoxi-2'-fluoro-pirimidina (por ejemplo, en la que todos los nucleótidos de pirimidina son nucleótidos de 2'-desoxi-2'-fluoro-pirimidina o alternativamente una pluralidad de nucleótidos de pirimidina son nucleótidos de 2'-desoxi-2'-fluoro-pirimidina), y en la que cualquier (por ejemplo, uno o más o todos) nucleótido de purina presente en la región antisentido es nucleótido de 2'OMe-purina (por ejemplo, en la que todos los nucleótidos de purina son nucleótidos de 2'OMe-purina o alternativamente una pluralidad de nucleótidos de purina son nucleótidos de 2'OMe-purina).

60 Una molécula de ANip químicamente modificada capaz de mediar en la interferencia de ARN (iARN) frente a hsp47 dentro de una célula o sistema *in vitro* reconstituido puede incluir una región sentido, en la que uno o más nucleótidos de pirimidina presentes en la región sentido son nucleótidos de 2'-desoxi-2'-fluoro-pirimidina (por ejemplo, en la que todos los nucleótidos de pirimidina son nucleótidos de 2'-desoxi-2'-fluoro-pirimidina o alternativamente una pluralidad de nucleótidos de pirimidina son nucleótidos de 2'-desoxi-2'-fluoro-pirimidina), y uno

o más nucleótidos de purina presentes en la región sentido son nucleótidos de 2'-desoxi-purina (por ejemplo, en la que todos los nucleótidos de purina son nucleótidos de 2'-desoxi-purina o alternativamente una pluralidad de nucleótidos de purina son nucleótidos de 2'-desoxi-purina), y una región antisentido, en la que uno o más nucleótidos de pirimidina presentes en la región antisentido son nucleótidos de 2'-desoxi-2'-fluoro-pirimidina (por ejemplo, en la que todos los nucleótidos de pirimidina son nucleótidos de 2'-desoxi-2'-fluoro-pirimidina o alternativamente una pluralidad de nucleótidos de pirimidina son nucleótidos de 2'-desoxi-2'-fluoro-pirimidina), y uno o más nucleótidos de purina presentes en la región antisentido son nucleótidos de 2'OMe-purina (por ejemplo, en la que todos los nucleótidos de purina son nucleótidos de 2'OMe-purina o alternativamente una pluralidad de nucleótidos de purina son nucleótidos de 2'OMe-purina). La región sentido y/o la región antisentido pueden tener una modificación de ocupación de centros reactivos terminal, tal como cualquier modificación que está opcionalmente presente en el extremo 3', el extremo 5', o los extremos tanto 3' como 5' de la secuencia sentido y/o antisentido. La región sentido y/o antisentido puede incluir opcionalmente además una proyección de nucleótidos 3'-terminal que tiene de aproximadamente 1 a aproximadamente 4 (por ejemplo, aproximadamente 1, 2, 3 o 4) 2'-desoxinucleótidos. Los nucleótidos de proyección pueden incluir además una o más (por ejemplo, aproximadamente 1, 2, 3, 4 o más) uniones internucleotídicas de fosforotioato, fosfonoacetato y/o tiofosfonoacetato. Los nucleótidos de purina en la región sentido pueden ser alternativamente nucleótidos de 2'OMe-purina (por ejemplo, en la que todos los nucleótidos de purina son nucleótidos de 2'OMe-purina o alternativamente una pluralidad de nucleótidos de purina son nucleótidos de 2'OMe-purina) y uno o más nucleótidos de purina presentes en la región antisentido son nucleótidos de 2'OMe-purina (por ejemplo, en la que todos los nucleótidos de purina son nucleótidos de 2'OMe-purina o alternativamente una pluralidad de nucleótidos de purina son nucleótidos de 2'OMe-purina). Uno o más nucleótidos de purina en la región sentido pueden ser alternativamente ribonucleótidos de purina (por ejemplo, en la que todos los nucleótidos de purina son ribonucleótidos de purina o alternativamente una pluralidad de nucleótidos de purina son ribonucleótidos de purina) y cualquier nucleótido de purina presente en la región antisentido es nucleótido de 2'OMe-purina (por ejemplo, en la que todos los nucleótidos de purina son nucleótidos de 2'OMe-purina o alternativamente una pluralidad de nucleótidos de purina son nucleótidos de 2'OMe-purina). Uno o más nucleótidos de purina en la región sentido y/o presentes en la región antisentido pueden seleccionarse alternativamente del grupo que consiste en 2'-desoxi-nucleótidos, nucleótidos de ANB, 2'-metoxietil-nucleótidos, 4'-tionucleótidos, y 2'OMe-nucleótidos (por ejemplo, en la que todos los nucleótidos de purina se seleccionan del grupo que consiste en 2'-desoxi-nucleótidos, nucleótidos de ANB, 2'-metoxietil-nucleótidos, 4'-tionucleótidos, y 2'OMe-nucleótidos o alternativamente una pluralidad de nucleótidos de purina se seleccionan del grupo que consiste en 2'-desoxi-nucleótidos, nucleótidos de ANB, 2'-metoxietil-nucleótidos, 4'-tionucleótidos, y 2'OMe-nucleótidos).

En algunas realizaciones, una molécula de ácido nucleico (por ejemplo, una molécula de ANip) tal como se describe en el presente documento incluye un nucleótido modificado (por ejemplo, un nucleótido modificado) en la cadena antisentido; por ejemplo, en la posición 6 o la posición 7 de la cadena antisentido.

#### Patrones de modificación y modificaciones alternantes

Las moléculas de ácido nucleico (por ejemplo, moléculas de ANip) proporcionadas en el presente documento pueden tener patrones de ácidos nucleicos modificados y no modificados. Un patrón de modificación de los nucleótidos en un tramo contiguo de nucleótidos puede ser una modificación contenida dentro de un único nucleótido o grupo de nucleótidos que están unidos covalentemente entre sí a través de enlaces fosfodiéster convencionales o, al menos parcialmente, a través de enlaces fosforotioato. Por consiguiente, no se necesita necesariamente que un "patrón", tal como se contempla en el presente documento, implique unidades de repetición, aunque puede ser así. Los ejemplos de patrones de modificación que pueden usarse junto con las moléculas de ácido nucleico (por ejemplo, moléculas de ANip) proporcionadas en el presente documento incluyen aquellos divulgados en Giese, documento US7452987. Por ejemplo, las moléculas de ácido nucleico (por ejemplo, moléculas de ANip) proporcionadas en el presente documento incluyen aquellas con patrones de modificación tales como, similares a, o los mismos que, los patrones mostrados esquemáticamente en la figura 2 del documento US7452987.

Puede haber un nucleótido modificado o grupo de nucleótidos modificados en el extremo 5' o el extremo 3' de la cadena sentido o antisentido, un nucleótido o grupo de nucleótidos flanqueante está dispuesto a ambos lados del nucleótido o grupo modificado, en el que el nucleótido o grupo flanqueante o bien no está modificado o bien no tiene la misma modificación del nucleótido o grupo de nucleótidos anterior. Sin embargo, el nucleótido o grupo de nucleótidos flanqueante puede tener una modificación diferente. Esta secuencia de nucleótido modificado o grupo de nucleótidos modificados, respectivamente, y nucleótido no modificado o modificado de manera diferente o grupo de nucleótidos no modificados o modificados de manera diferente puede repetirse una o más veces.

En algunos patrones, el nucleótido 5'-terminal de una cadena es un nucleótido modificado mientras que en otros patrones el nucleótido 5'-terminal de una cadena es un nucleótido no modificado. En algunos patrones, el extremo 5' de una cadena comienza con un grupo de nucleótidos modificados mientras que en otros patrones, el extremo 5'-terminal es un grupo de nucleótidos no modificados. Este patrón puede estar o bien en el primer tramo o bien en el segundo tramo de la molécula de ácido nucleico o bien en ambos.

Los nucleótidos modificados de una cadena de la molécula de ácido nucleico pueden ser complementarios en la posición a los nucleótidos o grupos de nucleótidos modificados o no modificados de la otra cadena.

Puede haber un desplazamiento de fase entre modificaciones o patrones de modificaciones en una cadena con respecto al patrón de modificación de la otra cadena de tal manera que los grupos de modificación no se solapan. En un caso, el desplazamiento es tal que el grupo de nucleótidos modificados de la cadena sentido corresponde al grupo de nucleótidos no modificados de la cadena antisentido y viceversa.

Puede haber un desplazamiento parcial del patrón de modificación de tal manera que los grupos modificados se solapan. Los grupos de nucleótidos modificados en cualquier cadena dada pueden tener opcionalmente la misma longitud, pero pueden tener longitudes diferentes. De manera similar, los grupos de nucleótidos no modificados en cualquier cadena dada pueden tener opcionalmente la misma longitud, o longitudes diferentes.

En algunos patrones, el segundo (penúltimo) nucleótido en el extremo terminal de la cadena es un nucleótido no modificado o el comienzo de un grupo de nucleótidos no modificados. Preferiblemente, este nucleótido no modificado o grupo de nucleótidos no modificados está ubicado en el extremo 5' de cualquiera o ambas de las cadenas sentido y antisentido e incluso más preferiblemente en el extremo terminal de la cadena sentido. Un nucleótido no modificado o grupo de nucleótidos no modificados puede estar ubicado en el extremo 5' de la cadena sentido. En una realización preferida el patrón consiste en nucleótidos modificados y no modificados individuales alternantes.

Algunas moléculas de ácido nucleico bicatenario incluyen un nucleótido modificado con 2'OMe y un nucleótido no modificado, preferiblemente un nucleótido que no está modificado con 2'OMe, se incorporan en ambas cadenas de manera alternante, dando como resultado un patrón de nucleótidos modificados con 2'OMe y nucleótidos que o bien no están modificados o bien al menos no incluyen una modificación con 2'OMe alternantes. En determinadas realizaciones, la misma secuencia de modificación con 2'OMe y sin modificación existe en la segunda cadena; en otras realizaciones los nucleótidos modificados con 2'OMe alternantes solo están presentes en la cadena sentido y no están presentes en la cadena antisentido; y en aún otras realizaciones los nucleótidos modificados con 2'OMe alternantes solo están presentes en la cadena sentido y no están presentes en la cadena antisentido. En determinadas realizaciones, existe un desplazamiento de fase entre las dos cadenas de tal manera que el nucleótido modificado con 2'OMe en la primera cadena forma pares de bases con un(os) nucleótido(s) no modificado(s) en la segunda cadena y viceversa. Esta disposición particular, es decir la formación de pares de bases de nucleótido(s) modificado(s) con 2'OMe y no modificado(s) en ambas cadenas, se prefiere particularmente en determinadas realizaciones. En determinadas realizaciones, el patrón de nucleótidos modificados con 2'OMe alternantes existe a lo largo de toda la molécula de ácido nucleico; o toda la región de dúplex. En otras realizaciones el patrón de nucleótidos modificados con 2'OMe alternantes solo existe en una parte del ácido nucleico; o toda la región de dúplex.

En patrones con "desplazamiento de fase", puede preferirse si la cadena antisentido comienza con un nucleótido modificado con 2'OMe en el extremo 5' mientras que por consiguiente el segundo nucleótido no está modificado, el tercero, quinto, séptimo nucleótidos, y así sucesivamente, están por tanto de nuevo modificados con 2'OMe mientras que el segundo, cuarto, sexto, octavo y similares nucleótidos son nucleótidos no modificados.

#### Patrones y ubicaciones de modificación

Aunque se proporcionan patrones a modo de ejemplo con más detalle a continuación, se contemplan todas las permutaciones de patrones con todas las características posibles de las moléculas de ácido nucleico divulgadas en el presente documento y las conocidas en la técnica (por ejemplo, las características incluyen, pero no se limitan a, longitud de cadena sentido, longitud de cadena antisentido, longitud de región de dúplex, longitud de proyección, si uno o ambos extremos de una molécula de ácido nucleico bicatenario son romos o tienen una proyección, ubicación de ácido nucleico modificado, número de ácidos nucleicos modificados, tipos de modificaciones, si una molécula de ácido nucleico con proyección doble tiene el mismo número o un número diferente de nucleótidos en la proyección de cada lado, si se usa uno o más de un tipo de modificación en una molécula de ácido nucleico, y el número de nucleótidos modificados/no modificados contiguos). Con respecto a todos los ejemplos detallados proporcionados a continuación, aunque se muestra que la región de dúplex tiene 19 nucleótidos, las moléculas de ácido nucleico proporcionadas en el presente documento pueden tener una región de dúplex que oscila entre 1 y 49 nucleótidos de longitud ya que cada cadena de una región de dúplex puede tener independientemente 17-49 nucleótidos de longitud. En el presente documento se proporcionan patrones a modo de ejemplo.

Las moléculas de ácido nucleico pueden tener un extremo romo (cuando n es 0) en ambos extremos que incluyen un conjunto único o contiguo de ácidos nucleicos modificados. El ácido nucleico modificado puede estar ubicado en cualquier posición a lo largo de la cadena sentido o antisentido. Las moléculas de ácido nucleico pueden incluir un grupo de aproximadamente 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, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40; 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48 o 49 nucleótidos modificados contiguos. Los ácidos nucleicos modificados pueden constituir el 1 %, el 2 %, el 3 %, el 5 %, el 10 %, el 15 %, el 20 %, el 25 %, el 30 %, el 35 %, el 40 %, el 45 %, el 50 %, el 55 %, el 60 %, el 65 %, el 70 %, el 75 %, el 80 %, el 85 %, el 90 %, el 95 %, el 97 %, el 98 % o el 100 % de una cadena de ácido nucleico. Los ácidos nucleicos modificados de los ejemplos inmediatamente a continuación pueden estar solo en la cadena sentido, solo en la

cadena antisentido o en la cadena tanto sentido como antisentido.

5 A continuación se muestran patrones de ácido nucleico generales en los que X = nucleótido de cadena sentido en la región de dúplex; X<sub>a</sub> = nucleótido de proyección en 5' en la cadena sentido; X<sub>b</sub> = nucleótido de proyección en 3' en la cadena sentido; Y = nucleótido de cadena antisentido en la región de dúplex; Y<sub>a</sub> = nucleótido de proyección en 3' en la cadena antisentido; Y<sub>b</sub> = nucleótido de proyección en 5' en la cadena antisentido; y M = un nucleótido modificado en la región de dúplex. Cada a y b son independientemente de 0 a 8 (por ejemplo, 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8). Cada X, Y, a y b están independientemente modificados o no modificados. Las cadenas sentido y antisentido pueden tener cada una independientemente 17-49 nucleótidos de longitud. Los ejemplos proporcionados a continuación tienen una región de dúplex de 19 nucleótidos; sin embargo, las moléculas de ácido nucleico divulgadas en el presente documento pueden tener una región de dúplex en cualquier punto entre 17 y 49 nucleótidos y en las que cada cadena tiene independientemente entre 17 y 49 nucleótidos de longitud.

15 5' X<sub>a</sub>XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX<sub>b</sub>  
3' Y<sub>b</sub>YYYYYYYYYYYYYYYYYYY<sub>a</sub>

20 A continuación se muestran patrones de moléculas de ácido nucleico a modo de ejemplo adicionales en los que X = nucleótidos de cadena sentido no modificados; x = un nucleótido de proyección no modificado en la cadena sentido; Y = nucleótidos de cadena antisentido no modificados; y = un nucleótido de proyección no modificado en la cadena antisentido; y M = un nucleótido modificado. Las cadenas sentido y antisentido pueden tener cada una independientemente 17-49 nucleótidos de longitud. Los ejemplos proporcionados a continuación tienen una región de dúplex de 19 nucleótidos; sin embargo, las moléculas de ácido nucleico divulgadas en el presente documento pueden tener una región de dúplex en cualquier punto entre 17 y 49 nucleótidos y en la que cada cadena tiene independientemente entre 17 y 49 nucleótidos de longitud.

5' M<sub>n</sub>XXXXXXXXXXMXXXXXXXXXXM<sub>n</sub>  
3' M<sub>n</sub>YYYYYYYYYYYYYYYYYYYM<sub>n</sub>

5' XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX  
3' YYYYYYYYYYMYYYYYYYY

5' XXXXXXXXXXXMXXXXXXXXX  
3' YYYYYYYYYYYYYYYYYY

5' XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX  
3' YYYYYYYYYMMYYYYYYY

5' XXXXXXXXXXXMXXXXXXXXX  
3' YYYYYYYYYYMYYYYYYYY

5' XXXXMXXXXXXXXXXXXXXXXX  
3' YYYYYYYYYYMYYYYYYYY

5' MXXXXXXXXXXXXXXXXXX  
3' YYYYYYYYYYYYYYMYYYYY

5' XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXM  
3' YYYYYMYYYYYYYYYYYY

5' XXXXXXXXXXXMXXXXXXXXX  
3' MYYYYYYYYYYYYYYYY

5' XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX  
3' YYYYYYYYYYYYYYYYM

25 5' XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX  
3' MYYYYYYYYYYYYYYYY

5' **MMMMMMMMMMMMMMMMMMMM**  
 3' **MMMMMMMMMMMMMMMMMMMM**

5 Las moléculas de ácido nucleico pueden tener extremos romos en ambos extremos con ácidos nucleicos modificados alternantes. Los ácidos nucleicos modificados pueden estar ubicados en cualquier posición a lo largo de la cadena o bien sentido o bien antisentido.

5' **MXMXMXMXMXMXMXMXMXM**  
 3' **YMYMYMYMYMYMYMYMYMY**

5' **XXMXMXMXMXMXMXMXMXMX**  
 3' **MYMYMYMYMYMYMYMYMYMY**

5' **MMXMMXMMXMMXMMXMMXMM**  
 3' **YMMYMMYMMYMMYMMYMMYMM**

5' **XMMXMMXMMXMMXMMXMMX**  
 3' **MMYMMYMMYMMYMMYMMYMM**

5' **MMMXXMMXMMXMMXMMXMMM**  
 3' **YMMMYYMMYMMYMMYMMYMM**

5' **XXMMMXXMMMXXMMMXXMMM**  
 3' **MMMYMMMYMMMYMMMYMMM**

10 Moléculas de ácido nucleico con un extremo 5' romo y un extremo con proyección de extremo 3' con un único ácido nucleico modificado.

Moléculas de ácido nucleico con una proyección de extremo 5' y un extremo 3' romo con un único ácido nucleico modificado.

15 Las moléculas de ácido nucleico con proyecciones en ambos extremos y todas las proyecciones son ácidos nucleicos modificados. En el patrón inmediatamente a continuación, M es n número de ácidos nucleicos modificados, en el que n es un número entero de desde 0 hasta 8 (es decir, 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8).

5' **XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXM**  
 3' **MYYYYYYYYYYYYYYYYYYY**

20 Las moléculas de ácido nucleico con proyecciones en ambos extremos y algunos nucleótidos de proyección son nucleótidos modificados. En los patrones inmediatamente a continuación, M es n número de nucleótidos modificados, x es n número de nucleótidos de proyección no modificados en la cadena sentido, y es n número de nucleótidos de proyección no modificados en la cadena antisentido, en los que cada n es independientemente un número entero de desde 0 hasta 8 (es decir, 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8), y en los que cada proyección tiene como máximo 20 nucleótidos; preferiblemente como máximo 8 nucleótidos (modificados y/o no modificados).

25

5' XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXM  
3' yYYYYYYYYYYYYYYYYYYY

5' XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXMx  
3' yYYYYYYYYYYYYYYYYYYY

5' XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXMxM  
3' yYYYYYYYYYYYYYYYYYYY

5' XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXMxMx  
3' yYYYYYYYYYYYYYYYYYYY

5' XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXMxMxM  
3' yYYYYYYYYYYYYYYYYYYY

5' XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXMxMxMx  
3' yYYYYYYYYYYYYYYYYYYY

5' XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXMxMxMxM  
3' yYYYYYYYYYYYYYYYYYYY

5' XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXMxMxMxMx  
3' yYYYYYYYYYYYYYYYYYYY

5' MXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX  
3' YYYYYYYYYYYYYYYYYYy

5' xMXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX  
3' YYYYYYYYYYYYYYYYYYy

5' MxMXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX  
3' YYYYYYYYYYYYYYYYYYy

5' xMxMXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX  
3' YYYYYYYYYYYYYYYYYYy

5' MxMxMXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX  
3' YYYYYYYYYYYYYYYYYYy

5' xMxMxMXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX  
3' YYYYYYYYYYYYYYYYYYy

5' MxMxMxMXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX  
3' YYYYYYYYYYYYYYYYYYy

5' xMxMxMxMXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX  
3' YYYYYYYYYYYYYYYYYYy

5' xXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX  
3' YYYYYYYYYYYYYYYYYYM

5' xXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX  
 3' YYYYYYYYYYYYYYYYYYMy

5' xXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX  
 3' YYYYYYYYYYYYYYYYYYMyM

5' xXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX  
 3' YYYYYYYYYYYYYYYYYYMyMy

5' xXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX  
 3' YYYYYYYYYYYYYYYYYYMyMyM

5' xXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX  
 3' YYYYYYYYYYYYYYYYYYMyMyMy

5' xXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX  
 3' YYYYYYYYYYYYYYYYYYMyMyMyM

5' XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXx  
 3' MYYYYYYYYYYYYYYYYYY

5' XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXx  
 3' yMYYYYYYYYYYYYYYYYYY

5' XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXx  
 3' MyMYYYYYYYYYYYYYYYYYY

5' XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXx  
 3' yMyMYYYYYYYYYYYYYYYYYY

5' XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXx  
 3' MyMyMYYYYYYYYYYYYYYYYYY

5' XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXx  
 3' yMyMyMYYYYYYYYYYYYYYYYYY

5' XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXx  
 3' MyMyMyMYYYYYYYYYYYYYYYYYY

5' XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXx  
 3' yMyMyMyMYYYYYYYYYYYYYYYYYY

Nucleótidos modificados en el extremo 3' de la región sentido.

5' XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXM  
 3' YYYYYYYYYYYYYYYYYY

5' XXXXXXXXXXXXXXXXXXXMM  
 3' YYYYYYYYYYYYYYYYYY

5

5' XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXMMM  
3' YYYYYYYYYYYYYYYYYYYYYY

Proyección en el extremo 5' de la región sentido.

5' **M**XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX  
3' YYYYYYYYYYYYYYYYYYYYYY

5' **MM**XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX  
3' YYYYYYYYYYYYYYYYYYYYYY

5' **MMM**XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX  
3' YYYYYYYYYYYYYYYYYYYYYY

5' **MMMM**XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX  
3' YYYYYYYYYYYYYYYYYYYYYY

5' **MMMMM**XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX  
3' YYYYYYYYYYYYYYYYYYYYYY

5' **MMMMMM**XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX  
3' YYYYYYYYYYYYYYYYYYYYYY

5' **MMMMMMM**XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX  
3' YYYYYYYYYYYYYYYYYYYYYY

5' **MMMMMMMM**XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX  
3' YYYYYYYYYYYYYYYYYYYYYY

Proyección en el extremo 3' de la región antisentido.

5' XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX  
3' **M**YYYYYYYYYYYYYYYYYYYYY

5' XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX  
3' **MM**YYYYYYYYYYYYYYYYYYYY

5' XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX  
3' **MMM**YYYYYYYYYYYYYYYYYYYY

5' XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX  
3' **MMMM**YYYYYYYYYYYYYYYYYYYY

5' XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX  
3' **MMMMM**YYYYYYYYYYYYYYYYYYYY

5' XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX  
3' **MMMMMM**YYYYYYYYYYYYYYYYYYYY

5' XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX  
3' **MMMMMMM**YYYYYYYYYYYYYYYYYYYY

5' XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX  
3' **MMMMMMMM**YYYYYYYYYYYYYYYYYYYY

Nucleótido(s) modificado(s) dentro de la región sentido.

5' XXXXXXXXXXX**M**XXXXXXXXXX  
3' YYYYYYYYYYYYYYYYYYYYY

5' XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX  
3' YYYYYYYYY**M**YYYYYYYY

5' XXXXXXXXXXXXXXXXXXX**MM**  
3' YYYYYYYYYYYYYYYYYYYYY

5' XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX  
3' **MM**YYYYYYYYYYYYYYYYYYYY

A continuación se proporcionan moléculas de ácido nucleico a modo de ejemplo junto con la estructura general equivalente en línea con los símbolos usados anteriormente:

10 ARNip de siHSP47-C frente a hsp47 humana y de rata que tiene una región de dúplex de 19 nucleótidos (es decir, 19 meros) y proyecciones de 2 nucleótidos modificados (es decir, desoxinucleótido) en los extremos 3' de las cadenas sentido y antisentido.

5' GGACAGGCCUCUACAACUA**dTdT** 3'  
3' **dTdT**CCUGUCCGGAGAUGUUGAU 5'

15 5' XXXXXXXXXXXXXXXXXXX**MM**  
3' **MM**YYYYYYYYYYYYYYYYYYYY

ARNip de siHSP47-Cd frente a hsp47 humana y de rata que tiene una región de dúplex de 25 meros, una proyección de 2 nucleótidos en el extremo 3' de la cadena antisentido y 2 nucleótidos modificados en las posiciones 5'-terminal y penúltima en 5' de la cadena sentido.

5' GGACAGGCCUCUACAACUACUAC**dGdA** 3'  
3' UCCUGUCCGGAGAUGUUGAUGAUGCU 5'

20 5' XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX**MM** 3'  
3' **yy**YYYYYYYYYYYYYYYYYYYYYYYY 5'

ARNip de siHSP47-1 frente a ADNc 719-737 de hsp47 humana y de rata que tiene una región de dúplex de 19 meros, y proyecciones de 2 nucleótidos modificados (es decir, desoxinucleótido) en los extremos 3' de las cadenas sentido y antisentido.

5' CAGGCCUCUACAACUACUAdTdT 3'  
3' dTdTGUCCGGAGAUGUUGAUGAU 5'

5' XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXMM 3'  
3' MMYYYYYYYYYYYYYYYYYY 5'

ARNip de siHSP47-1d frente a ADNc 719-743 de hsp47 humana que tiene 25 meros con un extremo romo en el extremo 3' de la cadena sentido y una proyección de 2 nucleótidos en el extremo 3' de la cadena antisentido, y 2 nucleótidos modificados en las posiciones 5'-terminal y penúltima en 5' de la cadena sentido.

5' CAGGCCUCUACAACUACUACGACdGdA 3'  
3' UUGUCCGGAGAUGUUGAUGAUGCUGCU 5'

5' XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXMM 3'  
3' yyYYYYYYYYYYYYYYYYY 5'

ARNip de siHSP47-2 frente a ADNc 469-487 de hsp47 humana que tiene una región de dúplex de 19 meros, y proyecciones de 2 nucleótidos modificados (es decir, desoxinucleótido) en los extremos 3' de las cadenas sentido y antisentido.

5' GAGCACUCCAAGAUCAACUdTdT 3'  
3' dTdTUCUGAGGUUCUAGUUGA 5'

5' XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXMM 3'  
3' MMYYYYYYYYYYYYYYYYYY 5'

ARNip de siHSP47-2d frente a ADNc 469-493 de hsp47 humana que tiene una región de dúplex de 25 meros con un extremo romo en el extremo 3' de la cadena sentido y una proyección de 2 nucleótidos en el extremo 3' de la cadena antisentido, y 2 nucleótidos modificados en las posiciones 5'-terminal y penúltima en 5' de la cadena sentido.

5' GAGCACUCCAAGAUCAACUCCGdCdG 3'  
3' UUCUCGUGAGGUUCUAGUUGAAGGCGC 5'

5' XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXMM 3'  
3' yyYYYYYYYYYYYYYYYYY 5'

ARNip de rata de siHSP47-2d frente a ADNc 466-490 de Gp46 de rata que tiene una región de dúplex de 25 meros con un extremo romo en el extremo 3' de la cadena sentido y una proyección de 2 nucleótidos en el extremo 3' de la cadena antisentido, y 2 nucleótidos modificados en las posiciones 5'-terminal y penúltima en 5' de la cadena sentido.

5' GAACACUCCAAGAUCAACUCCGdAdG 3'  
3' UUCUUGUGAGGUUCUAGUUGAAGGCUC 5'

5' XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXMM 3'  
3' yyYYYYYYYYYYYYYYYYY 5'

ARNip de siHSP47-3 frente a ADNc 980-998 de hsp47 humana que tiene una región de dúplex de 19 meros, y proyecciones de 2 nucleótidos modificados (es decir, desoxinucleótido) en los extremos 3' de las cadenas sentido y antisentido.

5' CTGAGGCCATTGACAAGAAdTdT 3'  
3' dTdTGACUCCGGUAACUGUUCUU 5'

5' XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXMM 3'  
3' MMYYYYYYYYYYYYYYYYYY 5'

ARNip de siHSP47-3d frente a ADNc 980-1004 de hsp47 humana que tiene una región de dúplex de 25 meros con un extremo romo en el extremo 3' de la cadena sentido y una proyección de 2 nucleótidos en el extremo 3' de la cadena antisentido, y 2 nucleótidos modificados en las posiciones 5'-terminal y penúltima en 5' de la cadena sentido.

5'           CTGAGGCCATTGACAAGAACAAGdGdC   3'  
 3'           UUGACUCCGGUAACUGUUCUUGUCCG   5'

5'           XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXMM       3'  
 3'           yyYYYYYYYYYYYYYYYYYYYYYYYY       5'

5

ARNip de siHSP47-4 frente a ADNc 735-753 de hsp47 humana que tiene una región de dúplex de 19 meros, y proyecciones de 2 nucleótidos modificados (es decir, desoxinucleótido) en los extremos 3' de las cadenas sentido y antisentido.

5'           CUACGACGACGAGAAGGAAdTdT   3'  
 3'           dTdTGAUGCUGCUGCUCUCCUU       5'

5'           XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXMM       3'  
 3'           MMYYYYYYYYYYYYYYYYYYYY       5'

10

ARNip de siHSP47-4d frente a ADNc 735-759 de hsp47 humana que tiene una región de dúplex de 25 meros con un extremo romo en el extremo 3' de la cadena sentido y una proyección de 2 nucleótidos en el extremo 3' de la cadena antisentido, y 2 nucleótidos modificados en las posiciones 5'-terminal y penúltima en 5' de la cadena sentido.

5'           CUACGACGACGAGAAGGAAAAGCdTdG   3'  
 3'           UUGAUGCUGCUGCUCUCCUUUCGAC   5'

5'           XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXMM       3'  
 3'           yyYYYYYYYYYYYYYYYYYYYY       5'

15

ARNip de siHSP47-5 frente a ADNc 621-639 de hsp47 humana que tiene una región de dúplex de 19 meros, y proyecciones de 2 nucleótidos modificados (es decir, desoxinucleótido) en los extremos 3' de las cadenas sentido y antisentido.

5'           GCCACACUGGGAUGAGAAAdTdT   3'  
 3'           dTdTTCGGUGUGACCCUACUCUUU       5'

5'           XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXMM       3'  
 3'           MMYYYYYYYYYYYYYYYYYYYY       5'

20

ARNip de siHSP47-6 frente a ADNc 446-464 de hsp47 humana que tiene una región de dúplex de 19 meros, y proyecciones de 2 nucleótidos modificados (es decir, desoxinucleótido) en los extremos 3' de las cadenas sentido y antisentido.

5'           GCAGCAAGCAGCACUACAAAdTdT   3'  
 3'           dTdTTCGUCGUUCGUCGUGAUGUU       5'

5'           XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXMM       3'  
 3'           MMYYYYYYYYYYYYYYYYYYYY       5'

25

30

ARNip de siHSP47-7 frente a ADNc 692-710 de hsp47 humana que tiene una región de dúplex de 19 meros, y proyecciones de 2 nucleótidos modificados (es decir, desoxinucleótido) en los extremos 3' de las cadenas sentido y antisentido.

5'           CCGUGGGUGUCAUGAUGAUdTdT   3'  
 3'           dTdTGGCACCCACAGUACUACUA       5'

5'           XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXMM       3'  
 3'           MMYYYYYYYYYYYYYYYYYYYY       5'

35

Mellas y Huecos en cadenas de ácido nucleico

Las moléculas de ácido nucleico (por ejemplo, moléculas de ANip) proporcionadas en el presente documento pueden tener una cadena, preferiblemente, la cadena sentido, que tiene mellas o huecos. Como tal, las moléculas de ácido nucleico pueden tener tres o más cadenas, por ejemplo, tal como un ARN de merodúplex (ARNmd) divulgado en el documento PCT/US07/081836. Las moléculas de ácido nucleico con una cadena con mellas o huecos pueden tener entre aproximadamente 1-49 nucleótidos, o pueden tener una longitud de RISC (por ejemplo, aproximadamente de 15 a 25 nucleótidos) o una longitud de sustrato de Dicer (por ejemplo, aproximadamente de 25 a 30 nucleótidos) tal como se divulga en el presente documento.

Las moléculas de ácido nucleico con tres o más cadenas incluyen, por ejemplo, una cadena 'A' (antisentido), cadena 'S1' (segunda), y cadena 'S2' (tercera) en las que las cadenas 'S1' y 'S2' son complementarias a, y forman pares de bases con, regiones no solapantes de la cadena 'A' (por ejemplo, un ARNmd puede tener la forma de A:S1S2). Las cadenas S1, S2, o más juntas forman algo que es sustancialmente similar a una cadena sentido con respecto a la cadena antisentido 'A'. La región bicatenaria formada por la hibridación de las cadenas 'S1' y 'A' es distinta de, y no solapante con, la región bicatenaria formada por la hibridación de las cadenas 'S2' y 'A'. Una molécula de ácido nucleico (por ejemplo, una molécula de ANip) puede ser una molécula "con huecos", lo que significa un "hueco" que oscila desde 0 nucleótidos hasta aproximadamente 10 nucleótidos (por ejemplo, 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 nucleótidos). Preferiblemente, la cadena sentido tiene huecos. En algunas realizaciones, el dúplex A:S1 está separado del dúplex A:S2 por un hueco resultante de al menos un nucleótido que no forma pares (hasta aproximadamente 10 nucleótidos que no forman pares) en la cadena 'A' que está colocado entre el dúplex A:S1 y el dúplex A:S2 y que es distinto de cualquiera de uno o más nucleótidos que no forman pares en el extremo 3' de una o más de las cadenas 'A', 'S1', o 'S2'. El dúplex A:S1 puede estar separado del dúplex A:S2 por un hueco de cero nucleótidos (es decir, una mella en la que solo se rompe o falta un enlace fosfodiéster entre dos nucleótidos en la molécula de polinucleótido) entre el dúplex A:S1 y el dúplex A:S2, que también puede denominarse ARNbc con mellas (ARNbcm). Por ejemplo, A:S1S2 puede incluir un ARNbc que tiene al menos dos regiones bicatenarias que combinadas tienen en total de aproximadamente 14 pares de bases a aproximadamente 40 pares de bases y las regiones bicatenarias están separadas por un hueco de aproximadamente 0 a aproximadamente 10 nucleótidos, que tienen opcionalmente extremos romos, o A:S1S2 puede incluir un ARNbc que tiene al menos dos regiones bicatenarias separadas por un hueco de hasta diez nucleótidos en el que al menos una de las regiones bicatenarias incluye entre aproximadamente cinco pares de bases y trece pares de bases.

Sustratos de Dicer

En determinadas realizaciones, las moléculas de ácido nucleico (por ejemplo, moléculas de ANip) proporcionadas en el presente documento pueden ser una molécula de "sustrato de Dicer" precursora, por ejemplo, ácido nucleico bicatenario, procesada *in vivo* para producir moléculas de ácido nucleico activas, por ejemplo, tal como se describe en Rossi, documento US20050244858. En determinadas condiciones y situaciones, se ha encontrado que estas especies de ANip de ARNbc relativamente más largas, por ejemplo, de desde aproximadamente 25 hasta aproximadamente 30 nucleótidos, pueden proporcionar resultados inesperadamente eficaces en cuanto a la potencia y duración de acción. Sin desear limitarse a ninguna teoría particular, se piensa que las especies de ARNbc más largas sirven como sustrato para la enzima Dicer en el citoplasma de una célula. Además de escindir ácido nucleico bicatenario para dar segmentos más cortos, Dicer puede facilitar la incorporación de un producto de escisión monocatenario derivado del ARNbc escindido en el complejo de silenciamiento inducido por ARN (complejo RISC) que es responsable de la destrucción del ARN citoplasmático derivado del gen diana.

Los sustratos de Dicer pueden tener determinadas propiedades que potencian su procesamiento por Dicer. Los sustratos de Dicer tienen una longitud suficiente de tal manera que se procesan por Dicer para producir una molécula de ácido nucleico activa y pueden incluir además una o más de las siguientes propiedades: (i) el ARNbc es asimétrico, por ejemplo, tiene una proyección en 3' en la primera cadena (cadena antisentido) y (ii) el ARNbc tiene un extremo 3' modificado en la cadena antisentido (cadena sentido) para dirigir la orientación de la unión y procesamiento de Dicer del ARNbc para dar un ARNip activo. En determinadas realizaciones, la cadena más larga en el sustrato de Dicer puede tener 24-30 nucleótidos.

Los sustratos de Dicer pueden ser simétricos o asimétricos. El sustrato de Dicer puede tener una cadena sentido que incluye 22-28 nucleótidos y la cadena antisentido puede incluir 24-30 nucleótidos; por tanto, en algunas realizaciones, el sustrato de Dicer resultante puede tener una proyección en el extremo 3' de la cadena antisentido. El sustrato de Dicer puede tener una cadena sentido de 25 nucleótidos de longitud, y la cadena antisentido puede tener 27 nucleótidos de longitud con una proyección en 3' de dos bases. La proyección puede tener 1-3 nucleótidos, por ejemplo, 2 nucleótidos. La cadena sentido también puede tener un 5'-fosfato.

Un sustrato de Dicer asimétrico puede contener además dos desoxinucleótidos en el extremo 3' de la cadena sentido en lugar de dos de los ribonucleótidos. Algunas longitudes y estructuras de sustratos de Dicer a modo de ejemplo son 21+0; 21+2, 21-2, 22+0, 22+1, 22-1, 23+0, 23+2, 23-2, 24+0, 24+2, 24-2, 25+0, 25+2, 25-2, 26+0, 26+2, 26-2, 27+0, 27+2 y 27-2.

La cadena sentido de un sustrato de Dicer puede tener entre de aproximadamente 22 a aproximadamente 30 (por ejemplo, aproximadamente 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30); de aproximadamente 22 a aproximadamente 28; de aproximadamente 24 a aproximadamente 30; de aproximadamente 25 a aproximadamente 30; de aproximadamente 26 a aproximadamente 30; de aproximadamente 26 y 29; o de aproximadamente 27 a aproximadamente 28 nucleótidos de longitud. En determinadas realizaciones preferidas los sustratos de Dicer contienen cadenas sentido y antisentido, que tienen al menos aproximadamente 25 nucleótidos de longitud y no más de aproximadamente 30 nucleótidos; entre aproximadamente 26 y 29 nucleótidos; o 27 nucleótidos de longitud. Las cadenas sentido y antisentido pueden tener la misma longitud (extremos romos), diferentes longitudes (tener proyecciones), o una combinación. Las cadenas sentido y antisentido pueden existir en el mismo polinucleótido o en polinucleótidos diferentes. Un sustrato de Dicer puede tener una región de dúplex de aproximadamente 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 o 27 nucleótidos.

Como otras moléculas de ANip proporcionadas en el presente documento, la cadena antisentido de un sustrato de Dicer puede tener cualquier secuencia que se hibride con la cadena antisentido en condiciones biológicas, tales como dentro del citoplasma de una célula eucariota.

Los sustratos de Dicer pueden tener cualquier modificación en base de nucleótido, azúcar o estructura principal de fosfato tal como se conoce en la técnica y/o tal como se describe en el presente documento para otras moléculas de ácido nucleico (tales como moléculas de ANip). En determinadas realizaciones, los sustratos de Dicer pueden tener una cadena sentido que se modifica para el procesamiento por Dicer mediante modificadores adecuados ubicados en el extremo 3' de la cadena sentido, es decir, el ARNbc está diseñado para dirigir la orientación de la unión y procesamiento de Dicer. Los modificadores adecuados incluyen nucleótidos tales como desoxirribonucleótidos, didesoxirribonucleótidos, aciclonucleótidos y similares y moléculas con impedimento estérico, tales como moléculas fluorescentes y similares. Los aciclonucleótidos sustituyen el azúcar de 2'-desoxirribofuranosilo normalmente presente en dNMP por un grupo 2-hidroxietoximetilo. Otros modificadores de nucleótidos que pueden usarse en moléculas de ANip de sustrato de Dicer incluyen 3'-desoxiadenosina (cordicepina), 3'-azido-3'-desoxitimidina (AZT), 2',3'-didesoxiinosina (ddl), 2',3'-didesoxi-3'-tiacitidina (3TC), 2',3'-dideshidro-2',3'-didesoxitimidina (d4T) y los nucleótidos de monofosfato de 3'-azido-3'-desoxitimidina (AZT), 2',3'-didesoxi-3'-tiacitidina (3TC) y 2',3'-dideshidro-2',3'-didesoxitimidina (d4T). En una realización, se usan desoxinucleótidos como modificadores. Cuando se usan modificadores de nucleótidos, pueden sustituir a ribonucleótidos (por ejemplo, los ribonucleótidos se sustituyen por 1-3 modificadores de nucleótidos, o 2 modificadores de nucleótidos, en el extremo 3' de la cadena sentido) de tal manera que la longitud del sustrato de Dicer no cambia. Cuando se usan moléculas con impedimento estérico, pueden unirse al ribonucleótido en el extremo 3' de la cadena antisentido. Por tanto, en determinadas realizaciones la longitud de la cadena no cambia con la incorporación de los modificadores. En determinadas realizaciones, dos bases de ADN en el ARNbc se sustituyen para dirigir la orientación del procesamiento de Dicer de la cadena antisentido. En una realización adicional, dos ribonucleótidos se sustituyen por dos bases de ADN terminales en el extremo 3' de la cadena sentido formando un extremo romo del dúplex en el extremo 3' de la cadena sentido y el extremo 5' de la cadena antisentido, y una proyección de ARN de dos nucleótidos se ubica en el extremo 3' de la cadena antisentido. Esto es una composición asimétrica con ADN en el extremo romo y bases de ARN en el extremo con proyección.

En determinadas realizaciones se incluyen modificaciones en el sustrato de Dicer de tal manera que la modificación no impide que la molécula de ácido nucleico sirva como sustrato para Dicer. En una realización, se realizan una o más modificaciones que potencian el procesamiento de Dicer del sustrato de Dicer. Pueden realizarse una o más modificaciones que dan como resultado una generación de iARN más eficaz. Pueden realizarse una o más modificaciones que soportan un mayor efecto de iARN. Se realizan una o más modificaciones que dan como resultado una mayor potencia por cada sustrato de Dicer que se suministra a la célula. Pueden incorporarse modificaciones en la región 3'-terminal, la región 5'-terminal, en la región tanto 3'-terminal como 5'-terminal o en diversas posiciones dentro de la secuencia. Puede incorporarse cualquier número y combinación de modificaciones en el sustrato de Dicer siempre que la modificación no impida que la molécula de ácido nucleico sirva como sustrato para Dicer. Cuando hay múltiples modificaciones presentes, pueden ser iguales o diferentes. Se contemplan modificaciones en bases, restos de azúcar, la estructura principal de fosfato, y sus combinaciones. Cualquier extremo 5'-terminal puede fosforilarse.

Los ejemplos de modificaciones en la estructura principal de fosfato de sustratos de Dicer incluyen fosfonatos, incluyendo metilfosfonato, fosforotioato, y modificaciones de fosfotriéster tales como alquilfosfotriésteres, y similares. Los ejemplos de modificaciones en el resto de azúcar de sustratos de Dicer incluyen modificaciones de 2'-alquilpirimidina, tal como 2'-OMe, 2'-fluoro, amino, y desoxi y similares (véase, por ejemplo, Amarzguioui *et al.*, 2003). Los ejemplos de modificaciones en el grupo de base de sustratos de Dicer incluyen azúcares abásicos, pirimidinas modificadas con 2-O-alquilo, 4-tiouracilo, 5-bromouracilo, 5-yodouracilo y 5-(3-aminoalil)-uracilo y similares. También pueden incorporarse ANB.

La cadena sentido puede modificarse para el procesamiento de Dicer mediante modificadores adecuados ubicados en el extremo 3' de la cadena sentido, es decir, el sustrato de Dicer está diseñado para dirigir la orientación de unión y procesamiento de Dicer. Los modificadores adecuados incluyen nucleótidos tales como desoxirribonucleótidos, didesoxirribonucleótidos, aciclonucleótidos y similares y moléculas con impedimento estérico, tales como moléculas

fluorescentes y similares. Los aciclonucleótidos sustituyen el azúcar de 2'-desoxirribofuranosilo normalmente presente en dNMP por un grupo 2-hidroxietoximetilo. Otros modificadores de nucleótidos pueden incluir cordicepina, AZT, ddl, 3TC, d4T y los nucleótidos de monofosfato de AZT, 3TC y d4T. En una realización, se usan desoxinucleótidos como modificadores. Cuando se usan modificadores de nucleótidos, los ribonucleótidos se sustituyen por 1-3 modificadores de nucleótidos, o 2 modificadores de nucleótidos, en el extremo 3' de la cadena sentido. Cuando se usan moléculas con impedimento estérico, se unen al ribonucleótido en el extremo 3' de la cadena antisentido. Por tanto, la longitud de la cadena no cambia con la incorporación de los modificadores. En otra realización, la descripción contempla sustituir dos bases de ADN en el sustrato de Dicer para dirigir la orientación del procesamiento de Dicer de la cadena antisentido. En una realización adicional de la presente descripción, dos ribonucleótidos se sustituyen por dos bases de ADN terminales en el extremo 3' de la cadena sentido formando un extremo romo del dúplex en el extremo 3' de la cadena sentido y el extremo 5' de la cadena antisentido, y una proyección de ARN de dos nucleótidos se ubica en el extremo 3' de la cadena antisentido. Esto es una composición asimétrica con ADN en el extremo romo y bases de ARN en el extremo con proyección.

La cadena antisentido puede modificarse para el procesamiento de Dicer mediante modificadores adecuados ubicados en el extremo 3' de la cadena antisentido, es decir, el ARNbc se diseña para dirigir la orientación de la unión y procesamiento de Dicer. Los modificadores adecuados incluyen nucleótidos tales como desoxirribonucleótidos, dideoxirribonucleótidos, aciclonucleótidos y similares y moléculas con impedimento estérico, tales como moléculas fluorescentes y similares. Los aciclonucleótidos sustituyen el azúcar de 2'-desoxirribofuranosilo normalmente presente en dNMP por un grupo 2-hidroxietoximetilo. Otros modificadores de nucleótidos pueden incluir cordicepina, AZT, ddl, 3TC, d4T y los nucleótidos de monofosfato de AZT, 3TC y d4T. En una realización, se usan desoxinucleótidos como modificadores. Cuando se usan modificadores de nucleótidos, los ribonucleótidos se sustituyen por 1-3 modificadores de nucleótidos, o 2 modificadores de nucleótidos, en el extremo 3' de la cadena antisentido. Cuando se usan moléculas con impedimento estérico, se unen al ribonucleótido en el extremo 3' de la cadena antisentido. Por tanto, la longitud de la cadena no cambia con la incorporación de los modificadores. En otra realización, la descripción contempla sustituir dos bases de ADN en el ARNbc para dirigir la orientación del procesamiento de Dicer. En una descripción adicional, dos bases de ADN terminales se ubican en el extremo 3' de la cadena antisentido en lugar de dos ribonucleótidos formando un extremo romo del dúplex en el extremo 5' de la cadena sentido y el extremo 3' de la cadena antisentido, y una proyección de ARN de dos nucleótidos se ubica en el extremo 3' de la cadena sentido. Esta es una composición asimétrica con ADN en el extremo romo y bases de ARN en el extremo con proyección.

Pueden unirse sustratos de Dicer con una cadena sentido y una antisentido mediante una tercera estructura. La tercera estructura no bloqueará la actividad de Dicer sobre el sustrato de Dicer y no interferirá con la destrucción dirigida del ARN transcrito a partir del gen diana. La tercera estructura puede ser un grupo de unión químico. En la técnica se conocen grupos de unión químicos adecuados y pueden usarse. Alternativamente, la tercera estructura puede ser un oligonucleótido que une los dos oligonucleótidos del ARNbc de tal manera que se produce una estructura de horquilla tras la hibridación de los dos oligonucleótidos constituyendo el sustrato de Dicer. La estructura de horquilla preferiblemente no bloquea la actividad de Dicer sobre el sustrato de Dicer ni interfiere con la destrucción dirigida del ARN transcrito a partir del gen diana.

No se requiere que las cadenas sentido y antisentido del sustrato de Dicer sean completamente complementarias. Solo se necesita que sean sustancialmente complementarias para hibridarse en condiciones biológicas y proporcionar un sustrato para Dicer que produzca un ARNip lo suficientemente complementario con respecto a la secuencia diana.

El sustrato de Dicer puede tener determinadas propiedades que potencian su procesamiento por Dicer. El sustrato de Dicer puede tener una longitud suficiente de tal manera que se procesa por Dicer para producir moléculas de ácido nucleico activas (por ejemplo, ARNip) y puede tener una o más de las siguientes propiedades: el sustrato de Dicer es asimétrico, por ejemplo, tiene una proyección en 3' en la primera cadena (cadena antisentido) y/o el sustrato de Dicer tiene un extremo 3' modificado en la segunda cadena (cadena sentido) para dirigir la orientación de unión y procesamiento de Dicer del sustrato de Dicer para dar un ARNip activo. El sustrato de Dicer puede ser asimétrico de tal manera que la cadena sentido incluye 22-28 nucleótidos y la cadena antisentido incluye 24-30 nucleótidos. Por tanto, el sustrato de Dicer resultante tiene una proyección en el extremo 3' de la cadena antisentido. La proyección tiene 1-3 nucleótidos, por ejemplo, dos nucleótidos. La cadena sentido también puede tener un 5' fosfato.

Un sustrato de Dicer puede tener una proyección en el extremo 3' de la cadena antisentido y la cadena sentido se modifica para el procesamiento de Dicer. El extremo 5' de la cadena sentido puede tener un fosfato. Las cadenas sentido y antisentido pueden hibridarse en condiciones biológicas, tales como las condiciones encontradas en el citoplasma de una célula. Una región de una de las cadenas, particularmente la cadena antisentido, del sustrato de Dicer puede tener una longitud de secuencia de al menos 19 nucleótidos, en la que estos nucleótidos están en la región de 21 nucleótidos adyacente al extremo 3' de la cadena antisentido y son lo suficientemente complementarios a una secuencia de nucleótidos del ARN producido a partir del gen diana. Un sustrato de Dicer también puede tener una o más de las siguientes propiedades adicionales: la cadena antisentido tiene un desplazamiento a la derecha a partir de una cadena de 21 meros correspondiente (es decir, la cadena antisentido incluye nucleótidos en el lado

derecho de la molécula en comparación con la cadena de 21 meros correspondientes), las cadenas pueden no ser completamente complementarias, es decir, las cadenas pueden contener formaciones de pares de bases con apareamientos erróneos individuales y pueden incluirse modificaciones de bases tales como ANB en el extremo 5' de la cadena sentido.

Una cadena antisentido de una molécula de ácido nucleico de sustrato de Dicer puede modificarse para incluir 1-9 ribonucleótidos en el extremo 5' para dar una longitud de 22-28 nucleótidos. Cuando la cadena antisentido tiene una longitud de 21 nucleótidos, entonces pueden añadirse 1-7 ribonucleótidos, o 2-5 ribonucleótidos y/o 4 ribonucleótidos en el extremo 3'. Los ribonucleótidos añadidos pueden tener cualquier secuencia. Aunque los ribonucleótidos añadidos pueden ser complementarios a la secuencia de gen diana, no se requiere complementariedad completa entre la secuencia diana y las cadenas antisentido. Es decir, la cadena antisentido resultante es suficientemente complementaria con la secuencia diana. Una cadena sentido puede tener entonces 24-30 nucleótidos. La cadena sentido puede ser sustancialmente complementaria con la cadena antisentido para hibridarse con la cadena antisentido en condiciones biológicas. En una realización, la cadena antisentido puede sintetizarse para contener un extremo 3' modificado para dirigir el procesamiento de Dicer. La cadena sentido puede tener una proyección en 3'. La cadena antisentido puede sintetizarse para contener un extremo 3' modificado para la unión y procesamiento de Dicer y la cadena sentido tiene una proyección en 3'.

#### Proteína de choque térmico 47

La proteína de choque térmico 47 (HSP47) es una chaperona molecular específica de colágeno y reside en el retículo endoplasmático. Interacciona con el procolágeno durante el proceso de plegamiento, ensamblaje y transporte a partir del retículo endoplasmático (Nagata Trends Biochem Sci 1996; 21:22-6; Razaque *et al.* 2005; Contrib Nephrol 2005; 148: 57-69; Koide *et al.* 2006 J. Biol. Chem.; 281: 3432-38; Leivo *et al.* Dev. Biol. 1980; 76:100-114; Masuda *et al.* J. Clin. Invest. 1994; 94:2481-2488; Masuda *et al.* Cell Stress Chaperones 1998; 3:256-264). Se ha notificado que HSP47 tiene una expresión regulada por incremento en diversas fibrosis tisulares (Koide *et al.* J Biol Chem 1999; 274: 34523-26), tales como cirrosis hepática (Masuda *et al.* J Clin Invest 1994; 94:2481-8), fibrosis pulmonar (Razaque *et al.* Virchows Arch 1998; 432:455-60; Kakugawa *et al.* Eur Respir J 2004; 24: 57-65), y glomeruloesclerosis (Moriyama *et al.* Kidney Int 1998; 54: 110-19). La secuencia de ácido nucleico a modo de ejemplo de ADNc de hsp47 humana diana se divulga en el número de registro de GenBank: NM\_001235 y la secuencia de ARNm correspondiente, por ejemplo, tal como se indica en SEQ ID NO: 1. Un experto habitual en la técnica entenderá que una secuencia dada puede cambiar a lo largo del tiempo e incorporar por consiguiente cualquier cambio necesario en las moléculas de ácido nucleico en el presente documento.

La asociación específica de HSP47 con una diversa gama de tipos de colágeno hace que HSP47 sea una posible diana para el tratamiento de la fibrosis. La inhibición de la expresión de hsp47 puede prevenir la secreción de colágeno I extracelular. Sato *et al.* (Nat Biotechnol 2008; 26:431-442) exploraron esta posibilidad usando ARNip para la inhibición de la expresión de hsp47 y la prevención de la progresión de fibrosis hepática en ratas. De manera similar, Chen *et al.* (Br J Dermatol 2007; 156: 1188-1195) y Wang *et al.* (Plast. Reconstr Surg 2003; 111: 1980-7) investigaron la inhibición de la expresión de hsp47 mediante tecnología de interferencia de ARN.

#### Métodos y composiciones para inhibir hsp47

Se proporcionan composiciones y métodos para la inhibición de la expresión de hsp47 usando moléculas de ácido nucleico pequeño, tales como ácido nucleico de interferencia pequeño (ANip), ARN de interferencia (iARN), ARN de interferencia pequeño (ARNip), ARN bicatenario (ARNbc), micro-ARN (miARN), y ARN de horquilla corta (ARNhc), moléculas capaces de mediar o que median en la interferencia de ARN frente a la expresión génica de hsp47. La composición y los métodos divulgados en el presente documento también son útiles en el tratamiento de diversas fibrosis tales como fibrosis hepática, fibrosis de pulmón y fibrosis renal.

Se usan molécula(s) de ácido nucleico y/o métodos de la descripción para regular por disminución la expresión del/de los gen(es) que codifica(n) el ARN mencionado, por ejemplo, en el registro de Genbank NM\_001235.

Las composiciones, los métodos y los kits proporcionados en el presente documento pueden incluir una o más moléculas de ácido nucleico (por ejemplo, ANip) y métodos que independientemente o en combinación modulan (por ejemplo, regulan por disminución) la expresión de la proteína hsp47 y/o genes que codifican proteínas hsp47, proteínas y/o genes que codifican hsp47 (por ejemplo, genes que codifican secuencias que comprenden las secuencias mencionadas en los registros de GenBank n.ºs NM\_001235), o un miembro de la familia de genes de hsp47 en el que los genes o las secuencias de la familia de genes comparten homología de secuencia asociada con el mantenimiento y/o desarrollo de enfermedades, estados o trastornos asociados con hsp47, tales como fibrosis hepática, cirrosis, fibrosis pulmonar, fibrosis renal, fibrosis peritoneal, daño hepático crónico, y fibrilógenesis. La descripción de los diversos aspectos y realizaciones se proporciona con referencia al gen de hsp47 a modo de ejemplo. Sin embargo, los diversos aspectos y realizaciones también se refieren a otros genes de hsp47 relacionados, tales como genes homólogos y variantes de transcritos, y polimorfismos (por ejemplo, polimorfismo de un solo nucleótido, (SNP)) asociados con determinados genes de hsp47. Como tales, los diversos aspectos y realizaciones también se refieren a otros genes que están implicados en rutas mediadas por hsp47 de transducción

de señales o expresión génica que está implicada, por ejemplo, en el mantenimiento o el desarrollo de enfermedades, características o estados descritos en el presente documento. Estos genes adicionales pueden analizarse para determinar sitios diana usando los métodos descritos para el gen de hsp47 en el presente documento. Por tanto, la modulación de otros genes y los efectos de tal modulación de los otros genes pueden realizarse, determinarse y medirse tal como se describe en el presente documento.

En una realización, las composiciones y los métodos proporcionados en el presente documento incluyen una molécula de ácido nucleico de interferencia pequeño (ANip) bicatenario que regula por disminución la expresión de un gen de hsp47 (por ejemplo, hsp47 humana mostrada a modo de ejemplo mediante SEQ ID NO: 1), en los que la molécula de ácido nucleico incluye de aproximadamente 15 a aproximadamente 49 pares de bases.

En una realización, un ácido nucleico divulgado puede usarse para inhibir la expresión del gen de hsp47 o una familia de genes de hsp47 en el que los genes o las secuencias de la familia de genes comparten homología de secuencia. Tales secuencias homólogas pueden identificarse tal como se conoce en la técnica, por ejemplo, usando alineaciones de secuencias. Pueden diseñarse moléculas de ácido nucleico para seleccionar como diana tales secuencias homólogas, por ejemplo, usando secuencias perfectamente complementarias o incorporando pares de bases no canónicos, por ejemplo, apareamientos erróneos y/o pares de bases con titubeo que pueden proporcionar secuencias diana adicionales. En casos en los que se identifican apareamientos erróneos, pueden usarse pares de bases no canónicos (por ejemplo, apareamientos erróneos y/o bases con titubeo) para generar moléculas de ácido nucleico que seleccionan como diana más de una secuencia de gen. En un ejemplo no limitativo, se usan pares de bases no canónicos tales como pares de bases UU y CC para generar moléculas de ácido nucleico que son capaces de seleccionar como diana secuencias para diferentes dianas de hsp47 que comparten homología de secuencia. Como tales, una ventaja de usar ANip divulgados en el presente documento es que puede diseñarse un único ácido nucleico para incluir una secuencia de ácido nucleico que es complementaria a la secuencia de nucleótidos que se conserva entre los genes homólogos. En este enfoque, puede usarse un único ácido nucleico para la inhibir la expresión de más de un gen en lugar de usar más de una molécula de ácido nucleico para seleccionar como diana los diferentes genes.

Pueden usarse moléculas de ácido nucleico para seleccionar como diana secuencias conservadas correspondientes a una familia de genes o familias de genes tales como genes de la familia de hsp47. Como tales, moléculas de ácido nucleico que seleccionan como diana múltiples dianas de hsp47 pueden proporcionar un efecto terapéutico aumentado. Además, puede usarse ácido nucleico para caracterizar rutas de la función génica en una variedad de aplicaciones. Por ejemplo, pueden usarse moléculas de ácido nucleico para inhibir la actividad de gen(es) diana en una ruta para determinar la función de gen(es) no caracterizados en el análisis de la función génica, análisis de la función de ARNm o análisis de traducción. Las moléculas de ácido nucleico pueden usarse para determinar posibles rutas de genes diana implicadas en diversas enfermedades y estados hacia el desarrollo farmacéutico. Las moléculas de ácido nucleico pueden usarse para entender rutas de expresión génica implicadas, por ejemplo, en fibrosis tales como fibrosis de hígado, de riñón o pulmonar, y/o características, enfermedades, trastornos y/o estados inflamatorios y proliferativos.

En una realización, las composiciones y métodos proporcionados en el presente documento incluyen una molécula de ácido nucleico que tiene actividad de iARN frente a ARN de hsp47, en los que la molécula de ácido nucleico incluye una secuencia complementaria a cualquier ARN que tiene una secuencia que codifica hsp47, tal como las secuencias que tienen secuencias tal como se muestran en la tabla 3. En otra realización, una molécula de ácido nucleico puede tener actividad de iARN frente a ARN de hsp47, en la que la molécula de ácido nucleico incluye una secuencia complementaria a un ARN que tiene una secuencia que codifica hsp47 variante, por ejemplo, otros genes de hsp47 mutantes no mostrados en la tabla 3 pero que se sabe en la técnica que están asociados con el mantenimiento y/o desarrollo de fibrosis. Pueden aplicarse modificaciones químicas tal como se muestra en la tabla 3 o descritas de otro modo en el presente documento a cualquier constructo de ácido nucleico divulgado en el presente documento. En otra realización, una molécula de ácido nucleico divulgada en el presente documento incluye una secuencia de nucleótidos que puede interactuar con la secuencia de nucleótidos de un gen de hsp47 y de ese modo mediar en el silenciamiento de la expresión génica de hsp47, por ejemplo, en la que la molécula de ácido nucleico media en la regulación de la expresión génica de hsp47 mediante procesos celulares que modulan la estructura de cromatina o los patrones de metilación del gen de hsp47 y previenen la transcripción del gen de hsp47.

Las moléculas de ácido nucleico divulgadas en el presente documento pueden tener actividad de iARN frente a ARN de hsp47, en las que la molécula de ácido nucleico incluye una secuencia complementaria a cualquier ARN que tiene una secuencia que codifica hsp47, tal como aquellas secuencias que tienen los n.<sup>os</sup> de registro de GenBank NM\_001235. Las moléculas de ácido nucleico pueden tener actividad de iARN frente a ARN de hsp47, en las que la molécula de ácido nucleico incluye una secuencia complementaria a un ARN que tiene una secuencia que codifica hsp47 variante, por ejemplo, otros genes de hsp47 mutantes que se sabe en la técnica que están asociados con el mantenimiento y/o desarrollo de fibrosis.

Las moléculas de ácido nucleico divulgadas en el presente documento incluyen una secuencia de nucleótidos que puede interactuar con una secuencia de nucleótidos de un gen de hsp47 y de ese modo mediar en el silenciamiento de la expresión génica de hsp47, por ejemplo, en las que la molécula de ácido nucleico media en la

regulación de la expresión génica de hsp47 mediante procesos celulares que modulan la estructura de cromatina o los patrones de metilación del gen de hsp47 y previenen la transcripción del gen de hsp47.

#### Métodos de tratamiento

5 La asociación específica de HSP47 con una diversa gama de tipos de colágeno hace que hsp47 sea una diana para el tratamiento de la fibrosis. La inhibición de la expresión de hsp47 puede prevenir la secreción de colágeno I extracelular. Sato *et al.* (Nat Biotechnol 2008; 26:431-442) exploraron esta posibilidad usando ARNip para la inhibición de la expresión de hsp47 y la prevención de la progresión de fibrosis hepática en ratas. De manera similar, Chen *et al.* (Br J Dermatol 2007; 156: 1188-1195) y Wang *et al.* (Plast Reconstr Surg 2003; 111: 1980-7) investigaron la inhibición de la expresión de hsp47 mediante tecnología de interferencia de ARN.

15 En una realización, pueden usarse moléculas de ácido nucleico para regular por disminución o inhibir la expresión de hsp47 y/o proteínas hsp47 que surgen de hsp47 y/o polimorfismos de haplotipo de hsp47 que están asociados con una enfermedad o estado (por ejemplo, fibrosis). El análisis de los niveles de hsp47 y/o genes de hsp47, o hsp47 y/o proteína hsp47 o ARN, puede usarse para identificar sujetos con tales polimorfismos y aquellos sujetos que corren el riesgo de desarrollar características, estados o enfermedades descritos en el presente documento. Estos sujetos pueden ser susceptibles de tratamiento, por ejemplo, tratamiento con moléculas de ácido nucleico divulgadas en el presente documento y cualquier otra composición útil para tratar enfermedades relacionadas con hsp47 y/o la expresión génica de hsp47. Como tal, el análisis de los niveles de hsp47 y/o proteína hsp47 o ARN puede usarse para determinar el tipo de tratamiento y el ciclo de terapia en el tratamiento de un sujeto. Puede usarse la monitorización de los niveles de hsp47 y/o proteína hsp47 o ARN para predecir el desenlace de tratamiento y para determinar la eficacia de compuestos y composiciones que modulan el nivel y/o la actividad de determinadas hsp47 y/o proteínas hsp47 asociadas con una característica, estado o enfermedad.

25 Se proporcionan composiciones y métodos para la inhibición de la expresión de hsp47 usando moléculas de ácido nucleico pequeño tal como se proporciona en el presente documento, tales como moléculas de ANip, iARN, ARNip, ARN bicatenario (ARNbc), micro-ARN (miARN), y ARN de horquilla corta (ARNhc) capaces de mediar o que median en la interferencia de ARN frente a la expresión génica de hsp47. La composición y los métodos divulgados en el presente documento también son útiles en el tratamiento de diversas fibrosis tales como fibrosis hepática, fibrosis de pulmón, y fibrosis renal.

35 Las moléculas de ácido nucleico divulgadas en el presente documento, individualmente o en combinación o junto con otros fármacos, pueden usarse para prevenir o tratar enfermedades, características, estados y/o trastornos asociados con hsp47, tales como fibrosis hepática, cirrosis, fibrosis pulmonar, fibrosis renal, fibrosis peritoneal, daño hepático crónico, y fibroglógenesis.

40 Las moléculas de ácido nucleico divulgadas en el presente documento pueden inhibir la expresión de hsp47 de una manera específica de secuencia. Las moléculas de ácido nucleico pueden incluir una cadena sentido y una cadena antisentido que incluyen nucleótidos contiguos que son al menos parcialmente complementarios (antisentido) con respecto a un ARNm de hsp47.

45 En algunas realizaciones, puede usarse ARNbc específico para hsp47 junto con otro ARNbc específico para otras chaperonas moleculares que ayudan en el plegamiento de proteínas recién sintetizadas, tales como calnexina, calreticulina y/o BiP (Bergeron *et al.* Trends Biochem. Sci. 1994; 19:124-128; Herbert *et al.* 1995; Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 60:405-415)

50 La fibrosis puede tratarse mediante interferencia de ARN usando moléculas de ácido nucleico tal como se divulga en el presente documento. Las fibrosis a modo de ejemplo incluyen fibrosis hepática, fibrosis peritoneal, fibrosis de pulmón, fibrosis renal. Las moléculas de ácido nucleico divulgadas en el presente documento pueden inhibir la expresión de hsp47 de una manera específica de secuencia.

55 El tratamiento de fibrosis puede monitorizarse determinando el nivel de colágeno extracelular usando técnicas adecuadas conocidas en la técnica, tales como usando anticuerpos anti-colágeno I. El tratamiento también puede monitorizarse determinando el nivel de ARNm de hsp47 o el nivel de proteína HSP47 en las células del tejido afectado. El tratamiento también puede monitorizarse mediante exploración no invasiva del órgano o tejido afectado tal como mediante exploración por tomografía asistida por ordenador, exploraciones de elastografía por resonancia magnética.

60 Un método para tratar o prevenir una enfermedad o un estado asociado con hsp47 en un sujeto u organismo puede incluir poner en contacto el sujeto u organismo con una molécula de ácido nucleico tal como se proporciona en el presente documento en condiciones adecuadas para modular la expresión del gen de hsp47 en el sujeto u organismo.

65 Un método para tratar o prevenir fibrosis en un sujeto u organismo puede incluir poner en contacto el sujeto u organismo con una molécula de ácido nucleico en condiciones adecuadas para modular la expresión del gen de

hsp47 en el sujeto u organismo.

5 Un método para tratar o prevenir una o más fibrosis seleccionadas del grupo que consiste en fibrosis hepática, fibrosis renal, y fibrosis pulmonar en un sujeto u organismo puede incluir poner en contacto el sujeto u organismo con una molécula de ácido nucleico en condiciones adecuadas para modular la expresión del gen de hsp47 en el sujeto u organismo.

#### Enfermedades fibróticas

10 Las enfermedades fibróticas se caracterizan generalmente por el exceso de depósito de un material fibroso dentro de la matriz extracelular, lo cual contribuye a cambios anómalos en la arquitectura del tejido e interfiere con la función normal del órgano.

15 Todos los tejidos dañados por traumatismo responden mediante el inicio de un programa de cicatrización de heridas. La fibrosis, un tipo de trastorno caracterizado por cicatrización excesiva, se produce cuando el proceso normal de remisión espontánea de la respuesta de cicatrización de heridas se ve alterado, y provoca un exceso de producción y depósito de colágeno. Como resultado, el tejido normal del órgano se sustituye por tejido cicatricial, lo cual conduce finalmente al fallo funcional del órgano.

20 La fibrosis puede iniciarse por diversas causas y en diversos órganos. Cirrosis hepática, fibrosis pulmonar, sarcoidosis, queloides y fibrosis renal son todos estados crónicos asociados con fibrosis progresiva, provocando de ese modo una pérdida continua de la función normal del tejido.

25 Se produce fibrosis aguda (habitualmente con una aparición repentina e intensa y de corta duración) como respuesta común a diversas formas de traumatismo incluyendo lesiones por accidentes (particularmente lesiones a la médula espinal y el sistema nervioso central), infecciones, cirugía, enfermedad isquémica (por ejemplo, cicatrización cardíaca tras un ataque al corazón), quemaduras, contaminantes medioambientales, alcohol y otros tipos de toxinas, síndrome de dificultad respiratoria aguda, tratamientos por radiación y quimioterapia).

30 La fibrosis, una patología relacionada con fibrosis o una patología relacionada con reticulación aberrante de proteínas celulares, pueden tratarse todas ellas mediante los ARNip divulgados en el presente documento. Las enfermedades fibróticas o enfermedades en las que la fibrosis es evidente (patología relacionada con fibrosis) incluyen formas tanto agudas como crónicas de fibrosis de órganos, incluyendo todas las variantes etiológicas de las siguientes: fibrosis pulmonar, incluyendo enfermedad pulmonar intersticial y enfermedad pulmonar fibrótica, fibrosis hepática, fibrosis cardíaca incluyendo fibrosis de miocardio, fibrosis renal incluyendo insuficiencia renal crónica, fibrosis cutánea incluyendo esclerodermia, queloides y cicatrices hipertróficas; mielofibrosis (fibrosis de médula ósea); todos los tipos de cicatrización ocular incluyendo vitreorretinopatía proliferativa (PVR) y cicatrización resultante de cirugía para tratar cataratas o glaucoma; enfermedad inflamatoria del intestino de etiología variable, degeneración macular, oftalmopatía de Grave, ergotismo inducido por fármacos, cicatrices queloides, esclerodermia, psoriasis, glioblastoma en síndrome de Li-Fraumeni, glioblastoma esporádico, leucemia mielóide, leucemia mielógena aguda, síndrome mielodisplásico, síndrome mieloproferativo, cáncer ginecológico, sarcoma de Kaposi, enfermedad de Hansen y colitis colagenosa.

45 En diversas realizaciones, los compuestos (moléculas de ácido nucleico) tal como se divulgan en el presente documento pueden usarse para tratar enfermedades fibróticas, por ejemplo, tal como se divulgan en el presente documento, así como muchas otras enfermedades y estados aparte de enfermedades fibróticas, por ejemplo, tal como se divulgan en el presente documento. Otros estados que van a tratarse incluyen enfermedades fibróticas en otros órganos: fibrosis renal por cualquier motivo (CKD incluyendo ESRD); fibrosis de pulmón (incluyendo ILF); mielofibrosis, cicatrización anómala (queloides) asociada con todos los posibles tipos de lesión cutánea por accidente y yatrogénica (operaciones); esclerodermia; cardiofibrosis, insuficiencia de la operación de filtrado de glaucoma; adhesiones intestinales.

#### Cirugía ocular y complicaciones fibróticas

55 Con frecuencia puede producirse contractura de tejido cicatricial resultante de la cirugía ocular. La cirugía del glaucoma para crear nuevos canales de drenaje con frecuencia no tiene éxito debido a la cicatrización y contracción de tejidos y el sistema de drenaje generado puede bloquearse requiriendo una intervención quirúrgica adicional. Los regímenes anticicatrización actuales (mitomicina C o 5FU) están limitados debido a las complicaciones implicadas (por ejemplo, ceguera), véase, por ejemplo, Cordeiro MF, *et al.*, Human anti-transforming growth factor-beta2 antibody: a new glaucoma anti-scarring agent Invest Ophthalmol Vis Sci. septiembre de 1999; 40(10):2225-34. También puede formarse contractura de tejido cicatricial tras traumatismo corneal o cirugía corneal, por ejemplo, tratamiento por láser o quirúrgico para miopía o error refractario en el que la contractura de tejidos puede conducir a resultados poco precisos. Puede formarse tejido cicatricial sobre/dentro del humor vítreo o la retina, por ejemplo, y puede provocar finalmente ceguera en algunos diabéticos, y puede formarse tras cirugía por desprendimiento, denominada vitreorretinopatía proliferativa (PVR). PVR es la complicación más común tras desprendimiento de retina y está asociada con una rotura u orificio retiniano. PVR se refiere al crecimiento de membranas celulares

dentro de la cavidad vítrea y sobre las superficies delantera y trasera de la retina que contienen células epiteliales pigmentarias retinianas (RPE). Estas membranas, que son esencialmente tejidos cicatriciales, ejercen tracción sobre la retina y pueden dar como resultado recidivas de desprendimiento de retina, incluso tras un procedimiento por desprendimiento de retina inicialmente satisfactorio.

5 Puede formarse tejido cicatricial en la órbita o en los músculos oculares y de los párpados tras cirugía por estrabismo, orbital o de párpados, o enfermedad tiroidea ocular, y en la que se produce cicatrización de la conjuntiva tal como puede suceder tras cirugía por glaucoma o en enfermedad cicatricial, enfermedad inflamatoria, por ejemplo, penfigoide, o enfermedad infecciosa, por ejemplo, tracoma. Un problema ocular adicional asociado con la  
10 contracción de tejidos que incluyen colágeno es la opacificación y contractura de la cápsula del cristalino tras la extracción de cataratas. Se ha reconocido un papel importante para MMP en enfermedades oculares incluyendo cicatrización de heridas, sequedad de ojos, formación de úlceras de la córnea estériles, erosión epitelial recurrente, neovascularización de la córnea, pterigión, conjuntivocalasia, glaucoma, PVR y fibrosis ocular.

#### 15 Fibrosis hepática

La fibrosis hepática (LF) es una consecuencia generalmente irreversible del daño hepático de varias etiologías. En los países occidentales, las principales categorías etiológicas son: enfermedad hepática alcohólica (30-50 %), hepatitis vírica (30 %), enfermedad biliar (5-10 %), hemocromatosis primaria (5 %), y cirrosis relacionada con fármacos y criptogénica etiología desconocida (10-15 %). La enfermedad de Wilson, deficiencia de  $\alpha_1$ -antitripsina y otras enfermedades poco frecuentes también tienen fibrosis hepática como uno de los síntomas. La cirrosis hepática, el estadio terminal de fibrosis hepática, requiere con frecuencia trasplante de hígado y se encuentra entre las diez causas de muerte principales en los países occidentales.

#### 25 Fibrosis renal y estados relacionados

##### Insuficiencia renal crónica (CRF)

30 La insuficiencia renal crónica es una pérdida gradual y progresiva de la capacidad de los riñones para excretar residuos, concentrar orina y conservar electrolitos. CRF progresa de manera lenta. Lo más frecuentemente resulta de cualquier enfermedad que provoque una pérdida gradual de la función del riñón, y la fibrosis es la principal patología que produce CRF.

##### Nefropatía diabética

35 La nefropatía diabética, cuyos rasgos característicos son glomerulosclerosis y fibrosis tubulointerstitial, es la causa más prevalente de enfermedad renal en estadio terminal en la era moderna, y los pacientes diabéticos constituyen la mayor población con diálisis. Tal terapia es costosa y queda lejos de ser óptima. El trasplante ofrece un mejor desenlace pero presenta el inconveniente de una gran escasez de donantes.

##### Enfermedad renal crónica

40 La enfermedad renal crónica (CKD) es un problema de salud pública a nivel mundial y se reconoce como estado común que está asociado con un riesgo aumentado de enfermedad cardiovascular e insuficiencia renal crónica (CRF).  
45

La iniciativa para la calidad de los resultados de insuficiencia renal (K/DOQI) de la Fundación Nacional del Riñón (NKF) define la enfermedad renal crónica como o bien daño renal o bien reducción de la tasa de filtración glomerular (GFR) del riñón durante tres o más meses. También se conocen y se usan para el diagnóstico otros marcadores de CKD. En general, la destrucción de masa renal con esclerosis irreversible y pérdida de nefronas conduce a una disminución progresiva de la GFR. Recientemente, la K/DOQI publicó una clasificación de los estadios de CKD, de la siguiente manera:

55 Estadio 1: Daño renal con GFR normal o aumentada GFR ( $>90$  ml/min/1,73 m<sup>2</sup>)

Estadio 2: Reducción leve de la GFR (60-89 ml/min/1,73 m<sup>2</sup>)

Estadio 3: Reducción moderada de la GFR (30-59 ml/min/1,73 m<sup>2</sup>)

60 Estadio 4: Reducción intensa de la GFR (15-29 ml/min/1,73 m<sup>2</sup>)

Estadio 5: Insuficiencia renal (GFR  $<15$  ml/min/1,73 m<sup>2</sup> o diálisis)

65 En los estadios 1 y 2 de CKD, GFR sola no confirma el diagnóstico. Es posible basarse en otros marcadores de daño renal, incluyendo anomalías en la composición de la sangre o la orina o anomalías en las pruebas de obtención de imágenes.

Fisiopatología de CKD

5 Aproximadamente 1 millón de nefronas están presentes en cada riñón, contribuyendo cada una a la GFR total. Independientemente de la etiología de la lesión renal, con la destrucción progresiva de nefronas, el riñón puede mantener la GFR mediante hiperfiltración e hipertrofia de compensación de las nefronas sanas restantes. Esta adaptabilidad de las nefronas permite un aclaramiento normal continuado de solutos plasmáticos de modo que sustancias tales como urea y creatinina comienzan a mostrar aumentos significativos en los niveles en plasma solo después de que la GFR total haya disminuido hasta el 50 %, cuando se ha agotado la reserva renal. El valor de creatinina en plasma será de aproximadamente el doble con una reducción del 50 % en la GFR. Por tanto, una duplicación de la creatinina en plasma desde un valor de referencia de 0,6 mg/dl hasta 1,2 mg/dl en un paciente representa realmente una pérdida del 50 % de la masa de nefronas funcionales.

15 Se piensa que la hiperfiltración e hipertrofia de las nefronas residuales, aunque resulta beneficiosa por los motivos indicados, representa una causa principal de la disfunción renal progresiva. Se cree que esto sucede debido a la presión capilar glomerular aumentada, que daña los capilares y conduce inicialmente a glomeruloesclerosis focal y segmentaria y finalmente a glomeruloesclerosis global. Esta hipótesis se ha basado en estudios de ratas sometidas a nefrectomía a cinco sextos, que desarrollaron lesiones que son idénticas a las observadas en humanos con CKD.

20 Las dos causas más comunes de enfermedad renal crónica son diabetes e hipertensión. Otros factores incluyen ataques agudos de nefrotoxinas, incluyendo agentes de contraste, o disminución de la perfusión; proteinuria; aumento de amoniagénesis renal con lesión intersticial; hiperlipidemia; hiperfosfatemia con depósito de fosfato de calcio; disminución de los niveles de óxido nítrico y hábito de fumar.

25 En los Estados Unidos, la incidencia y prevalencia de CKD está aumentando, con malos desenlaces y un alto coste para el sistema sanitario. La enfermedad renal es la novena causa principal de muerte en los EE.UU. La alta tasa de mortalidad ha llevado a la orden del director general de sanidad de los EE.UU. de que America's citizenry, Healthy People 2010, contenga un capítulo centrado en CKD. Los objetivos de este capítulo son expresar claramente los objetivos y proporcionar estrategias para reducir la incidencia, morbilidad, mortalidad y costes sanitarios de enfermedad renal crónica en los Estados Unidos.

35 Las tasas de incidencia de enfermedad renal en estadio terminal (ESRD) también han aumentado continuamente a nivel internacional desde 1989. Los Estados Unidos tienen la mayor tasa de incidencia de ESRD, seguidos por Japón. Japón tiene la mayor prevalencia por millón de habitantes seguido por los Estados Unidos.

40 Las tasas de mortalidad asociadas con la hemodiálisis son sorprendentes e indican que la esperanza de vida de pacientes que entran en hemodiálisis se acorta notablemente. A cualquier edad, los pacientes con ESRD con diálisis tienen una mortalidad significativamente aumentada en comparación con pacientes que no se someten a diálisis e individuos sin enfermedad renal. A los 60 años de edad, una persona sana puede esperar vivir más de 20 años, mientras que la esperanza de vida de un paciente de 60 años de edad que comienza la hemodiálisis está más cerca de 4 años.

Fibrosis pulmonar

45 La fibrosis pulmonar intersticial (IPF) es la cicatrización del pulmón provocada por una variedad de agentes inhalados incluyendo partículas minerales, polvos orgánicos y gases oxidantes, o por motivos desconocidos (fibrosis de pulmón idiopática). La enfermedad afecta a millones de individuos en todo el mundo, y no hay ningún enfoque terapéutico eficaz. Un motivo principal para la falta de tratamientos útiles es que pocos de los mecanismos moleculares de la enfermedad se han identificado suficientemente como para diseñar dianas apropiadas para la terapia (Lasky, *et al.*, 2000, *Environ Health Perspect*; 108:751-62).

Fibrosis cardiaca

55 La insuficiencia cardiaca es única entre los trastornos cardiovascular principales porque solo en su caso está aumentando la prevalencia mientras que ha habido una notable disminución en otros estados. Parte de esto puede atribuirse al envejecimiento de las poblaciones de los Estados Unidos y Europa. La capacidad de proteger a pacientes con daño de miocardio también es un factor principal, ya que estos pacientes pueden desarrollar progresión de disfunción del ventrículo izquierdo debido al remodelado perjudicial del corazón.

60 El miocardio normal está compuesto por una variedad de células, miocitos cardiacos y miocitos que no son cardiomiocitos, que incluyen fibroblastos y células de músculo liso vascular y endoteliales.

65 El remodelado estructural de la pared ventricular es un determinante clave del desenlace clínico en la cardiopatía. Tal remodelado implica la producción y destrucción de proteínas de la matriz extracelular, proliferación y migración celular, y muerte celular apoptótica y necrótica. Los fibroblastos cardiacos están implicados de manera crucial en estos procesos, produciendo factores de crecimiento y citocinas que actúan como factores autocrinos y paracrinos,

así como proteínas de la matriz extracelular y proteinasas. Recientes estudios han mostrado que las interacciones entre fibroblastos cardiacos y cardiomiocitos son esenciales para la progresión del remodelado cardiaco cuyo efecto neto es el deterioro de la función cardiaca y la aparición de insuficiencia cardiaca (Manabe, *et al.*, 2002, *Circ Res.* 13:1103-13).

5

#### Quemaduras y cicatrices

Un problema particular que puede surgir, particularmente en enfermedad fibrótica, es la contracción de tejidos, por ejemplo, contracción de cicatrices. La contracción de tejidos incluyendo componentes de la matriz extracelular, especialmente de tejidos que incluyen colágeno, puede producirse en relación con muchos estados patológicos diferentes y con procedimientos quirúrgicos o estéticos. La contractura, por ejemplo, de cicatrices, puede provocar problemas físicos, que pueden conducir a la necesidad de tratamiento médico, o puede provocar problemas de naturaleza puramente estética. El colágeno es el principal componente de las cicatrices y otros tejidos contraídos y como tal es el componente estructural más importante que debe considerarse. No obstante, las cicatrices y otros tejidos contraídos también incluyen otros componentes estructurales, especialmente otros componentes de la matriz extracelular, por ejemplo, elastina, que también puede contribuir a la contracción del tejido.

La contracción de tejido que incluye colágeno, que también puede incluir otros componentes de la matriz extracelular, se produce con frecuencia en la cicatrización de quemaduras. Las quemaduras pueden ser quemaduras químicas, térmicas o por radiación y pueden ser del ojo, la superficie de la piel o la piel y los tejidos subyacentes. También puede darse el caso de que haya quemaduras en tejidos internos, por ejemplo, provocadas por tratamiento por radiación. La contracción de tejidos con quemaduras es con frecuencia un problema y puede conducir a problemas físicos y/o estéticos, por ejemplo, pérdida de movimiento y/o desfiguración.

Pueden aplicarse injertos de piel por una variedad de motivos y con frecuencia pueden experimentar contracción tras la aplicación. Como con la cicatrización de tejidos con quemaduras, la contracción puede conducir a problemas tanto físicos como estéticos. Es problema particularmente grave cuando se necesitan muchos injertos de piel tal como, por ejemplo, en un caso de quemaduras graves.

La contracción también es un problema en la producción de piel artificial. Para fabricar auténtica piel artificial es necesario tener una epidermis compuesta por células epiteliales (queratinocitos) y una dermis compuesta por colágeno poblado con fibroblastos. Es importante tener ambos tipos de células porque señalizan y se estimulan entre sí usando factores de crecimiento. El componente de colágeno de la piel artificial con frecuencia se contrae hasta menos de una décima parte de su área original cuando está poblado por fibroblastos.

La contracción de cicatrices, contracción debida al encogimiento del tejido fibroso de una cicatriz, es común. En algunos casos, la cicatriz puede convertirse en una cicatriz viciosa, una cicatriz en la que la contracción provoca una deformidad grave. El estómago de un paciente puede dividirse eficazmente en dos cámaras separadas en una contractura en forma de reloj de arena mediante la contracción de tejido cicatricial formado cuando cicatriza una úlcera de estómago. La obstrucción de pasos y conductos, estenosis cicatricial, puede producirse debido a la contracción de tejido cicatricial. La contracción de vasos sanguíneos puede deberse a la obstrucción primaria o a traumatismo quirúrgico, por ejemplo, tras cirugía o angioplastia. También puede producirse la estenosis de otras vísceras huecas, por ejemplo, uréteres. Pueden producirse problemas cuando tiene lugar cualquier forma de cicatrización, ya sea resultante de heridas por accidente o de cirugía. Los estados de la piel y los tendones que implican contracción de tejidos que incluyen colágeno incluyen estados tras traumatismo resultantes de cirugía o accidentes, por ejemplo, lesiones en los tendones de las manos o los pies, estados tras injerto y estados patológicos, tales como esclerodermia, contractura de Dupuytren y epidermolisis bullosa. La cicatrización y contracción de tejidos en el ojo puede producirse en diversos estados, por ejemplo, las secuelas de desprendimiento de retina o enfermedad ocular diabética (tal como se mencionó anteriormente). La contracción de las cuencas encontradas en la calavera para los globos oculares y estructuras asociadas, incluyendo músculos extraoculares o párpados, puede producirse si hay traumatismo o daño inflamatorio. Los tejidos se contraen dentro de las cuencas provocando una variedad de problemas incluyendo visión doble y un aspecto antiestético.

Para más información sobre diferentes tipos de fibrosis véase: Molina V, *et al.*, 2002, *Harefuah*, 141: 973-8, 1009; Yu, *et al.*, 2002, *Curr Opin Pharmacol.* 2(2):177-81; Keane, *et al.*, 2003, *Am J Kidney Dis.* 41: S22-5; Bohle, *et al.*, 1989, *Pathol Res Pract.* 185:421-40; Kikkawa, *et al.*, 1997, *Kidney Int Sup.* 62:S39-40; Bataller *et al.*, 2001, *Semin Liver Dis.* 21:437-51; Gross, *et al.*, 2001 *N Engl J Med.* 345:517-25; Frohlich, 2001, *Am J Hypertens*; 14: 194S-199S; Friedman, 2003, *J Hepatol.* 38:S38-53; Albanis, *et al.*, 2003, *Curr Gastroenterol Rep.* 5:48-56; Weber, 2000, *Curr Opin Cardiol.* 15:264-72.

60

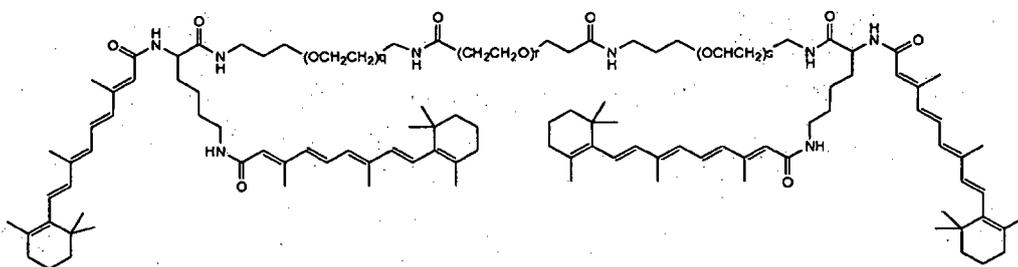
#### Suministro de moléculas de ácido nucleico y formulaciones farmacéuticas

El retinoide o conjugado de retinoide útil para el suministro de ácido nucleico está en un estado en el que está disuelto en, o mezclado con, un medio que puede disolverlo y retenerlo.

65

En la presente descripción puede usarse cualquier retinoide o conjugado de retinoide siempre que se acumule de

manera activa por células estrelladas; los ejemplos de retinoide incluyen, pero no se limitan a, tretinoína, adapaleno, palmitato de retinol, y en particular vitamina A, vitamina A saturada, ácido retinoico, y retinal. Los ejemplos del conjugado de retinoide incluyen conjugados de PEG-retinoide. La presente descripción aprovecha la propiedad de células estrelladas de incorporar de manera positiva un retinoide y/o un conjugado de retinoide, y usando el retinoide y/o conjugado de retinoide como portador de fármaco o uniéndolo a o incluyéndolo en otro componente de portador de fármaco, se transporta un material o cuerpo deseado específicamente a células estrelladas. Un retinoide es un miembro de la clase de compuestos que tienen un esqueleto en el que cuatro unidades de isoprenoide están unidas de una manera cabeza a cola. Véase G. P. Moss, "Biochemical Nomenclature and Related Documents", 2ª ed. Portland Press, págs. 247-251 (1992). La vitamina A es un término descriptivo genérico para un retinoide que muestra cualitativamente la actividad biológica de retinol. El retinoide en la presente descripción fomenta el suministro de sustancia específica a una célula cancerosa y un CAF (es decir, la sustancia se dirige a esas células). Un retinoide de este tipo no está particularmente limitado, y los ejemplos del mismo incluyen retinol, vitamina A, vitamina A saturada, retinal, ácido retinoico, un éster de retinol y un ácido graso, un éster de un alcohol alifático y ácido retinoico, etretinato, tretinoína, isotretinoína, adapaleno, acitretina, tazaroteno, y palmitato de retinol, y análogos de vitamina A tales como fenretinida, y bexaroteno. Los conjugados de retinoide incluyen conjugados de PEG, por ejemplo, diVA-PEG-diVA, mostrados en la siguiente estructura.



Por tanto, el portador de fármaco de la presente descripción puede contener un componente de portador de fármaco distinto de un retinoide y/o conjugado de retinoide. Un componente de este tipo no está particularmente limitado, y puede usarse cualquier componente conocido en los campos de la medicina y la farmacia, pero es preferible que sea capaz de incluir un retinoide y/o conjugado de retinoide. Los ejemplos de un componente de este tipo incluyen un lípido, por ejemplo, un fosfolípido tal como glicerofosfolípido, un esfingolípido tal como esfingomielina, un esteroide tal como colesterol, un aceite vegetal tal como aceite de semilla de soja o aceite de semilla de adormidera, aceite mineral, y una lecitina tal como lecitina de yema de huevo, pero los ejemplos no se limitan a los mismos. Entre ellos, se prefieren aquellos que pueden formar un liposoma, por ejemplo, fosfolípidos naturales tales como lecitina, fosfolípidos semisintéticos tales como dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC), dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) y diestearoilfosfatidilcolina (DSPC), y colesterol.

Además, el portador de fármaco de la presente descripción puede contener una sustancia que mejora la incorporación en células estrelladas, por ejemplo, proteína de unión a retinol (RBP).

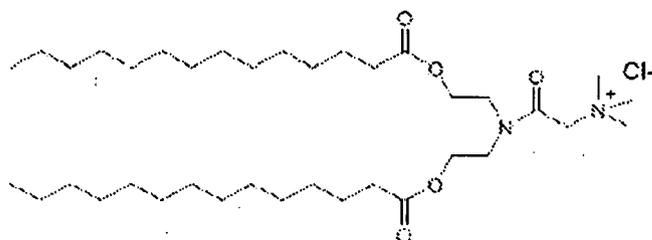
La unión o inclusión del retinoide y/o conjugado de retinoide con el portador de fármaco de la presente descripción también puede llevarse a cabo uniendo o incluyendo el retinoide y/o conjugado de retinoide con otro componente del portador de fármaco mediante métodos químicos y/o físicos. Alternativamente, la unión o inclusión del retinoide y/o conjugado de retinoide con el portador de fármaco de la presente descripción también puede llevarse a cabo mezclando el retinoide y/o conjugado de retinoide que tiene componentes del portador de fármaco básicos y de afinidad de formación, en los componentes de portador de fármaco durante la preparación del portador de fármaco. La cantidad de retinoide y/o conjugado de retinoide unido a o incluido en el portador de fármaco de la presente descripción puede ser del 0,01 % al 100 % como proporción en peso con respecto a los componentes de portador de fármaco, preferiblemente del 0,2 % al 20 % y más preferiblemente del 1 % al 5 %.

Los sistemas de suministro de ácido nucleico pueden incluir, por ejemplo, geles acuosos y no acuosos, cremas, múltiples emulsiones, microemulsiones, liposomas, pomadas, disoluciones acuosas y no acuosas, lociones, aerosoles, polvos y bases de hidrocarburos, y pueden contener excipientes tales como solubilizantes, potenciadores de la permeación (por ejemplo, ácidos grasos, ésteres de ácidos grasos, alcoholes grasos y aminoácidos), y polímeros hidrófilos (por ejemplo, policarbófilo y polivinilpirrolidona). En una realización, el portador farmacéuticamente aceptable es un liposoma o un potenciador transdérmico. Los ejemplos de liposomas que pueden usarse en esta descripción incluyen los siguientes:

- CellFectin, una formulación de liposoma 1:1,5 (M/M) del lípido catiónico N,N',N'',N'''-tetrametil-N,N',N'',N'''-tetrapalmitilpermina y dioleoil-fosfatidiletanolamina (DOPE) (GIBCO BRL);
- Cytofectin GSV, una formulación de liposoma 2:1 (M/M) de un lípido catiónico y DOPE (Glen Research);
- DOTAP (etilsulfato de N-[1-(2,3-dioleoiloxi)-N,N,N-tri-metil-amonio] (Boehringer Mannheim);

• Lipofectamine, una formulación de liposoma 3:1 (M/M) del lípido policationico DOSPA, el lípido neutro DOPE (GIBCO BRL) y aminoácido di-alquilado (DiLA2);

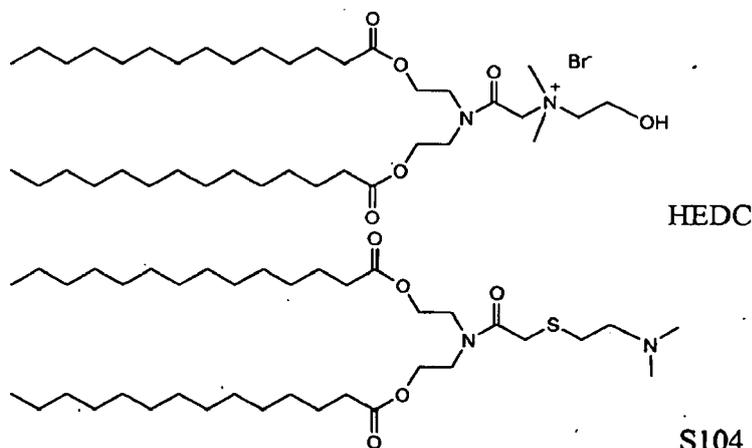
- 5 • Lipotrust, una formulación de liposoma 4:3:3 (M/M) de cloruro de O,O'-ditetradecanoil-N-( $\alpha$ -trimetilamonioacetil)dietanolamina (DC-6-14), colesterol y dioleoilfosfatidiletanolamina (Hokkaido System Science). DC-6-14 consiste en la siguiente estructura.



DC-6-14

10

Otros lípidos pueden ser útiles: lípidos catiónicos permanentes y lípidos catiónicos ionizable, incluyendo



HEDC

S104

15

y PEG-lípidos, incluyendo

- 1,2-dimiristoleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-PEG (PEG-DMPE)
- 20 • 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-PEG (PEG-DPPE),
- 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-PEG (PEG-DSPE), o
- 25 • 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-PEG (PEG-DOPE) y/o
- PEG-ceramida.

30

Los sistemas de suministro pueden incluir parches, comprimidos, supositorios, pesarios, geles y cremas, y pueden contener excipientes tales como solubilizantes y potenciadores (por ejemplo, propilenglicol, sales biliares y aminoácidos), y otros vehículos (por ejemplo, polietilenglicol, ésteres y derivados de ácidos grasos, y polímeros hidrófilos tales como hidroxipropilmetilcelulosa y ácido hialurónico).

35

El portador de fármaco de la presente descripción puede estar en cualquier forma siempre que pueda transportarse un material o cuerpo deseado a células estrelladas diana, y ejemplos de la forma incluyen, pero no se limitan a, micela polimérica, liposoma, emulsión, microesfera y nanoesfera. Además, el portador de fármaco de la presente descripción puede incluir en su interior la sustancia que va a transportarse, unirse al exterior de la sustancia que va a transportarse, o mezclarse con la sustancia que va a transportarse siempre que el retinoide y/o conjugado de retinoide incluido en el mismo esté al menos parcialmente expuesto en el exterior de la preparación antes de alcanzar las células estrelladas como muy tarde.

40

El portador de fármaco de la presente descripción selecciona específicamente como diana células estrelladas y permite que se muestre un efecto deseado tal como, por ejemplo, inhibición o prevención de fibrosis con el máximo efecto y mínimos efectos secundarios transportando eficazmente a células estrelladas un material o cuerpo deseado tal como, por ejemplo, un fármaco para controlar la actividad o el crecimiento de células estrelladas. El material o

cuerpo que suministra el presente portador de fármaco no está particularmente limitado, pero preferiblemente tiene un tamaño que permite el movimiento físico en un organismo vivo desde un sitio de administración hasta el hígado, páncreas, etc., en el que están presentes las células estrelladas. Por tanto, el portador de fármaco de la presente descripción puede transportar no solo un material tal como un átomo, una molécula, un compuesto, una proteína, o un ácido nucleico sino también un cuerpo tal como un vector, una partícula de virus, una célula, un sistema de liberación de fármaco constituido por uno o más elementos, o una micromáquina. El material o cuerpo tiene preferiblemente la propiedad de ejercer algún efecto sobre células estrelladas, y ejemplos del mismo incluyen uno que marca células estrelladas y uno que controla la actividad o el crecimiento de células estrelladas.

Por tanto, en una realización de la presente descripción, es un fármaco para controlar la actividad o el crecimiento de células estrelladas lo que suministra el portador de fármaco. Esto puede ser cualquier fármaco que inhibe directa o indirectamente las acciones fisicoquímicas de células estrelladas implicadas en la promoción de fibrosis, y ejemplos de los mismos incluyen, pero no se limitan a, inhibidores de la actividad de TGF $\beta$  tales como un receptor de TGF $\beta$  tipo II truncado y un receptor de TGF $\beta$  tipo II soluble, preparaciones de factores de crecimiento tales como HGF y vectores de expresión para los mismos, promotores de la producción de MMP tales como un vector de adenovirus que contiene gen de MMP, inhibidores de la producción de TIMP tales como un ácido nucleico de TIMP antisentido, un ligando de PPAR $\gamma$ , inhibidores de la activación celular y/o inhibidores del crecimiento celular tales como un inhibidor de la actividad de angiotensina, un inhibidor de la actividad de PDGF, y un inhibidor de canales de sodio, y también inductores de la apoptosis tales como compuesto 861 y gliotoxina, adiponectina, y un compuesto que tiene actividad inhibidora de Rho cinasa tal como (+)-trans-4-(1-aminoetil)-1-(4-piridilcarbamoil)ciclohexano. Además, el fármaco para controlar la actividad o el crecimiento de células estrelladas en la presente descripción puede ser cualquier fármaco que promueve directa o indirectamente las acciones fisicoquímicas de células estrelladas directa o indirectamente implicadas en la inhibición de fibrosis, y ejemplos de los mismos incluyen, pero no se limitan a, un fármaco para promover un sistema de degradación de colágeno, por ejemplo, promotores de la producción de MMP tales como un vector de expresión de MMP, HGF, y fármacos que tienen actividad de tipo HGF tales como análogos de HGF y vectores de expresión para los mismos.

Otros ejemplos del fármaco para controlar la actividad o el crecimiento de células estrelladas en la presente descripción incluyen un fármaco para controlar el metabolismo de una matriz extracelular tal como colágeno, por ejemplo, una sustancia que tiene un efecto de inhibir la expresión de una molécula diana, tal como ARNip, ribozima, y ácido nucleico antisentido (incluyendo ARN, ADN, ANP, y un material compuesto de los mismos), una sustancia que tiene un efecto negativo dominante, y vectores que expresan los mismos, que seleccionan como diana, por ejemplo, una molécula constituyente de la matriz extracelular producida por células estrelladas o seleccionan como diana una o más moléculas que tienen la función de producir o secretar la molécula constituyente de la matriz extracelular.

La presente descripción también se refiere a un medicamento para tratar un trastorno relacionado con células estrelladas, conteniendo el medicamento el portador de fármaco y el fármaco para controlar la actividad o el crecimiento de células estrelladas, y se refiere al uso del portador de fármaco en la producción de una composición farmacéutica para tratar un trastorno relacionado con células estrelladas. El trastorno relacionado con células estrelladas al que se hace referencia en el presente documento significa un trastorno en el que las células estrelladas están directa o indirectamente implicadas en el proceso del trastorno, es decir, la aparición, exacerbación, mejora, remisión, cura, etc. del trastorno, y los ejemplos de los mismos incluyen trastornos hepáticos tales como hepatitis, en particular hepatitis crónica, fibrosis hepática, cirrosis hepática, y cáncer de hígado, y trastornos pancreáticos tales como pancreatitis, en particular pancreatitis crónica, fibrosis pancreática, y cáncer pancreático.

En el medicamento de la presente descripción, el portador de fármaco puede incluir un fármaco en su interior, estar unido al exterior de una sustancia que contiene fármaco, o mezclarse con un fármaco siempre que el retinoide y/o conjugado de retinoide incluido en el portador de fármaco esté al menos parcialmente expuesto en el exterior de la preparación antes de que alcance las células estrelladas como muy tarde. Por tanto, dependiendo de la vía de administración o la manera en la que se libera el fármaco, el medicamento puede cubrirse con un material apropiado, tal como, por ejemplo, un recubrimiento entérico o un material que se disgrega a lo largo del tiempo, o puede incorporarse en un sistema de liberación de fármaco apropiado.

Por tanto, la presente descripción incluye un portador de fármaco o kit de preparación de medicamento que contiene uno o más recipientes que contienen uno o más de un constituyente de portador de fármaco, un retinoide y/o un conjugado de retinoide, y/o un fármaco, y también incluye un componente esencial para el portador de fármaco o el medicamento proporcionado en forma de un kit de este tipo. El kit de la presente descripción puede contener, además de los descritos anteriormente, una descripción, etc. en la que se describe un método de preparación o un método de administración para el portador de fármaco y el medicamento de la presente descripción. Además, el kit de la presente descripción puede contener todos los componentes para completar el portador de fármaco o el medicamento de la presente descripción pero no contiene necesariamente todos los componentes. Por tanto, no es necesario que el kit de la presente descripción contenga un reactivo o un disolvente que está normalmente disponible en el lugar de tratamiento médico, una instalación de experimentación, etc. tal como, por ejemplo, agua estéril, solución salina o una disolución de glucosa.

La presente descripción se refiere además a un método para tratar un trastorno relacionado con células estrelladas, incluyendo el método administrar una cantidad eficaz del medicamento a un sujeto que lo necesita. La cantidad eficaz a la que se hace referencia en el presente documento es una cantidad que suprime la aparición del trastorno diana, reduce los síntomas del mismo, o previene la progresión del mismo, y preferiblemente es una cantidad que previene la aparición del trastorno diana o cura el trastorno diana. También es preferiblemente una cantidad que no provoca un efecto adverso que supere el beneficio de la administración. Una cantidad de este tipo puede determinarse según sea apropiado mediante una prueba *in vitro* usando células en cultivo, etc. o mediante una prueba en un animal de modelo tal como un ratón, una rata, u perro o un cerdo, y tales métodos de prueba los conoce bien un experto en la técnica.

En el método de la presente descripción, el término "sujeto" significa cualquier individuo vivo, preferiblemente un animal, más preferiblemente un mamífero, y aún más preferiblemente un individuo humano. En la presente descripción, el sujeto puede estar sano o afectado por algún trastorno, y en el caso de que se pretenda tratamiento de un trastorno, el sujeto normalmente significa un sujeto afectado por el trastorno o que tiene riesgo de verse afectado.

Además, el término "tratamiento" incluye todos los tipos de intervención profiláctica y/o terapéutica médicamente aceptable con el propósito de la cura, remisión temporal, prevención, etc. de un trastorno. Por ejemplo, cuando el trastorno es fibrosis hepática, el término "tratamiento" incluye la intervención médicamente aceptable para diversos fines incluyendo retrasar o detener la progresión de fibrosis, regresión o desaparición de lesiones, prevención de la aparición de fibrosis, o prevención de la recidiva.

La presente descripción también se refiere a un método para suministrar un fármaco a células estrelladas usando el portador de fármaco. Este método incluye, pero no se limita a, una etapa de soportar una sustancia que va a suministrarse sobre el portador de fármaco, y una etapa de administrar o añadir el portador de fármaco que porta la sustancia que va a suministrarse a un medio u organismo vivo que contiene células estrelladas, tal como, por ejemplo, un medio de cultivo. Estas etapas pueden lograrse según sea apropiado según cualquier método conocido, el método descrito en la presente memoria descriptiva, etc. Este método de suministro puede combinarse con otro método de suministro, por ejemplo, otro método de suministro en el que un órgano en el que están presentes células estrelladas es la diana, etc.

Las moléculas de ácido nucleico pueden estar adaptadas para su uso para prevenir o tratar enfermedades, características, estados y/o trastornos de fibrosis (por ejemplo, de hígado, de riñón, peritoneal y pulmonar), y/o cualquier otra característica, enfermedad, trastorno o estado que está relacionado con, o responderá a, los niveles de hsp47 en una célula o tejido, solas o en combinación con otras terapias. Una molécula de ácido nucleico puede incluir un vehículo de suministro, incluyendo liposomas, para su administración a un sujeto, portadores y diluyentes y sus sales, y/o puede estar presente en formulaciones farmacéuticamente aceptables.

Las moléculas de ácido nucleico de la descripción pueden incluir secuencias mostradas en la tabla 3. Ejemplos de tales moléculas de ácido nucleico consisten esencialmente en secuencias proporcionadas en la tabla 3.

Las moléculas de ácido nucleico pueden administrarse mediante suministro pulmonar, tal como mediante inhalación de un aerosol o pulverización de formulación seca administrada mediante un dispositivo de inhalación o nebulizador, proporcionando una rápida captación local de las moléculas de ácido nucleico en tejidos pulmonares relevantes. Pueden prepararse composiciones particuladas sólidas que contienen partículas secas respirables de composiciones de ácido nucleico micronizadas triturando composiciones de ácido nucleico secadas o liofilizadas, y después haciendo pasar la composición micronizada a través, por ejemplo, de un tamiz de 400 de malla para descomponer o separar aglomerados grandes. Una composición particulada sólida que comprende las composiciones de ácido nucleico de la descripción puede contener opcionalmente un dispersante que sirve para facilitar la formación de un aerosol así como otros compuestos terapéuticos. Un dispersante adecuado es lactosa, que puede combinarse con el compuesto de ácido nucleico en cualquier proporción adecuada, tal como una proporción de 1 con respecto a 1 en peso.

Los aerosoles de partículas líquidas pueden incluir una molécula de ácido nucleico divulgada en el presente documento y pueden producirse mediante cualquier medio adecuado, tal como con un nebulizador (véase, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 4.501.729). Los nebulizadores son dispositivos comercialmente disponibles que transforman disoluciones o suspensiones de un principio activo en una niebla de aerosol terapéutica o bien por medio de aceleración de un gas comprimido, normalmente aire u oxígeno, a través de un orificio estrecho de tipo Venturi o bien por medio de agitación por ultrasonidos. Las formulaciones adecuadas para su uso en nebulizadores incluyen el principio activo en un portador líquido en una cantidad de hasta el 40 % p/p, preferiblemente menos del 20 % p/p de la formulación. El portador es normalmente agua o una disolución alcohólica acuosa diluida, preferiblemente que se vuelve isotónica con los líquidos corporales mediante la adición, por ejemplo, de cloruro de sodio u otras sales adecuadas. Los aditivos opcionales incluyen conservantes si la formulación no se prepara de manera estéril, por ejemplo, hidroxibenzoato de metilo, antioxidantes, aromatizantes, aceites volátiles, agentes tamponantes y emulsionantes y otros tensioactivos de formulación. Los aerosoles de partículas sólidas que incluyen

la composición activa y tensioactivo también pueden producirse con cualquier generador de aerosol particulado sólido. Los generadores de aerosol para administrar productos terapéuticos particulados sólidos a un sujeto producen partículas que son respirables, tal como se explicó anteriormente, y generan un volumen de aerosol que contiene una dosis medida predeterminada de una composición terapéutica a una velocidad adecuada para la administración a humanos. Un tipo ilustrativo de generador de aerosol particulado sólido es un insuflador. Las formulaciones adecuadas para administración mediante insuflación incluyen polvos finamente triturados que pueden suministrarse por medio de un insuflador. En el insuflador, el polvo, por ejemplo, una dosis medida del mismo eficaz para llevar a cabo los tratamientos descritos en el presente documento, está contenido en cápsulas o cartuchos, normalmente compuestos por gelatina o plástico, que o bien se perforan o bien se abren *in situ* y el polvo se suministra mediante aire extraído a través del dispositivo tras la inhalación o por medio de una bomba accionada manualmente. El polvo empleado en el insuflador consiste o bien únicamente en el principio activo o bien en una combinación en polvo que comprende el principio activo, un diluyente en polvo adecuado, tal como lactosa, y un tensioactivo opcional. El principio activo incluye normalmente desde 0,1 hasta 100 p/p de la formulación. Un segundo tipo de generador de aerosol ilustrativo incluye un inhalador de dosis medida. Los inhaladores de dosis medida son dispensadores de aerosol a presión, que contienen normalmente una formulación en suspensión o disolución del principio activo en un propelente licuado. Durante el uso estos dispositivos descargan la formulación a través de una válvula adaptada para suministrar un volumen medido para producir una pulverización de partículas finas que contiene el principio activo. Los propelentes adecuados incluyen determinados compuestos de clorofluorocarbono, por ejemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano y mezclas de los mismos. La formulación puede contener adicionalmente uno o más codisolventes, por ejemplo, etanol, emulsionantes y otros tensioactivos de formulación, tales como ácido oleico o trioleato de sorbitano, antioxidantes y agentes aromatizantes adecuados. Otros métodos para el suministro pulmonar se describen, por ejemplo, en los documentos US20040037780, US6592904, US6582728 y US6565885. El documento WO08132723 se refiere al suministro mediante aerosol de oligonucleótidos en general, y de ARNip en particular, al sistema respiratorio.

Las moléculas de ácido nucleico pueden administrarse al sistema nervioso central (SNC) o sistema nervioso periférico (SNP). Experimentos han demostrado la captación eficaz *in vivo* de ácidos nucleicos mediante neuronas. Véase, por ejemplo, Sommer *et al.*, 1998, *Antisense Nuc. Acid Drug Dev.*, 8:75; Epa *et al.*, 2000, *Antisense Nuc. Acid Drug Dev.*, 10:469; Broaddus *et al.*, 1998, *J. Neurosurg.*, 88:734; Karle *et al.*, 1997, *Eur. J. Pharmacol.*, 340:153; Bannai *et al.*, 1998, *Cerebro Research*, 784:304; Rajakumar *et al.*, 1997, *Synapse*, 26:199; Wu-pong *et al.*, 1999, *BioPharm*, 12:32; Bannai *et al.*, 1998, *Cerebro Res. Protoc.*, 3:83; y Simantov *et al.*, 1996, *Neuroscience*, 74:39. Por tanto, las moléculas de ácido nucleico son susceptibles de suministro a, y captación por, células en el SNC y/o SNP.

El suministro de moléculas de ácido nucleico al SNC se proporciona mediante una variedad de estrategias diferentes. Los enfoques tradicionales para el suministro al SNC que pueden usarse incluyen, pero no se limitan a, administración intratecal e intracerebroventricular, implantación de catéteres y bombas, inyección directa o perfusión en el sitio del daño o la lesión, inyección en el sistema arterial cerebral, o mediante apertura química u osmótica de la barrera hematoencefálica. Otros enfoques pueden incluir el uso de diversos sistemas de transporte y portador, por ejemplo, mediante el uso de conjugados y polímeros biodegradables. Además, pueden usarse enfoques de terapia génica, por ejemplo, tal como se describe en Kapliitt *et al.*, patente estadounidense n.º 6.180.613 y Davidson, documento WO 04/013280, para expresar moléculas de ácido nucleico en el SNC.

Pueden formularse o complejarse moléculas de ácido nucleico con polietilenimina (por ejemplo, PEI lineal o ramificada) y/o derivados de polietilenimina, incluyendo, por ejemplo, PEI injertadas tales como galactosa-PEI, colesterol-PEI, PEI derivatizada con anticuerpos, y derivados de polietilenglicol-PEI (PEG-PEI) de los mismos (véase, por ejemplo, Ogris *et al.*, 2001, *AAPA PharmSci*, 3, 1-11; Furgeson *et al.*, 2003, *Bioconjugate Chem.*, 14, 840-847; Kunath *et al.*, 2002, *Pharm Res* 19:810-17; Choi *et al.*, 2001, *Bull. Korean Chem. Soc.*, 22:46-52; Bettinger *et al.*, 1999, *Bioconjugate Chem.*, 10:558-561; Peterson *et al.*, 2002, *Bioconjugate Chem.* 13:845-54; Erbacher *et al.*, 1999, *J Gene Med* 1:1-18; Godbey *et al.*, 1999, *PNAS*, 96:5177-81; Godbey *et al.*, 1999, *J Controlled Release*, 60:149-60; Diebold *et al.*, 1999, *J Biol Chem*, 274:19087-94; Thomas *et al.*, 2002, *PNAS*, 99, 14640-45; y Sagara, patente estadounidense n.º 6.586.524).

Las moléculas de ácido nucleico pueden incluir un bioconjugado, por ejemplo, un conjugado de ácido nucleico tal como se describe en Vargeese *et al.*, documento estadounidense con n.º de serie 10/427.160; patente estadounidense n.º 6.528.631; patente estadounidense n.º 6.335.434; patente estadounidense n.º 6.235.886; patente estadounidense n.º 6.153.737; patente estadounidense n.º 5.214.136; patente estadounidense n.º 5.138.045.

Las composiciones, los métodos y los kits divulgados en el presente documento pueden incluir un vector de expresión que incluye una secuencia de ácido nucleico que codifica al menos una molécula de ácido nucleico de la descripción de una manera que permite la expresión de la molécula de ácido nucleico. Los métodos de introducir moléculas de ácido nucleico o uno o más vectores capaces de expresar las cadenas de ARNbc en el entorno de la célula dependerán del tipo de célula y la composición de su entorno. La molécula de ácido nucleico o el constructo de vector pueden introducirse directamente en la célula (es decir, de manera intracelular); o introducirse de manera extracelular en una cavidad, espacio intersticial, en la circulación de un organismo, introducirse por vía oral, o pueden introducirse bañando un organismo o una célula en una disolución que contiene ARNbc. La célula es

preferiblemente una célula de mamífero; más preferiblemente una célula humana. La molécula de ácido nucleico del vector de expresión puede incluir una región sentido y una región antisentido. La región antisentido puede incluir una secuencia complementaria a una secuencia de ARN o ADN que codifica hsp47 y la región sentido puede incluir una secuencia complementaria a la región antisentido. La molécula de ácido nucleico puede incluir dos cadenas distintas que tienen regiones sentido y antisentido complementarias. La molécula de ácido nucleico puede incluir una única cadena que tiene regiones sentido y antisentido complementarias.

Las moléculas de ácido nucleico que interactúan con moléculas de ARN diana y regulan por disminución el gen que codifica moléculas de ARN diana (por ejemplo, moléculas de ARN diana mencionadas en los números de registro de Genbank en el presente documento) pueden expresarse a partir de unidades de transcripción insertadas en vectores de ADN o ARN. Los vectores recombinantes pueden ser plásmidos de ADN o vectores víricos. Pueden construirse vectores víricos que expresan moléculas de ácido nucleico basándose en, pero sin limitarse a, virus adenoasociados, retrovirus, adenovirus, o alfavirus. Los vectores recombinantes capaces de expresar las moléculas de ácido nucleico pueden suministrarse tal como se describe en el presente documento, y persistir en células diana. Alternativamente, pueden usarse vectores víricos que proporcionan la expresión transitoria de moléculas de ácido nucleico. Tales vectores pueden administrarse de manera repetida según sea necesario. Una vez expresadas, las moléculas de ácido nucleico se unen y regulan por disminución la función o expresión génica mediante interferencia de ARN (iARN). El suministro de vectores que expresan moléculas de ácido nucleico puede ser sistémico, tal como mediante administración intravenosa o intramuscular, mediante administración a células diana explantadas de un sujeto seguido por reintroducción en el sujeto, o mediante cualquier otro medio que permitirá la introducción en la célula diana deseada.

Los vectores de expresión pueden incluir una secuencia de ácido nucleico que codifica al menos una molécula de ácido nucleico divulgada en el presente documento, de una manera que permite la expresión de la molécula de ácido nucleico. Por ejemplo, el vector puede contener secuencia(s) que codifica(n) ambas cadenas de una molécula de ácido nucleico que incluyen un dúplex. El vector también puede contener secuencia(s) que codifica(n) una única molécula de ácido nucleico que es complementaria consigo misma y por tanto forma una molécula de ácido nucleico. Se describen ejemplos no limitativos de tales vectores de expresión en Paul *et al.*, 2002, Nature Biotech 19, 505; Miyagishi *et al.*, 2002, Nature Biotech 19, 497; Lee *et al.*, 2002, Nature Biotech 19, 500; y Novina *et al.*, 2002, Nature Med:10.1038/nm725. También pueden incluirse vectores de expresión en una célula de mamífero (por ejemplo, humana).

Un vector de expresión puede incluir una secuencia de ácido nucleico que codifica dos o más moléculas de ácido nucleico, que pueden ser iguales o diferentes. Los vectores de expresión pueden incluir una secuencia para una molécula de ácido nucleico complementaria a una molécula de ácido nucleico a la que se hace referencia mediante un número de registro de Genbank NM\_001235, por ejemplo, las mostradas en la tabla 2.

Un vector de expresión puede codificar una o ambas cadenas de un dúplex de ácido nucleico, o una única cadena complementaria consigo misma que se hibrida consigo misma para dar un dúplex de ácido nucleico. Las secuencias de ácido nucleico que codifican moléculas de ácido nucleico pueden unirse operativamente de una manera que permite la expresión de la molécula de ácido nucleico (véase, por ejemplo, Paul *et al.*, 2002, Nature Biotech, 19:505; Miyagishi y Taira, 2002, Nature Biotech 19:497; Lee *et al.*, 2002, Nature Biotech 19:500; y Novina *et al.*, 2002, Nature Med, 10.1038/nm725).

Un vector de expresión puede incluir uno o más de los siguientes: a) una región de inicio de la transcripción (por ejemplo, región de inicio pol I, II o III eucariota); b) una región de terminación de la transcripción (por ejemplo, región de terminación pol I, II o III eucariota); c) un intrón y d) una secuencia de ácido nucleico que codifica al menos una de las moléculas de ácido nucleico, en el que dicha secuencia está operativamente unida a la región de inicio y la región de terminación de una manera que permite la expresión y/o el suministro de la molécula de ácido nucleico. El vector puede incluir opcionalmente un marco de lectura abierto (ORF) para una proteína operativamente unida al lado 5' o al lado 3' de la secuencia que codifica la molécula de ácido nucleico; y/o un intrón (secuencias intermedias).

La transcripción de las secuencias de moléculas de ácido nucleico puede impulsarse a partir de un promotor para ARN polimerasa I (pol I) eucariota, ARN polimerasa II (pol II), o ARN polimerasa III (pol III). Los transcritos de promotores pol II o pol III se expresan a altos niveles en todas las células; los niveles de un promotor pol II dado en un tipo de célula dado depende de la naturaleza de las secuencias reguladoras del gen (potenciadores, silenciadores, etc.) presentes cerca. También se usan promotores de ARN polimerasa eucariotas, siempre que la enzima ARN polimerasa procariota se exprese en las células apropiadas (Elroy *et al.*, 1990, PNAS, 87:6743-47; Gao *et al.*, 1993, Nucleic Acids Res 21:2867-72; Lieber *et al.*, 1993, Methods Enzymol., 217:47-66; Zhou *et al.*, 1990, Mol. Cell. Biol. 10:4529-37). Varios investigadores han demostrado que moléculas de ácido nucleico expresadas a partir de tales promotores pueden funcionar en células de mamífero (por ejemplo, Kashani-Sabet *et al.*, 1992, Antisense Res. Dev., 2:3-15; Ojwang *et al.*, 1992, PNAS 89:10802-06; Chen *et al.*, 1992, Nucleic Acids Res., 20:4581-89; Yu *et al.*, 1993, PNAS, 90:6340-44; L'Huillier *et al.*, 1992, EMBO J., 11:4411-18; Lisiewicz *et al.*, 1993, PNAS 90: 8000-04; Thompson *et al.*, 1995, Nucleic Acids Res., 23:2259; Sullenger *et al.*, 1993, Science, 262:1566). Más específicamente, unidades de transcripción tales como las derivadas de genes que codifican unidad pequeña

nuclear U6 (ARN<sub>n</sub>), ARN de transferencia (ARN<sub>t</sub>) y ARN de VA de adenovirus son útiles en la generación de altas concentraciones de moléculas de ARN deseadas tales como ANip en células (Thompson *et al.*, citado anteriormente; Couture y Stinchcomb, 1996, citado anteriormente; Noonberg *et al.*, 1994, *Nucleic Acids Res.* 22:2830; Noonberg *et al.*, patente estadounidense n.º 5.624.803; Good *et al.*, 1997, *Gene Ther.*, 4:45; Beigelman *et al.*, publicación PCT internacional n.º WO 96/18736). Las unidades de transcripción de ácido nucleico anteriores pueden incorporarse en una variedad de vectores para la introducción en células de mamífero, incluyendo, pero sin limitarse a, vectores de ADN de plásmidos, vectores de ADN vírico (tales como vectores de adenovirus o virus adenoasociado), o vectores de ARN vírico (tales como vectores retrovíricos o de alfavirus) (véase Couture y Stinchcomb, 1996 citado anteriormente).

La molécula de ácido nucleico puede expresarse dentro de células de promotores eucariotas (por ejemplo, Izant y Weintraub, 1985, *Science*, 229, 345; McGarry y Lindquist, 1986, *PNAS* 83, 399; Scanlon *et al.*, 1991, *PNAS* 88:10591-95; Kashani-Sabet *et al.*, 1992, *Antisense Res. Dev.*, 2:3-15; Dropulic *et al.*, 1992, *J. Virol.*, 66:1432-41; Weerasinghe *et al.*, 1991, *J. Virol.*, 65:5531-34; Ojwang *et al.*, 1992, *PNAS*, 89:10802-06; Chen *et al.*, 1992, *Nucleic Acids Res.*, 20:4581-89; Sarver *et al.*, 1990 *Science*, 247:1222-25; Thompson *et al.*, 1995, *Nucleic Acids Res.*, 23:2259; Good *et al.*, 1997, *Gene Therapy*, 4:45). Los expertos en la técnica constatarán que cualquier ácido nucleico puede expresarse en células eucariotas a partir del vector de ADN/ARN apropiado. La actividad de tales ácidos nucleicos puede aumentarse mediante su liberación a partir del transcrito primario mediante un ácido nucleico enzimático (Draper *et al.*, documento PCT WO 93/23569, y Sullivan *et al.*, documento PCT WO 94/02595; Ohkawa *et al.*, 1992, *Nucleic Acids Symp. Ser.*, 27:15-6; Taira *et al.*, 1991, *Nucleic Acids Res.*, 19:5125-30; Ventura *et al.*, 1993, *Nucleic Acids Res.*, 21:3249-55; Chowrira *et al.*, 1994, *J. Biol. Chem.*, 269:25856).

Un constructo vírico empaquetado en una partícula vírica logrará tanto la introducción eficaz de un constructo de expresión en la célula como la transcripción de constructo de ARNbc codificado por el constructo de expresión.

Los métodos para la introducción oral incluyen el mezclado directo de ARN con alimentos del organismo, así como enfoques modificados por ingeniería en los que una especie que se usa como alimento se modifica por ingeniería para expresar un ARN, después se alimenta al organismo que va a afectarse. Pueden emplearse métodos físicos para introducir una disolución de molécula de ácido nucleico en la célula. Los métodos físicos de introducción de ácidos nucleicos incluyen inyección de una disolución que contiene la molécula de ácido nucleico, bombardeo mediante partículas cubiertas por la molécula de ácido nucleico, empapado de la célula u organismo en una disolución del ARN, o electroporación de membranas celulares en presencia de la molécula de ácido nucleico.

Pueden usarse otros métodos conocidos en la técnica para la introducción de ácidos nucleicos en células, tales como transporte con portador mediado por lípidos, transporte mediado por productos químicos, tales como fosfato de calcio, y similares. Por tanto, las moléculas de ácido nucleico pueden introducirse junto con componentes que realizan una o más de las siguientes actividades: potenciar la captación de ARN por la célula, fomentar la hibridación de las cadenas de dúplex, estabilizar las cadenas hibridadas, o de otro modo aumentar la inhibición del gen diana.

#### Dosificaciones

La dosificación útil que va a administrarse y el modo de administración particular variarán dependiendo de factores tales como el tipo de célula, o para el uso *in vivo*, la edad, peso y animal particular y la región del mismo que va a tratarse, el ácido nucleico particular y el método de suministro usado, el uso terapéutico o de diagnóstico contemplado, y la forma de la formulación, por ejemplo, suspensión, emulsión, micelas o liposoma, tal como apreciarán fácilmente los expertos en la técnica. Normalmente, la dosificación se administra a niveles bajos y se aumenta hasta que se logra el efecto deseado.

Cuando se usan lípidos para suministrar el ácido nucleico, la cantidad de compuesto lipídico que se administra puede variar y depende generalmente de la cantidad de ácido nucleico que esté administrándose. Por ejemplo, la proporción en peso de compuesto lipídico con respecto a ácido nucleico es preferiblemente de desde aproximadamente 1:1 hasta aproximadamente 30:1, prefiriéndose más una proporción en peso de aproximadamente 5:1 a aproximadamente 15:1.

Una unidad de dosificación adecuada de moléculas de ácido nucleico puede estar en el intervalo de 0,001 a 0,25 miligramos por kilogramo de peso corporal del receptor al día, o en el intervalo de 0,01 a 20 microgramos por kilogramo de peso corporal al día, o en el intervalo de 0,01 a 10 microgramos por kilogramo de peso corporal al día, o en el intervalo de 0,10 a 5 microgramos por kilogramo de peso corporal al día, o en el intervalo de 0,1 a 2,5 microgramos por kilogramo de peso corporal al día.

Pueden introducirse cantidades adecuadas de moléculas de ácido nucleico y estas cantidades pueden determinarse empíricamente usando métodos convencionales. Las concentraciones eficaces de especies de moléculas de ácido nucleico individuales en el entorno de una célula pueden ser de aproximadamente 1 femtomolar, aproximadamente 50 femtomolar, 100 femtomolar, 1 picomolar, 1,5 picomolar, 2,5 picomolar, 5 picomolar, 10 picomolar, 25 picomolar, 50 picomolar, 100 picomolar, 500 picomolar, 1 nanomolar, 2,5 nanomolar, 5 nanomolar, 10 nanomolar, 25 nanomolar, 50 nanomolar, 100 nanomolar, 500 nanomolar, 1 micromolar, 2,5 micromolar, 5 micromolar,

10 micromolar, 100 micromolar o más.

Niveles de dosificación del orden de desde aproximadamente 0,1 mg hasta aproximadamente 140 mg por kilogramo de peso corporal al día son útiles en el tratamiento de los estados indicados anteriormente (de aproximadamente 0,5 mg a aproximadamente 7 g por sujeto al día). La cantidad de principio activo que puede combinarse con los materiales portadores para producir una forma de dosificación individual varía dependiendo del huésped tratado y el modo de administración particular. Las formas de unidades de dosificación contienen generalmente desde aproximadamente 1 mg hasta aproximadamente 500 mg de un principio activo.

Se entiende que el nivel de dosis específico para cualquier sujeto particular depende de una variedad de factores incluyendo la actividad del compuesto específico empleado, la edad, peso corporal, salud general, sexo, dieta, hora de administración, vía de administración, y tasa de excreción, combinación de fármacos e intensidad de la enfermedad particular que está sometiéndose a terapia.

Las composiciones farmacéuticas que incluyen la molécula de ácido nucleico divulgada en el presente documento pueden administrarse una vez al día, qid, tid, bid, QD, o a cualquier intervalo y durante cualquier duración que sea médicamente apropiada. Sin embargo, el agente terapéutico también puede administrarse en unidades de dosificación que contienen dos, tres, cuatro, cinco, seis o más subdosis administradas a intervalos apropiados a lo largo de todo el día. En ese caso, las moléculas de ácido nucleico contenidas en cada subdosis pueden ser correspondientemente más pequeñas con el fin de lograr la unidad de dosificación diaria total. La unidad de dosificación también puede estar compuesta por una única dosis a lo largo de varios días, por ejemplo, usando una formulación de liberación sostenida convencional que proporciona liberación sostenida y constante del ARNbc a lo largo de un periodo de varios días. Las formulaciones de liberación sostenida se conocen bien en la técnica. La unidad de dosificación puede contener un múltiplo correspondiente de la dosis diaria. La composición puede estar compuesta de tal manera que la suma de las unidades múltiples de un ácido nucleico juntas contienen una dosis suficiente.

#### Composiciones farmacéuticas, kits y recipientes

También se proporcionan composiciones, kits, recipientes y formulaciones que incluyen una molécula de ácido nucleico (por ejemplo, una molécula de ANip) tal como se proporciona en el presente documento para reducir la expresión de hsp47 para administrar o distribuir la molécula de ácido nucleico a un paciente. Un kit puede incluir al menos un recipiente y al menos una etiqueta. Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, botellas, viales, jeringuillas y tubos de ensayo. Los recipientes pueden formarse a partir de una variedad de materiales tales como vidrio, metal o plástico. El recipiente puede contener secuencia(s) de aminoácidos, molécula(s) pequeña(s), secuencia(s) de ácido nucleico, población/poblaciones celular(es) y/o anticuerpo(s). En una realización, el recipiente contiene un polinucleótido para su uso en el examen del perfil de expresión de ARNm de una célula, junto con reactivos usados para este fin. En otra realización un recipiente incluye un anticuerpo, fragmento de unión del mismo o proteína de unión específica para su uso en la evaluación de la expresión de proteína hsp47 en células y tejidos, o para fines relevantes de laboratorio, pronóstico, diagnóstico, profilácticos y terapéuticos; pueden incluirse indicaciones y/o instrucciones para tales usos en o con tal recipiente, al igual que reactivos y otras composiciones o herramientas usadas para estos fines. Los kits pueden incluir además indicaciones y/o instrucciones asociadas; también pueden incluirse reactivos y otras composiciones o herramientas usadas para tal fin.

El recipiente puede contener alternativamente una composición que es eficaz para tratar, diagnosticar, pronosticar o realizar la profilaxis de un estado y puede tener un orificio de acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa de disolución intravenosa o un vial que tiene un tapón que puede perforarse mediante una aguja de inyección hipodérmica). Los agentes activos en la composición pueden ser una molécula de ácido nucleico capaz de unirse específicamente a hsp47 y/o modular la función de hsp47.

Un kit puede incluir además un segundo recipiente que incluye un tampón farmacéuticamente aceptable, tal como solución salina tamponada con fosfato, solución de Ringer y/o disolución de dextrosa. Puede incluir además otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y de usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, agitadores, agujas, jeringuillas y/o prospectos con indicaciones y/o instrucciones de uso.

Las ampollas de dosificación unitaria o recipientes multidosis, en los que se envasan las moléculas de ácido nucleico antes de su uso, pueden incluir un recipiente herméticamente sellado que encierra una cantidad de polinucleótido o disolución que contiene un polinucleótido adecuada para una dosis farmacéuticamente eficaz del mismo, o múltiplos de una dosis eficaz. El polinucleótido se envasa como formulación estéril, y el recipiente herméticamente sellado está diseñado para conservar la esterilidad de la formulación hasta su uso.

El recipiente en el que el polinucleótido que incluye una secuencia que codifica un elemento de respuesta inmunitaria celular o fragmento del mismo puede incluir un envase que tiene una etiqueta, y la etiqueta puede llevar un aviso en la forma recomendada por una agencia gubernamental, por ejemplo, la Food and Drug Administration, aviso que refleja la aprobación por parte de la agencia según la ley federal, de la fabricación, el uso o la comercialización del material de polinucleótido en el mismo para su administración a humanos.

La ley federal requiere que el uso de composiciones farmacéuticas en la terapia de humanos lo apruebe una agencia del gobierno federal. En los Estados Unidos, la implementación es responsabilidad de la Food and Drug Administration, que emite reglamentos apropiados para obtener tal aprobación, detallados en 21 U.S.C. § 301-392. El reglamento para material biológico, incluyendo productos producidos a partir de los tejidos de animales, se proporciona en 42 U.S.C. § 262. Se requiere una aprobación similar en la mayoría de los países extranjeros. Los reglamentos pueden variar de un país a otro, pero los procedimientos individuales los conocen bien los expertos en la técnica y por consiguiente las composiciones y los métodos proporcionados en el presente documento preferiblemente cumplen con ellos.

La dosificación que va a administrarse depende en gran medida del estado y del tamaño del sujeto que está tratándose así como de la frecuencia de tratamiento y la vía de administración. Los regímenes para continuar la terapia, incluyendo la dosis y la frecuencia, pueden guiarse por la respuesta inicial y el criterio clínico. Se prefiere la vía de inyección parenteral en el espacio intersticial de tejidos, aunque pueden requerirse otras vías parenterales, tales como inhalación de una formulación de aerosol, en administración específica, tal como, por ejemplo, a las membranas mucosas de los tejidos de la nariz, la garganta, los bronquios o los pulmones.

Como tal, en el presente documento se proporciona un producto farmacéutico que puede incluir un polinucleótido que incluye una secuencia que codifica un elemento de respuesta inmunitaria celular o fragmento del mismo en disolución en un portador inyectable farmacéuticamente aceptable y adecuado para su introducción de manera intersticial en un tejido para provocar que las células del tejido expresen un elemento de respuesta inmunitaria celular o fragmento del mismo, un recipiente que encierra la disolución, y un aviso asociado con el recipiente en forma recomendada por una agencia gubernamental que regula la fabricación, uso o comercialización de productos farmacéuticos, aviso que refleja la aprobación por parte de la agencia de la fabricación, uso o comercialización de la disolución de polinucleótido para su administración a humanos.

#### Indicaciones

Las moléculas de ácido nucleico divulgadas en el presente documento pueden usarse para tratar enfermedades, estados o trastornos asociados con hsp47, tales como fibrosis hepática, cirrosis, fibrosis pulmonar, fibrosis renal, fibrosis peritoneal, daño hepático crónico, y fibrillogénesis y cualquier otra enfermedad o estado que está relacionado con o responderá a los niveles de hsp47 en una célula o tejido, solas o en combinación con otras terapias. Como tales, las composiciones, los kits y los métodos divulgados en el presente documento pueden incluir envasar una molécula de ácido nucleico divulgada en el presente documento incluyendo una etiqueta o prospecto. La etiqueta puede incluir indicaciones para el uso de las moléculas de ácido nucleico tales como el uso para el tratamiento o la prevención de fibrosis hepática, fibrosis peritoneal, fibrosis renal y fibrosis pulmonar, y cualquier otra enfermedad o estado que está relacionado con o responderá a los niveles de hsp47 en una célula o tejido, solas o en combinación con otras terapias. Una etiqueta puede incluir una indicación para su uso en la reducción de la expresión de hsp47. Un "prospecto" se usa para hacer referencia a instrucciones habitualmente incluidas en envases comerciales de productos terapéuticos, que contienen información sobre las indicaciones, uso, dosificación, administración, contraindicaciones, otros productos terapéuticos que van a combinarse con el producto envasado y/o advertencias referentes al uso de tales productos terapéuticos, etc.

Los expertos en la técnica reconocerán que otros tratamientos, fármacos y terapias anti-fibrosis conocidos en la técnica pueden combinarse fácilmente con las moléculas de ácido nucleico en el presente documento (por ejemplo, moléculas de ANip) y por tanto se contemplan en el presente documento.

Ahora se describirán los métodos y las composiciones proporcionados en el presente documento con más detalle mediante referencia a los siguientes ejemplos no limitativos.

#### EJEMPLO 1 Preparación de ARNip para gp46

Entre las secuencias óptimas para el reconocimiento de ARNip en la selección como diana de una secuencia de base de HSP47, que es una chaperona molecular común para colágenos (tipos I a IV), se prepararon las secuencias A y B según un programa de diseño de oligómeros de ARNip por iGENE Therapeutics, Inc. Se preparó la secuencia C mediante búsqueda en Internet usando siRNA Target Finder de Ambion, Inc. y seleccionando secuencias de 19 bases que se convertirán en una diana para Gp46 de rata (homólogo de HSP47 humana, n.º de registro de GenBank M69246). Cuando se llevó a cabo el diseño, se tuvo cuidado de comenzar de 75 a 100 bases en el sentido de 3' desde el codón de iniciación, colocar el primer dímero de AA y asegurarse de que el contenido en GC era del 30 % al 70 %. En este ejemplo, se prepararon los ARNip que tenían las siguientes secuencias.

A: GUUCCACCAUAAGAUGGUAGACAAC

B: CCACAAGUUUUAUAUCCAAUCUAGG

C: GAAACCUGUAGAGGCCGCA

EJEMPLO 2 Inhibición de la expresión de gp46 mediante ARNip preparado

5 Se transfectaron células de riñón de rata normales (células NRK), que tenían gp46 de rata y eran fibroblastos que producían colágeno, con ARNip de 0,1 nM a 50 nM y se cultivaron durante de 12 a 48 horas (figura 1). Se comprobó la cantidad de expresión de gp46 mediante el método de inmunotransferencia de tipo Western (figuras 2 a 4, correspondiendo la banda superior a gp46, correspondiendo la banda inferior a control de actina). Todos los ARNip inhibieron la expresión de proteína gp46 notablemente en comparación con un vehículo (figura 2). En el siguiente experimento, se usó la secuencia A de ARNip, que mostró el efecto más fuerte. La inhibición mediante ARNip fue dependiente de la concentración (figura 3); la expresión de proteína mediante gp46 se inhibió en aproximadamente el 90 % mediante ARNip 50 nM a las 48 horas (figura 4).

EJEMPLO 3 Inhibición de la síntesis de colágeno mediante ARNip preparado

15 Con el fin de examinar la cantidad de colágeno sintetizado, se añadió <sup>3</sup>H-prolina al sobrenadante de cultivo de fibroblastos de rata (células NRK) en las condiciones mencionadas anteriormente (concentración de ARNip de 50 nM, tiempo de 48 horas), y tras la transfección se examinó la cantidad de <sup>3</sup>H en la proteína secretada (figura 5). Se calculó la cantidad de colágeno sintetizado a partir de la proporción de proteína secretada en el sobrenadante con respecto a la proteína degradada mediante colagenasa cuando se cultivaron fibroblastos transfectados con ARNip de gp46 en presencia de <sup>3</sup>H-prolina según Peterkofsky *et al.*, 1971 *Biochemistry* 10:988-94.

Proporción de síntesis de colágeno = fracción sensible a colagenasa x 100 (5,4 x fracción insensible a colagenasa + fracción sensible a colagenasa)

25 La proporción de síntesis de colágeno en fibroblastos de rata disminuyó en aproximadamente el 40 % en comparación con un grupo de control (figura 6).

EJEMPLO 4 Transfección específica de ácido nucleico en HSC

30 Se preparó una emulsión (VA-Lip-GFP) mezclando plásmido de expresión de GFP y VA encapsulada en liposoma formada mezclando vitamina A al 10 % (VA) y liposoma. Se disolvieron liposomas catiónicos que contenían cloruro de O,O'-ditetradecanoil-N-( $\alpha$ -trimetilamonioacetil)dietanolamina (DC-6-14) como lípido catiónico, colesterol y dioleoilfosfatidiletanolamina a una proporción molar de 4:3:3 en una mezcla de cloroformo-metanol (4:1, v:v), y se eliminó el disolvente mediante evaporación a vacío. Se mezclaron los lípidos con una disolución acuosa de sacarosa al 9 % y se hidrataron a 60°C y se homogeneizaron hasta la uniformidad. Se extruyó la dispersión dos veces a través de un filtro de membrana de poli(difluoruro de vinilideno) con un tamaño de poro de 0,22  $\mu$ m. Se tomaron alícuotas de la dispersión en viales de vidrio y se congelaron y después se liofilizaron. Se reconstituyeron los liposomas secados con agua destilada a una concentración de DC-6-14 1 mM con agitación con vórtex antes de su uso. Específicamente, en primer lugar, se disolvieron 25 mg de vitamina A en 87  $\mu$ l de DMSO para dar así una disolución madre 100 mM. Para preparar liposomas acoplados a VA, se mezclaron 200 nmol de VA disuelta en DMSO con 100 nmol de DC-6-14 mediante agitación con vórtex a temperatura ambiente. Se administraron por vía intraportal los VA-ARNip-liposomas a una rata, se extrajo tejido hepático y se fijó. Se preparó la emulsión suponiendo que la cantidad de plasma para una rata de 200 g era de aproximadamente 10 ml, y estableciendo las concentraciones de VA y GFP en la sangre portal a 10  $\mu$ M. Se mezcló 1  $\mu$ l de esta disolución madre de VA con 10  $\mu$ l de los VA-liposomas y 179  $\mu$ l de PBS, se añadieron adicionalmente 10  $\mu$ g de plásmido de expresión de GFP a ello para dar un total de 200  $\mu$ l, y se agitó la mezcla con vórtex durante tres minutos para dar VA-Lip-GFP. Se abrió el abdomen de una rata SD, y se inyectó lentamente VA-Lip-GFP en una vena portal periférica. Cuarenta y ocho horas tras la inyección, se extirpó tejido hepático. Dado que, en comparación con otras células hepáticas, la desmina de filamentos intermedios se expresa específicamente en HSC, cuando se tiñó tejido hepático fijado con anticuerpo anti-desmina marcado con Alexa Fluor 568, y se examinó una imagen de fluorescencia doble con GFP, se confirmó que GFP se expresaba dentro de la HSC (figura 7). Para controles no tratados y un grupo al que se le administró el vector de plásmido de expresión de GFP solo, no se observó la expresión en HSC de rata, pero en un grupo al que se le administró VA-Lip-GFP, se observó expresión de GFP específicamente en células estrelladas.

EJEMPLO 5 Análisis cuantitativo de la tasa de transfección de ácido nucleico

De la misma manera que en el ejemplo 4, excepto porque se usó ARNip de gp46 marcado con FITC en lugar del plásmido de expresión de GFP, se preparó una emulsión (VA-Lip-ARNip de gp46 (FITC)) que contenía liposoma encapsulado con VA y ARNip de gp46 marcado con FITC. Se añadió una disolución de ARNip de gp46 (580 pmol/ $\mu$ l en agua destilada) a la disolución de liposoma acoplado a VA del ejemplo 4 con agitación a temperatura ambiente. La proporción de ARNip con respecto a DC-6-14 era de 1:11,5 (mol/mol) y la proporción de ARNip con respecto a liposoma (p/p) era de 1:1. Se eliminaron VA o ARNip libres mediante microrreparto usando un concentrador VIVASPIN, MWCO de 30 K, mediante tres pases. Se reconstituyó el material atrapado en la membrana con PBS y se administró por vía intraportal a una rata SD (10  $\mu$ g como la cantidad de ARNip/200  $\mu$ l). Cuarenta y ocho horas tras la administración se extirpó tejido hepático, se tiñó  $\alpha$ SMA (actina de músculo liso), que en comparación con otras

células hepáticas se expresa específicamente en HSC, con anticuerpo anti- $\alpha$ SMA marcado con Alexa Fluor 568, se tiñeron los núcleos celulares con DAPI, y se examinó una imagen de fluorescencia mediante microscopio de barrido láser confocal (LSM). Tal como se muestra en la parte izquierda de la figura 8, en un grupo al que se le administró VA-Lip-ARNip de gp46 (FITC), se observó un gran número de células que emitían tanto fluorescencia verde debida a FITC como fluorescencia roja debida a Alexa Fluor 568, y cuando se llevó a cabo un análisis cuantitativo mediante NIH Image (se contó el número de células seleccionando 10 campos cualesquiera a partir de una fotografía de microscopio de fluorescencia a X1000), la eficacia de transfección fue del 77,6 % (promedio de 10 campos). Por otro lado, en un grupo al que se le administró Lip-ARNip de gp46 (FITC) que no contenía VA, la eficacia de transfección fue un valor bajo del 14,0 % y, además, se observó transfección en células distintas de células estrelladas al 3,0 % (parte derecha de la figura 8). Se ha encontrado a partir de los resultados anteriores que la eficacia de transfección en células estrelladas aumenta notablemente al incluir VA.

#### EJEMPLO 6 Inhibición de la expresión de gp46 mediante VA-Lip-ARNip de gp46

Con respecto a otra sección del tejido extirpada en el ejemplo 5, se tiñó gp46 con anticuerpo anti-HSP47 marcado con Alexa Fluor 568 y se tiñeron los núcleos celulares con DAPI, y se examinó una imagen de fluorescencia mediante un microscopio de barrido láser confocal. Tal como se muestra en la figura 9, se observó que en un grupo al que se le administró VA-Lip-ARNip de gp46, la expresión de gp46, que puede observarse como fluorescencia roja (parte derecha en la figura), se redujo notablemente en comparación con un grupo de control al que se le administró VA-Lip-ARNip al azar que contenía ARNip al azar, que no era específico para gp46 (parte izquierda en la figura). La tasa de inhibición de la expresión con respecto a un promedio de seis campos del grupo de control fue del 75 %, lo cual era extremadamente alto, cuando el número de células negativas para gp46 se examinó seleccionando diez campos cualesquiera de una fotografía de microscopio de fluorescencia a X1000 usando NIH Image de la misma manera que en el ejemplo 7.

#### EJEMPLO 7 Tratamiento de rata de LC (administración intraportal 1)

Según un informe de Jezequel *et al.* (Jezequel *et al.*, 1987, J Hepatol. 5:174-81), se preparó una rata de modelo de LC usando dimetilnitrosamina (DMN) (figura 10). Específicamente, se administró una dosis de 1 ml/kg de DMN al 1 % (administración intraperitoneal) a una rata SD de cinco semanas de edad (macho) tres días seguidos por semana. Tal como ya se notificó, se observó un aumento en la fibra a partir de la 2ª semana, y en la 4ª semana esto estuvo acompañado por los hallazgos de fibrosis marcada, observándose destrucción de la estructura de lóbulo hepático, y formación de nódulos regenerativos (figura 11). Después, mediante el mismo método que en los ejemplos 4 y 5, se preparó una emulsión (VA-Lip-ARNip de gp46) formulando ARNip de gp46 como un liposoma y mezclando con VA al 10 %, y se administró. Se inició la administración de VA-Lip-ARNip de gp46 en la 3ª semana, momento en el cual se observó suficiente fibrosis, y se llevó a cabo la evaluación en las semanas 4ª y 5ª. Dado que se confirmó mediante el ejemplo 2 que los efectos se observaban durante hasta 48 horas *in vitro*, se llevó a cabo la administración dos veces por semana (figura 11). Se determinó la cantidad administrada según un informe en el cual se inyectó ARNip directamente (McCaffery *et al.*, 2002, Nature 418: 38-39), y fue de 40  $\mu$ g como cantidad total de ARNip. A partir de la tinción con azán del hígado tras la administración de ARNip; en la 4ª semana no había ninguna diferencia aparente entre un grupo al que se le había administrado solución salina, un grupo al que se le había administrado ARNip (al azar), y un grupo al que se le había administrado ARNip (gp46), pero en la 5ª semana se observó una disminución en la cantidad de fibra para el grupo al que se le había administrado ARNip de gp46 (figura 12). Con el fin de analizar cuantitativamente la cantidad de fibra, se extrajo una parte no teñida usando NIH Image, se midió su área (figura 13), y se observó una disminución significativa en el área de colágeno para el grupo al que se le había administrado ARNip de gp46 (figura 14). Además, con el fin de evaluar el grado de fibrosis usando otra medición, se midió cuantitativamente la cantidad de hidroxiprolina, que es un indicador de fibrosis, mediante un método convencional. Específicamente, tras hidrolizar 20 mg de tejido hepático liofilizado con HCl durante 24 horas, se centrifugó el líquido de reacción, y se trató el sobrenadante con un reactivo tal como solución de Ehrlich y se centrifugó. Se recuperó el sobrenadante, y se midió la cantidad de hidroxiprolina en el tejido hepático midiendo la absorbancia a 560 nm (Hepatology 1998, 28:1247-52). Tal como se muestra en la figura 15, en el grupo al que se le había administrado ARNip de gp46, la cantidad de hidroxiprolina se volvió muy pequeña.

#### EJEMPLO 8 Tratamiento de rata de LC (administración intraportal 2)

Además, con el fin de examinar un cambio en la tasa de supervivencia mediante la administración del medicamento de la presente descripción, según un método de Qi Z *et al.* (PNAS 1999; 96:2345-49), se preparó una rata de modelo de LC usando DMN en una cantidad que se aumentó en el 20 % con respecto a la cantidad normal. En este modelo, se llevó a cabo un total de cuatro administraciones intraportales en las semanas primera y segunda. Los detalles de la administración fueron: PBS, Lip-ARNip de gp46, VA-Lip-ARNip al azar, y VA-Lip-ARNip de gp46 (n=7 para cada grupo). Tras la tercera semana, todos los controles (el grupo al que se le había administrado PBS, el grupo al que se le había administrado VA-Lip-ARNip al azar, y el grupo al que se le había administrado Lip-ARNip de gp46) estaban muertos, pero 6 de 7 sobrevivieron para el grupo al que se le había administrado VA-Lip-ARNip de gp46 (figura 16). Además, en la tinción con azán del hígado en el día 21, se observó una disminución aparente de la cantidad de fibra para el grupo al que se le había administrado ARNip de gp46 (figura 17).

EJEMPLO 9 Tratamiento de rata de LC (administración intraportal 3)

En otro experimento, se llevó a cabo la administración intraportal a partir de la 3ª semana para ratas de modelo de LC (DMN al 1 %, 1 mg/kg administrado por vía intraperitoneal 3 veces por semana) preparado según el método de Qi *et al.* y un método de Ueki *et al.*, 1999, Nat Med. 5:226-30, tal como se muestra en la tabla 2 a continuación (n=6 para cada grupo). Se añadió PBS a cada sustancia que iba a administrarse para preparar un volumen total de 200 µl, y la frecuencia de administración fue de una vez por semana.

TABLA 2

Grupo de tratamiento	Contenido de la administración	Dosificación	Frecuencia de administración
10-1	VA	VA, 200 nmol	Dos veces por semana 10-2
10-2	Lip-ARNip de gp46	liposoma, 100 nmol; ARNip de gp46, 100 µg	
10-3	VA-Lip-ARNip al azar	VA, 200 nmol; ARNip liposoma, 100 nmol; ARNip al azar, 100 µg	
10-4	VA-Lip-ARNip de gp46	VA, 200 nmol; liposoma, 100 nmol; ARNip de gp46, 100 µg	
10-5	PBS	200 µl	Tres veces por semana
10-6	VA	VA, 200 nmol	
10-7	VA-Lip	VA, 200 nmol; liposoma, 100 nmol	
10-8	Lip-ARNip de gp46	liposoma, 100 nmol; ARNip de gp46, 150 µg	
10-9	VA-Lip-ARNip al azar	VA, 200 nmol; liposoma, 100 nmol; ARNip al azar, 150 µg	
10-10	VA-Lip-ARNip de gp46	VA, 200 nmol; liposoma, 100 nmol; ARNip de gp46, 150 µg	

A partir de los resultados, en los grupos distintos del grupo al que se le había administrado el medicamento de la presente descripción (grupo de tratamiento 9-4), las 6 ratas estaban muertas en el día 45 tras comenzar la administración de DMN, pero en el grupo al que se le había administrado el medicamento de la presente descripción, todos los individuos salvo un caso, que estaba muerto en el día 36, sobrevivieron durante más de 70 días tras comenzar la administración de DMN (figura 18). Para los individuos muertos, se analizó cuantitativamente la cantidad de fibra hepática basándose en el área de colágeno de la misma manera que en el ejemplo 7, y el aumento de la cantidad de fibra hepática se inhibió notablemente mediante la administración de VA-Lip-ARNip de gp46 (figura 19).

EJEMPLO 10 Tratamiento de rata de LC (administración intravenosa)

Se llevó a cabo la administración intravenosa a partir de la 3ª semana para ratas de modelo de LC (DMN al 1 %, 1 mg/PC (g) administrado por vía intraperitoneal 3 veces por semana) preparadas de la misma manera que en el ejemplo 9, tal como se muestra en la siguiente tabla (n=6 para cada grupo). Se añadió PBS a cada sustancia que iba a administrarse para preparar un volumen total de 200 µl. El periodo de administración fue hasta la muerte excepto porque fue hasta la 7ª semana para el grupo 10-4 y la 6ª semana para el grupo 10-10.

A partir de los resultados, en los grupos distintos de los grupos a los que se les había administrado el medicamento de la presente descripción (grupos de tratamiento 10-4 y 10-10), las 6 ratas estaban muertas en el día 45 tras comenzar la administración de DMN, pero en los grupos a los que se les había administrado el medicamento de la presente descripción, todos los individuos, aparte de un caso en el que dos ratas estaban muertas en el día 45 en el grupo de tratamiento 10-4, sobrevivieron durante más de 70 días tras comenzar la administración de DMN (figuras 20 y 21). Para los individuos muertos, se analizó cuantitativamente la cantidad de fibra hepática de la misma manera que en el ejemplo 7, y se inhibió notablemente el aumento de la cantidad de fibra hepática mediante administración de VA-Lip-ARNip de gp46 (figura 22).

Los resultados mencionados anteriormente muestran que el medicamento de la presente descripción es extremadamente eficaz para la prevención y el tratamiento de la fibrosis, en la que están implicadas células estrelladas.

EJEMPLO 11 Mejora de resultados mediante RBP (proteína de unión a retinol)

Se examinó la influencia de RBP sobre la eficacia de transfección de VA-Lip-ARNip de gp46 usando LI90, una línea celular derivada de HSC humana. Se añadieron 100 nM de VA-Lip-ARNip de gp46 (FITC) preparado en el ejemplo 5, junto con diversas concentraciones (es decir el 0, el 0,1, el 0,5, el 1, el 2, el 4 o el 10 %) de FBS (suero bovino

fetal), a LI90 durante el cultivo y se cultivó durante 48 horas, se observó una imagen de fluorescencia mediante LSM, y se analizó cuantitativamente la cantidad de ARNip incorporado en células individuales mediante FACS. El FBS contenía aproximadamente 0,7 mg/dl de RBP. Tal como se muestra en la figura 23, FBS (RBP) dio un aumento dependiente de la concentración de la cantidad de transfección de ARNip. Posteriormente, se añadieron 100 nM de VA-Lip-ARNip de gp46 (FITC) y FBS al 4 %, junto con 10 µg (21,476 nmol) de anticuerpo anti-RBP, a LI90 durante el cultivo, y se evaluó la eficacia de transfección de ARNip de la misma manera. Tal como se muestra en la figura 24, el aumento de la cantidad de transfección mediante RBP disminuyó notablemente mediante la adición de anticuerpo anti-RBP. Los resultados mencionados anteriormente muestran que RBP es eficaz en potenciar adicionalmente la transfección del medicamento de la presente descripción.

**EJEMPLO 12 Selección de secuencias de moléculas de ácido nucleico de hsp47**

Se diseñaron moléculas de ácido nucleico (por ejemplo, ANip ≤ 25 nucleótidos) contra Hsp47 usando varios programas informáticos incluyendo siRNA en el Whitehead Institute for Biomedical Research, siRNA Design (Integrated DNA Technologies), BLOCK-iT RNAi Designer (Invitrogen), siDESIGN Center (Dharmacon), y BIOPREDSi (Friedrich Miescher Institute for Biomedical Research). Se compararon las secuencias de los ARNip de mayor puntuación a partir de estos programas y se seleccionaron (véase la tabla 3) basándose en los algoritmos, así como en la homología de secuencia entre humano y rata. Se validaron las secuencias candidatas mediante ensayos de atenuación *in vitro*.

Se consideraron varios parámetros para seleccionar una secuencia de molécula de ácido nucleico (por ejemplo, un ARNip de 21 meros). Los parámetros a modo de ejemplo incluyen:

- estabilidad termodinámica (RISC favorece la cadena con un extremo 5' menos estable)
- contenido en GC del 30-52 %
- preferencia de nucleótidos posicional:



en la que N es cualquier nucleótido

- desprovisto de supuestos motivos inmunoestimulantes
- proyección de 2 nucleótidos en 3'
- posición de ARNip dentro del transcrito (preferiblemente dentro de la región de ADNc)
- especificidad de secuencia (comprobada usando BLAST)
- variaciones en un único nucleótido mediante comprobación de la base de datos de SNP

Se diseñaron secuencias de ARNi que tenían ≤ 25 nucleótidos basándose en los métodos anteriores. Se diseñó el ARNip de sustrato de Dicer correspondiente (por ejemplo, ≥ 26 nucleótidos) basándose en las secuencias más pequeñas y se extendió el sitio diana del ANip ≤ 25 nucleótidos mediante adición de cuatro bases al extremo 3' de la cadena sentido y 6 bases al extremo 5' de la cadena antisentido. Los sustratos de Dicer que se prepararon tienen generalmente una cadena sentido de 25 bases y una cadena antisentido de 27 bases con una molécula con proyección en 3' y extremo como asimétrico. Las secuencias de la cadena sentido y antisentido sin modificación de bases (secuencia de base) y con modificaciones (secuencia experimental) se proporcionan en la tabla 3.

TABLA 3

ARNip	Región diana		Secuencia de base (nucleótidos correspondientes de SEQ ID NO: 1)	Secuencia experimental (nucleótidos correspondientes de SEQ ID NO: 1)
siHSP47-C	hsp47 humana / de rata	sentido	5' GGACAGGCCUCUACAACUAUU (SEQ ID NO: 3) [945-963]	5' GGACAGGCCUCUACAACUAAdTdT (SEQ ID NO: 5)
		anti-sentido	5' UAGUUGUAGAGGCCUGUCCUU (SEQ ID NO: 4) [945-963]	5' UAGUUGUAGAGGCCUGUCCdTdT (SEQ ID NO: 6) [945-963]
siHSP47-Cd	hsp47 humana / de rata	sentido	5' GGACAGGCCUCUACAACUACUACGA (SEQ ID NO: 7) [945-969]	5' GGACAGGCCUCUACAACUACUACdGdA (SEQ ID NO: 9) [945-969]
		anti-sentido	5' UCGUAGUAGUUGUAGAGGCCUGUCCUU (SEQ ID NO: 8) [945-969]	5' UCGUAGUAGUUGUAGAGGCCUGUCCUU (SEQ ID NO: 10) [945-969]
siHSP47-1	hsp47 humana	sentido	5' CAGGCCUCUACAACUACUAUU (SEQ ID NO: 11) [948-966]	5' CAGGCCUCUACAACUACUAAdTdT (SEQ ID NO: 13) [948-966]

	/ de rata	anti-sentido	5' UAGUAGUUGUAGAGGCCUGUU (SEQ ID NO: 12) [948-966]	5' UAGUAGUUGUAGAGGCCUGdTdT (SEQ ID NO: 14) [948-966]
siHsp47-1d	hsp47 humana	sentido	5' CAGGCCUCUACAACUACUACGACGA (SEQ ID NO: 15) [948-972]	5' CAGGCCUCUACAACUACUACGACdGdA (SEQ ID NO: 17) [948-972]
		anti-sentido	5' CGUCGUAGUAGUUGUAGAGGCCUGUU (SEQ ID NO: 16) [948-972]	5' CGUCGUAGUAGUUGUAGAGGCCUGUU (SEQ ID NO: 18) [948-972]
siHsp47-2	hsp47 humana	sentido	5' GAGCACUCCAAGAUAACUUU (SEQ ID NO: 19) [698-717]	5' GAGCACUCCAAGAUAACUdTdT (SEQ ID NO: 21) [698-717]
		anti-sentido	5' AGUUGAUCUUGGAGUGCUCUU (SEQ ID NO: 20) [698-716]	5' AGUUGAUCUUGGAGUGCdTdT (SEQ ID NO: 22) [698-716]
siHsp47-2d	hsp47 humana	sentido	5' GAGCACUCCAAGAUAACUCCGCG (SEQ ID NO: 23) [698-722]	5' GAGCACUCCAAGAUAACUCCGdCdG (SEQ ID NO: 25) [698-722]
		anti-sentido	5' CGCGGAAGUUGAUCUUGGAGUGCUCUU (SEQ ID NO: 24) [698-722]	5' GCGGAAGUUGAUCUUGGAGUGCUCUU (SEQ ID NO: 26) [698-722]
siHsp47-2d rata	Gp46 de rata	sentido	5' GAACACUCCAAGAUAACUCCGAG (SEQ ID NO: 27) [587-611]	5' GAACACUCCAAGAUAACUCCGdAdG (SEQ ID NO: 29) [587-611]
		anti-sentido	5' CUCGGAAGUUGAUCUUGGAGUGUUCUU (SEQ ID NO: 28) [587-611]	5' UCGGAAGUUGAUCUUGGAGUGUUCUU (SEQ ID NO: 30) [587-611]
siHsp47-3	hsp47 humana	sentido	5' CUGAGGCCAUUGACAAGAAUU (SEQ ID NO: 31) [1209-1227]	5' CUGAGGCCAUUGACAAGAdTdT (SEQ ID NO: 33) [1209-1227]
		anti-sentido	5' UUCUUGUCAAUUGGCCUCAGUU (SEQ ID NO: 32) [1209-1227]	5' UUCUUGUCAAUUGGCCUCAGdTdT (SEQ ID NO: 34) [1209-1227]
siHsp47-3d	hsp47 humana	sentido	5' CUGAGGCCAUUGACAAGAACAAGGC (SEQ ID NO: 35) [1209-1233]	5' CUGAGGCCAUUGACAAGAACAAGdGdC (SEQ ID NO: 37) [1209-1233]
		anti-sentido	5' CCUUGUUCUUGUCAAUUGGCCUCAGUU (SEQ ID NO: 36) [1209-1233]	5' GCCUUGUUCUUGUCAAUUGGCCUCAGUU (SEQ ID NO: 38) [1209-1233]
siHsp47-4	hsp47 humana	sentido	5' CUACGACGACGAGAAGGAAUU (SEQ ID NO: 39) [964-982]	5' CUACGACGACGAGAAGGAdTdT (SEQ ID NO: 41) [964-982]
		anti-sentido	5' UUCUUCUCGUCGUCGUAGUU (SEQ ID NO: 40) [964-982]	5' UUCUUCUCGUCGUCGUAGdTdT (SEQ ID NO: 42) [964-982]
siHsp47-4d	hsp47 humana	sentido	5' CUACGACGACGAGAAGGAAAAGCUG (SEQ ID NO: 43) [964-988]	5' CUACGACGACGAGAAGGAAAAGCdTdT (SEQ ID NO: 45) [964-988]
		anti-sentido	5' AGCUUUCCUUCUCGUCGUCGUAGUU (SEQ ID NO: 44) [964-988]	5' AGCUUUCCUUCUCGUCGUCGUAGUU (SEQ ID NO: 46) [964-988]
siHsp47-5	hsp47 humana	sentido	5' GCCACACUGGGAUGAGAAUU (SEQ ID NO: 47) [850-870]	5' GCCACACUGGGAUGAGAAdTdT (SEQ ID NO: 49) [850-870]
		anti-sentido	5' UUUUCUAUCCAGUGUGGCUU (SEQ ID NO: 48) [850-868]	5' UUUUCUAUCCAGUGUGGcdTdT (SEQ ID NO: 50) [850-868]
siHsp47-6	hsp47 humana	sentido	5' GCAGCAAGCAGCACUACAAUU (SEQ ID NO: 51) [675-693]	5' GCAGCAAGCAGCACUACAAdTdT (SEQ ID NO: 53) [675-693]
		anti-sentido	5' UUGUAGUGCUGCUUGCUGCUU (SEQ ID NO: 52) [675-693]	5' UUGUAGUGCUGCUUGCUGCdTdT (SEQ ID NO: 54) [675-693]
siHsp47-7	hsp47 humana	sentido	5' CCGUGGGUGUCAUGAUGAUUU (SEQ ID NO: 55) [921-939]	5' CCGUGGGUGUCAUGAUGAUdTdT (SEQ ID NO: 57) [921-939]
		anti-sentido	5' AUCAUCAUGACACCCACGGUU (SEQ ID NO: 56) [921-939]	5' AUCAUCAUGACACCCACGGdTdT (SEQ ID NO: 58) [921-939]

### EJEMPLO 13

- 5 Con el fin de seleccionar las potentes de diversas moléculas de ANip contra los genes de hsp47 tanto humana como de rata, se establecieron diversas líneas celulares indicadoras mediante inducción por lentivirus de constructo de ADNc de HSP47 humana-proteína verde fluorescente (GFP) o ADNc de GP46 de rata-GFP en líneas celulares 293, HT1080, línea de HSC humana hTERT, o NRK. Se evaluaron adicionalmente estas líneas celulares mediante ARNip contra GFP. Se midió la señal de fluorescencia restante y se normalizó con respecto a ARNip aleatorizado (Ambion)
- 10 y posteriormente se normalizó con respecto a la viabilidad celular. Los resultados mostraron que ARNip contra GFP atenúa la fluorescencia en diferentes grados en diferentes líneas celulares (figura 25). Se seleccionaron las líneas celulares 293\_HSP47-GFP y 293\_GP46-GFP para el examen de siHsp47 debido a su facilidad de transfección y sensibilidad a la atenuación de la fluorescencia.
- 15 Se transfectaron células con 1,5 pmol por pocillo de ANip contra GFP en placas de cultivo tisular de 96 pocillos usando Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen) en un modo de transfección inversa. Se sembraron células a 6.000 células por pocillo y se mezclaron con los complejos de ANip. Se tomaron lecturas de fluorescencia tras una incubación de 72 horas con un lector de microplacas multimodal Synergy 2 (BioTek).
- 20 Se midieron las células tratadas con o sin ANip para determinar la viabilidad tras una incubación de 72 horas usando el kit de ensayo de viabilidad celular luminiscente CellTiter-Glo según el manual (Promega). Se normalizaron las lecturas con respecto a muestras tratadas con moléculas de ANip aleatorizado.

EJEMPLO 14 Evaluación de la eficacia inhibidora de siHsp47 sobre expresión de hsp47 en líneas celulares indicadoras

Se evaluaron ANip contra hsp47 para determinar su eficacia inhibidora en líneas celulares 293\_HSP47-GFP y 293\_GP46-GFP evaluando el cambio en la señal fluorescente a partir de la GFP indicadora. Se llevaron a cabo los experimentos tal como se describió en el ejemplo 2. Se normalizaron las señales fluorescentes con respecto a señales fluorescentes de células tratadas con ARNip aleatorizado (Ambion) que sirvieron de control. Los resultados indican que las moléculas de ANip de hsp47 sometidas a prueba eran eficaces en la inhibición de ARNm de hsp47 en ambas líneas celulares. Sin embargo, ANip contra ARNm de GP46 (tal como se publicó en el artículo de 2008 de Sato *et al.*) solo fue eficaz en la línea celular 293\_GP46-GFP. Los resultados se muestran en las figuras 26A y 26B.

Se evaluaron las líneas celulares 293\_HSP47-GFP y 293\_GP46-GFP tratadas con ARNip contra hsp47 y gp46 para determinar la viabilidad usando los métodos descritos en el ejemplo 2. Se normalizó la viabilidad celular con respecto a células tratadas con ARNip aleatorizado (Ambion). Los resultados indican que la viabilidad celular no se vio afectada significativamente por el tratamiento con moléculas de ANip. Sin embargo, la viabilidad celular de las líneas celulares 293\_HSP47-GFP tratadas con diferentes moléculas de ANip de hsp47 varió dependiendo de las moléculas de ANip usadas, mientras que la viabilidad de las líneas celulares 293\_GP46-GFP fue similar. La viabilidad para células 293\_HSP47-GFP fue inferior para células tratadas con siHsp47-6 y Hsp47-7 que para el resto. Los resultados se muestran en las figuras 26C y 26D.

EJEMPLO 15 Evaluación del efecto inhibidor de siHsp47 sobre ARNm de hsp47 mediante qPCR TaqMan®

En el ejemplo 14, se evaluó la eficacia de atenuación de siHsp47 en líneas celulares indicadoras mediante el cambio en la señal fluorescente. Para validar los resultados a nivel de ARNm, se transfectaron ARNip que seleccionaban como diana hsp47 endógena en células de la línea celular de HSC humanas hTERT usando Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen) en un modo de transfección inversa tal como se describió en el ejemplo 13.

Se evaluó el nivel de ARNm de hsp47 para determinar la eficacia de atenuación de las diversas moléculas de ANip de siHsp47 sometidas a prueba. En resumen, se aislaron ARNm de células hTERT tras 72 horas después de la transfección usando un kit RNeasy mini (Qiagen). Se determinó el nivel de ARNm de hsp47 mediante transcripción inversa acoplada con PCR cuantitativa usando sondas TaqMan®. En resumen, se llevó a cabo la síntesis de ADNc usando el kit de transcripción inversa de ADNc High-Capacity (ABI) según las instrucciones del fabricante, y se sometió a ensayo de expresión génica TaqMan (ABI, hsp47). Se normalizó el nivel de ARNm de hsp47 con respecto al nivel de ARNm de GAPDH según las instrucciones del fabricante (ABI). Los resultados indican que siHsp47-C era el más eficaz de todos los ARNip de hsp47, siHsp47-2 y siHsp47-2d fueron los siguientes más eficaces. Las combinaciones de siHsp47-1 con siHsp47-2 o siHsp47-1 con siHsp47-2d fueron más eficaces que siHsp47-1 solo. Los resultados se muestran en la figura 27.

EJEMPLO 16 Validación del efecto de atenuación de siHsp47 a nivel de proteína

Se validó el efecto inhibidor de diferentes moléculas de ANip de Hsp47 (siHsp47) sobre la expresión de ARNm de hsp47 a nivel de proteína midiendo HSP47 en células hTERT transfectadas con diferentes siHsp47. Se realizó la transfección de células hTERT con diferentes siHsp47 tal como se describió en el ejemplo 13. Se sometieron células hTERT transfectadas a lisis y se aclaró el lisado celular mediante centrifugación. Se resolvieron proteínas en el lisado celular aclarado mediante electroforesis en SDS-gel de poliacrilamida. Se determinó el nivel de proteína HSP47 en el lisado celular usando un anticuerpo anti-HSP47 (Assay Designs) como anticuerpo primario, anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón conjugado con HRP (Millipore) como anticuerpo secundario, y posteriormente se detectó mediante el kit de quimioluminiscencia Supersignal West Pico (Pierce). Se usó anticuerpo anti-actina (Abcam) como control de carga de proteína. El resultado mostró una disminución significativa en el nivel de proteína Hsp47 en células tratadas con siHsp47-C, siHsp47-2d, solos o combinación de siHsp47-1 con siHsp47-2d.

EJEMPLO 17 Regulación por disminución de la expresión de colágeno I mediante ARNip de hsp47

Para determinar el efecto de siHsp47 sobre el nivel de expresión de colágeno I, se midió el nivel de ARNm de colágeno I en células hTERT tratadas con diferentes ARNip contra hsp47. En resumen, se transfectaron células hTERT con diferentes siHsp47 tal como se describió en el ejemplo 13. Se sometieron las células a lisis tras 72 horas y se aislaron ARNm usando el kit RNeasy mini según el manual (Qiagen). Se determinó el nivel de ARNm de colágeno I mediante transcripción inversa acoplada con PCR cuantitativa usando sondas TaqMan®. En resumen, se llevó a cabo la síntesis de ADNc usando el kit de transcripción inversa de ADNc High-Capacity (ABI) según el manual, y se sometió a ensayo de expresión génica TaqMan (ABI, ensayo COL1A1). Se normalizó el nivel de ARNm de colágeno I con respecto al nivel de ARNm de GAPDH según las instrucciones del fabricante (ABI). Se normalizaron las señales con respecto a la señal obtenida a partir de células transfectadas con ANip aleatorizado. El resultado indicó que el nivel de ARNm de colágeno I se reduce significativamente en las células tratadas con algunos de los candidatos siHsp47-2, siHsp47-2d, y su combinación con siHsp47-1 y se muestran en la figura 28.

EJEMPLO 18 Tinción de inmunofluorescencia de células hTERT tratadas con ARNip de hsp47

Para visualizar la expresión de dos marcadores de fibrosis, colágeno I y alfa-actina de músculo liso (SMA), en células hTERT transfectadas con o sin siHsp47, se tiñeron las células con anticuerpo de conejo anti-colágeno I (Abcam) y anticuerpo de ratón anti-alfa-SMA (Sigma). Se usaron anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón con Alexa Fluor 594 y anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo con Alexa Fluor 488 (Invitrogen (Molecular Probes)) como anticuerpos secundarios para visualizar el colágeno I (verde) y alfa-SMA (rojo). Se usó Hoescht para visualizar los núcleos (azul). Los resultados indican correlación entre la atenuación mediante ARNip de algunos de los genes diana y la expresión de colágeno/SMA.

#### 10 EJEMPLO 19 Pruebas *in vivo* de siHSP47 en modelos de animales de fibrosis hepática

La secuencia de dúplex de ARNip para HSP47 (siHSP47C) es tal como se indica a continuación.

15 Sentido (5'→3') ggacaggccuacaacuaTT

Antisentido (5'→3') uaguuguaggccuguccTT

20 Se preparó una disolución madre de ARNip 10 mg/ml mediante disolución en agua libre de nucleasa (Ambion). Para el tratamiento de ratas con cirrosis, se formuló ARNip con liposoma acoplado a vitamina A tal como se describió por Sato *et al* (Sato Y. *et al.* 2008 Nature Biotech. 26:431) con el fin de seleccionar como diana HSC activadas que producen colágeno. La formulación de vitamina A (VA)-liposoma-ARNip consiste en 0,33  $\mu$ mol/ml de VA, 0,33  $\mu$ mol/ml de liposoma (Coatsome EL, NOF Corporation) y 0,5  $\mu$ g/ $\mu$ l de ARNip en disolución de glucosa al 5 %.

25 Se indujo cirrosis hepática en ratas SD macho de cuatro semanas de edad con dimetilnitrosoamina al 0,5 % (DMN) (Wako Chemicals, Japón) en solución salina tamponada con fosfato (PBS). Se administró una dosis de 2 ml/kg de peso corporal por vía intraperitoneal durante 3 días consecutivos por semana en los días 0, 2, 4, 7, 9, 11, 14, 16, 18, 21, 23, 25, 28, 30, 32, 34, 36, 38 y 40

30 Tratamiento con ARNip: se llevó a cabo el tratamiento con ARNip desde el día 32 y durante 5 inyecciones intravenosas. En detalle, se trataron las ratas con ARNip en los días 32, 34, 36, 38 y 40. Después, se sacrificaron las ratas en el día 42 o 43. Se sometieron a prueba 3 dosis de ARNip diferentes (1,5 mg de ARNip por kg de peso corporal, 2,25 mg de ARNip por kg de peso corporal, 3,0 mg de ARNip por kg de peso corporal).

35 El detalle de los grupos sometidos a prueba y el número de animales en cada grupo es el siguiente:

1) Se indujo cirrosis mediante inyección de DMN, después se inyectó glucosa al 5 % en lugar de ARNip) (n=10)

2) VA-Lip-siHSP47C a 1,5 mg/kg (n=10)

40 3) VA-Lip-siHSP47C a 2,25 mg/kg (n=10)

4) VA-Lip-siHSP47C a 3,0 mg/Kg (n=10)

45 5) Simulado (se inyectó PBS en lugar de DMN; se inyectó glucosa al 5 % en lugar de ARNip) (n=6)

6) Control sin tratamiento (intacto) (n=6)

VA-Lip se refiere a complejo de vitamina A - liposoma.

50 Evaluación de la eficacia terapéutica: En el día 43, 2 de 10 animales en el grupo de "ratas enfermas" y 1 de 10 animales en el grupo de "VA-Lip-ARNip de siHSP47C a 1,5 mg/kg" murieron debido al desarrollo de cirrosis hepática. El resto de los animales sobrevivieron. Tras sacrificar las ratas, se fijaron tejidos hepáticos en formalina al 10 %. Después, se embebió el lóbulo izquierdo de cada hígado en parafina para la histología. Se tiñeron secciones de tejido con rojo sirio, y hematoxilina y eosina (HE). Se empleó tinción con rojo sirio para visualizar depósitos de colágeno y para determinar el nivel de cirrosis. La tinción con HE fue para núcleos y citoplasma como contratinción. Se observó cada sección con el microscopio (BZ-8000, Keyence Corp. Japón) y se determinó el porcentaje de área teñida con rojo sirio por sección mediante software de análisis de imágenes incorporado en el microscopio. Se prepararon al menos 4 secciones por cada hígado para el análisis de imágenes, y se capturó el área completa de cada sección (sección de hígado) mediante cámara y se analizó. Se llevó a cabo análisis estadístico mediante la prueba de la t de Student.

65 Resultados: La figura 29 muestra las áreas fibróticas. El área de fibrosis en "ratas enfermas" fue mayor que en los grupos "simulado" o "control sin tratamiento". Por tanto, el tratamiento con DMN indujo depósito de colágeno en el hígado, lo cual era una observación típica de fibrosis hepática. Sin embargo, el área de fibrosis se redujo significativamente mediante el tratamiento de ARNip que seleccionaba como diana el gen de HSP47, en comparación con el grupo de "ratas enfermas" (figura 29). Este resultado indica que ARNip tal como se divulga en el

presente documento tiene una eficacia terapéutica en la enfermedad real.

Se sometieron a prueba compuestos de ARNip adicionales en el modelo de animal de fibrosis hepática, y se mostró que reducían el área fibrótica en el hígado.

5 EJEMPLO 20 Generación de secuencias para compuestos de ARN bicatenario activos frente a HSP47/SERPINH1 y producción de los ARNip mostrados en las tablas 4, 5, B, C, D y E.

10 Se generan dúplex mediante hibridación de oligonucleótidos monocatenarios complementarios. En una campana de flujo laminar, se prepara una disolución madre 500  $\mu$ M de oligonucleótido monocatenario mediante dilución en WFI (agua para inyección). Se determinan las concentraciones de ARNmc reales mediante dilución de cada ARNmc 500  $\mu$ M 1:200 usando WFI, y midiendo la DO usando Nano Drop. Se repite el procedimiento 3 veces y se calcula la concentración promedio. Después se diluye la disolución madre hasta una concentración final de 250  $\mu$ M. Se hibridaron compuestos monocatenarios complementarios mediante calentamiento hasta 85°C y permitiendo enfriar hasta temperatura ambiente a lo largo de al menos 45 minutos. Se sometieron a prueba dúplex para determinar la hibridación completa sometiendo a prueba 5  $\mu$ l en un gel de poliacrilamida al 20 % y tiñendo. Se almacenaron las muestras a -80°C.

20 Las tablas 4, 5, B, C, D y E proporcionan ARNip para HSP47/SERPINH1. Para cada gen hay una lista separada de secuencias de ARNip de 19 meros, que se priorizan basándose en su puntuación en el algoritmo patentado como las mejores secuencias para seleccionar como diana la expresión génica en humanos.

25 Se usan las siguientes abreviaturas en las tablas 4, 5, B, C, D y E en el presente documento: "otra espec. o Sp." se refiere la identidad interespecies con otros animales: D-perro, Rt-rata, Rb-conejo, Rh-macaco rhesus, P-cerdo, M-ratón; ORF: marco de lectura abierto. 19 meros (tablas 5, B, C), y 18+1 (tablas 4, D, E) meros se refieren a oligómeros de 19 y 18+1 (U en la posición 1 de la cadena antisentido, A en la posición 19 de la cadena sentido) ácidos ribonucleicos de longitud, respectivamente.

30 En las tablas 4, 5, B, C, D y E a continuación se divulgan oligonucleótidos de ARNip útiles en la generación de moléculas de ARN bicatenario.

TABLA 4

Nombre	SEQ ID NO SEN	Sentido 5' > 3'	SEQ ID NO AS	Antisentido 3' > 5'	Inter-especies	Ident. humano g <sup>l</sup> 32454740
SERPINH1_2	60	GAGACACAUGGGUGCUAUA	127	UAUAGCACCCAUGUGUCUC	H, Rt, Rh, M, D	[1533-1551] (18/19)
SERPINH1_3	61	GGGAAGAUGCAGAAGAAGA	128	UCUUCUUCUGCAUCUCCCC	H, Rt, Rh, Rb	[1112-1130] (18/19)
SERPINH1_5	62	GAAGAAGGCUGUUGCCAUA	129	UAUGGCAACAGCCUUCUUC	H, Rt	[1123-1141] (18/19)
SERPINH1_6	63	ACAAGAUGCAGAGACGAGUA	130	UACUCGUCUCGCAUCUUGU	H, Rt, Rh,	[1464-1482] (18/19)
SERPINH1_7	64	GGACAACCGUGGCUUCAUA	131	UAUGAAGCCACGGUUGUCC	H, Rh, M	[886-904] (18/19)
SERPINH1_8	65	UGCAGUCCAUCAACGAGUA	132	UACUCGUUGAUGGACUGCA	H, Rt, Rh, M	[738-756] (18/19)
SERPINH1_9	66	GCCUCAUCAUCCUCAUGCA	133	UGCAUGAGGAUGAUGAGGC	H, Rt, Rh, M, D	[1026-1044] (18/19)
SERPINH1_10	67	CGCGCUGCAGUCCAUAAA	134	UUUGAUGGACUGCAGCGCG	H, Rt, Rh	[733-751] (18/19)
SERPINH1_11	68	CGGACAGGCCUCUACAACA	135	UGUUGUAGAGGCCUGUCCG	H, Rt, Rh, P	[944-962] (18/19)
SERPINH1_13	69	UGACAAGAUGCAGAGACGAA	136	UUCGUCUCGCAUCUUGUCA	H, Rh	[1462-1480] (18/19)
SERPINH1_14	70	CCAGCCUCAUCAUCCUCA	137	UUGAGGAUGAUGAGGCCUGG	H, M, Rt, Rh, D-	[1023-1041] (18/19)
SERPINH1_15	71	GCUGCAGUCCAUCAACGAA	138	UUCGUUGAUGGACUGCAGC	H, Rt, Rh	[736-754] (18/19)
SERPINH1_16	72	GCAGCGCGCUGCAGUCCAA	139	UUGGACUGCAGCGCGCUGC	H, Rt, Rh	[729-747] (18/19)
SERPINH1_17	73	UGAGACACAUGGGUGCUAA	140	UUAGCACCCAUGUGUCUCA	H, Rt, Rh, M, D	[1532-1550] (18/19)
SERPINH1_19	74	GGUGGAGGUGACCCAUGAA	141	UUCAUGGGUCACCUCCACC	H, Rt, Rh, M	[1159-1177] (18/19)
SERPINH1_20	75	CUUUGACCAGGACAUCUAA	142	UUAGAUGUCCUGGUCAAAG	H, Rt, Rh	[1324-1342] (18/19)
SERPINH1_21	76	GGAGGUGACCCAUGACCUA	143	UAGGUCAUGGGUCACCUCC	H, Rt, Rh, M, D	[1162-1180] (18/19)
SERPINH1_22	77	CUCCUGAGACACAUGGGUA	144	UACCCAUGUGUCUCAGGAG	H, D	[1528-1546]

						(18/19)
SERPINH1_23	78	AGAAGAAGGCUGUUGCCAA	145	UUGGCAACAGCCUUCUUCU	H, Rt	[1122-1140] (18/19)
SERPINH1_24	79	AGCUCUCCAGCCUCAUCAA	146	UUGAUGAGGCUGGAGAGCU	H, Rt, D, M, P, Rh	[1017-1035] (18/19)
SERPINH1_25	80	CUGCAGUCCAUAACGAGA	147	UCUCGUUGAUGGACUGCAG	H, Rt, Rh, M	[737-755] (18/19)
SERPINH1_26	81	CCGGACAGGCCUCUACAAA	148	UUUGUAGAGGCCUGUCCGG	H, Rt, Rh, Rb, P	[943-961] (18/19)
SERPINH1_27	82	GCACCGGACAGGCCUCUAA	149	UUAGAGGCCUGUCCGGUGC	H, Rt, Rh, Rb, P	[940-958] (18/19)
SERPINH1_28	83	GCAGAAGAAGGCUGUUGCA	150	UGCAACAGCCUUCUUCUGC	H, Rt	[1120-1138] (18/19)
SERPINH1_31	84	AGAAGGCUGUUGCCAUCUA	151	UAGAUGGCAACAGCCUUCU	H, Rt	[1125-1143] (18/19)
SERPINH1_32	85	AGCGCAGCGCGCUGCAGUA	152	UACUGCAGCGCGCUGCGCU	H, Rt, Rh,	[726-744] (18/19)
SERPINH1_33	86	GACACAUGGGUGCUAUUGA	153	UCAAUAGCACCCAUGUGUC	H, Rt, Rh, M	[1535-1553] (18/19)
SERPINH1_34	87	GGGCCUGACUGAGGCCAUA	154	UAUGGCCUCAGUCAGGCC	H, Rt	[1201-1219] (18/19)
SERPINH1_35	88	AGACACAUGGGUGCUAUUA	155	UAAUAGCACCCAUGUGUCU	H, Rt, Rh, M	[1534-1552] (18/19)
SERPINH1_36	89	CCAUGACCUGCAGAAACAA	156	UUGUUUCUGCAGGUCAUGG	H, Rt, Rh, M	[1171-1189] (18/19)
SERPINH1_37	90	AGAUGCAGAAGAAGGCUGA	157	UCAGCCUUCUUCUGCAUCU	H, Rt, Rh, M	[1116-1134] (18/19)
SERPINH1_38	91	CAAGCUCUCCAGCCUCAUA	158	UAUGAGGCUGGAGAGCUUG	H, Rt, Rh, M, P, D	[1015-1033] (18/19)
SERPINH1_39	92	UGCAGAAGAAGGCUGUUGA	159	UCAACAGCCUUCUUCUGCA	H, Rt	[1119-1137] (18/19)
SERPINH1_41	93	CAGCCUCAUCAUCCUCAUA	160	UAUGAGGAUGAUGAGGCUG	H, Rt, Rh, M, D	[1024-1042] (18/19)
SERPINH1_42	94	GACAGGCCUCUACAACUAA	161	UUAGUUGUAGAGGCCUGUC	H, Rt, Rh, Rb, P	[946-964] (18/19)
SERPINH1_43	95	GAUGCAGAAGAAGGCUGUA	162	UACAGCCUUCUUCUGCAUC	H, Rt, Rh, M	[1117-1135] (18/19)
SERPINH1_44	96	ACCCAUGACCUGCAGAAAA	163	UUUCUGCAGGUCAUGGGU	H, Rt, Rh, M	[1169-1187] (18/19)
SERPINH1_45	97	ACUCCAAGAUAACUCCA	164	UGGAAGUUGAUCUUGGAGU	H, Rt, Rh, M, D	[702-720] (18/19)
SERPINH1_45 a	98	ACUCCAAGAUAACUCCU	165	AGGAAGUUGAUCUUGGAGU	H, Rt, Rh, M, D	[702-720] (18/19)
SERPINH1_48	99	AGGCCUCUACAACUACUAA	166	UUAGUAGUUGUAGAGGCCU	H, Rt, Rh, Rb, P, D	[949-967] (18/19)
SERPINH1_49	100	CACUCCAAGAUAACUUCA	167	UGAAGUUGAUCUUGGAGUG	H, Rt, Rh, M, D	[701-719] (18/19)
SERPINH1_51	101	UCCUGAGACACAUGGGUGA	168	UCACCCAUGUGUCUCAGGA	H, Rt, D, M	[1529-1547] (18/19)
SERPINH1_52	102	GACAAGAUGCGAGACGAGA	169	UCUCGUCUCGCAUCUUGUC	H, Rt, Rh,	[1463-1481] (18/19)
SERPINH1_53	103	GGUGACCCAUGACCUGCAA	170	UUGCAGGUCAUGGGUCACC	H, Rt, Rh, M	[1165-1183] (18/19)
SERPINH1_59	104	CCGAGGUGAAGAAACCUGA	171	UCAGGUUUCUUCACCUCGG	H, Rt, Rh,	[285-303] (18/19)
SERPINH1_51 a	105	UCCUGAGACACAUGGGUGU	172	ACACCCAUGUGUCUCAGGA	H, Rt, D, M	[1529-1547] (18/19)
SERPINH1_61	106	GCACUCCAAGAUAACUUA	173	UAAGUUGAUCUUGGAGUGC	H, Rh, D	[700-718]

						(18/19)
SERPINH1_62	107	GUGGUGGAGGUGACCCAUA	174	UAUGGGUCACCUCCACCAC	H, Rt, Rh, M, Rb	[1157-1175] (18/19)
SERPINH1_64	108	GCCGAGGUGAAGAAACCUA	175	UAGGUUUCUUCACCUCCGGC	H, Rt, Rh,	[284-302] (18/19)
SERPINH1_65	109	GCUCUCCAGCCUCAUCAUA	176	UAUGAUGAGGCUGGAGAGC	H, Rt, D, M, P, Rh	[1018-1036] (18/19)
SERPINH1_66	110	GAUGCACCGGACAGGCCUA	177	UAGGCCUGUCCGGUGCAUC	H, Rt, Rh, M, Rb, P	[937-955] (18/19)
SERPINH1_68	111	CUCUCCAGCCUCAUCAUA	178	UGAUGAUGAGGCUGGAGAG	H, Rt, D, M, P, Rh	[1019-1037] (18/19)
SERPINH1_69	112	GCAGACCACCGACGGCAAA	179	UUUGCCGUCGGUGGUCUGC	H, Rt, D	[763-781] (18/19)
SERPINH1_70	113	AGUCCAUCAACGAGUGGGA	180	UCCCACUCGUUGAUGGACU	H, Rt, Rh, M	[741-759] (18/19)
SERPINH1_71	114	ACCGUGGCUUCAUGGUGAA	181	UUCACCAUGAAGCCACGGU	H, Rt, Rh, M	[891-909] (18/19)
SERPINH1_74	115	GAAGGCUGUUGCCAUCUCA	182	UGAGAUGGCAACAGCCUUC	H, Rt,	[1126-1144] (18/19)
SERPINH1_75	116	GAAGAUGCAGAAGAAGGCA	183	UGCCUUCUUCUGCAUCUUC	H, Rt, Rh, Rb	[1114-1132] (18/19)
SERPINH1_77	117	UGAUGAUGCACCGGACAGA	184	UCUGUCCGGUGCAUCAUCA	H, Rh,	[933-951] (18/19)
SERPINH1_78	118	CCCUUUGACCAGGACAUCA	185	UGAUGUCCUGGUCAAAGGG	H, Rt, Rh,	[1322-1340] (18/19)
SERPINH1_80	119	CAGUCCAUCAACGAGUGGA	186	UCCACUCGUUGAUGGACUG	H, Rt, Rh, M	[740-758] (18/19)
SERPINH1_82	120	CAACCGUGGCUUCAUGGUA	187	UACCAUGAAGCCACGGUUG	H, Rt, Rh, M	[889-907] (18/19)
SERPINH1_83	121	CGACAAGCGCAGCGCGCUA	188	UAGCGCGCUGCGCUUGUCG	H	[721-739] (18/19)
SERPINH1_84	122	GCAGUCCAUCAACGAGUGA	189	UCACUCGUUGAUGGACUGC	H, Rt, Rh, M	[739-757] (18/19)
SERPINH1_86	123	ACAGGCCUCUACAACUACA	190	UGUAGUUGUAGAGGCCUGU	H, Rt, Rh, Rb, P, D	[947-965] (18/19)
SERPINH1_87	124	AAGAUGCAGAAGAAGGCUA	191	UAGCCUUCUUCUGCAUCUU	H, Rt, Rh, M	[1115-1133] (18/19)
SERPINH1_89	125	CAGCGCGCUGCAGUCCAUA	192	UAUGGACUGCAGCGCGCUG	H, Rt, Rh,	[730-748] (18/19)
SERPINH1_90	126	GCGCAGCGCGCUGCAGUCA	193	UGACUGCAGCGCGCUGCGC	H, Rt, Rh,	[727-745] (18/19)

TABLA 5:

Nombre	SEQ ID NO SEN	Sentido 5' > 3'	SEQ ID NO AS	Antisentido 3' > 5'	Especie	Lg	Ident. humano gi 32454740
SERPINH1_1	194	GGACAGGCCUCUACAACUA	219	UAGUUGUAGAGGCCUGUCC	H, Rt, Rh, Rb, P	19	[945-963] (19/19)
SERPINH1_4	195	GAGACACAUGGGUGCUAUU	220	AAUAGCACCCAUGUGUCUC	H, Rt, Rh, M, D	19	[1533-1551] (19/19)
SERPINH1_12	196	ACAAGAUGCAGAGACGAGUU	221	AACUCGUCUCGCAUCUUGU	H, Rt, Rh,	19	[1464-1482] (19/19)
SERPINH1_18	197	CCUUUGACCAGGACAUCUA	222	UAGAUGUCCUGGUCAAAGG	H, Rt, Rh,	19	[1323-1341] (19/19)
SERPINH1_29	198	GACCCAUGACCUGCAGAAA	223	UUUCUGCAGGUCAUGGGUC	H, Rt, Rh,	19	[1168-1186]

SERPINH1_30	199	CGGACAGGCCUCUACAACU	224	AGUUGUAGAGGCCUGUCCG	M		(19/19)
SERPINH1_40	200	ACCGGACAGGCCUCUACAA	225	UUGUAGAGGCCUGUCCGGU	H, Rt, Rh, Rb, P	19	[944-962] (19/19)
SERPINH1_46	201	GCAGCGCGCUGCAGUCCAU	226	AUGGACUGCAGCGCGCUGC	H, Rt, Rh,	19	[942-960] (19/19)
SERPINH1_47	202	GCGCGCUGCAGUCCAUCAA	227	UUGAUGGACUGCAGCGCGC	H, Rt, Rh,	19	[729-747] (19/19)
SERPINH1_50	203	CUGAGACACAUGGGUGCUA	228	UAGCACCCAUGUGUCUCAG	H, Rt, Rh, M, D	19	[732-750] (19/19)
SERPINH1_54	204	AGAAGAAGGCUGUUGCCAU	229	AUGGCAACAGCCUUCUUCU	H, Rt	19	[1531-1549] (19/19)
SERPINH1_55	205	AGCUCUCCAGCCUCAUCAU	230	AUGAUGAGGCUGGAGAGCU	H, Rt, D, M, P, Rh	19	[1122-1140] (19/19)
SERPINH1_56	206	CUGCAGUCCAUAACGAGU	231	ACUCGUUGAUGGACUGCAG	H, Rt, Rh, M	19	[1017-1035] (19/19)
SERPINH1_57	207	CGCUGCAGUCCAUAACGA	232	UCGUUGAUGGACUGCAGCG	H, Rt, Rh,	19	[737-755] (19/19)
SERPINH1_58	208	GACAAGAUGCGAGACGAGU	233	ACUCGUCUCGCAUCUUGUC	H, Rt, Rh,	19	[735-753] (19/19)
SERPINH1_63	209	GGGCCUGACUGAGGCCAUU	234	AAUGGCCUCAGUCAGGCC	H, Rt	19	[1463-1481] (19/19)
SERPINH1_67	210	GAUGCAGAAGAAGGCUGUU	235	AACAGCCUUCUUCUGCAUC	H, Rt, Rh, M	19	[1201-1219] (19/19)
SERPINH1_72	211	CACCGGACAGGCCUCUACA	236	UGUAGAGGCCUGUCCGGUG	H, Rt, Rh, Rb, P	19	[1117-1135] (19/19)
SERPINH1_73	212	AGAUGCAGAAGAAGGCUGU	237	ACAGCCUUCUUCUGCAUCU	H, Rt, Rh, M	19	[941-959] (19/19)
SERPINH1_76	213	AGCGCGCUGCAGUCCAUCA	238	UGAUGGACUGCAGCGCGCU	H, Rt, Rh,	19	[1116-1134] (19/19)
SERPINH1_79	214	GGAAGAUGCAGAAGAAGGC	239	GCCUUCUUCUGCAUCUUC	H, Rt, Rh, Rb	19	[731-749] (19/19)
SERPINH1_81	215	GAAGAAGGCUGUUGCCAUC	240	GAUGGCAACAGCCUUCUUC	H, Rt	19	[1113-1131] (19/19)
SERPINH1_85	216	UGCAGUCCAUAACGAGUG	241	CACUCGUUGAUGGACUGCA	H, Rt, Rh, M	19	[1123-1141] (19/19)
SERPINH1_88	217	CCUGAGACACAUGGGUGCU	242	AGCACCCAUGUGUCUCAGG	H, Rt, D, M	19	[738-756] (19/19)
SERPINH1_91	218	CGCAGCGCGCUGCAGUCCA	243	UGGACUGCAGCGCGCUGCG	H, Rt, Rh,	19	[1530-1548] (19/19)

TABLA B: ARNip de SERPINH1 de 19 meros activos adicionales

N.º	SEQ ID SEN	ARNip sentido	SEQ ID AS	ARNip antisentido	Otras especies	humano-32454740-ORF:230-1486
1	244	GGCAGACUCUGGUCAAGAA	460	UUCUUGACCAGAGUCUGCC	Rh	[2009-2027] 3'UTR
2	245	CAGUGAGGCGGAUUGAGAA	461	UUCUCAUCCGCCUCACUG		[1967-1985] 3'UTR
3	246	AGCCUUGUUGCUAUCAAU	462	AUUGAUAGCAACAAAGGCU	Rh	[2117-2135] 3'UTR
4	247	CCAUGUUCUUAAGCCACA	463	UGUGGCUUGAAGAACAUGG	Rh,Rb,D	[837-855] ORF
5	248	CCUCUUCUGACACUAAAA	464	UUUJAGUGUCAGAAGAGGG		[1850-1868] 3'UTR
6	249	CCUCAUACAGUAUUCAUU	465	AUAUGAAUACUGAUUGAGG		[1774-1792] 3'UTR

7	250	GAGACACAUGGGUGCUAUU	466	AAUAGCACCCAUGUGUCUC	Rh,D,Rt,M	[1533-1551] 3'UTR
8	251	GUGACAAGAUGCGAGACGA	467	UCGUCUCGCAUCUUGUCAC	Rh	[1461-1479] ORF
9	252	GCCACACUGGGAUGAGAAA	468	UUUCUCAUCCCAGUGUGGC	Rh,Rb,M	[850-868] ORF
10	253	AGAUGCGAGACGAGUUAUA	469	UAUAACUCGUCUCGCAUCU	Rh	[1467-1485] ORF
11	254	ACGACGACGAGAAGGAAAA	470	UUUUCUUCUCGUCGUCGU		[966-984] ORF
12	255	GCCUCUACAACUACUACGA	471	UCGUAGUAGUUGUAGAGGC	Rb,D	[951-969] ORF
13	256	AGAUCAACUCCGCGACAA	472	UUGUCGCGGAAGUUGAUCU	D	[708-726] ORF
14	257	ACUACUACGACGACGAGAA	473	UUCUCGUCGUCGUAGUAGU	Rb	[960-978] ORF
15	258	AGCCUCUUCUGACACUAA	474	UUAGUGUCAGAAGAGGGCU		[1848-1866] 3'UTR
16	259	ACAAGAUGCGAGACGAGUU	475	AACUCGUCUCGCAUCUUGU	Rh,Rt	[1464-1482] ORF
17	260	AGCCACACUGGGAUGAGAA	476	UUCUCAUCCCAGUGUGGCU	Rh,Rb,M	[849-867] ORF
18	261	AGGACCAGGCAGUGGAGAA	477	UUCUCCACUGCCUGGUCCU	Rh	[408-426] ORF
19	262	CAGGCAAGAAGGACCUGUA	478	UACAGGUCCUUCUUGCCUG	Rh,D	[1251-1269] ORF
20	263	ACCUGUGAGACCAAUUGA	479	UCAAUUUGGUCUCACAGGU	Rh	[1813-1831] 3'UTR
21	264	CUUUGUUGCUAUCAAUCCA	480	UGGAUUGAUAGCAACAAAG	Rh	[2120-2138] 3'UTR
22	265	GUGAGACCAAUUGAGCUA	481	UAGCUCAAUUGGUCUCAC	Rh	[1817-1835] 3'UTR
23	266	CCUGAAAGUCCAGAUCA	482	UGAUCUGGGACUUCAGGG		[1749-1767] 3'UTR
24	267	CCUUGACCAGGACAUCUA	483	UAGAUGUCCUGGUCAAAGG	Rh,Rt	[1323-1341] ORF
25	268	GACCAGGCAGUGGAGAACA	484	UGUUCUCCACUGCCUGGUC	Rh	[410-428] ORF
26	269	CGCGAACGUGACCUGGAA	485	UUCCAGGUCACGUUGCGCG	M	[597-615] ORF
27	270	AUGAGAAAUCCACCACAA	486	UUGUGGUGGAAUUCUCAU	Rh	[861-879] ORF
28	271	GAAGAAACCUGCAGCCGCA	487	UGC GG CUGCAGGUUUCUUC		[292-310] ORF
29	272	CUCUCGAGCGCCUUGAAAA	488	UUUUCAAGGCGCUCGAGAG		[1059-1077] ORF
30	273	GGAACAUGAGCCUUGUUG	489	CAACAAAGGCUCAUGUUC	Rh	[2109-2127] 3'UTR
31	274	CUCACCUGUGAGACCAAU	490	AUUUGGUCUCACAGGUGAG	Rh	[1810-1828] 3'UTR
32	275	CUACGACGACGAGAAGGAA	491	UUCCUUCUCGUCGUCGUAG	Rb	[964-982] ORF
33	276	ACCACAAGAUGGUGGACAA	492	UUGUCCACCAUCUUGUGGU	Rh,Rb,M,P	[873-891] ORF
34	277	CUGGCACUGCGGAGAAGUU	493	AACUUCUCCGAGUGCCAG		[318-336] ORF
35	278	GGUCCUAUACCGUGGGUGU	494	ACACCCACGGUAUAGGACC	Rh	[912-930]

						ORF
36	279	CCAACCUCCCCAACUAUA	495	UAUAGUUGGGAGAGGUUGG	Rh	[1896-1914] 3'UTR
37	280	GAGAAGGAAAAGCUGCAAA	496	UUUGCAGCUUUUCCUUCUC	Rh	[974-992] ORF
38	281	GCCUCUCGAGCGCCUUGAA	497	UUCAAGGCGCUCGAGAGGC		[1057-1075] ORF
39	282	AGGCCAUUGACAAGAACAA	498	UUGUUCUUGUCAAUUGGCCU	Rh,D	[1212-1230] ORF
40	283	GACCAUGACCUGCAGAAA	499	UUUCUGCAGGUCAUGGGUC	Rh,Rt,M	[1168-1186] ORF
41	284	CUCCUGGCACUGCGGAGAA	500	UUCUCCGACUGCCAGGAG		[315-333] ORF
42	285	CGGACAGGCCUCUACAACU	501	AGUUGUAGAGGCCUGUCCG	Rh,Rb,Rt,P	[944-962] ORF
43	286	GAUGAGAAAUCCACCACA	502	UGUGGUGGAAUUUCUCAUC	Rh	[860-878] ORF
44	287	CACGCAUGUCAGGCAAGAA	503	UUCUUGCCUGACAUGCGUG	Rh,D	[1242-1260] ORF
45	288	ACCUCUCCAACUAUAAAA	504	UUUUUAUAGUUGGGAGAGGU	Rh	[1899-1917] 3'UTR
46	289	ACCAGGCAGUGGAGAACAU	505	AUGUUCUCCACUGCCUGGU	Rh	[411-429] ORF
47	290	GGGAACAUGAGCCUUUGUU	506	AACAAAGGCUCAUGUCCC	Rh	[2108-2126] 3'UTR
48	291	AGAAUUCACUCCACUUGGA	507	UCCAAGUGGAGUGAAUUCU	Rh	[1653-1671] 3'UTR
49	292	GGCAGACUCUGGUCAAGA	508	UCUUGACCAGAGUCUGCCC	Rh	[2008-2026] 3'UTR
50	293	AGAAGGAAAAGCUGCAAAU	509	AUUUGCAGCUUUUCCUUCU	Rh	[975-993] ORF
51	294	GGCAGUGGAGAACAUCUG	510	CAGGAUGUUCUCCACUGCC	Rh	[415-433] ORF
52	295	GGGAUGAGAAAUCCACCA	511	UGGUGGAAUUUCUCAUCCC	Rh	[858-876] ORF
53	296	CCAAGCUGUUCUACGCCGA	512	UCGGCGUAGAACAGCUUGG	Rh	[1365-1383] ORF
54	297	ACCGACAGGCCUCUACAA	513	UUGUAGAGGCCUGUCCGGU	Rh,Rb,Rt,P	[942-960] ORF
55	298	CUGCCUCAAUCAUAUUCA	514	UGAAUACUGAUUGAGGCAG		[1771-1789] 3'UTR
56	299	CAGCCUCUUCUGACACUA	515	UAGUGUCAGAAGAGGGCUG		[1847-1865] 3'UTR
57	300	CCAGCCUCAUCAUCCUCAU	516	AUGAGGAUGAUAGGGCUGG	Rh,D,Rt,M	[1023-1041] ORF
58	301	AGGGUGACAAGAUGCGAGA	517	UCUCGCAUCUUGUCACCCU	Rh,D	[1458-1476] ORF
59	302	GGACCAGGCAGUGGAGAAC	518	GUUCUCCACUGCCUGGUCC	Rh	[409-427] ORF
60	303	GCAGCGCGCUGCAGUCCAU	519	AUGGACUGCAGCGCGCUGC	Rh,Rt	[729-747] ORF
61	304	GCGCGCUGCAGUCCAUCAA	520	UUGAUGGACUGCAGCGCGC	Rh,Rt	[732-750] ORF
62	305	CCAGAUACCAUGAUGCUGA	521	UCAGCAUCAUGGUAUCUGG	Rh	[1680-1698] 3'UTR
63	306	CUAGUGCGGGACACCCAAA	522	UUUGGGUGUCCCGCACUAG		[1400-1418] ORF

64	307	AGGCAGUGGAGAACAUCU	523	AGGAUGUUCUCCACUGCCU	Rh	[414-432] ORF
65	308	CUGAGACACAUGGGUGCUA	524	UAGCACCCAUGUGUCUCAG	Rh,D,Rt,M	[1531-1549] 3'UTR
66	309	GAUUGAGAAGGAGCUCCCA	525	UGGGAGCUCCUUCUCAUUC		[1977-1995] 3'UTR
67	310	CGCAGACCACCGACGGCAA	526	UUGCCGUCGGUGGUCUGCG	D,Rt	[762-780] ORF
68	311	CCACACUGGGAUGAGAAAU	527	AUUUCUCAUCCCAGUGUGG	Rh	[851-869] ORF
69	312	GCUCAGUGAGCUUCGCUGA	528	UCAGCGAAGCUCACUGAGC		[642-660] ORF
70	313	CGCCUUUGAGUUGGACACA	529	UGUGUCCAACUCAAGGCG	Rh	[1294-1312] ORF
71	314	GGGUCAGCCAGCCCUUUC	530	GAAGAGGGCUGGCUGACCC	Rh	[1839-1857] 3'UTR
72	315	GGGCUUCUGGGCAGACUCU	531	AGAGUCUGCCCAGAAGCCC	Rh	[2000-2018] 3'UTR
73	316	GGUACCUUCUCACCGUGA	532	UCACAGGUGAGAAGGUACC	Rh	[1802-1820] 3'UTR
74	317	GCCUGCCUCAAUUCAGUAUU	533	AAUACUGAUUGAGGCAGGC		[1769-1787] 3'UTR
75	318	UCUACAACUACUACGACGA	534	UCGUCGUAGUAGUUGUAGA	Rb	[954-972] ORF
76	319	GGGAAGAUGCAGAAGAAGG	535	CCUUCUUCUGCAUCUCCCC	Rh,Rb,Rt	[1112-1130] ORF
77	320	CGAGAAGGAAAGCUGCAA	536	UUGCAGCUUUUCCUUCUCG	Rh	[973-991] ORF
78	321	AGAAGAAGGCUGUUGCCAU	537	AUGGCAACAGCCUUCUUCU	Rt	[1122-1140] ORF
79	322	CACAAGCUCUCCAGCCUCA	538	UGAGGCUGGAGAGCUUGUG	Rh,D,M,P	[1013-1031] ORF
80	323	GGGUGACAAGAUGCAGAC	539	GUCUCGCAUCUUGUCACCC	Rh,D	[1459-1477] ORF
81	324	UGUUGGAGCGUGGAAAAAA	540	UUUUUUCCACGCUCCAACA		[2190-2208] 3'UTR
82	325	CUUUGAGUUGGACACAGAU	541	AUCUGUGUCCAACUCAAG	Rh	[1297-1315] ORF
83	326	AGCUCUCCAGCCUCAUCAU	542	AUGAUGAGGCUGGAGAGCU	Rh,D,Rt,M, P	[1017-1035] ORF
84	327	AGCUGUUCUACGCCGACCA	543	UGGUCGGCGUAGAACAGCU	Rh	[1368-1386] ORF
85	328	CUGCAGUCCAUCAACGAGU	544	ACUCGUUGAUGGACUGCAG	Rh,Rt,M	[737-755] ORF
86	329	UACGACGACGAGAAGGAAA	545	UUUCCUUCUCGUCGUCGUA		[965-983] ORF
87	330	CCUAGUGCGGGACACCCAA	546	UUGGGUGUCCCGCACUAGG		[1399-1417] ORF
88	331	CUUCUCACCUUGUGAGACCA	547	UGGUCUCACAGGUGAGAAG	Rh	[1807-1825] 3'UTR
89	332	AGUUGGACACAGAUGGCAA	548	UUGCCAUCUGUGUCCAACU		[1302-1320] ORF
90	333	CAGUGGAGAACAUCUGGU	549	ACCAGGAUGUUCUCCACUG	Rh	[417-435] ORF
91	334	CCAGCUAGAAUUCACUCCA	550	UGGAGUGAAUUCUAGCUGG	Rh	[1647-1665] 3'UTR
92	335	CGCUGCAGUCCAUCAACGA	551	UCGUUGAUGGACUGCAGCG	Rh,Rt	[735-753]

ES 2 689 696 T3

						ORF
93	336	CCAAGGACCAGGCAGUGGA	552	UCCACUGCCUGGUCCUUGG	Rh	[405-423] ORF
94	337	AGUUCUCAAAGAUAGGGA	553	UCCCUAUCUUUGAAGAACU		[2082-2100] 3'UTR
95	338	CGGACCUUCCCAGCUAGAA	554	UUCUAGCUGGGAAGGUCCG	Rh	[1638-1656] 3'UTR
96	339	GACAAGAUGCAGAGACGAGU	555	ACUCGUCUCGCAUCUUGUC	Rh,Rt	[1463-1481] ORF
97	340	CCAAGAUCAACUCCGCGA	556	UCGCGGAAGUUGAUCUUGG	D	[705-723] ORF
98	341	CCAUCACGUGGAGCCUCU	557	AGAGGCUCCACGUGAUGGG	Rh	[1044-1062] ORF
99	342	CCAUGAUGCUGAGCCCGGA	558	UCCGGGCUCAGCAUCAUGG		[1687-1705] 3'UTR
100	343	AGCCUGCCUCAAUCAGUAU	559	AUACUGAUUGAGGCAGGCU		[1768-1786] 3'UTR
101	344	CGGCCUAAGGGUGACAAGA	560	UCUUGUCACCCUUAGGCCG	Rh	[1451-1469] ORF
102	345	GGGCCUGACUGAGGCCAUU	561	AAUGGCCUCAGUCAGGCC	Rt	[1201-1219] ORF
103	346	UCACCUGUGAGACCAAUU	562	AAUUUGGUCUCACAGGUGA	Rh	[1811-1829] 3'UTR
104	347	GAGGCCAUUGACAAGAACA	563	UGUUCUUGUCAAUAGGCCUC	Rh,D	[1211-1229] ORF
105	348	GCUCCUGGCACUGCGGAGA	564	UCUCCGCAGUGCCAGGAGC		[314-332] ORF
106	349	GGCGCCUGGUCCGGCCUAA	565	UUAGGCCGGACCAGGCC	Rh	[1440-1458] ORF
107	350	CCAGCCCUCUUCUGACACU	566	AGUGUCAGAAGAGGGCUGG		[1846-1864] 3'UTR
108	351	ACUACGACGACGAGAAGGA	567	UCCUUCUCGUCGUCGUAGU	Rb	[963-981] ORF
109	352	CCUAUACCGUGGGUGUCAU	568	AUGACACCCACGGUAUAGG	Rh,D,P	[915-933] ORF
110	353	GACCCAGCUCAGUGAGCUU	569	AAGCUCACUGAGCUGGGUC		[636-654] ORF
111	354	UGGGUGUCAUGAUGAUGCA	570	UGCAUCAUCAUGACACCCA	Rh	[924-942] ORF
112	355	CCAAGGGUGUGGUGGAGGU	571	ACCUCCACCACACCCUUGG	Rh,D	[1149-1167] ORF
113	356	AGGUCACCAAGGACGUGGA	572	UCCACGUCCUUGGUGACCU	Rh,D	[789-807] ORF
114	357	CCCUGGCCGCGAGGUGAA	573	UUCACCUCGGCGGCCAGGG		[276-294] ORF
115	358	AGCACUCCAAGAUCAACUU	574	AAGUUGAUCUUGGAGUGCU	Rh,D	[699-717] ORF
116	359	CCUGGCACUGCGGAGAAGU	575	ACUUCUCCGCAGUGCCAGG		[317-335] ORF
117	360	GAUGCAGAAGAAGGCUGUU	576	AACAGCCUUCUUCUGCAUC	Rh,Rt,M	[1117-1135] ORF
118	361	CCCACAAGCUCUCCAGCCU	577	AGGUCGGAGAGCUUGUGGG	Rh,D,P	[1011-1029] ORF
119	362	CUCUUCUGACACUAAAACA	578	UGUUUUAGUGUCAGAAGAG		[1852-1870] 3'UTR
120	363	ACGAGAAGGAAAAGCUGCA	579	UGCAGCUUUUCCUUCUCGU	Rh	[972-990] ORF

ES 2 689 696 T3

121	364	UGAAAAGCUGCUAACCAAA	580	UUUGGUUAGCAGCUUUUCA		[1072-1090] ORF
122	365	UCUCACCUUGUGAGACCAAA	581	UUUGGUCUCACAGGUGAGA	Rh	[1809-1827] 3'UTR
123	366	CAUGAUGAUGCACCGGACA	582	UGUCCGGUGCAUCAUCAUG	Rh	[931-949] ORF
124	367	GGAUUGAGAAGGAGCUCCC	583	GGGAGCUCCUUCUCAAUCC		[1976-1994] 3'UTR
125	368	CCUUCAUCUUCUAGUGCG	584	CGCACUAGGAAGAUGAAGG		[1389-1407] ORF
126	369	GGCCUGGCCUUCAGCUUGU	585	ACAAGCUGAAGGCCAGGCC		[374-392] ORF
127	370	GGUCAGCCAGCCUCUUCU	586	AGAAGAGGGCUGGCUGACC	Rh	[1840-1858] 3'UTR
128	371	UUCUCACCUUGUGAGACCAA	587	UUGGUCUCACAGGUGAGAA	Rh	[1808-1826] 3'UTR
129	372	CGCAGCAGCUCCUGGCACU	588	AGUGCCAGGAGCUGCUGCG		[307-325] ORF
130	373	GCCAUGUUCUUAAGCCAC	589	GUGGCUUGAAGAACAUGGC	Rh,Rb,D	[836-854] ORF
131	374	AGGCAGUGCUGAGCGCCGA	590	UCGGCGCUCAGCACUGCCU		[510-528] ORF
132	375	CACCUUGUGAGACCAAAUUG	591	CAAUUUGGUCUCACAGGUG	Rh	[1812-1830] 3'UTR
133	376	CACCGGACAGGCCUCUACA	592	UGUAGAGGCCUGUCCGGUG	Rh,Rb,Rt,P	[941-959] ORF
134	377	AGCUAGAAUUCACUCCACU	593	AGUGGAGUGAAUUCUAGCU	Rh	[1649-1667] 3'UTR
135	378	AGAUGCAGAAGAAGGCUGU	594	ACAGCCUUCUUCUGCAUCU	Rh,Rt,M	[1116-1134] ORF
136	379	CCUGCUAGUCAACGCCAU	595	AUGGCGUUGACUAGCAGGG	Rh	[822-840] ORF
137	380	ACAACUACUACGACGACGA	596	UCGUCGUCGUAGUAGUUGU	Rb	[957-975] ORF
138	381	GCUCCUGAGACACAUGGGU	597	ACCCAUGUGUCUCAGGAGC	D	[1527-1545] 3'UTR
139	382	UGGAGAACAUCCUGGUGUC	598	GACACCAGGAUGUUCUCCA	Rh	[420-438] ORF
140	383	AGCGCGCUGCAGUCCAUCA	599	UGAUGGACUGCAGCGCGCU	Rh,Rt	[731-749] ORF
141	384	CGCCUUGAAAAGCUGCUAA	600	UUAGCAGCUUUUCAAGGCG		[1067-1085] ORF
142	385	GCCUUUGUUGCUAUCAAUC	601	GAUUGAUAGCAACAAAGGC	Rh	[2118-2136] 3'UTR
143	386	CUCUACAACUACUACGACG	602	CGUCGUAGUAGUUGUAGAG	Rb	[953-971] ORF
144	387	CGCUCACUCAGCAACUCCA	603	UGGAGUUGCUGAGUGAGCG	Rh	[575-593] ORF
145	388	GGUACCAGCCUUGGAUACU	604	AGUAUCCAAGGCUGGUACC	Rh	[1571-1589] 3'UTR
146	389	GCCUGACUGAGGCCAUUGA	605	UCAAUAGGCCUCAGUCAGGC	Rh	[1203-1221] ORF
147	390	UGAGCUUCGCUGAUGACUU	606	AAGUCAUCAGCGAAGCUCA	Rh	[648-666] ORF
148	391	CCAGCCUUGGAUACUCCA	607	AUGGAGUAUCCAAGGCUGG	Rh	[1575-1593] 3'UTR
149	392	AAAGGCUCCUGAGACACAU	608	AUGUGUCUCAGGAGCCUUU		[1523-1541]

						3'UTR
150	393	UGACCCAUGACCCUGCAGAA	609	UUCUGCAGGUCAUGGGUCA	Rh,Rt,M	[1167-1185] ORF
151	394	CCUGUGAGACCAAAUUGAG	610	CUCAAUUUGGUCUCACAGG	Rh	[1814-1832] 3'UTR
152	395	GCGGACCUUCCCAGCUAGA	611	UCUAGCUGGGAAGGUCCGC	Rh	[1637-1655] 3'UTR
153	396	GGAAGAUGCAGAAGAAGGC	612	GCCUUCUUCUGCAUCUUC	Rh,Rb,Rt	[1113-1131] ORF
154	397	UGCCCAAGGGUGUGGUGGA	613	UCCACCACACCCUUGGGCA	Rh,D	[1146-1164] ORF
155	398	GGAGCCUCUCGAGCGCCUU	614	AAGGCGCUCGAGAGGCUC		[1054-1072] ORF
156	399	GACUCUGGUCAAGAAGCAU	615	AUGCUUCUUGACCAGAGUC	Rh	[2013-2031] 3'UTR
157	400	CAGGCAGUGGAGAACAUC	616	GGAUGUUCUCCACUGCCUG	Rh	[413-431] ORF
158	401	CAAGCCUGCCUCAAUUCAGU	617	ACUGAUUGAGGCAGGCUUG	Rh	[1766-1784] 3'UTR
159	402	CUGGAAGCUGGGCAGCCGA	618	UCGGCUGCCCAGCUUCCAG		[610-628] ORF
160	403	GAAGAAGGCUGUUGCCAUC	619	GAUGGCAACAGCCUUCUUC	Rt	[1123-1141] ORF
161	404	GGGCGAGCUGCUGCGCUCA	620	UGAGCGCAGCAGCUCGCC	Rh	[562-580] ORF
162	405	AAGCCACACUGGGAUGAGA	621	UCUCAUCCAGUGUGGCUU	Rh,Rb,M	[848-866] ORF
163	406	GUGUGGUGGAGGUGACCCA	622	UGGGUACCUCCACCACAC	Rh,D	[1155-1173] ORF
164	407	CCGCCUUUGAGUUGGACAC	623	GUGUCCAACUCAAAGGCGG	Rh	[1293-1311] ORF
165	408	GGCCAUUGACAAGAACAAG	624	CUUGUUCUUGUCAAUUGGCC	Rh,D	[1213-1231] ORF
166	409	UGCCUCAAUUCAGUAUUCAU	625	AUGAAUACUGAUUGAGGCA		[1772-1790] 3'UTR
167	410	CCUUCUCCAGCUAGAAUUC	626	UGAAUUCUAGCUGGGAAGG	Rh	[1642-1660] 3'UTR
168	411	GGGACCUGGGCCAUAGUCA	627	UGACUAUGGCCCAGGUCCC		[1721-1739] 3'UTR
169	412	CGAGGUGAAGAAACCUGCA	628	UGCAGGUUUCUUCACCUCG	Rh	[286-304] ORF
170	413	GCCUUGAGUUGGACACAG	629	CUGUGUCCAACUCAAAAGC	Rh	[1295-1313] ORF
171	414	AGCGGACCUUCCCAGCUAG	630	CUAGCUGGGAAGGUCCGCU	Rh	[1636-1654] 3'UTR
172	415	CGCAUGUCAGGCAAGAAGG	631	CCUUCUUGCCUGACAUGCG	Rh,D	[1244-1262] ORF
173	416	ACAACUGCGAGCACUCCAA	632	UUGGAGUGCUCGCAGUUGU	Rh,D	[690-708] ORF
174	417	GAGGCGGAUUGAGAAGGAG	633	CUCCUUCUCAAUCCGCCUC		[1971-1989] 3'UTR
175	418	GGCCGCCGAGGUGAAGAAA	634	UUUCUUCACCUCGGCGGCC		[280-298] ORF
176	419	CAGCUCUAUCCCAACCUCU	635	AGAGGUUGGGAUAGAGCUG		[1886-1904] 3'UTR
177	420	AGCUGGGCAGCCGACUGUA	636	UACAGUCGGCUGCCCAGCU		[615-633] ORF

178	421	GCCAUUGACAAGAACAAGG	637	CCUUGUUCUUGUCA AUGGC	Rh,D	[1214-1232] ORF
179	422	CGCCAUGUUCUUCAAGCCA	638	UGGCUUGAAGAACAUGGCG	Rh,Rb,P	[835-853] ORF
180	423	CCGAGGUCACCAAGGACGU	639	ACGUCCUUGGUGACCU CGG	Rh,D	[786-804] ORF
181	424	GGACCCAGCUCAGUGAGCU	640	AGCUCACUGAGCUGGGUCC		[635-653] ORF
182	425	CCA AUGACAUUUUGUUGGA	641	UCCAACAAA AUGUCAUUGG		[2178-2196] 3'UTR
183	426	AGUGAGGCGGAUUGAGAAG	642	CUUCUCAAUCCGCCUCACU		[1968-1986] 3'UTR
184	427	UGCAGUCCAUCAACGAGUG	643	CACUCGUUGAUGGACUGCA	Rh,Rt,M	[738-756] ORF
185	428	UGUCACGCAUGUCAGGCAA	644	UUGCCUGACAUGCGUGACA	Rh,D	[1239-1257] ORF
186	429	CGACGACGAGAAGGAAAAG	645	CUUUUCCUUCUCGUCGUCG		[967-985] ORF
187	430	ACAAGAACAAGGCCGACUU	646	AAGUCGGCCUUGUUCUUGU	Rh	[1221-1239] ORF
188	431	CUUCAAGCCACACUGGGAU	647	AUCCAGUGUGGCUUGAAG	Rh,Rb,D	[844-862] ORF
189	432	CCUGGGCCA UAGUCAUUCU	648	AGAAUGACUAUGGCCCAGG		[1725-1743] 3'UTR
190	433	UUUGUUGGAGCGUGGAAA	649	UUUUCACGCUCCAACAAA		[2188-2206] 3'UTR
191	434	AGAACAUCCUGGUGUCACC	650	GGUGACACCAGGAUGUUCU		[423-441] ORF
192	435	ACGCCACCGCCUUGAGUU	651	AACUCAAAAGCGGUGGCGU	Rh	[1287-1305] ORF
193	436	GUGAGGUACCAGCCUUGGA	652	UCCAAGGCUGGUACCUCAC	Rh	[1567-1585] 3'UTR
194	437	GCGCCUUCUGCCUCCUGGA	653	UCCAGGAGGCAGAAGGCGC		[252-270] ORF
195	438	GCCUGGCCUUCAGCUUGUA	654	UACAAGCUGAAGGCCAGGC		[375-393] ORF
196	439	CCCGAAAACUCCACAUCU	655	AGGAUGUGGAGUUCCGGG		[1700-1718] 3'UTR
197	440	UCUUCAAGCCACACUGGGA	656	UCCAGUGUGGCUUGAAGA	Rh,Rb,D	[843-861] ORF
198	441	UGUUGCUAUCAAUCCAAGA	657	UCUUGGAUUGAUAGCAACA	Rh	[2123-2141] 3'UTR
199	442	GAGUGGGCCGCGCAGACCA	658	UGGUCUGCGCGGCCACUC		[752-770] ORF
200	443	CCUGAGACACAUGGGUGCU	659	AGCACCCAUGUGUCUCAGG	D,Rt,M	[1530-1548] 3'UTR
201	444	AGCCGACUGUACGGACCCA	660	UGGGUCCGUACAGUCGGCU		[623-641] ORF
202	445	GGCCUCAGGGUGCACACA	661	UGUGUGCACCCUGAGGCC		[1486-1504] 3'UTR
203	446	ACUGGGAUGAGAAAUCCA	662	UGGAAUUCUCAUCCAGU	Rh	[855-873] ORF
204	447	AGAAUGACCUGGCCGAGU	663	ACUGCGGCCAGGUCAUUCU		[1952-1970] 3'UTR
205	448	CAUAUUUAUAGCCAGGUAC	664	GUACCUGGCUAUAUAUG	Rh	[1788-1806] 3'UTR
206	449	AGGUGACCCAUGACCU GCA	665	UGCAGGUCAUGGGUCACCU	Rh,Rt,M	[1164-1182]

						ORF
207	450	GCGCUGCAGUCCAUCAACG	666	CGUUGAUGGACUGCAGCGC	Rh,Rt	[734-752] ORF
208	451	GGUGACAAGAUGCGAGACG	667	CGUCUCGCAUCUUGUCACC	Rh	[1460-1478] ORF
209	452	CUUCAAGAUAGGGAGGGA	668	UCCCUCCUAUCUUGAAG		[2086-2104] 3'UTR
210	453	AGCUGCAAUUCGUGGAGAU	669	AUCUCCACGAUUUGCAGCU	Rh	[984-1002] ORF
211	454	GUGGAGAACAUCUGGUGU	670	ACACCAGGAUGUUCUCCAC	Rh	[419-437] ORF
212	455	GAACAAGGCCGACUUGUCA	671	UGACAAGUCGGCCUUGUUC	Rh	[1225-1243] ORF
213	456	CAUGAUGCUGAGCCCGGAA	672	UUCGGGCUCAGCAUCAUG		[1688-1706] 3'UTR
214	457	GCGCCUUGAAAAGCUGCUA	673	UAGCAGCUUUUCAAGGCGC	Rh	[1066-1084] ORF
215	458	GCAGACUCUGGUCAAGAAG	674	CUUCUUGACCAGAGUCUGC	Rh	[2010-2028] 3'UTR
216	459	CCAGGCAGUGGAGAACAUC	675	GAUGUUCUCCACUGCCUGG	Rh	[412-430] ORF

TABLA C: ARNip de SERPINH1 de 19 meros interespecies

N.º	SEQ ID SEN	ARNip sentido	SEQ ID AS	ARNip antisentido	Otras especies	humano-32454740 ORF:230-1486
1	676	CACUACAACUGCGAGCACU	973	AGUGCUCGCAGUUGUAGUG	Rh,D	[686-704] ORF
2	677	AACCGUGGCUUCAUGGUGA	974	UCACCAUGAAGCCACGGUU	Rh,Rt,M	[890-908] ORF
3	678	GGCAAGAAGGACCUUGUACC	975	GGUACAGGUCCUUCUUGCC	Rh,D,M	[1253-1271] ORF
4	679	GGUGGACAACCGUGGCUUC	976	GAAGCCACGGUUGUCCACC	Rh,M	[883-901] ORF
5	680	AGGCCAUGGCCAAGGACCA	977	UGGUCCUUGGCCAUGGCCU	Rh,D	[396-414] ORF
6	681	CGCAGCGCGCUGCAGUCCA	978	UGGACUGCAGCGCGCUGCG	Rh,Rt	[728-746] ORF
7	682	AGCAGCAAGCAGCACUACA	979	UGUAGUGCUGCUUGCUGCU	Rh,D	[674-692] ORF
8	683	GGCCUCUACAACUACUACG	980	CGUAGUAGUUGUAGAGGCC	Rb,D	[950-968] ORF
9	684	GAAGAUGCAGAAGAAGGCU	981	AGCCUUCUUCUGCAUCUUC	Rh,Rb,Rt	[1114-1132] ORF
10	685	GGCUCCUGAGACACAUGGG	982	CCCAUGUGUCUCAGGAGCC	D	[1526-1544] 3'UTR
11	686	AGCAAGCAGCACUACAACU	983	AGUUGUAGUGCUGCUUGCU	Rh,D	[677-695] ORF
12	687	GGAGGUGACCCAUGACCUG	984	CAGGUCAUGGGUCACCUC	Rh,Rt,M	[1162-1180] ORF
13	688	CCCUUUGACCAGGACAUCU	985	AGAUGUCCUGGUCAAAGGG	Rh,Rt	[1322-1340] ORF
14	689	CUCCUGAGACACAUGGGUG	986	CACCAUGUGUCUCAGGAG	D	[1528-1546] 3'UTR

15	690	AAGGCUCCUGAGACACAUG	987	CAUGUGUCUCAGGAGCCUU	D	[1524-1542] 3'UTR
16	691	CGCGCUGCAGUCCAUCAAC	988	GUUGAUGGACUGCAGCGCG	Rh,Rt	[733-751] ORF
17	692	AGGGUGUGGUGGAGGUGAC	989	GUCACCUCCACCACACCCU	Rh,D	[1152-1170] ORF
18	693	AGCACUACAACUGCGAGCA	990	UGCUCGCAGUUGUAGUGCU	Rh,D	[684-702] ORF
19	694	GGCUCCUGCUAUUCAUUG	991	CAAUGAAUAGCAGGGAGCC	D	[1421-1439] ORF
20	695	GCGCGCAACGUGACCUGGA	992	UCCAGGUCACGUUGCGCGC	M	[596-614] ORF
21	696	GCUGCAGUCCAUCAACGAG	993	CUCGUUGAUGGACUGCAGC	Rh,Rt	[736-754] ORF
22	697	ACCAAAGAGCAGCUGAAGA	994	UCUUCAGCUGCUCUUUGGU	Rh,Rb,P	[1085-1103] ORF
23	698	CCAAGGACGUGGAGCGCAC	995	GUGCGCUCCACGUCCUUGG	Rh,D	[795-813] ORF
24	699	UGUUCUUCAAGCCACACUG	996	CAGUGUGGCUUGAAGAACA	Rh,Rb,D	[840-858] ORF
25	700	GCCCAAGGGUGUGGUGGAG	997	CUCCACCACACCCUUGGGC	Rh,D	[1147-1165] ORF
26	701	ACAGGCCUCUACAACUACU	998	AGUAGUUGUAGAGGCCUGU	Rh,Rb,D,Rt,P	[947-965] ORF
27	702	UGCGCAGCAGCAAGCAGCA	999	UGCUGCUUGCUGCUGCGCA	Rh,D	[669-687] ORF
28	703	GGUGGAGGUGACCCAUGAC	1000	GUCAUGGGUCACCUCCACC	Rh,Rt,M	[1159-1177] ORF
29	704	CUUUGACCAGGACAUCUAC	1001	GUAGAUGUCCUGGUCAAAAG	Rh,Rt	[1324-1342] ORF
30	705	AAGGGUGUGGUGGAGGUGA	1002	UCACCUCCACCACACCCUU	Rh,D	[1151-1169] ORF
31	706	UCCUAUACCGUGGGUGUCA	1003	UGACACCCACGGUAUAGGA	Rh,D,P	[914-932] ORF
32	707	GCGCAGACCACCGACGGCA	1004	UGCCGUCGGUGGUCUGCGC	D	[761-779] ORF
33	708	CGCAGCAGCAAGCAGCACU	1005	AGUGCUGCUUGCUGCUGCG	Rh,D	[671-689] ORF
34	709	GCCUCAUCAUCCUCAUGCC	1006	GGCAUGAGGAUGAUGAGGC	Rh,D,Rt,M	[1026-1044] ORF
35	710	UCUCCAGCCUCAUCAUCCU	1007	AGGAUGAUGAGGCUGGAGA	Rh,D,Rt,M	[1020-1038] ORF
36	711	CCAUUGACAAGAACAAGGC	1008	GCCUUGUUCUUGUCAAUGG	Rh,D	[1215-1233] ORF
37	712	AGCAGCACUACAACUGCGA	1009	UCGCAGUUGUAGUGCUGCU	Rh,D	[681-699] ORF
38	713	UGCACCGGACAGGCCUCUA	1010	UAGAGGCCUGUCCGGUGCA	Rh,Rb,Rt,P	[939-957] ORF
39	714	ACUCCAAGAUCAACUCCG	1011	CGGAAGUUGAUCUUGGAGU	Rh,D,Rt,M	[702-720] ORF
40	715	UGGACAACCGUGGCUUCAU	1012	AUGAAGCCACGGUUGUCCA	Rh,M	[885-903] ORF
41	716	GAGCAGCUGAAGAUCUGGA	1013	UCCAGAUCUUCAGCUGCUC	Rh,D	[1091-1109] ORF
42	717	CAGAAGAAGGCUGUUGCCA	1014	UGGCAACAGCCUUCUUCUG	Rt	[1121-1139] ORF

43	718	AGGCAAGAAGGACCUGUAC	1015	GUACAGGUCCUUCUUGCCU	Rh,D	[1252-1270] ORF
44	719	CCUCUACAACUACUACGAC	1016	GUCGUAGUAGUUGUAGAGG	Rb,D	[952-970] ORF
45	720	AGCAGCUGAAGAUCUGGAU	1017	AUCCAGAUCUUCAGCUGCU	Rh,D	[1092-1110] ORF
46	721	AACUACUACGACGACGAGA	1018	UCUCGUCGUCGUAGUAGUU	Rb	[959-977] ORF
47	722	GGCAAGCUGCCCGAGGUCA	1019	UGACCUCGGGCAGCUUGCC	Rh,D	[776-794] ORF
48	723	CCGGACAGGCCUCUACAAC	1020	GUUGUAGAGGCCUGUCCGG	Rh,Rb,Rt,P	[943-961] ORF
49	724	GCUCCCUGCUAUUCAUUGG	1021	CCAAUGAAUAGCAGGGAGC	D	[1422-1440] ORF
50	725	AACUUCGAGCACUCCAAGA	1022	UCUUGGAGUGCUCGCAGUU	Rh,D	[692-710] ORF
51	726	GACACAUGGGUGCUAUUGG	1023	CCAAUAGCACCCAUGUGUC	Rh,Rt,M	[1535-1553] 3'UTR
52	727	GCACCGGACAGGCCUCUAC	1024	GUAGAGGCCUGUCCGGUGC	Rh,Rb,Rt,P	[940-958] ORF
53	728	AGCGCAGCGCGCUGCAGUC	1025	GACUGCAGCGCGCUGCGCU	Rh,Rt	[726-744] ORF
54	729	GGACGUGGAGCGCACGGAC	1026	GUCCGUGCGCUCCACGUCC	Rh,D	[799-817] ORF
55	730	CAGCCUCAUCAUCCUCAUG	1027	CAUGAGGAUGAUGAGGCUG	Rh,D,Rt,M	[1024-1042] ORF
56	731	AAGAUCAACUUCGCGACA	1028	UGUCGCGGAAGUUGAUCUU	D	[707-725] ORF
57	732	GCGCAACGUGACCUUGGAAG	1029	CUUCCAGGUCACGUUGCGC	M	[598-616] ORF
58	733	ACUGCGAGCACUCCAAGAU	1030	AUCUUGGAGUGCUCGCAGU	Rh,D	[693-711] ORF
59	734	GUGGACAACCGUGGCUUCA	1031	UGAAGCCACGGUUGUCCAC	Rh,M	[884-902] ORF
60	735	CCACAAGCUCUCCAGCCUC	1032	GAGGCUGGAGAGCUUGUGG	Rh,D,P	[1012-1030] ORF
61	736	CAAGAUGGUGGACAACCGU	1033	ACGGUUGUCCACCAUCUUG	Rh,Rb,M,P	[877-895] ORF
62	737	CGAGCACUCCAAGAUCAAC	1034	GUUGAUCUUGGAGUGCUCG	Rh,D	[697-715] ORF
63	738	AGCUGCCCGAGGUCACCAA	1035	UUGGUGACCUCGGGCAGCU	Rh,D	[780-798] ORF
64	739	GGACAUCUACGGGCGCGAG	1036	CUCGCGCCCGUAGAUGUCC	D	[1333-1351] ORF
65	740	AGGACAUCUACGGGCGCGA	1037	UCGCGCCCGUAGAUGUCCU	D	[1332-1350] ORF
66	741	UGUCAGGCAAGAAGGACCU	1038	AGGUCCUUCUUGCCUGACA	Rh,D	[1248-1266] ORF
67	742	GGGUGUGGUGGAGGUGACC	1039	GGUCACCUCACCACACCC	Rh,D	[1153-1171] ORF
68	743	CAAGCUCUCCAGCCUCAUC	1040	GAUGAGGCUGGAGAGCUUG	Rh,D,M,P	[1015-1033] ORF
69	744	GUGACCCAUGACCUGCAGA	1041	UCUGCAGGUCAUGGGUCAC	Rh,Rt,M	[1166-1184] ORF
70	745	GUUCUUCAAGCCACACUGG	1042	CCAGUUGGCUUGAAGAAC	Rh,Rb,D	[841-859] ORF

71	746	ACAUCUACGGGCGCGAGGA	1043	UCCUCGCGCCCGUAGAUGU	D,M	[1335-1353] ORF
72	747	UGGAGGUGACCCAUGACCU	1044	AGGUCAUGGGUCACCUCCA	Rh,Rt,M	[1161-1179] ORF
73	748	UGCAGAAGAAGGCUGUUGC	1045	GCAACAGCCUUCUUCUGCA	Rt	[1119-1137] ORF
74	749	UGUACCAGGCCAUGGCCAA	1046	UUGGCCAUGGCCUGGUACA	Rh,D	[390-408] ORF
75	750	UGUGGUGGAGGUGACCCAU	1047	AUGGGUCACCUCCACCACA	Rh,D	[1156-1174] ORF
76	751	AGAAGGACCUGUACCUGGC	1048	GCCAGGUACAGGUCCUUCU	Rh,D	[1257-1275] ORF
77	752	AGCAGCUGCGCGACGAGGA	1049	UCCUCGUCGCGCAGCUGCU	Rh,D	[528-546] ORF
78	753	ACGCCAUGUUCUUCAAGCC	1050	GGCUUGAAGAACAUGGCGU	Rh,Rb,P	[834-852] ORF
79	754	ACAAGAUGGUGGACAACCG	1051	CGGUUGUCCACCAUCUUGU	Rh,Rb,M,P	[876-894] ORF
80	755	CUGCGAGCACUCCAAGAUC	1052	GAUCUUGGAGUGCUCGCAG	Rh,D	[694-712] ORF
81	756	GUCACGCAUGUCAGGCAAG	1053	CUUGCCUGACAUGCGUGAC	Rh,D	[1240-1258] ORF
82	757	ACGCAUGUCAGGCAAGAAG	1054	CUUCUUGCCUGACAUGCGU	Rh,D	[1243-1261] ORF
83	758	UGCUAUUCAUUGGGCGCCU	1055	AGGCGCCCAAUGAAUAGCA	D	[1428-1446] ORF
84	759	UGC CGCAGCAGGAGGUGCA	1056	UGCACCUCCUCGUCGCGCA	Rh,D	[534-552] ORF
85	760	GCAGCUGAAGAUCUGGAUG	1057	CAUCCAGAUCUUCAGCUGC	Rh,D	[1093-1111] ORF
86	761	CCAUGACCUGCAGAAACAC	1058	GUGUUUCUGCAGGUCAUGG	Rh,Rt,M	[1171-1189] ORF
87	762	AAGCUCUCCAGCCUCAUCA	1059	UGAUGAGGCUGGAGAGCUU	Rh,D,Rt,M,P	[1016-1034] ORF
88	763	CAGCAAGCAGCACUACAAC	1060	GUUGUAGUGCUGCUUGCUG	Rh,D	[676-694] ORF
89	764	AUGUUCUUAAGCCACACU	1061	AGUGUGGCUUGAAGAACAU	Rh,Rb,D	[839-857] ORF
90	765	UCCUGAGACACAUGGGUGC	1062	GCACCAUGUGUCUCAGGA	D,Rt,M	[1529-1547] 3'UTR
91	766	CACUCCAAGAUAACUUC	1063	GGAAGUUGAUCUUGGAGUG	Rh,D,Rt,M	[701-719] ORF
92	767	AAGGGUGACAAGAUGCGAG	1064	CUCGCAUCUUGUCACCCU	Rh,D	[1457-1475] ORF
93	768	GACAGGCCUCUACAACUAC	1065	GUAGUUGUAGAGGCCUGUC	Rh,Rb,Rt,P	[946-964] ORF
94	769	ACCCAUGACCUGCAGAAAC	1066	GUUUCUGCAGGUCAUGGGU	Rh,Rt,M	[1169-1187] ORF
95	770	CACCACAAGAUGGUGGACA	1067	UGUCCACCAUCUUGUGGUG	Rh,Rb,M,P	[872-890] ORF
96	771	GCAGAAGAAGGCUGUUGCC	1068	GGCAACAGCCUUCUUCUGC	Rt	[1120-1138] ORF
97	772	GUGGUGGAGGUGACCCAUG	1069	CAUGGGUCACCUCCACCAC	Rh,Rb,Rt,M	[1157-1175] ORF
98	773	AGGCCUCUACAACUACUAC	1070	GUAGUAGUUGUAGAGGCCU	Rh,Rb,D,Rt,P	[949-967] ORF

99	774	GGUGACCCAUGACCUGCAG	1071	CUGCAGGUCAUGGGUCACC	Rh,Rt,M	[1165-1183] ORF
100	775	GCCGAGGUGAAGAAACCUG	1072	CAGGUUUCUUCACCUCGGC	Rh,Rt	[284-302] ORF
101	776	CAACUACUACGACGACGAG	1073	CUCGUCGUCGUAGUAGUUG	Rb	[958-976] ORF
102	777	CAAGAAGGACCUGUACCUG	1074	CAGGUACAGGUCCUUCUUG	Rh,D,M	[1255-1273] ORF
103	778	UGUUCACGCCACCGCCUU	1075	AAGGCGGUGGCGUGGAACA	D	[1281-1299] ORF
104	779	CCUGCUAUUCAUUGGGCG	1076	CGCCCAAUGAAUAGCAGGG	D	[1425-1443] ORF
105	780	CCGUGGCUUCAUGGUGACU	1077	AGUCACCAUGAAGCCACGG	Rh,Rt,M	[892-910] ORF
106	781	CUACAACUACUACGACGAC	1078	GUCGUCGUAGUAGUUGUAG	Rb	[955-973] ORF
107	782	GCAGCACUACAACUGCGAG	1079	CUCGCAGUUGUAGUGCUGC	Rh,D	[682-700] ORF
108	783	UGGUGGACAACCGUGGCUU	1080	AAGCCACGGUUGUCCACCA	Rh,M	[882-900] ORF
109	784	AGACCACCGACGGCAAGCU	1081	AGCUUGCCGUCGGUGGUCU	D,Rt	[765-783] ORF
110	785	AGAAACACCUGGCUGGGCU	1082	AGCCAGCCAGGUGUUCU	D	[1182-1200] ORF
111	786	ACCAAGGACGUGGAGCGCA	1083	UGCUCUCCACGUCCUUGGU	Rh,D	[794-812] ORF
112	787	CCGAGGUGAAGAAACCUGC	1084	GCAGGUUUCUUCACCUCGG	Rh,Rt	[285-303] ORF
113	788	ACUACAACUGCGAGCACUC	1085	GAGUGCUCGCAGUUGUAGU	Rh,D	[687-705] ORF
114	789	ACAAGCUCUCCAGCCUCAU	1086	AUGAGGCUGGAGAGCUUGU	Rh,D,M,P	[1014-1032] ORF
115	790	AGGACGUGGAGCGCACGGA	1087	UCCGUGCGUCCACGUCCU	Rh,D	[798-816] ORF
116	791	GCUAUUCAUUGGGCGCCUG	1088	CAGGCGCCAAUGAAUAGC	D	[1429-1447] ORF
117	792	AACUJCCGCGACAAGCGCA	1089	UGCUCUUGUCGCGGAAGUU	D	[713-731] ORF
118	793	GCUCUCCAGCCUCAUCAUC	1090	GAUGAUGAGGCUGGAGAGC	Rh,D,Rt,M,P	[1018-1036] ORF
119	794	AGAAGGCUGUUGCCAUCUC	1091	GAGAUGGCAACAGCCUUCU	Rt	[1125-1143] ORF
120	795	GGUCACCAAGGACGUGGAG	1092	CUCCACGUCCUUGGUGACC	Rh,D	[790-808] ORF
121	796	AGCUGCGCGACGAGGAGGU	1093	ACCUCUCGUCGCGCAGCU	Rh,D	[531-549] ORF
122	797	CCCGAGGUCACCAAGGACG	1094	CGUCCUUGGUGACCUCGGG	Rh,D	[785-803] ORF
123	798	AUGUCAGGCAAGAAGGACC	1095	GGUCCUUCUUGCCUGACAU	Rh,D	[1247-1265] ORF
124	799	CGAGGUCACCAAGGACGUG	1096	CACGUCCUUGGUGACCUCG	Rh,D	[787-805] ORF
125	800	GAUGCACCGACAGGCCUC	1097	GAGGCCUGUCCGGUGCAUC	Rh,Rb,Rt,M,P	[937-955] ORF
126	801	GCACUACAACUGCGAGCAC	1098	GUGCUCGCAGUUGUAGUGC	Rh,D	[685-703] ORF
127	802	CCACAAGAUGGUGGACAAC	1099	GUUGUCCACCAUCUUGUGG	Rh,Rb,M,P	[874-892]

						ORF
128	803	CAAGGGUGUGGUGGAGGUG	1100	CACCUCCACCACCCUUG	Rh,D	[1150-1168] ORF
129	804	AGCUGAAGAUCUGGAUGGG	1101	CCCAUCCAGAUCUUCAGCU	Rh,D	[1095-1113] ORF
130	805	ACCAGGCCAUGGCCAAGGA	1102	UCCUUGGCCAUGGCCUGGU	Rh,D	[393-411] ORF
131	806	CAUGUUCUUCAAGCCACAC	1103	GUGUGGCUUGAAGAACAUG	Rh,Rb,D	[838-856] ORF
132	807	CAAGAUCAACUUCGCGAC	1104	GUCGCGGAAGUUGAUCUUG	D	[706-724] ORF
133	808	UCCAGCCUCAUCAUCCUCA	1105	UGAGGAUGAUGAGGCUGGA	Rh,D,Rt,M	[1022-1040] ORF
134	809	GCCCAGGUCACCAAGGAC	1106	GUCCUUGGUGACCUCGGGC	Rh,D	[784-802] ORF
135	810	UCAAGCCACACUGGGAUGA	1107	UCAUCCAGUGUGGCUUGA	Rh,Rb	[846-864] ORF
136	811	AGUCCAUCAACGAGUGGGC	1108	GCCCACUCGUUGAUGGACU	Rh,Rt,M	[741-759] ORF
137	812	GACUUCGUGCGCAGCAGCA	1109	UGCUGCUGCGCACGAAGUC	Rh,D,M	[662-680] ORF
138	813	CUCUCCAGCCUCAUCAUCC	1110	GGAUGAUGAGGCUGGAGAG	Rh,D,Rt,M,P	[1019-1037] ORF
139	814	GCAGACCACCGACGGCAAG	1111	CUUGCCGUCGGUGGUCUGC	D,Rt	[763-781] ORF
140	815	AUGCAGAAGAAGGCUGUUG	1112	CAACAGCCUUCUUCUGCAU	Rt	[1118-1136] ORF
141	816	CAACCGUGGCUUCAUGGUG	1113	CACCAUGAAGCCACGGUUG	Rh,Rt,M	[889-907] ORF
142	817	UACUACGACGACGAGAAGG	1114	CCUUCUCGUCGUCGUAGUA	Rb	[962-980] ORF
143	818	GAAGGCUGUUGCCAUCUCC	1115	GGAGAUGGCAACAGCCUUC	Rt	[1126-1144] ORF
144	819	UCACCAAGGACGUGGAGCG	1116	CGCUCCACGUCCUJGGUGA	Rh,D	[792-810] ORF
145	820	CAGCUGAAGAUCUGGAUGG	1117	CCAUCCAGAUCUUCAGCUG	Rh,D	[1094-1112] ORF
146	821	UGGGCCUGACUGAGGCCAU	1118	AUGGCCUCAGUCAGGCCCA	Rt	[1200-1218] ORF
147	822	ACCGUGGCUUCAUGGUGAC	1119	GUCACCAUGAAGCCACGGU	Rh,Rt,M	[891-909] ORF
148	823	CAGUCCAUCAACGAGUGGG	1120	CCCACUCGUUGAUGGACUG	Rh,Rt,M	[740-758] ORF
149	824	CCGACGGCAAGCUGCCCGA	1121	UCGGGCAGCUUGCCGUCGG	D	[771-789] ORF
150	825	ACAAGCGCAGCGCGCUGCA	1122	UGCAGCGCGCUGCGCUUGU	Rh,Rt	[723-741] ORF
151	826	GAAACACCGUGGUGGUGGUG	1123	CAGCCCAGCCAGGUGUUUC	D	[1183-1201] ORF
152	827	AGGCUCCUGAGACACAUGG	1124	CCAUGUGUCUCAGGAGCCU	D	[1525-1543] 3'UTR
153	828	CAAGGACGUGGAGCGCACG	1125	CGUGCGCUCCACGUCCUUG	Rh,D	[796-814] ORF
154	829	GCAGUCCAUCAACGAGUGG	1126	CCACUCGUUGAUGGACUGC	Rh,Rt,M	[739-757] ORF
155	830	AGAUGGUGGACAACCGUGG	1127	CCACGGUUGUCCACCAUCU	Rh,M	[879-897] ORF

ES 2 689 696 T3

						ORF
156	831	AAGCGCAGCGCGCUGCAGU	1128	ACUGCAGCGCGCUGCGCUU	Rh,Rt	[725-743] ORF
157	832	CAUGCAGGCAAGAAGGAC	1129	GUCCUUCUUGCCUGACAUG	Rh,D	[1246-1264] ORF
158	833	CAAGCCACACUGGGAUGAG	1130	CUCAUCCAGUGUGGCUUG	Rh,Rb	[847-865] ORF
159	834	AAGAUGCAGAAGAAGGCUG	1131	CAGCCUUCUUCUGCAUCUU	Rh,Rt,M	[1115-1133] ORF
160	835	GGCCAUGGCCAAGGACCAG	1132	CUGGUCCUUGGCCAUGGCC	Rh,D	[397-415] ORF
161	836	GUGCGCAGCAGCAAGCAGC	1133	GCUGCUUGCUGCUGCGCAC	Rh,D	[668-686] ORF
162	837	CAACUGCGAGCACUCCAAG	1134	CUUGGAGUGCUCGCAGUUG	Rh,D	[691-709] ORF
163	838	UACAACUGCGAGCACUCCA	1135	UGGAGUGCUCGCAGUUGUA	Rh,D	[689-707] ORF
164	839	CAUUGACAAGAACAAGGCC	1136	GGCCUUGUUCUUGUCA AUG	Rh,D	[1216-1234] ORF
165	840	CAAGCAGCACUACAACUGC	1137	GCAGUUGUAGUGCUGCUUG	Rh,D	[679-697] ORF
166	841	GUGUUCACGCCACCGCCU	1138	AGGCGUGGCGUGGAACAC	D	[1280-1298] ORF
167	842	CCUGCUAUUCAUUGGGCGC	1139	GCGCCAAUGAAUAGCAGG	D	[1426-1444] ORF
168	843	GCCCACAAGCUCUCCAGCC	1140	GGCUGGAGAGCUUGUGGGC	Rh,D,P	[1010-1028] ORF
169	844	CAGCAGCAAGCAGCACUAC	1141	GUAGUGCUGCUUGCUGCUG	Rh,D	[673-691] ORF
170	845	UGAUGCACCGGACAGGCCU	1142	AGGCCUGUCCGGUGCAUCA	Rh,Rb,Rt,M,P	[936-954] ORF
171	846	UCAACUUCGCGACAAGCG	1143	CGCUUGUCGCGAAGUUGA	D	[711-729] ORF
172	847	UCAGGCAAGAAGGACCUGU	1144	ACAGGUCCUUCUUGCCUGA	Rh,D	[1250-1268] ORF
173	848	ACUUCGUGCGCAGCAGCAA	1145	UUGCUGCUGCGCAGGAAGU	Rh,D,M	[663-681] ORF
174	849	ACAACCGUGGCUUCAUGGU	1146	ACCAUGAAGCCACGGUUGU	Rh,Rt,M	[888-906] ORF
175	850	AAGGUGUUGCCAUCUCCU	1147	AGGAGAUGGCAACAGCCUU	D,Rt	[1127-1145] ORF
176	851	GCAGCUGCGGACGAGGAG	1148	CUCCUCGUCGCGCAGCUGC	Rh,D	[529-547] ORF
177	852	UAUUCAUUGGGCGCCUGGU	1149	ACCAGGCGCCAAUGAAUA	D	[1431-1449] ORF
178	853	UCCACCACAAGAUGGUGGA	1150	UCCACCAUCUUGGUGGA	Rh,Rb,D,P	[870-888] ORF
179	854	CCUGGCCCAACAAGCUCUC	1151	GAGAGCUUGUGGGCCAGGG	Rh,D,P	[1005-1023] ORF
180	855	ACCAGGACAUCUACGGGCG	1152	CGCCCGUAGAUGUCCUGGU	D,Rt	[1329-1347] ORF
181	856	GAUGAUGCACCGACAGGC	1153	GCCUGUCCGGUGCAUCAUC	Rh,Rb,Rt,M	[934-952] ORF
182	857	CAACGCCAUGUUCUCAAG	1154	CUUGAAGAACAUGGCGUUG	Rh,Rb,P	[832-850] ORF
183	858	ACGGCAAGCUGCCGAGGU	1155	ACCUCGGCAGCUUGCCGU	Rh,D	[774-792] ORF

184	859	CAGCGCGCUGCAGUCCAUC	1156	GAUGGACUGCAGCGCGCUG	Rh,Rt	[730-748] ORF
185	860	CCCAAGGGUGUGGUGGAGG	1157	CCUCCACCACACCCUUGGG	Rh,D	[1148-1166] ORF
186	861	CAUGGCCAAGGACCAGGCA	1158	UGCCUGGUCCUUGGCCAUG	Rh,D	[400-418] ORF
187	862	CUCCAGCCUCAUCAUCCUC	1159	GAGGAUGAUGAGGCUGGAG	Rh,D,Rt,M	[1021-1039] ORF
188	863	UCUACGGGCGCGAGGAGCU	1160	AGCUCCUCGCGCCCGUAGA	D,M	[1338-1356] ORF
189	864	GGCCACAAGCUCUCCAGC	1161	GCUGGAGAGCUUGUGGGCC	Rh,D,P	[1009-1027] ORF
190	865	GUCAGGCAAGAAGGACCUG	1162	CAGGUCCUUCUUGCCUGAC	Rh,D	[1249-1267] ORF
191	866	CAUCUACGGGCGCGAGGAG	1163	CUCCUCGCGCCCGUAGAUG	D,M	[1336-1354] ORF
192	867	CGUGCGCAGCAGCAAGCAG	1164	CUGCUUGCUGCUGCGCACG	Rh,D,M	[667-685] ORF
193	868	AGCCUCAUCAUCCUCAUGC	1165	GCAUGAGGAUGAUGAGGCU	Rh,D,Rt,M	[1025-1043] ORF
194	869	UUCAAGCCACACUGGGAUG	1166	CAUCCAGUGUGGCUUGAA	Rh,Rb	[845-863] ORF
195	870	AAGAAGGCUGUUGCCAUCU	1167	AGAUGGCAACAGCCUUCUU	Rt	[1124-1142] ORF
196	871	GGUGUGGUGGAGGUGACCC	1168	GGGUCACCUCACCACACC	Rh,D	[1154-1172] ORF
197	872	GAGGUGACCCAUGACCUGC	1169	GCAGGUCAUGGGUCACCUC	Rh,Rt,M	[1163-1181] ORF
198	873	GUGGAGGUGACCCAUGACC	1170	GGUCAUGGGUCACCUCAC	Rh,Rt,M	[1160-1178] ORF
199	874	CACAAGAUGGUGGACAACC	1171	GGUUGUCCACCAUCUUGUG	Rh,Rb,M,P	[875-893] ORF
200	875	CUGGCCACAAGCUCUCCA	1172	UGGAGAGCUUGUGGGCCAG	Rh,D,P	[1007-1025] ORF
201	876	GAUGACUUCGUGCGCAGCA	1173	UGCUGCGCACGAAGUCAUC	Rh,Rt,M	[659-677] ORF
202	877	ACUUCGCGACAAGCGCAG	1174	CUGCGCUUGUCGCGGAAGU	D	[714-732] ORF
203	878	AACGCCAUGUUCUUAAGC	1175	GCUUGAAGAACAUGGCGUU	Rh,Rb,P	[833-851] ORF
204	879	GGACUGUACCUGGCCAGC	1176	GCUGGCCAGGUACAGGUCC	Rh,D	[1261-1279] ORF
205	880	GCGACGAGGAGGUGCACGC	1177	GCGUGCACCUCUCGUCGC	D	[537-555] ORF
206	881	GCAAGCUGCCCAGGUCAC	1178	GUGACCUCGGGCAGCUUGC	Rh,D	[777-795] ORF
207	882	AUUCAUUGGGCGCCUGGUC	1179	GACCAGGCGCCCAAUGAAU	D	[1432-1450] ORF
208	883	GAGGUCACCAAGGACGUGG	1180	CCACGUCCUUGGUGACCUC	Rh,D	[788-806] ORF
209	884	AAGAAGGACCUGUACCUGG	1181	CCAGGUACAGGUCCUUCUU	Rh,D	[1256-1274] ORF
210	885	GACAACCGUGGCUUCAUGG	1182	CCAUGAAGCCACGGUUGUC	Rh,Rt,M	[887-905] ORF
211	886	CUGGGCCUGACUGAGGCCA	1183	UGGCCUCAGUCAGGCCAG	Rt	[1199-1217] ORF
212	887	CUCCAAGAUAACUCCGC	1184	GCGGAAGUUGAUCUUGGAG	Rh,D,Rt,M	[703-721]

						ORF
213	888	CAACUUCGCGACAAGCGC	1185	GCGCUUGUCGCGGAAGUUG	D	[712-730] ORF
214	889	CUCCUGCUAUUCAUUGGG	1186	CCCAAUGAAUAGCAGGGAG	D	[1423-1441] ORF
215	890	AAGCAGCACUACAACUGCG	1187	CGCAGUUGUAGUGUCUCUU	Rh,D	[680-698] ORF
216	891	GCGCAGCAGCAAGCAGCAC	1188	GUGCUGCUUGCUGCUGCGC	Rh,D	[670-688] ORF
217	892	CAGGCCAUGGCCAAGGACC	1189	GGUCCUUGGCCAUGGCCUG	Rh,D	[395-413] ORF
218	893	GUACCAGGCCAUGGCCAAG	1190	CUUGGCCAUGGCCUGGUAC	Rh,D	[391-409] ORF
219	894	CUUCGUGCGCAGCAGCAAG	1191	CUUGCUGCUGCGCACGAAG	Rh,D,M	[664-682] ORF
220	895	CAGCACUACAACUGCGAGC	1192	GCUCGCAGUUGUAGUGCUG	Rh,D	[683-701] ORF
221	896	UACAACUACUACGACGACG	1193	CGUCGUCGUAGUAGUUGUA	Rb	[956-974] ORF
222	897	GAUGGUGGACAACCGUGGC	1194	GCCACGGUUGUCCACCAUC	Rh,M	[880-898] ORF
223	898	CUACAACUGCGAGCACUCC	1195	GGAGUGCUCGCAGUUGUAG	Rh,D	[688-706] ORF
224	899	AAGGACCUGUACCUUGCCA	1196	UGGCCAGGUACAGGUCCUU	Rh,D	[1259-1277] ORF
225	900	GCUGCCCGAGGUCACCAAG	1197	CUUGGUGACCUCGGGCAGC	Rh,D	[781-799] ORF
226	901	GACAUUCACGGGCGCGAGG	1198	CCUCGCGCCCGUAGAUGUC	D,M	[1334-1352] ORF
227	902	CCACCACAAGAUGGUGGAC	1199	GUCCACCAUCUUGUGGUGG	Rh,Rb,D,P	[871-889] ORF
228	903	GCGCGACGAGGAGGUGCAC	1200	GUGCACCUCCUCGUCGCGC	Rh,D	[535-553] ORF
229	904	CUAUUCAUUGGGCGCCUGG	1201	CCAGGCGCCCAAUGAAUAG	D	[1430-1448] ORF
230	905	CCAGGACAUCUACGGGCGC	1202	GCGCCCGUAGAUGUCCUGG	D,Rt	[1330-1348] ORF
231	906	AAGAUGGUGGACAACCGUG	1203	CACGGUUGUCCACCAUCUU	Rh,M	[878-896] ORF
232	907	CAGGACAUCUACGGGCGCG	1204	CGCGCCCGUAGAUGUCCUG	D	[1331-1349] ORF
233	908	UCCAAGAUAACUUCGCG	1205	CGCGGAAGUUGAUCUUGGA	D	[704-722] ORF
234	909	GUCACCAAGGACGUGGAGC	1206	GCUCCACGUCCUUGGUGAC	Rh,D	[791-809] ORF
235	910	CUGCCCGAGGUCACCAAGG	1207	CCUUGGUGACCUCGGGCAG	Rh,D	[782-800] ORF
236	911	GACCAGGACAUCUACGGGC	1208	GCCCGUAGAUGUCCUGGUC	D,Rt	[1328-1346] ORF
237	912	CCAUGGCCAAGGACCAGGC	1209	GCCUGGUCCUUGGCCAUGG	Rh,D	[399-417] ORF
238	913	CACCAAGGACGUGGAGCGC	1210	GCGCUCCACGUCCUUGGUG	Rh,D	[793-811] ORF
239	914	GACAAGCGCAGCGCGCUGC	1211	GCAGCGCGCUGCGCUUGUC	Rh,Rt	[722-740] ORF
240	915	CAAGCGCAGCGCGCUGCAG	1212	CUGCAGCGCGCUGCGCUUG	Rh,Rt	[724-742] ORF

ES 2 689 696 T3

241	916	CAGACCACCGACGGCAAGC	1213	GCUUGCCGUCGGUGGUCUG	D,Rt	[764-782] ORF
242	917	GACCACCGACGGCAAGCUG	1214	CAGCUUGCCGUCGGUGGUC	D,Rt	[766-784] ORF
243	918	AGGACCUGUACCGGGCCAG	1215	CUGGCCAGGUACAGGUCCU	Rh,D	[1260- 1278] ORF
244	919	CUGCUAUUCAUUGGGCGCC	1216	GGCGCCAAUGAAUAGCAG	D	[1427- 1445] ORF
245	920	UCAUUGGGCGCCUGGUCCG	1217	CGGACCAGGGCCCAAUGA	Rh,D	[1434- 1452] ORF
246	921	GCUGCGGACGAGGAGGUG	1218	CACCUCUCGUCGCGCAGC	Rh,D	[532-550] ORF
247	922	CGGCAAGCUGCCCAGGUC	1219	GACCUCGGGACGUUGCCG	Rh,D	[775-793] ORF
248	923	CCUCAUCAUCCUCAUGCCC	1220	GGGAUGAGGAUGAUGAGG	Rh,D,Rt,M	[1027- 1045] ORF
249	924	CCAGGCCAUGGCCAAGGAC	1221	GUCCUUGGCCAUGGCCUGG	Rh,D	[394-412] ORF
250	925	GCCAUGGCCAAGGACCAGG	1222	CCUGGUCCUUGGCCAUGGC	Rh,D	[398-416] ORF
251	926	CCACCGACGGCAAGCUGCC	1223	GGCAGCUUGCCGUCGGUGG	D,Rt	[768-786] ORF
252	927	AUGGUGGACAACCGUGGCU	1224	AGCCACGGUUGUCCACCAU	Rh,M	[881-899] ORF
253	928	CUUCCGCGACAAGCGCAGC	1225	GCUGCGCUUGUCGCGGAAG	D	[715-733] ORF
254	929	CGCGACGAGGAGGUGCACG	1226	CGUGCACCUCCUCGUCGCG	Rh,D	[536-554] ORF
255	930	UGGCCACAAGCUCUCCAG	1227	CUGGAGAGCUUGUGGGCCA	Rh,D,P	[1008- 1026] ORF
256	931	GAGCAGCUGCGCGACGAGG	1228	CCUCGUCGCGCAGCUGCUC	Rh,D	[527-545] ORF
257	932	UGACCAGGACAUCUACGGG	1229	CCCGUAGAUGUCCUGGUCA	Rt	[1327- 1345] ORF
258	933	ACCACCGACGGCAAGCUGC	1230	GCAGCUUGCCGUCGGUGGU	D,Rt	[767-785] ORF
259	934	GAAGGACCUGUACCGGCC	1231	GGCCAGGUACAGGUCCUUC	Rh,D	[1258- 1276] ORF
260	935	CAUUGGGCGCCUGGUCCGG	1232	CCGACCAGGGCCCAAUG	Rh,D	[1435- 1453] ORF
261	936	AUGCACCGACAGGCCUCU	1233	AGAGGCCUGUCCGGUGCAU	Rh,Rb,Rt,P	[938-956] ORF
262	937	AUCAACUUCGCGACAAGC	1234	GCUUGUCGCGGAAGUUGAU	D	[710-728] ORF
263	938	CAGCUGCGGACGAGGAGG	1235	CCUCCUCGUCGCGCAGCUG	Rh,D	[530-548] ORF
264	939	CAGAAACACCGGGCUGGGC	1236	GCCCAGCCAGGUGUUCUG	D	[1181- 1199] ORF
265	940	CUACGGGCGGAGGAGCUG	1237	CAGCUCCUCGCGCCCGUAG	D,M	[1339- 1357] ORF
266	941	CGACGAGGAGGUGCACGCC	1238	GGCGUGCACCUCUCGUCG	D	[538-556] ORF
267	942	UUUGACCAGGACAUCUACG	1239	CGUAGAUGUCCUGGUCAA	Rt	[1325- 1343] ORF
268	943	GUCCAUCAACGAGUGGGCC	1240	GGCCACUCGUUGAUGGAC	Rh,Rt,M	[742-760] ORF
269	944	AUGACUUCGUGCGCAGCAG	1241	CUGCUGCGCACGAAGUCAU	Rh,Rt,M	[660-678]

ES 2 689 696 T3

						ORF
270	945	UCCCUUGCUAUUCAUUGGGC	1242	GCCCAAUGAAUAGCAGGGA	D	[1424-1442] ORF
271	946	CUGCGCGACGAGGAGGUGC	1243	GCACCUCCUCGUCGCGCAG	Rh,D	[533-551] ORF
272	947	CAAGCUGCCCGAGGUCACC	1244	GGUGACCUCGGGCAGCUUG	Rh,D	[778-796] ORF
273	948	AAGCUGCCCGAGGUCACCA	1245	UGGUGACCUCGGGCAGCUU	Rh,D	[779-797] ORF
274	949	UUCUUCAAGCCACACUGGG	1246	CCCAGUGUGGCUUGAAGAA	Rh,Rb,D	[842-860] ORF
275	950	ACACCUGGCUGGGCUGGGC	1247	GCCCAGCCCAGCCAGGUGU	D	[1186-1204] ORF
276	951	UCCAUCAACGAGUGGGCCG	1248	CGGCCACUCGUUGAUGGA	Ri,M	[743-761] ORF
277	952	AUCUACGGGCGCGAGGAGC	1249	GCUCCUCGCGCCCGUAGAU	D,M	[1337-1355] ORF
278	953	UCGUGCGCAGCAGCAAGCA	1250	UGCUCGUCGUCGCGCACGA	Rh,D,M	[666-684] ORF
279	954	CGACGGCAAGCUGCCCGAG	1251	CUCGGGCAGCUUGCCGUCG	D	[772-790] ORF
280	955	UUCAUUGGGCGCCUGGUCC	1252	GGACCAGGCGCCCAAUGAA	Rh,D	[1433-1451] ORF
281	956	UUGACCAGGACAUCUACGG	1253	CCGUAGAUGUCCUGGUCAA	Ri	[1326-1344] ORF
282	957	CCUGGCCACAAGCUCUCC	1254	GGAGAGCUUGUGGGCCAGG	Rh,D,P	[1006-1024] ORF
283	958	UGACUUCGUGCGCAGCAGC	1255	GCUCGUCGCGCACGAAGUCA	Rh,Ri,M	[661-679] ORF
284	959	AUGAUGCACCGACAGGCC	1256	GGCCUGUCCGGUGCAUCAU	Rh,Rb,Ri,M,P	[935-953] ORF
285	960	CACCGACGGCAAGCUGCCC	1257	GGGCAGCUUGCCGUCGGUG	D,Ri	[769-787] ORF
286	961	GACGGCAAGCUGCCCGAGG	1258	CCUCGGGCAGCUUGCCGUC	Rh,D	[773-791] ORF
287	962	UACCAGGCCAUGGCCAAGG	1259	CCUUGGCCAUGGCCUGGUA	Rh,D	[392-410] ORF
288	963	UCCGCGACAAGCGCAGCGC	1260	GCGCUGCGCUUGUCGCGGA	D	[717-735] ORF
289	964	UUCGCGACAAGCGCAGCG	1261	CGCUGCGCUUGUCGCGGAA	D	[716-734] ORF
290	965	AAGGACGUGGAGCGCACGG	1262	CCGUGCGCUCCACGUCCUU	Rh,D	[797-815] ORF
291	966	UUCACCACAAGAUGGUGG	1263	CCACCAUCUUGUGGUGGAA	Rh,Rb,D,P	[869-887] ORF
292	967	UACGGGCGCGAGGAGCUGC	1264	GCAGCUCCUCGCGCCCGUA	D,M	[1340-1358] ORF
293	968	AAACACCUGGCUGGGCUGG	1265	CCAGCCCAGCCAGGUGUUU	D	[1184-1202] ORF
294	969	AACACCUGGCUGGGCUGGG	1266	CCCAGCCCAGCCAGGUGUU	D	[1185-1203] ORF
295	970	AUUGGGCGCCUGGUCCGGC	1267	GCCGGACCAGGCGCCCAAU	Rh,D	[1436-1454] ORF
296	971	ACCGACGGCAAGCUGCCCG	1268	CGGGCAGCUUGCCGUCGGU	D	[770-788] ORF
297	972	UUCGUGCGCAGCAGCAAGC	1269	GCUUGCUGCUGCGCACGAA	Rh,D,M	[665-683] ORF

Tabla D: ARNip de 18+1 meros activos de SERPINH1

N.º	SEQ ID	ARNip sentido	SEQ ID	ARNip antisentido	Otras especies	humano-32454740 ORF:230-1486
1	1270	AGCCUUUGUUGCUAUCAAA	1849	UUUGAUAGCAACAAAGGCU	Rh	[2117-2135] 3'UTR
2	1271	GCCUAAGGGUGACAAGAU	1850	UAUCUUGUCACCCUUAGGC	Rh	[1453-1471] ORF
3	1272	GGCCUAAGGGUGACAAGAA	1851	UUCUUGUCACCCUUAGGCC	Rh	[1452-1470] ORF
4	1273	CCUCAUUCAGUAUUCAUAA	1852	UUAUGAAUACUGAUUGAGG		[1774-1792] 3'UTR
5	1274	GGCGGAUUGAGAAGGAGCA	1853	UGCUCUUCUCAAUCCGCC		[1973-1991] 3'UTR
6	1275	GGCAGUGGAGAACAUCUA	1854	UAGGAUGUUCUCCACUGCC	Rh	[415-433] ORF
7	1276	GGGUCAGCCAGCCUCUUA	1855	UAAGAGGGCUGGCUGACCC	Rh	[1839-1857] 3'UTR
8	1277	GGGUGACAAGAUGCGAGAA	1856	UUCUCGCAUCUUGUCACCC	Rh,D	[1459-1477] ORF
9	1278	GGACCAGGCAGUGGAGAAA	1857	UUUCUCCACUGCCUGGUCC	Rh	[409-427] ORF
10	1279	GAGACACAUGGGUGCUAUA	1858	UAUAGCACCAUGUGUCUC	Rh,D,Rt,M	[1533-1551] 3'UTR
11	1280	GUUGGAGCGUGGAAAAAAAA	1859	UUUUUUUCCACGCUCCAAC		[2191-2208] 3'UTR
12	1281	GGAACAUGAGCCUUUGUUA	1860	UAACAAAGGCUCAUGUUC	Rh	[2109-2127] 3'UTR
13	1282	GCCAUGUUCUUAAGCCAA	1861	UUGGUUGAAGAACAUGGC	Rh,Rb,D	[836-854] ORF
14	1283	GGAUUGAGAAGGAGCUCCA	1862	UGGAGCUCCUUCUCAAUCC		[1976-1994] 3'UTR
15	1284	GGGAUGAACUUUUUGUUUA	1863	UAAACAAAAAGUUCAUCCC	Rh	[2048-2066] 3'UTR
16	1285	GCCGCAGUGAGGCGGAUUA	1864	UAAUCCGCCUCACUGCGGC		[1963-1981] 3'UTR
17	1286	GGACCUUCCAGCUAGAAA	1865	UUUCUAGCUGGGAAGGUCC	Rh	[1639-1657] 3'UTR
18	1287	GACCUUCCAGCUAGAAUA	1866	UAUUCUAGCUGGGAAGGUC	Rh	[1640-1658] 3'UTR
19	1288	CCUGUGAGACAAAUUGAA	1867	UUCAAUUUGGUCUCACAGG	Rh	[1814-1832] 3'UTR
20	1289	UGGAGAACAUCUGGUGUA	1868	UACACCAGGAUGUUCUCA	Rh	[420-438] ORF
21	1290	GCCUUUGUUGCUAUCAAUA	1869	UAUUGAUAGCAACAAAGGC	Rh	[2118-2136] 3'UTR
22	1291	CCGCCUUUGAGUUGGACAA	1870	UUGUCCAACUCAAGGCGG	Rh	[1293-1311] ORF
23	1292	CAGGCAGUGGAGAACAUCA	1871	UGAUGUUCUCCACUGCCUG	Rh	[413-431] ORF
24	1293	CACCUGUGAGACAAAUUA	1872	UAAUUUGGUCUCACAGGUG	Rh	[1812-1830] 3'UTR
25	1294	GGGAAGAUGCAGAAGAAGA	1873	UCUUCUUCUGCAUCUCCC	Rh,Rb,Rt	[1112-1130] ORF
26	1295	GGCCAUUGACAAGAACAAA	1874	UUUGUUCUUGUCAAUUGGCC	Rh,D	[1213-1231]

						ORF
27	1296	GCCUUUGAGUUGGACACAA	1875	UUGUGUCCAACUCAAGGC	Rh	[1295-1313] ORF
28	1297	AGCGGACCUUCCCAGCUAA	1876	UUAGCUGGGAAGGUCCGCU	Rh	[1636-1654] 3'UTR
29	1298	GAAGAAGGCUGUUGCCAUA	1877	UAUGGCAACAGCCUUCUUC	Rt	[1123-1141] ORF
30	1299	ACAAGAUGCGAGACGAGUA	1878	UACUCGUCUCGCAUCUUGU	Rh,Rt	[1464-1482] ORF
31	1300	GAGGCGGAUUGAGAAGGAA	1879	UCCUUCUCAAUCCGCCUC		[1971-1989] 3'UTR
32	1301	GGACAACCGUGGCUUCAUA	1880	UAUGAAGCCACGGUUGUCC	Rh,M	[886-904] ORF
33	1302	CAUAUUUAUAGCCAGGUAA	1881	UUACCUGGCUAUAUAUAUG	Rh	[1788-1806] 3'UTR
34	1303	CGACGACGAGAAGGAAAAA	1882	UUUUUCCUUCUCGUCGUCG		[967-985] ORF
35	1304	CUCACCUGUGAGACCAAAA	1883	UUUUGGUCUCACAGGUGAG	Rh	[1810-1828] 3'UTR
36	1305	GCGGCUCCUGCUAUUCA	1884	UUGAAUAGCAGGGAGCCGC		[1419-1437] ORF
37	1306	AGAACAUCCUGGUGUCACA	1885	UGUGACACCAGGAUGUUCU		[423-441] ORF
38	1307	CACACUGGGAUGAGAAUA	1886	UAUUUCUCAUCCAGUGUG	Rh	[852-870] ORF
39	1308	GCUAGAAUUCACUCCACUA	1887	UAGUGGAGUGAAUUCUAGC	Rh	[1650-1668] 3'UTR
40	1309	CCUUCAUCUUCUAGUGCA	1888	UGCACUAGGAAGAUGAAGG		[1389-1407] ORF
41	1310	UGCUAUCAAUCCAAGAACA	1889	UGUUCUUGGAUUGAUAGCA	Rh	[2126-2144] 3'UTR
42	1311	GGAAGAUGCAGAAGAAGGA	1890	UCCUUCUUCUGCAUCUUC	Rh,Rb,Rt	[1113-1131] ORF
43	1312	CAUGAGCCUUUGUUGCUAA	1891	UUAGCAACAAAGGCUCAUG	Rh	[2113-2131] 3'UTR
44	1313	GCGGAUUGAGAAGGAGCUA	1892	UAGCUCCUUCUCAAUCCGC		[1974-1992] 3'UTR
45	1314	UGCAGUCCAUCAACGAGUA	1893	UACUCGUUGAUGGACUGCA	Rh,Rt,M	[738-756] ORF
46	1315	GCACUGCGGAGAAGUUGAA	1894	UUCAACUUCUCCGCAGUGC		[321-339] ORF
47	1316	CCAGGCAGUGGAGAACAUA	1895	UAUGUUCUCCACUGCCUGG	Rh	[412-430] ORF
48	1317	GGCAAGAAGGACCUGUACA	1896	UGUACAGGUCCUUCUUGCC	Rh,D,M	[1253-1271] ORF
49	1318	CUCUACAACUACUACGACA	1897	UGUCGUAGUAGUUGUAGA G	Rb	[953-971] ORF
50	1319	CUUCCAGCUAGAAUUCA	1898	UUGAAUUCUAGCUGGGAAG	Rh	[1643-1661] 3'UTR
51	1320	AGGCGGAUUGAGAAGGAGA	1899	UCUCCUUCUCAAUCCGCCU		[1972-1990] 3'UTR
52	1321	GGUCCUAUACCGUGGGUGA	1900	UCACCCACGGUAUAGGACC	Rh	[912-930] ORF
53	1322	GCAAGAAGGACCUGUACCA	1901	UGGUACAGGUCCUUCUUGC	Rh,D,M	[1254-1272] ORF
54	1323	CCGUGGGUGUCAUGAUGAA	1902	UUCAUCAUGACACCCACGG	Rh	[921-939] ORF

55	1324	GAUGCGAGACGAGUUAUAA	1903	UUUAUAACUCGUCUCGCAUC	Rh	[1468-1486] ORF
56	1325	GCCAGUGCUGAGCGCCGAA	1904	UUCGGCGCUCAGCACUGCC		[511-529] ORF
57	1326	CAGCUAGAAUUCACUCCAA	1905	UUGGAGUGAAUUCUAGCUG	Rh	[1648-1666] 3'UTR
58	1327	GAGCUUCGCUGAUGACUUA	1906	UAAGUCAUCAGCGAAGCUC	Rh	[649-667] ORF
59	1328	CUUUGAGUUGGACACAGAA	1907	UUCUGUGUCCAACUCAAAAG	Rh	[1297-1315] ORF
60	1329	GGUGGACAACCGUGGCUUA	1908	UAAGCCACGGUUGUCCACC	Rh,M	[883-901] ORF
61	1330	GCCUCAUCAUCCUCAUGCA	1909	UGCAUGAGGAUGAUGAGGC	Rh,D,Rt, M	[1026-1044] ORF
62	1331	ACCAGGCAGUGGAGAACAA	1910	UUGUUCUCCACUGCCUGGU	Rh	[411-429] ORF
63	1332	CCUGCCUCAAUUCAGUAUUA	1911	UAAUACUGAUUGAGGCAGG		[1770-1788] 3'UTR
64	1333	GAUCAAGCCUGCCUCAUA	1912	UAUUGAGGCAGGCUUGAUC	Rh	[1763-1781] 3'UTR
65	1334	CAGACUCUGGUCAAGAAGA	1913	UCUUCUUGACCAGAGUCUG	Rh	[2011-2029] 3'UTR
66	1335	CGCGCUGCAGUCCAUCAAA	1914	UUUGAUGGACUGCAGCGCG	Rh,Rt	[733-751] ORF
67	1336	CUGGCACUGCGGAGAAGUA	1915	UACUUCUCCGCAGUGCCAG		[318-336] ORF
68	1337	CCAGCUCUAUCCCAACCUA	1916	UAGGUUGGGAUAGAGCUG G		[1885-1903] 3'UTR
69	1338	AGGGUGUGGUGGAGGUGAA	1917	UUCACCUCCACCACCCU	Rh,D	[1152-1170] ORF
70	1339	AGUGAGGCGGAUUGAGAAA	1918	UUUCUCAAUCCGCCUCACU		[1968-1986] 3'UTR
71	1340	CGGACAGGCCUCUACAACA	1919	UGUUGUAGAGGCCUGUCCG	Rh,Rb,Rt, P	[944-962] ORF
72	1341	CGACGAGAAGGAAAAGCUA	1920	UAGCUUUUCUUCUCGUCG	Rh	[970-988] ORF
73	1342	AGGCCAAGGCAGUGCUGAA	1921	UUCAGCACUGCCUUGGCCU	Rh	[504-522] ORF
74	1343	GCCUCAGGGUGCACACAGA	1922	UCUGUGUGCACCCUGAGGC		[1488-1506] 3'UTR
75	1344	GGAUGAGAAAUCCACCAA	1923	UUGGUGGAAUUCUCAUCC	Rh	[859-877] ORF
76	1345	AGAAGGAAAAGCUGCAAAA	1924	UUUUGCAGCUUUUCCUUCU	Rh	[975-993] ORF
77	1346	AGCUCUAUCCCAACCUCUA	1925	UAGAGGUUGGGAUAGAGC U	Rh	[1887-1905] 3'UTR
78	1347	UGACAAGAUGCGAGACGAA	1926	UUCGUCUCGCAUCUUGUCA	Rh	[1462-1480] ORF
79	1348	AGAAGGAGCUCCAGGAGA	1927	UCUCCUGGGAGCUCCUUCU		[1982-2000] 3'UTR
80	1349	CCUUCUCACCUGUGAGACA	1928	UGUCUCACAGGUGAGAAGG	Rh	[1806-1824] 3'UTR
81	1350	GGCUCUGGGCAGACUCUA	1929	UAGAGUCUGCCCAGAAGCC	Rh	[2001-2019] 3'UTR
82	1351	CCAGCCUCAUCAUCCUCA	1930	UUGAGGAUGAUGAGGCUG G	Rh,D,Rt, M	[1023-1041] ORF
83	1352	CCAAAGGCUCCUGAGACAA	1931	UUGUCUCAGGAGCCUUUGG		[1521-1539]

						3'UTR
84	1353	GGACCUGGGCCAUAGUCA	1932	UUGACUAUGGCCAGGUCC		[1722-1740] 3'UTR.
85	1354	GGGUGUCAUGAUGAUGCAA	1933	UUGCAUCAUCAUGACACCC	Rh	[925-943] ORF
86	1355	GUACCAGCCUUGGAUACUA	1934	UAGUAUCCAAGGCUGGUAC	Rh	[1572-1590] 3'UTR
87	1356	GGCUGUUGCCAUCUCCUUA	1935	UAAGGAGAUGGCAACAGCC		[1129-1147] ORF
88	1357	CGCAGUGAGGCGGAUUGAA	1936	UUCAAUCCGCCUCACUGCG		[1965-1983] 3'UTR
89	1358	CCAAGGACGUGGAGCGCAA	1937	UUGCGCUCCAÇGUCCUUGG	Rh,D	[795-813] ORF
90	1359	GGCUCCUGAGACACAUGGA	1938	UCCAUGUGUCUCAGGAGCC	D	[1526-1544] 3'UTR
91	1360	GCUGCAGUCCAUCAACGAA	1939	UUCGUUGAUGGACUGCAGC	Rh,Rt	[736-754] ORF
92	1361	CCAGGUACCUUCUCACCUA	1940	UAGGUGAGAAGGUACCUGG	Rh	[1799-1817] 3'UTR
93	1362	GCAGCGCGCUGCAGUCCAA	1941	UUGGACUGCAGCGCGCUGC	Rh,Rt	[729-747] ORF
94	1363	GAGACCAAUUGAGCUAGA	1942	UCUAGCUCAAUUUGGUCUC	Rh	[1819-1837] 3'UTR
95	1364	GCCGCCGAGGUGAAGAAAA	1943	UUUUCUUCACCUCGGCGGC		[281-299] ORF
96	1365	GCAGACUCUGGUCAAGAAA	1944	UUUCUUGACCAGAGUCUGC	Rh	[2010-2028] 3'UTR
97	1366	CUAGAAUUCACUCCACUUA	1945	UAAGUGGAGUGAAUUCUA G	Rh	[1651-1669] 3'UTR
98	1367	GCAGUGGAGAACAUCCUGA	1946	UCAGGAUGUUCUCCACUGC	Rh	[416-434] ORF
99	1368	CGCAUGUCAGGCAAGAAGA	1947	UCUUCUUGCCUGACAUGCG	Rh,D	[1244-1262] ORF
100	1369	CGGAUUGAGAAGGAGCUCA	1948	UGAGCUCCUUCUCAAUCCG		[1975-1993] 3'UTR
101	1370	AGGUGAGGUACCAGCCUUA	1949	UAAGGCUGGUACCUCACCU	Rh	[1565-1583] 3'UTR
102	1371	CCACACUGGGAUGAGAAAA	1950	UUUUCUCAUCCAGUGUGG	Rh	[851-869] ORF
103	1372	GCCAUUGACAAGAACAAGA	1951	UCUUGUUCUUGUCAAUGGC	Rh,D	[1214-1232] ORF
104	1373	GCGCUGCAGUCCAUCAACA	1952	UGUUGAUGGACUGCAGCGC	Rh,Rt	[734-752] ORF
105	1374	CUCCCAACUAUAAAACUAA	1953	UUAGUUUAUAGUUGGGA G	Rh	[1903-1921] 3'UTR
106	1375	GGUGACAAGAUGCGAGACA	1954	UGUCUCGCAUCUUGUCACC	Rh	[1460-1478] ORF
107	1376	GGCCGACUUGUCACGCAUA	1955	UAUGCGUGACAAGUCGGCC	Rh	[1231-1249] ORF
108	1377	CCUAAGGGUGACAAGAUGA	1956	UCAUCUUGUCACCCUAGG	Rh	[1454-1472] ORF
109	1378	UGAGACACAUGGGUGCUAA	1957	UUAGCACCCAUGUGUCUCA	Rh,D,Rt, M	[1532-1550] 3'UTR
110	1379	GGGUGGAAAAACAGACCGA	1958	UCGGUCUGUUUUUCCACCC		[1601-1619] 3'UTR
111	1380	GGUGGAGGUGACCCAUGAA	1959	UUCAUGGGUCACCUCCACC	Rh,Rt,M	[1159-1177]

						ORF
112	1381	CUUUGACCAGGACAUCUAA	1960	UUAGAUGUCCUGGUCAAAAG	Rh,Rt	[1324-1342] ORF
113	1382	GAACAUGAGCCUUUGUUGA	1961	UCAACAAAGGCUCAUGUUC	Rh	[2110-2128] 3'UTR
114	1383	AGCCUUGGAUACUCCAUGA	1962	UCAUGGAGUAUCCAAGGCU	Rh	[1577-1595] 3'UTR
115	1384	GGAGGUGACCCAUGACCUA	1963	UAGGUCAUGGGUCACCUC	Rh,Rt,M	[1162-1180] ORF
116	1385	AGAUCAAGCCUGCCUCAA	1964	UUUGAGGCAGGCUUGAUCU	Rh	[1762-1780] 3'UTR
117	1386	GCCCAAGGGUGUGGUGGAA	1965	UUCACCACACCCUUGGGC	Rh,D	[1147-1165] ORF
118	1387	AGAACAAGGCCGACUUGUA	1966	UACAAGUCGGCCUUGUUCU	Rh	[1224-1242] ORF
119	1388	GUGGCUUCAUGGUGACUCA	1967	UGAGUCACCAUGAAGCCAC	Rh	[894-912] ORF
120	1389	CUCCUGAGACACAUGGGUA	1968	UACCCAUGUGUCUCAGGAG	D	[1528-1546] 3'UTR
121	1390	CAGCCUUGGAUACUCCAUA	1969	UAUGGAGUAUCCAAGGCUG	Rh	[1576-1594] 3'UTR
122	1391	AAGGCUCUGAGACACUA	1970	UAUGUGUCUCAGGAGCCUU	D	[1524-1542] 3'UTR
123	1392	AGAAGAAGGCUGUUGCCAA	1971	UUGGCAACAGCCUUCUUCU	Rt	[1122-1140] ORF
124	1393	CUACUACGACGACGAGAAA	1972	UUUCUCGUCGUCGUAGUAG	Rb	[961-979] ORF
125	1394	CCUUUGUUGCUAUCAAUCA	1973	UGAUUGAUAGCAACAAAGG	Rh	[2119-2137] 3'UTR
126	1395	AGGCAGUGGAGAACAUCCA	1974	UGGAUGUUCUCCACUGCCU	Rh	[414-432] ORF
127	1396	CCAUCACGUGGAGCCUCUA	1975	UAGAGGCUCCACGUGAUGG	Rh	[1045-1063] ORF
128	1397	AGCUCUCCAGCCUCAUCAA	1976	UUGAUGAGGCUGGAGAGCU	Rh,D,Rt, M,P	[1017-1035] ORF
129	1398	GGCUCUCCUGCUAUUCAUUA	1977	UAAUGAAUAGCAGGGAGCC	D	[1421-1439] ORF
130	1399	GGGAACAUGAGCCUUUGUA	1978	UACAAAGGCUCAUGUCCC	Rh	[2108-2126] 3'UTR
131	1400	GGGCAUAGUCAUUCUGCA	1979	UGCAGAAUGACUAUGGCC		[1728-1746] 3'UTR
132	1401	CCAAAGAGCAGCUGAAGAA	1980	UUCUUCAGCUGCUCUUUGG	Rh,Rb,P	[1086-1104] ORF
133	1402	GACGAGAAGGAAAAGCUGA	1981	UCAGCUUUUCCUUCUCGUC	Rh	[971-989] ORF
134	1403	GGGCUUCUGGGCAGACUCA	1982	UGAGUCUGCCAGAAGCCC	Rh	[2000-2018] 3'UTR
135	1404	CAAGGACCAGGCAGUGGAA	1983	UUCACUGCCUGGUCCUUG	Rh	[406-424] ORF
136	1405	CUGUGAGACCAAAUUGAGA	1984	UCUCAAUUUGGUCUCACAG	Rh	[1815-1833] 3'UTR
137	1406	GACUGAGGCCAUUGACAAA	1985	UUUGUCAAUUGCCUCAGUC	Rh	[1207-1225] ORF
138	1407	GACUUGUCACGCAUGUCAA	1986	UUGACAUGCGUGACAAGUC	Rh	[1235-1253] ORF
139	1408	GAGGUGAGGUACCAGCCUA	1987	UAGGCUGGUACCUCACCUC		[1564-1582] 3'UTR

140	1409	CAGAUACCAUGAUGCUGAA	1988	UUCAGCAUCAUGGUAUCUG	Rh	[1681-1699] 3'UTR
141	1410	AGGCAAGAAGGACCUGUAA	1989	UUACAGGUCCUUCUUGCCU	Rh,D	[1252-1270] ORF
142	1411	CUGGGAUGAGAAAUCCAA	1990	UUGGAAUUUCUCAUCCAG	Rh	[856-874] ORF
143	1412	AGGUACCAGCCUUGGAUAA	1991	UUAUCCAAGGCUGGUACCU	Rh	[1570-1588] 3'UTR
144	1413	CAGCCAGCCCUCUUCUGAA	1992	UUCAGAAGAGGGCUGGCUG		[1843-1861] 3'UTR
145	1414	GUGUCAUGAUGAUGCACCA	1993	UGGUGCAUCAUCAUGACAC	Rh	[927-945] ORF
146	1415	CCUCUACAACUACUACGAA	1994	UUCGUAGUAGUUGUAGAG G	Rb,D	[952-970] ORF
147	1416	CCGCCGAGGUGAAGAAACA	1995	UGUUUCUUCACCUCGGCGG	Rh	[282-300] ORF
148	1417	GCUAUCAAUCCAAGAACUA	1996	UAGUUCUUGGAUUGAUAGC	Rh	[2127-2145] 3'UTR
149	1418	AGCCUGCCUCAUCAGUAA	1997	UUACUGAUUGAGGCAGGCU		[1768-1786] 3'UTR
150	1419	GGUCCGGCCUAAGGGUGAA	1998	UUCACCCUAGGCCGGACC	Rh	[1447-1465] ORF
151	1420	GAAGGAAAAGCUGCAAAUA	1999	UAUUUGCAGCUUUUCCUUC	Rh	[976-994] ORF
152	1421	GGCCUCUACAACUACUACA	2000	UGUAGUAGUUGUAGAGGCC	Rb,D	[950-968] ORF
153	1422	UGUUCUUAAGCCACACUA	2001	UAGUGUGGCUUGAAGAACA	Rh,Rb,D	[840-858] ORF
154	1423	GGCCAAGGCAGUGCUGAGA	2002	UCUCAGCACUGCCUUGGCC	Rh	[505-523] ORF
155	1424	AGAAAUCCACCACAAGAA	2003	UUCUUGUGGUGGAAUUUCU	Rh	[864-882] ORF
156	1425	CUGCAGUCCAUCAACGAGA	2004	UCUCGUUGAUGGACUGCAG	Rh,Rt,M	[737-755] ORF
157	1426	CCAGCGUGUCCACGCCAA	2005	UUGGCGUGGAACACGCUGG		[1275-1293] ORF
158	1427	GCUCCCUCCUGCUUCUCAA	2006	UUGAGAAGCAGGAGGGAGC		[234-252] ORF
159	1428	CCGGACAGGCCUCUACAAA	2007	UUUGUAGAGGCCUGUCCGG	Rh,Rb,Rt, P	[943-961] ORF
160	1429	CCCAUCACGUGGAGCCUCA	2008	UGAGGCUCCACGUGAUGGG	Rh	[1044-1062] ORF
161	1430	CCGGCCUAAGGGUGACAAA	2009	UUUGUCACCCUAGGCCGG	Rh	[1450-1468] ORF
162	1431	CCUAUACCGUGGGUGUCA	2010	UUGACACCCACGGUAUAGG	Rh,D,P	[915-933] ORF
163	1432	CAGUGGAGAACAUCUGGA	2011	UCCAGGAUGUUCUCCACUG	Rh	[417-435] ORF
164	1433	CACUGGGAUGAGAAAUUCA	2012	UGAAUUUCUCAUCCAGUG	Rh	[854-872] ORF
165	1434	AUCCAAAGGCUCUGAGAA	2013	UUCUCAGGAGCCUUGGAU		[1519-1537] 3'UTR
166	1435	UGAGAAAUCCACCACAAA	2014	UUUGUGGUGGAAUUCUCA	Rh	[862-880] ORF
167	1436	GGUGGAAAAACAGACCGGA	2015	UCCGGUCUGUUUUUCCACC		[1602-1620] 3'UTR
168	1437	GCUGGCAGCCGACUGUAA	2016	UUACAGUCGGCUGCCCAGC		[616-634]

						ORF
169	1438	CCAUAGUCAUUCUGCCUGA	2017	UCAGGCAGAAUGACUAUGG		[1731-1749] 3'UTR
170	1439	GCACCGGACAGGCCUCUAA	2018	UUAGAGGCCUGUCCGGUGC	Rh,Rb,Rt, P	[940-958] ORF
171	1440	GUUGGACACAGAUGGCAAA	2019	UUUGCCAUCUGUGUCCAAC		[1303-1321] ORF
172	1441	GCCUGCCUCAAUUCAGUAUA	2020	UAUACUGAUUGAGGCAGGC		[1769-1787] 3'UTR
173	1442	GAUCAACUCCGCGACAAA	2021	UUUGUCGCGGAAGUUGAUC	D	[709-727] ORF
174	1443	GGCCGAGUGAGGCGGAUA	2022	UAUCCGCCUCACUGCGGCC		[1962-1980] 3'UTR
175	1444	CUGCGGAGAAGUUGAGCCA	2023	UGGCUCAACUUCUCCGCAG		[324-342] ORF
176	1445	GCAUCCAAAGGCUCUGAA	2024	UUCAGGAGCCUUUGGAUGC		[1517-1535] 3'UTR
177	1446	GCUUCUGGGCAGACUCUGA	2025	UCAGAGUCUGCCCAGAAGC	Rh	[2002-2020] 3'UTR
178	1447	CCAGCCCUCUUCUGACACA	2026	UGUGUCAGAAGAGGGCUGG		[1846-1864] 3'UTR
179	1448	GCUCUAUCCCAACCUCUCA	2027	UGAGAGGUUGGGAUAGAG	Rh	[1888-1906] 3'UTR
180	1449	GGACGUGGAGCGCACGGAA	2028	UUCGUGCGCUCCACGUCC	Rh,D	[799-817] ORF
181	1450	CCAAGGCAGUGCUGAGCGA	2029	UCGCUCAGCACUGCCUUGG	Rh	[507-525] ORF
182	1451	GCAGAAGAAGGCUGUUGCA	2030	UGCAACAGCCUUCUUCUGC	Rt	[1120-1138] ORF
183	1452	GACAUUUUGUUGGAGCGUA	2031	UACGCUCCAACAAAUGUC		[2183-2201] 3'UTR
184	1453	CGAGCACUCCAAGAUCAAA	2032	UUUGAUCUUGGAGUGCUCG	Rh,D	[697-715] ORF
185	1454	UCAUGAUGAUGCACCGGAA	2033	UUCGGUGCAUCAUCAUGA	Rh	[930-948] ORF
186	1455	CCUGCUUCUCAGCGCCUUA	2034	UAAGGCGCUGAGAAGCAGG		[241-259] ORF
187	1456	CCCAACCUCUCCCAACUAA	2035	UUAGUUGGGAGAGGUUGG	Rh	[1895-1913] 3'UTR
188	1457	UGGGCAGACUCUGGUCAAA	2036	UUUGACCAGAGUCUGCCCA	Rh	[2007-2025] 3'UTR
189	1458	CUCUGGUCAAGAAGCAUCA	2037	UGAUGCUCUUGACCAGAG	Rh	[2015-2033] 3'UTR
190	1459	GAGCCUCUCGAGCGCCUUA	2038	UAAGGCGCUCGAGAGGCUC		[1055-1073] ORF
191	1460	AGAAGGCUGUUGCCAUCUA	2039	UAGAUGGCAACAGCCUUCU	Rt	[1125-1143] ORF
192	1461	CCUGCUAGUCAACGCCAA	2040	UUGCGUUGACUAGCAGGG	Rh	[822-840] ORF
193	1462	GCCUUCAGCUUGUACCAGA	2041	UCUGGUACAAGCUGAAGGC		[380-398] ORF
194	1463	GCUGCUAACCAAAGAGCAA	2042	UUGCUCUUGGUUAGCAGC		[1078-1096] ORF
195	1464	CCCACAAGCUCUCCAGCCA	2043	UGGCUGGAGAGCUUGUGGG	Rh,D,P	[1011-1029] ORF
196	1465	GCUCCUGCUAUUCAUUGA	2044	UCAAUGAAUAGCAGGGAGC	D	[1422-1440] ORF

197	1466	GUUCUUCAAAAGAUAGGGAA	2045	UUCCCUAUCUUUGAAGAAC		[2083-2101] 3'UTR
198	1467	GUCAGCCAGCCUCUUCUA	2046	UAGAAGAGGGCUGGCUGAC	Rh	[1841-1859] 3'UTR
199	1468	GCGGGACACCCAAAGCGGA	2047	UCCGCUUUGGGUGUCCCGC		[1405-1423] ORF
200	1469	AGCGCAGCGCGCUGCAGUA	2048	UACUGCAGCGCGCUGCGCU	Rh,Rt	[726-744] ORF
201	1470	CCGGAACUCCACAUCCUA	2049	UAGGAUGUGGAGUUUCCGG		[1701-1719] 3'UTR
202	1471	CCAUUGACAAGAACAAGGA	2050	UCCUUGUUCUUGUCAAUGG	Rh,D	[1215-1233] ORF
203	1472	GGACAUCUACGGGCGCGAA	2051	UUCGCGCCCGUAGAUGUCC	D	[1333-1351] ORF
204	1473	GACACAUGGGUGCUAUUGA	2052	UCAAUAGCACCCAUGUGUC	Rh,Rt,M	[1535-1553] 3'UTR
205	1474	CCUGGCACUGCGGAGAAGA	2053	UCUUCUCCGCAGUGCCAGG		[317-335] ORF
206	1475	GGGCCUGACUGAGGCCAUA	2054	UAUGGCCUCAGUCAGGCC	Rt	[1201-1219] ORF
207	1476	ACACUGGGAUGAGAAAUA	2055	UAAUUUCUCAUCCAGUGU	Rh	[853-871] ORF
208	1477	GGUCAGCCAGCCUCUUCA	2056	UGAAGAGGGCUGGCUGACC	Rh	[1840-1858] 3'UTR
209	1478	GUGAGGCGGAUUGAGAAGA	2057	UCUUCUCAAUCCGCCUCAC		[1969-1987] 3'UTR
210	1479	UCACCUGUGAGACCAAUA	2058	UAUUUGGUCUCACAGGUGA	Rh	[1811-1829] 3'UTR
211	1480	AGCUGCAAAUCGUGGAGAA	2059	UUCUCCACGAUUUGCAGCU	Rh	[984-1002] ORF
212	1481	GGUGCACACAGGAUGGCAA	2060	UUGCCAUCCUGUGUGCACC	Rh	[1495-1513] 3'UTR
213	1482	GGGUGUGGUGGAGGUGACA	2061	UGUCACCUCCACCACACC	Rh,D	[1153-1171] ORF
214	1483	CCAGCCUUGGAUACUCCAA	2062	UUGGAGUAUCCAAGGCUGG	Rh	[1575-1593] 3'UTR
215	1484	CCACAAGCUCUCCAGCCUA	2063	UAGGCUGGAGAGCUUGUGG	Rh,D,P	[1012-1030] ORF
216	1485	AAAGGCUCCUGAGACACAA	2064	UUGUGUCUCAGGAGCCUUU		[1523-1541] 3'UTR
217	1486	AGGAAAAGCUGCAAAUCGA	2065	UCGAUUUGCAGCUUUUCCU	Rh	[978-996] ORF
218	1487	CGCAGCAGCUCCUGGCACA	2066	UGUGCCAGGAGCUGCUGCG		[307-325] ORF
219	1488	GGUGUCAUGAUGAUGCACA	2067	UGUGCAUCAUCAUGACACC	Rh	[926-944] ORF
220	1489	CCUCUUCUGACACUAAAA	2068	UUUUUAGUGUCAGAAGAG G		[1851-1869] 3'UTR
221	1490	AGCUAGAAUUCACUCCACA	2069	UGUGGAGUGAAUUCUAGCU	Rh	[1649-1667] 3'UTR
222	1491	CGCUGGGCGGCAAGGCGAA	2070	UUCGCCUUGCCGCCACGCG		[474-492] ORF
223	1492	GGCCUGGCCUUCAGCUUGA	2071	UCAAGCUGAAGGCCAGGCC		[374-392] ORF
224	1493	AGACACAUGGGUGCUAUUA	2072	UAAUAGCACCCAUGUGUCU	Rh,Rt,M	[1534-1552] 3'UTR
225	1494	CGUGGGUGUCAUGAUGAUA	2073	UAUCAUCAUGACACCCACG	Rh	[922-940]

						ORF
226	1495	GUGGGUGUCAUGAUGAUGA	2074	UCAUCAUCAUGACACCCAC	Rh	[923-941] ORF
227	1496	GAGAAGGAGCUCCCAGGAA	2075	UCCUGGGAGCUCCUUCUC		[1981-1999] 3'UTR
228	1497	GACUCUGGUCAAGAAGCAA	2076	UUGCUUCUUGACCAGAGUC	Rh	[2013-2031] 3'UTR
229	1498	CACUAAAACACCUCAGCUA	2077	UAGCUGAGGUGUUUAGU G		[1861-1879] 3'UTR
230	1499	GGAGGCAUCCAAAGGCUCA	2078	UGAGCCUUUGGAUGCCUCC		[1513-1531] 3'UTR
231	1500	GACCCAGCUCAGUGAGCUA	2079	UAGCUCACUGAGCUGGGUC		[636-654] ORF
232	1501	CCAUGACCUGCAGAAACAA	2080	UUGUUUCUGCAGGUCAUGG	Rh,Rt,M	[1171-1189] ORF
233	1502	AGAUGCAGAAGAAGGCUGA	2081	UCAGCCUUCUUCUGCAUCU	Rh,Rt,M	[1116-1134] ORF
234	1503	CAGCAAGCAGCACUACAAA	2082	UUUGUAGUGCUGCUUGCUG	Rh,D	[676-694] ORF
235	1504	CAAGCUCUCCAGCCUCAUA	2083	UAUGAGGCUGGAGAGCUUG	Rh,D,M,P	[1015-1033] ORF
236	1505	UGCAGAAGAAGGCUGUUGA	2084	UCAACAGCCUUCUUCUGCA	Rt	[1119-1137] ORF
237	1506	GGCGCGAGGAGCUGCGCAA	2085	UUGCGCAGCUCCUCGCGCC	Rh,D,M	[1344-1362] ORF
238	1507	GGUACCAGCCUUGGAUACA	2086	UGUAUCCAAGGCUGGUACC	Rh	[1571-1589] 3'UTR
239	1508	GCAGCCGACUGUACGGACA	2087	UGUCCGUACAGUCGGCUGC		[621-639] ORF
240	1509	CAGCCUCAUCAUCCUCAUA	2088	UAUGAGGAUGAUGAGGCU G	Rh,D,Rt, M	[1024-1042] ORF
241	1510	GCCACCGCCUUUGAGUUGA	2089	UCAACUCAAAAGGCGGUGGC	Rh	[1289-1307] ORF
242	1511	AGAAGGACCUGUACCUGGA	2090	UCCAGGUACAGGUCCUUCU	Rh,D	[1257-1275] ORF
243	1512	GGUGAAGAAACCUGCAGCA	2091	UGCUGCAGGUUUCUUCACC	Rh	[289-307] ORF
244	1513	GUACCUUCUCACCCUGUGAA	2092	UUCACAGGUGAGAAGGUAC	Rh	[1803-1821] 3'UTR
245	1514	GGCCAAGGACCAGGCAGUA	2093	UACUGCCUGGUCCUUGGCC	Rh	[403-421] ORF
246	1515	GGCGGCAAGGCGACCACGA	2094	UCGUGGUCGCCUUGCCGCC		[479-497] ORF
247	1516	AGCACUCCAAGAUCAACUA	2095	UAGUUGAUCUUGGAGUGCU	Rh,D	[699-717] ORF
248	1517	AUAUUUAUAGCCAGGUACA	2096	UGUACCUGGCUAUAUUUAU	Rh	[1789-1807] 3'UTR
249	1518	GGCAGCCGACUGUACGGAA	2097	UCCGUACAGUCGGCUGCC		[620-638] ORF
250	1519	GUCACGCAUGUCAGGCAAA	2098	UUUGCCUGACAUGCGUGAC	Rh,D	[1240-1258] ORF
251	1520	GACAGGCCUCUACAACUAA	2099	UUAGUUGUAGAGGCCUGUC	Rh,Rb,Rt, P	[946-964] ORF
252	1521	GAUGCAGAAGAAGGCUGUA	2100	UACAGCCUUCUUCUGCAUC	Rh,Rt,M	[1117-1135] ORF
253	1522	ACCAUGACCUGCAGAAAA	2101	UUUUCUGCAGGUCAUGGGU	Rh,Rt,M	[1169-1187] ORF

254	1523	GGCUUCAUGGUGACUCGGA	2102	UCCGAGUCACCAUGAAGCC	Rh	[896-914] ORF
255	1524	UGCCUCAUCAGUAUUCAA	2103	UUGAAUACUGAUUGAGGCA		[1772-1790] 3'UTR
256	1525	GUUCUUCAAGCCACACUGA	2104	UCAGUGUGGCUUGAAGAAC	Rh,Rb,D	[841-859] ORF
257	1526	ACUCCAAGAUCAACUCCA	2105	UGGAAGUUGAUCUUGGAG U	Rh,D,Rt, M	[702-720] ORF
258	1527	GCUGUUCUACGCCGACCAA	2106	UUGGUCGGCGUAGAACAGC	Rh	[1369-1387] ORF
259	1528	UAGUCAACGCCAUGUUCUA	2107	UAGAACAUGGCGUUGACUA	Rh	[828-846] ORF
260	1529	CCGUGUGCCUGAGCGGACA	2108	UGUCCGCUCAGGCACACGG	Rh	[1625-1643] 3'UTR
261	1530	AGGCCUCUACAACUACUAA	2109	UUAGUAGUUGUAGAGGCCU	Rh,Rb,D, Rt,P	[949-967] ORF
262	1531	GCUUCAUGGUGACUCGGUA	2110	UACCGAGUCACCAUGAAGC	Rh	[897-915] ORF
263	1532	GGUCAAGAAGCAUCGUGUA	2111	UACACGAUGCUUCUUGACC	Rh	[2019-2037] 3'UTR
264	1533	CUGCGAGCACUCCAAGAU	2112	UAUCUUGGAGUGCUCGCAG	Rh,D	[694-712] ORF
265	1534	GUCCUAUACCGUGGGUGUA	2113	UACACCCACGGUAUAGGAC	Rh	[913-931] ORF
266	1535	GGCCUGACUGAGGCCAUUA	2114	UAAUGGCCUCAGUCAGGCC	Rh	[1202-1220] ORF
267	1536	CACUCCAAGAUCAACUUA	2115	UGAAGUUGAUCUUGGAGU G	Rh,D,Rt, M	[701-719] ORF
268	1537	GCGUCGCAGGCCAAGGCAA	2116	UUGCCUUGGCCUGCGACGC		[497-515] ORF
269	1538	AAGGGUGACAAGAUGCGAA	2117	UUCGCAUCUUGUCACCCUU	Rh,D	[1457-1475] ORF
270	1539	CAAGCUGUUCUACGCCGAA	2118	UUCGGCGUAGAACAGCUUG	Rh	[1366-1384] ORF
271	1540	CCUGCUAGUCAACGCCAUA	2119	UAUGGCGUUGACUAGCAGG	Rh	[823-841] ORF
272	1541	CCAAGGGUGUGGUGGAGGA	2120	UCCUCCACCACACCCUUGG	Rh,D	[1149-1167] ORF
273	1542	CACACAGGAUGGCAGGAGA	2121	UCUCCUGCCAUCCUGUGUG	Rh	[1499-1517] 3'UTR
274	1543	UCCUGAGACACAUGGGUGA	2122	UCACCCAUGUGUCUCAGGA	D,Rt,M	[1529-1547] 3'UTR
275	1544	CUACAACUACUACGACGAA	2123	UUCGUCGUAGUAGUUGUAG	Rb	[955-973] ORF
276	1545	GACAAGAUGCGAGACGAGA	2124	UCUCGUCUCGCAUCUUGUC	Rh,Rt	[1463-1481] ORF
277	1546	CCUGGAAGCUGGGCAGCCA	2125	UGGCUGCCCAGCUCCAGG		[609-627] ORF
278	1547	CUUCAAGCCACACUGGGAA	2126	UUCCCAGUGUGGCUUGAAG	Rh,Rb,D	[844-862] ORF
279	1548	GCGAGACGAGUUAUAGGGA	2127	UCCCUAUAACUCGUCUCGC	Rh	[1471-1489] ORF+3'UTR
280	1549	GAAGCUGGGCAGCCGACUA	2128	UAGUCGGCUGCCCAGCUUC		[613-631] ORF
281	1550	GUGCCUGAGCGGACCUUA	2129	UGAAGGUCCGCUCAGGCAC	Rh	[1629-1647] 3'UTR
282	1551	GGUGACCCAUGACCUGCAA	2130	UUGCAGGUCAUGGUCACC	Rh,Rt,M	[1165-1183]

						ORF
283	1552	AUGAGCCUUUGUUGCUAUA	2131	UAUAGCAACAAAGGCUCAU	Rh	[2114-2132] 3'UTR
284	1553	CAACUACUACGACGACGAA	2132	UUCGUCGUCGUAGUAGUUG	Rb	[958-976] ORF
285	1554	GCUGCGCUCACUCAGCAAA	2133	UUUGCUGAGUGAGCGCAGC	Rh	[571-589] ORF
286	1555	GAGAACAUCCUGGUGUCA	2134	UUGACACCAGGAUGUUCUC		[422-440] ORF
287	1556	CCCAAGCUGUUCUACGCCA	2135	UGGCGUAGAACAGCUUGGG	Rh	[1364-1382] ORF
288	1557	CAGCUCUAUCCCAACCUC	2136	UGAGGUUGGGAUAGAGCU G		[1886-1904] 3'UTR
289	1558	UGAGCUUCGCUGAUGACUA	2137	UAGUCAUCAGCGAAGCUC	Rh	[648-666] ORF
290	1559	CCCAAGGCGGCCACGCUUA	2138	UAAGCGUGGCCGCCUUGGG	Rh	[341-359] ORF
291	1560	CUAUACCGUGGGUGUCAUA	2139	UAUGACACCCACGGUAUAG	Rh	[916-934] ORF
292	1561	CAUUGACAAGAACAAGGCA	2140	UGCCUUGUUCUUGUCA AUG	Rh,D	[1216-1234] ORF
293	1562	GGACCCAGCUCAGUGAGCA	2141	UGCUCACUGAGCUGGGUCC		[635-653] ORF
294	1563	GACGACGAGAAGGAAAAGA	2142	UCUUUCCUUCUCGUCGUC	Rh	[968-986] ORF
295	1564	GCGGCAAGGCGACCACGGA	2143	UCCGUGGUCGCCUUGCCGC		[480-498] ORF
296	1565	GGGACACCCAAAGCGGCUA	2144	UAGCCGCUUUGGGUGUCCC		[1407-1425] ORF
297	1566	GGGAGGUGAGGUACCAGCA	2145	UGCUGGUACCUCACCUC		[1562-1580] 3'UTR
298	1567	GCAGCACUACAACUGCGAA	2146	UUCGCAGUUGUAGUGCUGC	Rh,D	[682-700] ORF
299	1568	GCGCAACGUGACCUGGAAA	2147	UUUCCAGGUCACGUUGCGC	M	[598-616] ORF
300	1569	GGGUCUGGCCUGACUGAGA	2148	UCUCAGUCAGGCCAGCCC		[1196-1214] ORF
301	1570	CCUGAGCGGACCUUCCCAA	2149	UUGGGAAGGUCCGCUCAGG	Rh	[1632-1650] 3'UTR
302	1571	GCAGCUGAAGAUCUGGAUA	2150	UAUCCAGAUCUUCAGCUGC	Rh,D	[1093-1111] ORF
303	1572	AGUGGAGAACAUCUGGUA	2151	UACCAGGAUGUUCUCCACU	Rh	[418-436] ORF
304	1573	GCAAGCAGCACUACAACUA	2152	UAGUUGUAGUGCUGCUUGC	Rh,D	[678-696] ORF
305	1574	AGCUCAGUGAGCUUCGCUA	2153	UAGCGAAGCUCACUGAGCU		[641-659] ORF
306	1575	CCGACUUGUCACGCAUGUA	2154	UACAUGCGUGACAAGUCGG	Rh	[1233-1251] ORF
307	1576	CCGAGGUCACCAAGGACGA	2155	UCGUCCUUGGUGACCUCGG	Rh,D	[786-804] ORF
308	1577	GGAGCCUCUCGAGCGCCUA	2156	UAGGCGCUCGAGAGGCUC		[1054-1072] ORF
309	1578	GGCCGCGCAGACCACCGAA	2157	UUCGGUGGUCUGCGCGCC		[757-775] ORF
310	1579	GGAAACUCCACAUCUGUA	2158	UACAGGAUGUGGAGUUUCC	Rh	[1703-1721] 3'UTR

311	1580	CAAAGCGGCUCCUGCUAA	2159	UUAGCAGGGAGCCGCUUUG		[1415-1433] ORF
312	1581	GCUCCUGAGACACAUGGGA	2160	UCCCAUGUGUCUCAGGAGC	D	[1527-1545] 3'UTR
313	1582	CCUGGGCCAUAAGUCAUUA	2161	UGAAUGACUAUGGCCCAGG		[1725-1743] 3'UTR
314	1583	CGUGGAGCCUCUCGAGCGA	2162	UCGCUCGAGAGGCCUCCAG		[1051-1069] ORF
315	1584	CCUCCUGCUUCUCAGCGCA	2163	UGCGCUGAGAAGCAGGAGG		[238-256] ORF
316	1585	AGUCCAGAUCAAGCCUGA	2164	UCAGGCUUGAUCUGGGACU	Rh	[1756-1774] 3'UTR
317	1586	UACCGUGGGUGUCAUGAUA	2165	UAUCAUGACACCCACGGUA	Rh	[919-937] ORF
318	1587	GCCAGCCCUCUUCUGACAA	2166	UUGUCAGAAGAGGGCUGGC		[1845-1863] 3'UTR
319	1588	CCGAGGUGAAGAAACCUGA	2167	UCAGGUUUCUUCACCUCGG	Rh,Rt	[285-303] ORF
320	1589	UCCUGGCACUGCGGAGAAA	2168	UUUCUCCGCAGUGCCAGGA		[316-334] ORF
321	1590	CCCGGAAACUCCACAUCCA	2169	UGGAUGUGGAGUUUCCGGG		[1700-1718] 3'UTR
322	1591	ACUCUGGUCAAGAAGCAUA	2170	UAUGCUCUUGACCAGAGU	Rh	[2014-2032] 3'UTR
323	1592	CCCAGAUACCAUGAUGCUA	2171	UAGCAUCAUGGUAUCUGGG	Rh	[1679-1697] 3'UTR
324	1593	CCUGAGACACAUGGGUGCA	2172	UGCACCAUGUGUCUCAGG	D,Rt,M	[1530-1548] 3'UTR
325	1594	GCACUACAACUGCGAGCAA	2173	UUGCUCGCAGUUGUAGUGC	Rh,D	[685-703] ORF
326	1595	CCACAAGAUGGUGGACAAA	2174	UUUGUCCACCAUCUUGUGG	Rh,Rb,M, P	[874-892] ORF
327	1596	GGACACAGAUGGCAACCCA	2175	UGGGUUGCCAUCUGUGUCC		[1306-1324] ORF
328	1597	GAAAAGCUGCUAACCAAAA	2176	UUUUGGUUAGCAGCUUUUC		[1073-1091] ORF
329	1598	ACUACAACUGCGAGCACUA	2177	UAGUGCUCGCAGUUGUAGU	Rh,D	[687-705] ORF
330	1599	GCACUCCAAGAUCAACUUA	2178	UAAGUUGAUCUUGGAGUGC	Rh,D	[700-718] ORF
331	1600	GCCUUGAAAAGCUGCUAAA	2179	UUUAGCAGCUUUUCAAGGC		[1068-1086] ORF
332	1601	GUGACUCGGUCCUAUACCA	2180	UGGUAUAGGACCGAGUCAC	Rh	[905-923] ORF
333	1602	GUGGUGGAGGUGACCCAUA	2181	UAUGGGUCACCUCACCAC	Rh,Rb,Rt, M	[1157-1175] ORF
334	1603	AUGCGAGACGAGUUAUAGA	2182	UCUAUAACUCGUCUCGCAU	Rh	[1469-1487] ORF+3'UTR
335	1604	ACCUUCCAGCUAGAAUUA	2183	UAAUUCUAGCUGGGAAGGU	Rh	[1641-1659] 3'UTR
336	1605	CCAGCUAGAAUUCACUCA	2184	UGAGUGAAUUCUAGCUGGG	Rh	[1646-1664] 3'UTR
337	1606	GGUCACCAAGGACGUGGAA	2185	UCCACGUCCUUGGUGACC	Rh,D	[790-808] ORF
338	1607	GGCCUCAGGGUGCACACAA	2186	UUGUGUGCACCCUGAGGCC		[1487-1505] 3'UTR
339	1608	UGAGGUACCAGCCUUGGAA	2187	UCCAAGGCUGGUACCUCA	Rh	[1568-1586]

						3'UTR
340	1609	CAUGGUGACUCGGUCCUAA	2188	UUAGGACCGAGUCACCAUG	Rh	[901-919] ORF
341	1610	GGUGAGGUACCAGCCUUGA	2189	UCAAGGCUGGUACCUCACC	Rh	[1566-1584] 3'UTR
342	1611	GCCGAGGUGAAGAAACCUA	2190	UAGGUUUCUUCACCUCGGC	Rh,Rt	[284-302] ORF
343	1612	GUACGGACCCAGCUCAGUA	2191	UACUGAGCUGGGUCCGUAC		[631-649] ORF
344	1613	CAAGAAGGACCUGUACCUA	2192	UAGGUACAGGUCCUUCUUG	Rh,D,M	[1255-1273] ORF
345	1614	GAGCACUCCAAGAUCAACA	2193	UGUUGAUCUUGGAGUGCUC	Rh,D	[698-716] ORF
346	1615	CAUGUUCUUAAGCCACAA	2194	UUGUGGCUUGAAGAACAUG	Rh,Rb,D	[838-856] ORF
347	1616	CCCUCCUGCUUCUCAGCGA	2195	UCGCUGAGAAGCAGGAGGG		[237-255] ORF
348	1617	AUGUCAGGCAAGAAGGACA	2196	UGUCCUUCUUGCCUGACAU	Rh,D	[1247-1265] ORF
349	1618	CAAGAUCAACUUCGCGAA	2197	UUCGCGGAAGUUGAUCUUG	D	[706-724] ORF
350	1619	GCGUGUUCACGCCACCGA	2198	UCGGUGGCGUGGAACACGC		[1278-1296] ORF
351	1620	CGGACCCAGCUCAGUGAGA	2199	UCUCACUGAGCUGGGUCCG		[634-652] ORF
352	1621	CCUUCAGCUUGUACCAGGA	2200	UCCUGGUACAAGCUGAAGG		[381-399] ORF
353	1622	GCUCUCCAGCCUCAUCAUA	2201	UAUGAUGAGGCUGGAGAGC	Rh,D,Rt, M,P	[1018-1036] ORF
354	1623	CCCUGGCCCACAAGCUCUA	2202	UAGAGCUUGUGGGCCAGGG	Rh,D,P	[1005-1023] ORF
355	1624	GCCCGAGGUCACCAAGGAA	2203	UCCUUGGUGACCUCGGGC	Rh,D	[784-802] ORF
356	1625	GUGGAGAACAUCUGGUGA	2204	UCACCAGGAUGUUCUCCAC	Rh	[419-437] ORF
357	1626	GCUCACUCAGCAACUCCAA	2205	UUGGAGUUGCUGAGUGAGC	Rh	[576-594] ORF
358	1627	ACGCAUGUUCUUAAGCA	2206	UGCUUGAAGAACAUGGCGU	Rh,Rb,P	[834-852] ORF
359	1628	ACACAUGGGUGCUAUUGGA	2207	UCCAAUAGCACCCAUGUGU	Rh	[1536-1554] 3'UTR
360	1629	CCAGCUCAGUGAGCUUCGA	2208	UCGAAGCUCACUGAGCUGG		[639-657] ORF
361	1630	CCCAGCUCAGUGAGCUUCA	2209	UGAAGCUCACUGAGCUGGG		[638-656] ORF
362	1631	GGGCGGCAAGGCGACCACA	2210	UGUGGUCGCCUUGCCGCC		[478-496] ORF
363	1632	CAGGGUGCACACAGGAUGA	2211	UCAUCCUGUGUGCACCCUG		[1492-1510] 3'UTR
364	1633	AGGUGAAGAAACCUGCAGA	2212	UCUGCAGGUUUCUUCACCU	Rh	[288-306] ORF
365	1634	CCUCUCCCAACUAUAAAAA	2213	UUUUUAUAGUUGGGAGAG G	Rh	[1900-1918] 3'UTR
366	1635	GACUGUACGGACCCAGCUA	2214	UAGCUGGGUCCGUACAGUC		[627-645] ORF
367	1636	GAAGGAGCUCCAGGAGGA	2215	UCCUCCUGGGAGCUCCUUC		[1983-2001] 3'UTR

368	1637	ACGCAUGUCAGGCAAGAAA	2216	UUUCUUGCCUGACAUGCGU	Rh,D	[1243-1261] ORF
369	1638	GACUCGGUCCUAUACCGUA	2217	UACGGUAUAGGACCGAGUC	Rh	[907-925] ORF
370	1639	CACUACAACUGCGAGCACA	2218	UGUGCUCGCAGUUGUAGUG	Rh,D	[686-704] ORF
371	1640	AGCUCCUGGCACUGCGGAA	2219	UUCCGCAGUGCCAGGAGCU		[313-331] ORF
372	1641	CUAAGGGUGACAAGAUGCA	2220	UGCAUCUUGUCACCCUAG	Rh	[1455-1473] ORF
373	1642	UGUGAGACCAAAUUGAGCA	2221	UGCUCAAUUGGUCUCACA	Rh	[1816-1834] 3'UTR
374	1643	GCCGACUUGUCACGCAUGA	2222	UCAUGCGUGACAAGUCGCG	Rh	[1232-1250] ORF
375	1644	CAGGAUUGCAGGAGGCAUA	2223	UAUGCCUCCUGCCAUCCUG		[1503-1521] 3'UTR
376	1645	ACAAGAACAAGGCCGACUA	2224	UAGUCGGCCUUGUUCUUGU	Rh	[1221-1239] ORF
377	1646	UGCGCUCCUCCUGCUUCA	2225	UGAAGCAGGAGGGAGCGCA		[231-249] ORF
378	1647	GGCGAGCUGCUGCGCUCAA	2226	UUGAGCGCAGCAGCUCGCC	Rh	[563-581] ORF
379	1648	GAUGCACCGGACAGGCCUA	2227	UAGGCCUGUCCGGUGCAUC	Rh,Rb,Rt, M,P	[937-955] ORF
380	1649	CGUGUCGCGGGCGGCAA	2228	UUUGCCGCCAGCGACACG		[469-487] ORF
381	1650	AUCCCAACCUCUCCCAACA	2229	UGUUGGGAGAGGUUGGGA U	Rh	[1893-1911] 3'UTR
382	1651	UGUUCUACGCCGACCACCA	2230	UGGUGGUCGGCGUAGAACA	Rh	[1371-1389] ORF
383	1652	CGGCCUGGCCUUCAGCUUA	2231	UAAGCUGAAGGCCAGGCCG		[373-391] ORF
384	1653	GUCGCAGGCCAAGGCAGUA	2232	UACUGCCUUGGCCUGCGAC		[499-517] ORF
385	1654	AGUCAUUCUGCCUGCCCUA	2233	UAGGGCAGGCAGAAUGACU		[1735-1753] 3'UTR
386	1655	CCCAGAAUGACCUGGCCGA	2234	UCGCCAGGUCAUUCUGGG		[1949-1967] 3'UTR
387	1656	ACAAGAUGGUGGACAACCA	2235	UGGUUGUCCACCAUCUUGU	Rh,Rb,M, P	[876-894] ORF
388	1657	GCUAGUCAACGCCAUGUUA	2236	UAACAUGGCGUUGACUAGC	Rh	[826-844] ORF
389	1658	ACGCCACCGCCUUGAGUA	2237	UACUCAAGGCGGUGGCGU	Rh	[1287-1305] ORF
390	1659	GCCGCGCAGACCACCGACA	2238	UGUCGGUGGUCUGCGCGGC		[758-776] ORF
391	1660	GCUAUUCAUUGGGCGCCUA	2239	UAGGCGCCCAAUGAAUAGC	D	[1429-1447] ORF
392	1661	CUCAGUGAGCUUCGCUGAA	2240	UUCAGCGAAGCUCACUGAG		[643-661] ORF
393	1662	GGAGGUGAGGUACCAGCCA	2241	UGGCUGGUACCUCACCUCC		[1563-1581] 3'UTR
394	1663	GCCAAGGCAGUGCUGAGCA	2242	UGCUCAGCACUGCCUUGGC	Rh	[506-524] ORF
395	1664	CUCUCCAGCCUCAUCAUCA	2243	UGAUGAUGAGGCUGGAGA G	Rh,D,Rt, M,P	[1019-1037] ORF
396	1665	GAAUGACCUGGCCGAGUA	2244	UACUCGGCCAGGUCAUUC		[1953-1971]

						3'UTR
397	1666	UGGUGACUCGGUCCUAUAA	2245	UUAUAGGACCGAGUCACCA	Rh	[903-921] ORF
398	1667	CAGGUACCUUCUCACCUGA	2246	UCAGGUGAGAAGGUACCUG	Rh	[1800-1818] 3'UTR
399	1668	GUUCCACGCCACCGCCUUA	2247	UAAGGCGGUGGCGUGGAAC	D	[1282-1300] ORF
400	1669	CCGACUGUACGGACCCAGA	2248	UCUGGGUCCGUACAGUCGG		[625-643] ORF
401	1670	GCAGACCACCGACGGCAAA	2249	UUUGCCGUCGGUGGUCUGC	D,Rt	[763-781] ORF
402	1671	AAGAUGCAGACGAGUUA	2250	UUAACUCGUCUCGCAUCU	Rh	[1466-1484] ORF
403	1672	CAAAGAGCAGCUGAAGUA	2251	UAUCUUCAGCUGCUCUUUG	Rh	[1087-1105] ORF
404	1673	ACGACGAGAAGGAAAAGCA	2252	UGCUUUCCUUCUCGUCGU	Rh	[969-987] ORF
405	1674	CACUCCACUUGGACAUGGA	2253	UCCAUGUCCAAGUGGAGUG	Rh	[1659-1677] 3'UTR
406	1675	AGUCCAUCAACGAGUGGGA	2254	UCCCACUCGUUGAUGGACU	Rh,Rt,M	[741-759] ORF
407	1676	GCGCCGGCCUGGCCUCAA	2255	UUGAAGGCCAGGCCGGCGC	Rh	[369-387] ORF
408	1677	GGAAAAGCUGCAAUUCGUA	2256	UACGAUUUGCAGCUUUUCC	Rh	[979-997] ORF
409	1678	ACAUUUUGUUGGAGCGUGA	2257	UCACGCUCCAACAAAUGU		[2184-2202] 3'UTR
410	1679	ACCGUGGCUUCAUGGUGAA	2258	UUCACCAUGAAGCCACGGU	Rh,Rt,M	[891-909] ORF
411	1680	CCCUUCAUCUCCUAGUGA	2259	UCACUAGGAAGAUGAAGGG		[1388-1406] ORF
412	1681	GAAAUUCCACCACAAGUA	2260	UAUCUUGUGGUGGAAUUUC	Rh	[865-883] ORF
413	1682	CUAUA AAAACUAGGUGCUGA	2261	UCAGCACCUAGUUUUUAUAG	Rh	[1910-1928] 3'UTR
414	1683	GGAGGUGCACGCCGCCUA	2262	UAGGCCGGCGUGCACCUC		[544-562] ORF
415	1684	GCAGGCCAAGGCAGUGCUA	2263	UAGCACUGCCUUGGCCUGC		[502-520] ORF
416	1685	UGAGACCAAAUUGAGCUAA	2264	UUAGCUCAAUUUGGUCUCA	Rh	[1818-1836] 3'UTR
417	1686	GCCAUAGUCAUUCUGCCUA	2265	UAGGCAGAAUGACUAUGGC		[1730-1748] 3'UTR
418	1687	AGCUGAAGAUCUGGAUGGA	2266	UCCAUCCAGAUCUUCAGCU	Rh,D	[1095-1113] ORF
419	1688	CCAUCUCCUUGCCCAAGGA	2267	UCCUUGGGCAAGGAGAUGG	Rh	[1137-1155] ORF
420	1689	CCCAGAUCAAGCCUGCCUA	2268	UAGGCAGGCUUGAUCUGGG	Rh	[1759-1777] 3'UTR
421	1690	GCUGUUGCCAUCUCCUUGA	2269	UCAAGGAGAUGGCAACAGC		[1130-1148] ORF
422	1691	CGAGGUCACCAAGGACGUA	2270	UACGUCCUUGGUGACCUCG	Rh,D	[787-805] ORF
423	1692	CAACUAUAAAACUAGGUGA	2271	UCACCUAGUUUUUAUAGUUG	Rh	[1907-1925] 3'UTR
424	1693	GAAGGCUGUUGCCAUCUCA	2272	UGAGAUGGCAACAGCCUUC	Rt	[1126-1144] ORF

425	1694	UGCGGAGAAGUUGAGCCCA	2273	UGGGCUCAACUUCUCCGCA		[325-343] ORF
426	1695	CUCCUUGCCCAAGGGUGUA	2274	UACACCCUUGGGCAAGGAG	Rh	[1141-1159] ORF
427	1696	GCCCUGAAAGUCCCAGAU	2275	UAUCUGGGACUUUCAGGGC		[1748-1766] 3'UTR
428	1697	CAAGGGUGUGGUGGAGGUA	2276	UACCUCCACCACCCUUG	Rh,D	[1150-1168] ORF
429	1698	AAGAGCAGCUGAAGAUCUA	2277	UAGAUCUUCAGCUGCUCUU	Rh	[1089-1107] ORF
430	1699	GAAGAUGCAGAAGAAGGCA	2278	UGCCUUCUUCUGCAUCUUC	Rh,Rb,Rt	[1114-1132] ORF
431	1700	CGGAAACUCCACAUCUGA	2279	UCAGGAUGUGGAGUUCCG		[1702-1720] 3'UTR
432	1701	AGUCAACGCCAUGUUCUUA	2280	UAAGAACAUGGCGUUGACU	Rh	[829-847] ORF
433	1702	CGAGCGCCUUGAAAAGCUA	2281	UAGCUUUUCAAGGCGCUCG		[1063-1081] ORF
434	1703	AUACCGUGGGUGUCAUGAA	2282	UUAUGACACCCACGGUAU	Rh	[918-936] ORF
435	1704	GACCUGGGCCAUAGUCAUA	2283	UAUGACUAUGGCCCAGGUC		[1723-1741] 3'UTR
436	1705	CAUGUCAGGCAAGAAGGAA	2284	UUCUUCUUGCCUGACAUG	Rh,D	[1246-1264] ORF
437	1706	UGCGAGACGAGUUUAUAGGA	2285	UCCUAUAACUCGUCUCGCA	Rh	[1470-1488] ORF+3'UTR
438	1707	CGCAACGUGACCUGGAAGA	2286	UCUCCAGGUCACGUUGCG		[599-617] ORF
439	1708	AGCAAGCAGCACUACAACA	2287	UGUUGUAGUGCUGCUUGCU	Rh,D	[677-695] ORF
440	1709	GCUGCUGCGCUCACUCAGA	2288	UCUGAGUGAGCGCAGCAGC	Rh	[568-586] ORF
441	1710	UGAUGAUGCACCGGACAGA	2289	UCUGUCCGGUGCAUCAUCA	Rh	[933-951] ORF
442	1711	UUUGUUCUAUCAAUCCAAA	2290	UUUGGAUUGAUAGCAACAA	Rh	[2122-2140] 3'UTR
443	1712	CCUUGAAAAGCUGCUAACA	2291	UGUUAGCAGCUUUUCAAGG		[1069-1087] ORF
444	1713	CCCUUUGACCAGGACAUCA	2292	UGAUGUCCUGGUCAAAGGG	Rh,Rt	[1322-1340] ORF
445	1714	GAGGUGAAGAAACUGCAA	2293	UUGCAGGUUUCUUCACCUC	Rh	[287-305] ORF
446	1715	CCAAGGGUGUGGUGGAGA	2294	UCUCCACCACCCUUGGG	Rh,D	[1148-1166] ORF
447	1716	CCUGCUAUUCAUUGGGCA	2295	UGCCCAAUGAAUAGCAGGG	D	[1425-1443] ORF
448	1717	CUGAAAGUCCCAGAUCAAA	2296	UUUGAUCUGGGACUUUCAG		[1751-1769] 3'UTR
449	1718	GCUGCAAAUCGUGGAGAU	2297	UAUCUCCACGAUUUGCAGC	Rh	[985-1003] ORF
450	1719	CAAGCCUGCCUCAUCAGA	2298	UCUGAUUGAGGCAGGCUUG	Rh	[1766-1784] 3'UTR
451	1720	CGAGCAGCUGCGCGACGAA	2299	UUCGUCGCGCAGCUGCUCG		[526-544] ORF
452	1721	AGGCCGACUUGUCACGCAA	2300	UUGCGUGACAAGUCGGCCU	Rh	[1230-1248] ORF
453	1722	GCAGCAGCUCCUGGCACUA	2301	UAGUGCCAGGAGCUGCUGC		[308-326]

						ORF
454	1723	GGCCAUAGUCAUUCUGCCA	2302	UGGCAGAAUGACUAUGGCC		[1729-1747] 3'UTR
455	1724	CCCGUGUGCCUGAGCGGAA	2303	UCCCGCUCAGGCACACGGG	Rh	[1624-1642] 3'UTR
456	1725	CAGCUGAAGAUCUGGAUGA	2304	UCAUCCAGAUCUUCAGCUG	Rh,D	[1094-1112] ORF
457	1726	CAAGCCACACUGGGAUGAA	2305	UUCAUCCCAGUGUGGCUUG	Rh,Rb	[847-865] ORF
458	1727	GAAUUCACUCCACUUGGAA	2306	UCCAAGUGGAGUGAAUUC	Rh	[1654-1672] 3'UTR
459	1728	CGGCGCCUGCUAGUCAAA	2307	UUUGACUAGCAGGGCGCCG	Rh	[817-835] ORF
460	1729	UGGAAGCUGGGCAGCCGAA	2308	UUCGGCUGCCAGCUUCCA		[611-629] ORF
461	1730	GGCAAGGCGACCACGGCGA	2309	UCGCCGUGGUCGCCUUGCC	Rh	[482-500] ORF
462	1731	CACUGCGGAGAAGUUGAGA	2310	UCUCAACUUCUCCGCAGUG		[322-340] ORF
463	1732	GGCAGGAGGCAUCCAAAGA	2311	UCUUUGGAUGCCUCCUGCC		[1509-1527] 3'UTR
464	1733	GGUGACUCGGUCCUAUACA	2312	UGUAUAGGACCGAGUCACC	Rh	[904-922] ORF
465	1734	UUUAUAGCCAGGUACCUUA	2313	UAAGGUACCUGGCUAUAAA	Rh	[1792-1810] 3'UTR
466	1735	GGCCAUGGCCAAGGACCAA	2314	UUGGUCCUUGGCCAUGGCC	Rh,D	[397-415] ORF
467	1736	CAAAGAUAGGGAGGGAAGA	2315	UCUCCCCUCCUAUCUUUG		[2089-2107] 3'UTR
468	1737	UCUUCUGACACUAAAACAA	2316	UUGUUUUAGUGUCAGAAG A		[1853-1871] 3'UTR
469	1738	CUUCUGACACUAAAACACA	2317	UGUGUUUUAGUGUCAGAA G		[1854-1872] 3'UTR
470	1739	UCACGUGGAGCCUCUCGAA	2318	UUCGAGAGGCCUCCACGUGA		[1048-1066] ORF
471	1740	CAGUCCAUCAACGAGUGGA	2319	UCCACUCGUUGAUGGACUG	Rh,Rt,M	[740-758] ORF
472	1741	AGACCAAAUUGAGCUAGGA	2320	UCCUAGCUCAAUUUGGUCU		[1820-1838] 3'UTR
473	1742	GGGUUCCCGUGUGCCUGAA	2321	UUCAGGCACACGGGAACCC	Rh	[1619-1637] 3'UTR
474	1743	UUGCUAUCAAUCCAAGAAA	2322	UUUCUUGGAUUGAUAGCAA	Rh	[2125-2143] 3'UTR
475	1744	CAACCGUGGCUUCAUGGUA	2323	UACCAUGAAGCCACGGUUG	Rh,Rt,M	[889-907] ORF
476	1745	CUGUACGGACCCAGCUCAA	2324	UUGAGCUGGGUCCGUACAG		[629-647] ORF
477	1746	CAGCAGCAAGCAGCACUAA	2325	UUAGUGCUGCUUGCUGCUG	Rh,D	[673-691] ORF
478	1747	CCUGCAGCCGAGCAGCUA	2326	UAGCUGCUGCGGCUGCAGG		[299-317] ORF
479	1748	GACACUAAAACACCUCAGA	2327	UCUGAGGUGUUUUAGUGUC		[1859-1877] 3'UTR
480	1749	CAACUGCGAGCACUCCAAA	2328	UUUGGAGUGCUCGCAGUUG	Rh,D	[691-709] ORF
481	1750	ACUGCGGAGAAGUUGAGCA	2329	UGCUCAACUUCUCCGCAGU		[323-341] ORF

482	1751	GCGCCCUAGCUAGUCAACGA	2330	UCGUUGACUAGCAGGGCGC	Rh	[819-837] ORF
483	1752	GGAAGCUGGGCAGCCGACA	2331	UGUCGGCUGCCCAGCUUCC		[612-630] ORF
484	1753	AGGCUCCUGAGACACAUGA	2332	UCAUGUGUCUCAGGAGCCU	D	[1525-1543] 3'UTR
485	1754	CGACAAGCGCAGCGCGCUA	2333	UAGCGCGCUGCGCUUGUCG		[721-739] ORF
486	1755	UCAGUGAGCUUCGCUGAUA	2334	UAUCAGCGAAGCUCACUGA		[644-662] ORF
487	1756	UUGAGAAGGAGCUCCCAGA	2335	UCUGGGAGCUCCUUCUCA		[1979-1997] 3'UTR
488	1757	ACUGCGAGCACUCCAAGAA	2336	UUCUUGGAGUGCUCGCAGU	Rh,D	[693-711] ORF
489	1758	CAUCCUGGUGUCACCCGUA	2337	UACGGGUGACACCAGGAUG		[427-445] ORF
490	1759	GUGCGCAGCAGCAAGCAGA	2338	UCUGCUUGCUGCUGCGCAC	Rh,D	[668-686] ORF
491	1760	CACGCCACCGCCUUUGAGA	2339	UCUCAAGGCGGUGGCGUG	Rh	[1286-1304] ORF
492	1761	UCUCGAGCGCCUUGAAAA	2340	UUUUUCAAGGCGCUCGAGA		[1060-1078] ORF
493	1762	GCUUCGCUGAUGACUUCGA	2341	UCGAAGUCAUCAGCGAAGC	Rh	[651-669] ORF
494	1763	UCUCCUUGCCCAAGGGUGA	2342	UCACCCUUGGGCAAGGAGA	Rh	[1140-1158] ORF
495	1764	GCAGUCCAUCAACGAGUGA	2343	UCACUCGUUGAUGGACUGC	Rh,Rt,M	[739-757] ORF
496	1765	AGAUGGUGGACAACCGUGA	2344	UCACGGUUGUCCACCAUCU	Rh,M	[879-897] ORF
497	1766	CGGCUCCUGCUAUUCAUA	2345	UAUGAAUAGCAGGGAGCCG		[1420-1438] ORF
498	1767	AUACCAUGAUGCUGAGCCA	2346	UGGCUCAGCAUCAUGGUAU		[1684-1702] 3'UTR
499	1768	AGCCAGGUACCUUCUCACA	2347	UGUGAGAAGGUACCUUGGCU	Rh	[1797-1815] 3'UTR
500	1769	GAGCCCGGAAACUCCACAA	2348	UUGUGGAGUUUCCGGGCUC		[1697-1715] 3'UTR
501	1770	GCAGCUCCUGGCACUGCGA	2349	UCGCAGUGCCAGGAGCUGC		[311-329] ORF
502	1771	CCCGAGGUCACCAAGGACA	2350	UGUCCUUGGUGACCUCGGG	Rh,D	[785-803] ORF
503	1772	CCUGACUGAGGCCAUUGAA	2351	UUCAAUGGCCUCAGUCAGG	Rh	[1204-1222] ORF
504	1773	UGCUGAGCCCGGAAACUCA	2352	UGAGUUUCCGGGCUCAGCA		[1693-1711] 3'UTR
505	1774	GCCAUCUCCUUGCCCAAGA	2353	UCUUGGGCAAGGAGAUGGC	Rh	[1136-1154] ORF
506	1775	CAAGCAGCACUACAACUGA	2354	UCAGUUGUAGUGCUGCUUG	Rh,D	[679-697] ORF
507	1776	CAAGGCAGUGCUGAGCGCA	2355	UGCGCUCAGCACUGCCUUG	Rh	[508-526] ORF
508	1777	CAAUGACAUUUUGUUGGAA	2356	UCCAACAAAUGUCAUUG		[2179-2197] 3'UTR
509	1778	AGUGAGCUUCGCUGAUGAA	2357	UUCAUCAGCGAAGCUCACU		[646-664] ORF
510	1779	AUGAUGAUGCACCGGACAA	2358	UUGUCCGGUGCAUCAUCAU	Rh	[932-950]

						ORF
511	1780	GAAACACCUGGCUGGGCUA	2359	UAGCCCAGCCAGGUGUUUC	D	[1183-1201] ORF
512	1781	CCUGCUAUUCAUUGGGCGA	2360	UCGCCCAAUGAAUAGCAGG	D	[1426-1444] ORF
513	1782	CGCCACCGCCUUUGAGUUA	2361	UAACUCAAAGGCGGUGGGCG	Rh	[1288-1306] ORF
514	1783	GCUUCUCAGCGCCUUCUGA	2362	UCAGAAGGCGCUGAGAAGC		[244-262] ORF
515	1784	UGAUGCUGAGCCCGAAAA	2363	UUUUCGGGCUCAGCAUCA		[1690-1708] 3'UTR
516	1785	UGACCUGGCCGCAGUGAGA	2364	UCUCACUGCGGCCAGGUCA		[1956-1974] 3'UTR
517	1786	UGCAGAAACACCUGGCUGA	2365	UCAGCCAGGUGUUUCUGCA		[1179-1197] ORF
518	1787	GCAGUGCUGAGCGCCGAGA	2366	UCUCGGCGCUCAGCACUGC		[512-530] ORF
519	1788	CGGCGCGCAACGUGACCUA	2367	UAGGUCACGUUGCGCGCCG		[594-612] ORF
520	1789	AGUGCUGAGCGCCGAGCAA	2368	UUGCUCGGCGCUCAGCACU		[514-532] ORF
521	1790	ACAGGCCUCUACAACUACA	2369	UGUAGUUGUAGAGGCCUGU	Rh,Rb,D, Rt,P	[947-965] ORF
522	1791	GCAGCUGCGCGACGAGGAA	2370	UUCUCGUCGCGCAGCUGC	Rh,D	[529-547] ORF
523	1792	AUUGAGAAGGAGCUCCCAA	2371	UUGGGAGCUCCUUCUCAAU		[1978-1996] 3'UTR
524	1793	CGCGCAGACCACCGACGGA	2372	UCCGUCGGUGUCUGCGCG		[760-778] ORF
525	1794	CCUGUACCUGGCCAGCGUA	2373	UACGCUGGCCAGGUACAGG	Rh	[1264-1282] ORF
526	1795	CUGAGCGGACCUUCCAGA	2374	UCUGGGAAGGUCCGCUCAG	Rh	[1633-1651] 3'UTR
527	1796	GGCCUUCAGCUUGUACCAA	2375	UUGGUACAAGCUGAAGGCC		[379-397] ORF
528	1797	CACCCAAAGCGGCUCCCUA	2376	UAGGGAGCCGCUUUGGGUG		[1411-1429] ORF
529	1798	GCCAAGGACCAGGCAGUGA	2377	UCACUGCCUGGUCCUUGGC	Rh	[404-422] ORF
530	1799	CUCAGGGUGCACACAGGAA	2378	UUCUGUGUGCACCCUGAG		[1490-1508] 3'UTR
531	1800	CGAGCUGCUGCGCUCACUA	2379	UAGUGAGCGCAGCAGCUCG	Rh	[565-583] ORF
532	1801	GGCUGGGCCUGACUGAGGA	2380	UCCUCAGUCAGGCCAGCC		[1197-1215] ORF
533	1802	CCGCAGCAGCUCCUGGCAA	2381	UUGCCAGGAGCUGCUGCGG		[306-324] ORF
534	1803	UGUGGGACCUGGGCCAUA	2382	UUAUGGCCAGGUCCCACA		[1718-1736] 3'UTR
535	1804	AAGAUGCAGAAGAAGGCUA	2383	UAGCCUUCUUCUGCAUCUU	Rh,Rt,M	[1115-1133] ORF
536	1805	CCACGGCGCGCAACGUGAA	2384	UUCACGUUGCGCGCCGUGG	Rh	[591-609] ORF
537	1806	ACCUUCUCACCUGUGAGAA	2385	UUCUCACAGGUGAGAAGGU	Rh	[1805-1823] 3'UTR
538	1807	UGAAGAAACCUGCAGCCGA	2386	UCGGCUGCAGGUUCUUCA		[291-309] ORF

539	1808	CAGCACUACAACUGCGAGA	2387	UCUCGCAGUUGUAGUGCUG	Rh,D	[683-701] ORF
540	1809	GCGACAAGCGCAGCGCGCA	2388	UGCGCGCUGCGCUUGUCGC		[720-738] ORF
541	1810	UAGAAUUCACUCCACUUGA	2389	UCAAGUGGAGUGAAUUCUA	Rh	[1652-1670] 3'UTR
542	1811	GUGGAAAAACAGACCGGGA	2390	UCCCGGUCUGUUUUUCCAC		[1603-1621] 3'UTR
543	1812	ACGUGGAGCCUCUCGAGCA	2391	UGCUCGAGAGGCUCCACGU		[1050-1068] ORF
544	1813	GGCGCGCAACGUGACCUGA	2392	UCAGGUCACGUUGCGCGCC		[595-613] ORF
545	1814	UGGACAACCGUGGCUUCAA	2393	UUGAAGCCACGGUUGUCCA	Rh,M	[885-903] ORF
546	1815	CUAGUCAACGCCAUGUUCA	2394	UGAACAUUGGCGUUGACUAG	Rh	[827-845] ORF
547	1816	AGAAUGACCUGGCCGCGAGA	2395	UCUGCGGCCAGGUCAUUCU		[1952-1970] 3'UTR
548	1817	AGCUGCUGCGCUCACUCAA	2396	UUGAGUGAGCGCAGCAGCU	Rh	[567-585] ORF
549	1818	CUCUAUCCCAACCUCUCCA	2397	UGGAGAGGUUGGGAUAGA G	Rh	[1889-1907] 3'UTR
550	1819	GCGAGCUGCUGCGCUCACA	2398	UGUGAGCGCAGCAGCUCGC	Rh	[564-582] ORF
551	1820	CGCAGCAGCAAGCAGCACA	2399	UGUGCUGCUUGCUCUGCG	Rh,D	[671-689] ORF
552	1821	GGCUGGGCUGGGCCUGACA	2400	UGUCAGGCCAGCCAGCC		[1192-1210] ORF
553	1822	UCUCCAGCCUCAUCAUCCA	2401	UGGAUGAUGAGGCUGGAG A	Rh,D,Rt, M	[1020-1038] ORF
554	1823	CAACGCCAUGUUCUCAA	2402	UUUGAAGAACAUGGCGUUG	Rh,Rb,P	[832-850] ORF
555	1824	UGGCACUGCGGAGAAGUUA	2403	UAACUUCUCCGCAGUGCCA		[319-337] ORF
556	1825	UUUGAGUUGGACACAGAUA	2404	UAUCUGUGUCCAACUCAAA		[1298-1316] ORF
557	1826	UGGGCGAGCUGCUGCGCUA	2405	UAGCGCAGCAGCUCGCCA	Rh	[561-579] ORF
558	1827	CUGCUAACCAAAGAGCAGA	2406	UCUGCUCUUUGGUUAGCAG		[1079-1097] ORF
559	1828	AACGUGACCUGGAAGCUGA	2407	UCAGCUUCCAGGUCACGUU		[602-620] ORF
560	1829	AUGACAUUUUGUUGGAGCA	2408	UGCUGCAACAAAUGUCAU		[2181-2199] 3'UTR
561	1830	CAGGAGGCAUCCAAAGGCA	2409	UGCCUUUGGAUGCCUCCUG		[1511-1529] 3'UTR
562	1831	AUCUCCUUGCCCAAGGGUA	2410	UACCCUUGGGCAAGGAGAU	Rh	[1139-1157] ORF
563	1832	UGGGAUGAGAAAUCCACA	2411	UGUGGAAUUUCUCAUCCA	Rh	[857-875] ORF
564	1833	AAAGCUGCUAACCAAAGAA	2412	UUCUUUGGUUAGCAGCUU		[1075-1093] ORF
565	1834	AGGAGGCAUCCAAAGGCUA	2413	UAGCCUUUGGAUGCCUCCU		[1512-1530] 3'UTR
566	1835	CACCGCCUUUGAGUUGGAA	2414	UCCAACUCAAAAGCGGUG	Rh	[1291-1309] ORF
567	1836	CCAACUAUAAAACUAGGUA	2415	UACCUAGUUUUAUAGUUGG	Rh	[1906-1924]

						3'UTR
568	1837	CAAGAAGCAUCGUGUCUGA	2416	UCAGACACGAUGCUUCUUG	Rh	[2022-2040] 3'UTR
569	1838	AGCAGCUGAAGAUCUGGAA	2417	UCCAGAUUCUUCAGCUGCU	Rh,D	[1092-1110] ORF
570	1839	GCGCUCCCUCCUGCUUCUA	2418	UAGAAGCAGGAGGGAGCGC		[232-250] ORF
571	1840	UGCUGUCAACGCCAUGUA	2419	UACAUGGCGUUGACUAGCA	Rh	[825-843] ORF
572	1841	CGCCGAGCAGCUGCGGAA	2420	UUCGCGCAGCUGCUCGGCG		[523-541] ORF
573	1842	CCGCGCAGACCACCGACGA	2421	UCGUCGGUGGUCUGCGCGG		[759-777] ORF
574	1843	UAGCCAGGUACCUUCUCAA	2422	UUGAGAAGGUACCUGGCUA	Rh	[1796-1814] 3'UTR
575	1844	UGCUCUCAGCGCCUUCUA	2423	UAGAAGGCGCUGAGAAGCA		[243-261] ORF
576	1845	CUCCUCCUGCUUCUCAGA	2424	UCUGAGAAGCAGGAGGGAG		[235-253] ORF
577	1846	CGCAGGCCAAGGCAGUGCA	2425	UGCACUGCCUUGGCCUUGCG		[501-519] ORF
578	1847	GCAAGGCGACCACGGCGUA	2426	UACGCGUGGUCGCCUUGC	Rh	[483-501] ORF
579	1848	GCAGCCGCAGCAGCUCCUA	2427	UAGGAGCUGCUGCGGCUGC		[302-320] ORF

TABLA E: ARNip de 18+1 meros interespecies de SERPINH1

N.º	SEQ ID NO	ARNip sentido	SEQ ID NO	ARNip antisentido	Otras especies	humano-32454740 ORF:230-1486
1	2428	UCACCAAGGACGUGGAGCA	2576	UGCUCACGUCCUUGGUGA	Rh,D	[792-810] ORF
2	2429	CAGCGCGCUGCAGUCCAUA	2577	UAUGGACUGCAGCGCGCUG	Rh,Rt	[730-748] ORF
3	2430	CAUCUACGGGCGCGAGGAA	2578	UUCCUCGCGCCCGUAGAUG	D,M	[1336-1354] ORF
4	2431	CUCCAGCCUCAUCAUCCUA	2579	UAGGAUGAUGAGGCUGGAG	Rh,D,Rt,M	[1021-1039] ORF
5	2432	GACAUCUACGGGCGCGAGA	2580	UCUCGCGCCCGUAGAUGUC	D,M	[1334-1352] ORF
6	2433	CGUGCGCAGCAGCAAGCAA	2581	UUGCUUGCUGCUGCGCACG	Rh,D,M	[667-685] ORF
7	2434	GUCACCAAGGACGUGGAGA	2582	UCUCCACGUCCUUGGUGAC	Rh,D	[791-809] ORF
8	2435	CCGCGACAAGCGCAGCGCA	2583	UGCGCUGCGCUUGUCGCGG	D	[718-736] ORF
9	2436	GCGCAGCGCGCUGCAGUCA	2584	UGACUGCAGCGCGCUGCGC	Rh,Rt	[727-745] ORF
10	2437	GGCCACAAGCUCUCCAGA	2585	UCUGGAGAGCUUGUGGGCC	Rh,D,P	[1009-1027] ORF
11	2438	CAAGGACGUGGAGCGCACA	2586	UGUGCGCUCCACGUCCUUG	Rh,D	[796-814] ORF
12	2439	AGCCUCAUCAUCCUCAUGA	2587	UCAUGAGGAUGAUGAGGCU	Rh,D,Rt,M	[1025-1043] ORF
13	2440	GGUGUGGUGGAGGUGACCA	2588	UGGUCACCUCCACCACA	Rh,D	[1154-1172]

				CC		ORF
14	2441	GCAAGCUGCCCGAGGUCAA	2589	UUGACCUCGGGCAGCUU GC	Rh,D	[777-795] ORF
15	2442	GUGGAGGUGACCCAUGACA	2590	UGUCAUGGGUCACCUCC AC	Rh,Rt,M	[1160-1178] ORF
16	2443	CACAAGAUGGUGGACAACA	2591	UGUUGUCCACCAUCUUG UG	Rh,Rb,M,P	[875-893] ORF
17	2444	GCGAGGAGCUGCGCAGCCA	2592	UGGCUGCGCAGCUCCUC GC	D,M	[1347-1365] ORF
18	2445	UACUACGACGACGAGAAGA	2593	UCUUCUCGUCGUCGUAG UA	Rb	[962-980] ORF
19	2446	GAGGUGACCCAUGACCUGA	2594	UCAGGUCAUGGGUCACC UC	Rh,Rt,M	[1163-1181] ORF
20	2447	ACUUCCGCGACAAGCGCAA	2595	UUGCUCUUGUCGCGGAA GU	D	[714-732] ORF
21	2448	GCCCACAAGCUCUCCAGCA	2596	UGCUGGAGAGCUUGUGG GC	Rh,D,P	[1010-1028] ORF
22	2449	GCGCAGCAGCAAGCAGCAA	2597	UUGCUCUUGCUCGUCG GC	Rh,D	[670-688] ORF
23	2450	CGAGGAGCUGCGCAGCCCA	2598	UGGGCUGCGCAGCUCCU CG	D,M	[1348-1366] ORF
24	2451	AACGCCAUGUUCUUAAGA	2599	UCUUGAAGAACAUGGCG UU	Rh,Rb,P	[833-851] ORF
25	2452	GUCAGGCAAGAAGGACCUA	2600	UAGGUCCUUCUUGCCUG AC	Rh,D	[1249-1267] ORF
26	2453	GCCUGGGCGAGCUCUGCA	2601	UGCAGCAGCUCGCCCAG GC	Rh,D	[558-576] ORF
27	2454	GAUGAUGCACCGGACAGGA	2602	UCCUGUCCGGUGCAUCA UC	Rh,Rb,Rt,M	[934-952] ORF
28	2455	GGACCUGUACCUGGCCAGA	2603	UCUGGCCAGGUACAGGU CC	Rh,D	[1261-1279] ORF
29	2456	GCGACGAGGAGGUGCACGA	2604	UCGUGCACCUCUCGUC GC	D	[537-555] ORF
30	2457	UGUGGUGGAGGUGACCCAA	2605	UUGGGUCACCUCACCA CA	Rh,D	[1156-1174] ORF
31	2458	UUCAAGCCACACUGGGAUA	2606	UAUCCAGUGUGGCUUG AA	Rh,Rb	[845-863] ORF
32	2459	CAAGAUGGUGGACAACCGA	2607	UCGGUUGUCCACCAUCU UG	Rh,Rb,M,P	[877-895] ORF
33	2460	UCAACUUCGCGACAAGCA	2608	UGCUCUGUCGCGGAAGUU GA	D	[711-729] ORF
34	2461	AUUCAUUGGGCGCCUGGUA	2609	UACCAGGCGCCCAAUGA AU	D	[1432-1450] ORF
35	2462	CUCCAAGAUCAACUCCGA	2610	UCGGAAGUUGAUCUUGG AG	Rh,D,Rt,M	[703-721] ORF
36	2463	CAGGCCAUGGCCAAGGACA	2611	UGUCCUUGGCCAUGGCC UG	Rh,D	[395-413] ORF
37	2464	GUACCAGGCCAUGGCCAAA	2612	UUUGGCCAUGGCCUGGU AC	Rh,D	[391-409] ORF
38	2465	UGUCAGGCAAGAAGGACCA	2613	UGGUCCUUCUUGCCUGA CA	Rh,D	[1248-1266] ORF
39	2466	CUUCGUGCGCAGCAGCAAA	2614	UUJGCUGCUGCGCACGA AG	Rh,D,M	[664-682] ORF
40	2467	CAACUUCGCGACAAGCGA	2615	UCGCUUGUCGCGGAAGU UG	D	[712-730] ORF
41	2468	CCACCACAAGAUGGUGGAA	2616	UUCCACCAUCUUGUGGU GG	Rh,Rb,D,P	[871-889] ORF

42	2469	GCGCGACGAGGAGGUGCAA	2617	UUGCACCUCUCGUCGC GC	Rh,D	[535-553] ORF
43	2470	CUACAACUGCGAGCACUCA	2618	UGAGUGCUCGCAGUUGU AG	Rh,D	[688-706] ORF
44	2471	UGGAGGUGACCCAUGACCA	2619	UGGUCAUGGGUCACCUC CA	Rh,Rt,M	[1161-1179] ORF
45	2472	GAGGUCACCAAGGACGUGA	2620	UCACGUCCUUGGUGACC UC	Rh,D	[788-806] ORF
46	2473	AAGAAGGACCUGUACCUGA	2621	UCAGGUACAGGUCCUUC UU	Rh,D	[1256-1274] ORF
47	2474	GACAACCGUGGCUUCAUGA	2622	UCAUGAAGCCACGGUUG UC	Rh,Rt,M	[887-905] ORF
48	2475	ACCAGGACAUCUACGGGCA	2623	UGCCCGUAGAUGUCCUG GU	D,Rt	[1329-1347] ORF
49	2476	GCUGCCCGAGGUCACAAA	2624	UUUGGUGACCUCGGGCA GC	Rh,D	[781-799] ORF
50	2477	AUGCAGAAGAAGGCUGUUA	2625	UAACAGCCUUCUUCUGC AU	Rt	[1118-1136] ORF
51	2478	GGCCUGGGCGAGCUGCUGA	2626	UCAGCAGCUCGCCCAGG CC	Rh,D	[557-575] ORF
52	2479	GAUGGUGGACAACCGUGGA	2627	UCCACGGUUGUCCACCA UC	Rh,M	[880-898] ORF
53	2480	CUCCUGCUAUUCAUUGGA	2628	UCCAAUGAAUAGCAGGG AG	D	[1423-1441] ORF
54	2481	GAAGGACCUGUACCUGGCA	2629	UGCCAGGUACAGGUCCU UC	Rh,D	[1258-1276] ORF
55	2482	CCACCGACGGCAAGCUGCA	2630	UGCAGCUUGCCGUCGGU GG	D,Rt	[768-786] ORF
56	2483	UGCUAUUCAUUGGGCGCCA	2631	UGGCGCCCAAUGAAUAG CA	D	[1428-1446] ORF
57	2484	AUGUUCUUCAAGCCACACA	2632	UGUGUGGCUUGAAGAAC AU	Rh,Rb,D	[839-857] ORF
58	2485	CCAGGACAUCUACGGGCGA	2633	UCGCCCCUAGAUGUCCU GG	D,Rt	[1330-1348] ORF
59	2486	GCGCGAGGAGCUGCGCAGA	2634	UCUGCGCAGCUCCUCGC GC	Rh,D,M	[1345-1363] ORF
60	2487	GAGCAGCUGCGCGACGAGA	2635	UCUCGUCGCGCAGCUGC UC	Rh,D	[527-545] ORF
61	2488	CUAUUCAUUGGGCGCCUGA	2636	UCAGGCGCCCAAUGAAU AG	D	[1430-1448] ORF
62	2489	ACAAGCUCUCCAGCCUCAA	2637	UUGAGGCUGGAGAGCUU GU	Rh,D,M,P	[1014-1032] ORF
63	2490	GCUGAAGAUCUGGAUGGGA	2638	UCCCAUCCAGAUCUUCA GC	Rh,D	[1096-1114] ORF
64	2491	GACCAGGACAUCUACGGGA	2639	UCCCGUAGAUGUCCUGG UC	D,Rt	[1328-1346] ORF
65	2492	CAAGCGCAGCGCGUGCAA	2640	UUGCAGCGCGCUGCGCU UG	Rh,Rt	[724-742] ORF
66	2493	CCAUGGCCAAGGACCAGGA	2641	UCCUGGUCCUUGGCCAU GG	Rh,D	[399-417] ORF
67	2494	CACCAAGGACGUGGAGCGA	2642	UCGCUCCACGUCCUUGG UG	Rh,D	[793-811] ORF
68	2495	CCGUGGCUUCAUGGUGACA	2643	UGUCACCAUGAAGCCAC GG	Rh,Rt,M	[892-910] ORF
69	2496	UGACCAGGACAUCUACGGA	2644	UCCGUAGAUGUCCUGGU CA	Rt	[1327-1345] ORF
70	2497	AGACCACCGACGGCAAGCA	2645	UGCUUGCCGUCGGUGGU	D,Rt	[765-783]

				CU		ORF
71	2498	GACAAGCGCAGCGCGCUGA	2646	UCAGCGCGCUGCGCUUG UC	Rh,Rt	[722-740] ORF
72	2499	AGAAACACCUGGCUGGGCA	2647	UGCCCAGCCAGGUGUUU CU	D	[1182-1200] ORF
73	2500	AAGAUGGUGGACAACCGUA	2648	UACGGUUGUCCACCAUC UU	Rh,M	[878-896] ORF
74	2501	CAGACCACCGACGGCAAGA	2649	UCUUGCCGUCGGUGGUC UG	D,Rt	[764-782] ORF
75	2502	AGGACCUGUACCUGGCCAA	2650	UUGGCCAGGUACAGGUC CU	Rh,D	[1260-1278] ORF
76	2503	CUGCUAUUCAUUGGGCGCA	2651	UGC GCCAAUGAAUAGC AG	D	[1427-1445] ORF
77	2504	GUCCAUCAACGAGUGGGCA	2652	UGCCCACUCGUUGAUGG AC	Rh,Rt,M	[742-760] ORF
78	2505	CCAGGCCAUGGCCAAGGAA	2653	UUCUUGGCCAUGGCCU GG	Rh,D	[394-412] ORF
79	2506	AAGCAGCACUACAACUGCA	2654	UGCAGUUGUAGUGCUGC UU	Rh,D	[680-698] ORF
80	2507	UGUUCCACGCCACCGCCUA	2655	UAGGCGGUGGCGUGGAA CA	D	[1281-1299] ORF
81	2508	UACAACUACUACGACGACA	2656	UGUCGUCGUAGUAGUUG UA	Rb	[956-974] ORF
82	2509	CCUCAUCAUCCUCAUGCCA	2657	UGGCAUGAGGAUGAUGA GG	Rh,D,Rt,M	[1027-1045] ORF
83	2510	UGGUGGACAACCGUGGCUA	2658	UAGCCACGGUUGUCCAC CA	Rh,M	[882-900] ORF
84	2511	GACCACCGACGGCAAGCUA	2659	UAGCUUGCCGUCGGUGG UC	D,Rt	[766-784] ORF
85	2512	AGCUGCGCGACGAGGAGGA	2660	UCCUCCUCGUCGCGCAG CU	Rh,D	[531-549] ORF
86	2513	CGGCAAGCUGCCCGAGGUA	2661	UACCUCCGGCAGCUUGC CG	Rh,D	[775-793] ORF
87	2514	UGGCCACAAGCUCUCCAA	2662	UUGGAGAGCUUGUGGGC CA	Rh,D,P	[1008-1026] ORF
88	2515	CAGCUGCGCGACGAGGAGA	2663	UCUCCUCGUCGCGCAGC UG	Rh,D	[530-548] ORF
89	2516	CUUCCGCGACAAGCGCAGA	2664	UCUGCGCUUGUCGCGGA AG	D	[715-733] ORF
90	2517	UGGGCCUGACUGAGGCCAA	2665	UUGGCCUCAGUCAGGCC CA	Rt	[1200-1218] ORF
91	2518	GCUGCGCGACGAGGAGGUA	2666	UACCUCCUCGUCGCGCA GC	Rh,D	[532-550] ORF
92	2519	CAGGACAUCUACGGGCGCA	2667	UGC GCCGUAGAUGUCC UG	D	[1331-1349] ORF
93	2520	GCCAUGGCCAAGGACCAGA	2668	UCUGGUCCUUGGCCAUG GC	Rh,D	[398-416] ORF
94	2521	UCCAAGAUCAACUCCGCA	2669	UGC GGAAGUUGAUCUUG GA	D	[704-722] ORF
95	2522	ACCACCGACGGCAAGCUGA	2670	UCAGCUUGCCGUCGGUG GU	D,Rt	[767-785] ORF
96	2523	AUCUACGGGCGGAGGAGA	2671	UCUCCUCGCGCCGUAG AU	D,M	[1337-1355] ORF
97	2524	CUGCCCGAGGUCACCAAGA	2672	UCUUGGUGACCUCGGGC AG	Rh,D	[782-800] ORF
98	2525	AUCAACUCCGCGACAAGA	2673	UCUUGUCGCGGAAGUUG AU	D	[710-728] ORF

99	2526	UCAUUGGGCGCCUGGUCCA	2674	UGGACCAGGCGCCCAAU GA	Rh,D	[1434-1452] ORF
100	2527	CAUUGGGCGCCUGGUCCGA	2675	UCGGACCAGGCGCCCAA UG	Rh,D	[1435-1453] ORF
101	2528	GUGUUCCACGCCACCGCCA	2676	UGGCGGUGGCGUGGAAC AC	D	[1280-1298] ORF
102	2529	AUGAUGCACCGGACAGGCA	2677	UGCCUGUCCGGUGCAUC AU	Rh,Rb,Rt,M ,P	[935-953] ORF
103	2530	CGACGAGGAGGUGCAGCA	2678	UGCUGACCCUCCUCGU CG	D	[538-556] ORF
104	2531	CAGAAACACCUGGCUGGGA	2679	UCCCAGCCAGGUGUUUC UG	D	[1181-1199] ORF
105	2532	UGAUGCACCGGACAGGCCA	2680	UGGCCUGUCCGGUGCAU CA	Rh,Rb,Rt,M ,P	[936-954] ORF
106	2533	AAGGCUGUUGCCAUCUCCA	2681	UGGAGAUGGCAACAGCC UU	D,Rt	[1127-1145] ORF
107	2534	AUGACUUCGUGCGCAGCAA	2682	UUGCUGCGCACGAAGUC AU	Rh,Rt,M	[660-678] ORF
108	2535	UCAGGCAAGAAGGACCUGA	2683	UCAGGUCCUUCUUGCCU GA	Rh,D	[1250-1268] ORF
109	2536	CUCAUCAUCCUCAUGCCCA	2684	UGGGCAUGAGGAUGAUG AG	Rh,Rt,M	[1028-1046] ORF
110	2537	CGCGACGAGGAGGUGCACA	2685	UGUGACCCUCCUCGUCG CG	Rh,D	[536-554] ORF
111	2538	ACAACCGUGGCUUCAUGGA	2686	UCCAUGAAGCCACGGUU GU	Rh,Rt,M	[888-906] ORF
112	2539	UUGACCAGGACAUCUACGA	2687	UCGUAGAUGUCCUGGUC AA	Rt	[1326-1344] ORF
113	2540	CAAGCUGCCCGAGGUCACA	2688	UGUGACCUCGGGCAGCU UG	Rh,D	[778-796] ORF
114	2541	UCCCUGCUAUUCAUUGGGA	2689	UCCCAAUGAAUAGCAGG GA	D	[1424-1442] ORF
115	2542	UAUUCAUUGGGCGCCUGGA	2690	UCCAGGCGCCCAAUGAA UA	D	[1431-1449] ORF
116	2543	CUGCGCGACGAGGAGGUGA	2691	UCACCUCCUCGUCGCGC AG	Rh,D	[533-551] ORF
117	2544	CUACGGGCGCGAGGAGCUA	2692	UAGCUCCUCGCGCCCGU AG	D,M	[1339-1357] ORF
118	2545	CGCGAGGAGCUGCGCAGCA	2693	UGCUGCGCAGCUCCUCG CG	D,M	[1346-1364] ORF
119	2546	ACACCUGGCUGGGCUGGGA	2694	UCCCAGCCCAGCCAGGU GU	D	[1186-1204] ORF
120	2547	UCUACGGGCGCGAGGAGCA	2695	UGCUCUCCUCGCGCCCGUA GA	D,M	[1338-1356] ORF
121	2548	UUCUUCAAGCCACACUGGA	2696	UCCAGUGUGGCUUGAAG AA	Rh,Rb,D	[842-860] ORF
122	2549	CCUGGGCGAGCUGCUGCGA	2697	UCGCAGCAGCUCGCCCA GG	Rh,D	[559-577] ORF
123	2550	AAGAAGGCUGUUGCCAUCA	2698	UGAUGGCAACAGCCUUC UU	Rt	[1124-1142] ORF
124	2551	CGACGGCAAGCUGCCCGAA	2699	UUCGGGCAGCUUGCCGU CG	D	[772-790] ORF
125	2552	GACGGCAAGCUGCCCGAGA	2700	UCUCGGGCAGCUUGCCG UC	Rh,D	[773-791] ORF
126	2553	UUCAUUGGGCGCCUGGUCA	2701	UGACCAGGCGCCCAAUG AA	Rh,D	[1433-1451] ORF
127	2554	AAGCGCAGCGCGCUGCAGA	2702	UCUGCAGCGCGCUGCGC	Rh,Rt	[725-743]

				UU		ORF
128	2555	CCUGGCCCAACAAGCUCUCA	2703	UGAGAGCUUGUGGGCCA GG	Rh,D,P	[1006-1024] ORF
129	2556	ACGGCAAGCUGCCCGAGGA	2704	UCCUCGGGCAGCUUGCC GU	Rh,D	[774-792] ORF
130	2557	UUUGACCAGGACAUCUACA	2705	UGUAGAUGUCCUGGUCA AA	Rt	[1325-1343] ORF
131	2558	UGACUUCGUGCGCAGCAGA	2706	UCUGCUGCGCACGAAGU CA	Rh,Rt,M	[661-679] ORF
132	2559	AAGGACGUGGAGCGCACGA	2707	UCGUGCGCUCCACGUCC UU	Rh,D	[797-815] ORF
133	2560	UCCAUCAACGAGUGGGCCA	2708	UGGCCACUCGUUGAUG GA	Rt,M	[743-761] ORF
134	2561	CACCGACGGCAAGCUGCCA	2709	UGGCAGCUUGCCGUCGG UG	D,Rt	[769-787] ORF
135	2562	ACGGGCGCGAGGAGCUGCA	2710	UGCAGCUCCUCGCGCCC GU	D,M	[1341-1359] ORF
136	2563	UCCGCGACAAGCGCAGCGA	2711	UCGCUGCGCUUGUCGCG GA	D	[717-735] ORF
137	2564	UUGGGCGCCUGGUCCGGCA	2712	UGCCGGACCAGGCGCCC AA	Rh,D	[1437-1455] ORF
138	2565	AUGGUGGACAACCGUGGCA	2713	UGCCACGGUUGUCCACC AU	Rh,M	[881-899] ORF
139	2566	AUUGGGCGCCUGGUCCGGA	2714	UCCGGACCAGGCGCCA AU	Rh,D	[1436-1454] ORF
140	2567	UACGGGCGCGAGGAGCUGA	2715	UCAGCUCCUCGCGCCCG UA	D,M	[1340-1358] ORF
141	2568	AUGCACCGACAGGCCUCA	2716	UGAGGCCUGUCCGGUGC AU	Rh,Rb,Rt,P	[938-956] ORF
142	2569	UCCACCACAAGAUGGUGA	2717	UCACCAUCUUGUGGUGG AA	Rh,Rb,D,P	[869-887] ORF
143	2570	UCCGCGACAAGCGCAGCA	2718	UGCUGCGCUUGUCGCGG AA	D	[716-734] ORF
144	2571	UACCAGGCCAUGGCCAAGA	2719	UCUUGGCCAUGGCCUGG UA	Rh,D	[392-410] ORF
145	2572	AAACACCUGGCUGGGCUGA	2720	UCAGCCCAGCCAGGUGU UU	D	[1184-1202] ORF
146	2573	ACCGACGGCAAGCUGCCCA	2721	UGGGCAGCUUGCCGUCG GU	D	[770-788] ORF
147	2574	AACACCUGGCUGGGCUGGA	2722	UCCAGCCCAGCCAGGUG UU	D	[1185-1203] ORF
148	2575	UUCGUGCGCAGCAGCAAGA	2723	UCUUGCUGCUGCGCACG AA	Rh,D,M	[665-683] ORF

Se seleccionaron las secuencias más activas de ensayos adicionales. De la tabla 4 se seleccionaron los compuestos de ARNip SERPINH1\_2, SERPINH1\_6, SERPINH1\_13, SERPINH1\_45, SERPINH1\_45a, SERPINH1\_51, SERPINH1\_51a, SERPINH1\_52 y SERPINH1\_86 como compuestos preferidos (tablas 6-A y B).

TABLA 6-A: ARNip seleccionados

ARNip	SEQ ID SEN	SEQ ID AS	Actividad 0,1 nM	Actividad 0,5 nM	Actividad 5 nM	CI50 (nM)	Longitud
SERPINH1_2	60	127	65	48	7	0,008	19
SERPINH1_6	63	130	164	39	5	0,019	19
SERPINH1_11	68	135	119	54	6	0,05	19
SERPINH1_13	69	136	91	24	4		19
SERPINH1_45	97	164	156	38	8	0,07	19
SERPINH1_45a	98	165		(1)			19
SERPINH1_51	101	168	68	39	5	0,05	19
SERPINH1_52	102	169	149	37	9	0,06	19
SERPINH1_86	123	190	121	61		0,27	19

TABLA 6B

ARNip	SEQ ID SEN	SEQ ID AS	Actividad 0,026 nM	Actividad 0,077 nM	Actividad 0,23 nM	Actividad 0,69 nM	(2) Actividad 2,1 nM	Actividad 6,25 M	Actividad 25 nM
SERPINH1_45	97	164	102	81	55	41	28	22	16
SERPINH1_45a	98	165	107	(3) 98	84	69	36	24	16

- 5 A partir de la tabla 5 se seleccionaron los compuestos de ARNip SERPINH1\_4, SERPINH1\_12, SERPINH1\_18, SERPINH1\_30, SERPINH1\_58 y SERPINH1\_88 como compuestos preferidos (tabla 7).

TABLA 7: ARNip seleccionados

ARNip	SEQ ID NO SEN	SEQ ID NO AS	Actividad 0,1 nM	Actividad 0,5 nM	Actividad 5 nM	CI50 (nM)	Longitud
SERPINH1_4	195	220	60	35	5	0,006	19
SERPINH1_12	196	221	54	42	8	0,065	19
SERPINH1_18	197	222	139	43	9		19
SERPINH1_30	199	224	146	49	9	0,093	19
SERPINH1_58	208	233	na	na	8		19
SERPINH1_88	217	242	105	43	9		19

10

#### EJEMPLO 21: Sistemas de modelos de animal de estados fibróticos

Pueden realizarse pruebas de los ARNip activos de la descripción en modelos de animales predictivos. Los modelos de envejecimiento y de diabetes de ratas de fibrosis renal incluyen ratas obesas diabéticas de Zucker (ZDF), ratas fa/fa envejecidas (obesas de Zucker), ratas Sprague-Dawley envejecidas (SD), y ratas Goto Kakizaki (GK); las ratas GK son una raza consanguínea derivada de ratas Wistar, seleccionadas para el desarrollo espontáneo de NIDDM (diabetes tipo II). Los modelos inducidos de fibrosis renal incluyen el modelo de obstrucción de uréter unilateral permanente (UUO) que es un modelo de fibrosis intersticial aguda que se produce en animales no diabéticos sanos; se desarrolla fibrosis renal en el plazo de unos días tras la obstrucción. Otro modelo inducido de fibrosis renal es la nefrectomía de 5/6.

15

20

Dos modelos de fibrosis hepática en ratas son la ligadura de conductos biliares (BDL) con operación simulada como controles, y el envenenamiento con CC14, con animales alimentados con aceite de oliva como controles, tal como se describe en las siguientes referencias: Lotersztajn S, *et al.* Hepatic Fibrosis: Molecular Mechanisms and Drug Targets. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2004 Oct 07; Uchio K, *et al.*, Down-regulation of connective tissue growth factor and type I collagen mRNA expression by connective tissue growth factor antisense oligonucleotide during experimental liver fibrosis. *Wound Repair Regen.* enero-febrero de 2004; 12(1):60-6; Xu XQ, *et al.*, Molecular classification of liver cirrhosis in a rat model by proteomics and bioinformatics *Proteomics.* oct. de 2004; 4(10):3235-45.

25

30

Los modelos para cicatrización ocular se conocen bien en la técnica, por ejemplo, Sherwood MB *et al.*, *J Glaucoma.* oct. de 2004; 13(5):407-12. A new model of glaucoma filtering surgery in the rat; Miller MH *et al.*, *Ophthalmic Surg.* mayo de 1989; 20(5):350-7. Wound healing in an animal model of glaucoma fistulizing surgery in the Rb; vanBoclocmeer FM *et al.*, *Retina.* 1985 Fall-Winter; 5(4): 239-52. Models for assessing scar tissue inhibitors; Wiedemann P *et al.*, *J Pharmacol Methods.* ago. de 1984; 12(1): 69-78. Proliferative vitreoretinopathy: the Rb cell injection model for screening of antiproliferative drugs.

35

40

Se describen modelos de cataratas en las siguientes publicaciones: Zhou *et al.*, 2002. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 43:2293-300; Wang *et al.* 2004 *Curr Eye Res.* 29:51-58.

Se someten a prueba los compuestos de la tabla 5 y la tabla 4 en estos modelos de estados fibróticos, en los que se encuentra que son eficaces en el tratamiento de fibrosis hepática y otros estados fibróticos.

#### Sistemas de modelo de glaucoma

45

Se realizan pruebas de los ARNip activos de la descripción para tratar o prevenir el glaucoma en un modelo de animal de rata para aplastamiento del nervio óptico descrito, por ejemplo, en: Maeda *et al.*, 2004 *Investigative Ophthalmology and visual Science (IOVS)*, 45:851. Específicamente, para la transección del nervio óptico se expone el nervio óptico orbital (ON) de ratas anestesiadas mediante un enfoque supraorbital, se extirpan las meninges y se someten a transección todos los axones en el ON mediante aplastamiento con pinzas durante 10 segundos, a 2 mm desde la lámina cribosa.

50

Se someten a prueba moléculas de ácido nucleico tal como se divulgan en el presente documento en este modelo de animal y los resultados muestran que estos compuestos de ARNip son útiles en el tratamiento y/o la prevención de glaucoma.

5 Modelo de aplastamiento del nervio óptico (ONC) en ratas: suministro de ARNip por vía intravítrea y suministro mediante colirio

10 Para la transección del nervio óptico se expone el nervio óptico orbital (ON) de ratas anestesiadas mediante un enfoque supraorbital, se extirpan las meninges y se someten a transección todos los axones en el ON mediante aplastamiento con pinzas durante 10 segundos, a 2 mm de la lámina cribosa.

15 Se suministran los compuestos de ARNip solos o en combinación en un volumen de 5 ul (10 ug/ul) como colirio. Inmediatamente tras el aplastamiento del nervio óptico (ONC), se administran 20 ug/10 ul de ARNip de prueba o 10 ul de PBS a uno o ambos ojos de ratas Wistar adultas y se determinan los niveles de ARNip captado en las retinas completas disecadas y sometidas a congelación instantánea a las 5 h y 1 d, y después a los 2 d, 4 d, 7 d, 14 d y 21 d tras la inyección. Se realizan experimentos similares con el fin de someter a prueba la actividad y eficacia de ARNip administrado mediante colirio.

20 Sistemas de modelo de lesión isquémica por reperfusión tras trasplante de pulmón en ratas

25 Se logra lesión pulmonar por isquemia/reperfusión en un modelo de animal de rata tal como se describe en Mizobuchi, *et al.*, 2004 J Heart Lung Transplantation, 23 y en Kazuhiro *et al.*, 2001 Am. J. Respir. Cell Mol Biol, 25:26-34.

30 Específicamente, tras inducir anestesia con isoflurano, se canula la tráquea con un catéter de Teflon de calibre 14 y se somete la rata a ventilación mecánica con un ventilador para roedores usando oxígeno al 100 %, a una velocidad de 70 respiraciones por minuto y 2 cm de H<sub>2</sub>O de presión de final de la respiración positiva. Se ocluyen la arteria pulmonar izquierda, las venas y el bronquio principal con una pinza de Castaneda. Durante la operación, se mantiene el pulmón húmedo con solución salina y se cubre la incisión para minimizar las pérdidas por evaporación. El periodo de isquemia tiene una duración de 60 minutos. Al final del periodo isquémico se retira la pinza y se permite que se ventile el pulmón y se somete a reperfusión durante otras 4 h, 24 h y 5 d tras la inducción de isquemia pulmonar. Al final del experimento, se extirpan cuidadosamente los pulmones y o bien se congelan para la extracción de ARN o bien se fijan en una mezcla de glutaraldehído para su posterior análisis histológico.

35 El modelo de animal de bleomicina como modelo para fibrosis pulmonar idiopática (IPF)

40 Se realizan pruebas de viabilidad del suministro al pulmón y al hígado de ARNip formulado con vitamina A-Coatsome administrado mediante inyección intravenosa y administración intratraqueal de complejo de ARNip-vitamina A-Coatsome a ratones sanos y ratones tratados con bleomicina.

45 Objetivo: Someter a prueba dos vías de administración para determinar la viabilidad del suministro de ARNip formulado con vitamina A-Coatsome a pulmones de ratón normales y fibróticos. Las principales hipótesis que van a someterse a prueba en el actual estudio son si la administración sistémica de ARNip modificado formulado con vitamina A-Coatsome proporciona una captación eficaz y distribución específica de células en los pulmones de ratón fibróticos y normales. La vía intratraqueal de ARNip modificado formulado con vitamina A-Coatsome se someterá a prueba en paralelo. Se realizará la detección de ARNip y la distribución específica de células en los pulmones y el hígado mediante hibridación *in situ* (ISH).

50 El modelo de bleomicina de fibrosis pulmonar se ha desarrollado y caracterizado bien a lo largo de las últimas tres décadas (Moeller, *et al.* 2008 Int J Biochem Cell Biol, 40:362-82; Chua *et al.*, 2005 Am J Respir Cell Mol Biol 33:9-13). Los rasgos característicos histológicos, tales como brotes intraalveolares, incorporación mural de colágeno y obliteración del espacio alveolar están presentes en animales tratados con BLM de manera similar a pacientes con IPF. Estudios iniciales demostraron que los ratones C57/B1 eran sistemáticamente propensos a fibrosis de pulmón inducida por BLM, mientras que los ratones Balb/C eran inherentemente resistentes. Dependiendo de la vía de administración, se desarrollan diferentes patrones fibróticos. La instilación intratraqueal de BLM da como resultado una fibrosis acentuada broncocéntrica, mientras que la administración intravenosa o intraperitoneal induce cicatrización subpleural similar a la enfermedad en humanos (Chua *et al.* *ibid.*). Se usa un modelo de ratón de neumonía intersticial habitual (UIP). Este modelo muestra una distribución heterogénea de fibroproliferación, distribuida de manera subpleural, formando lesiones similares a las observadas en los pulmones de pacientes con fibrosis pulmonar idiopática (IPF) (Onuma, *et al.*, 2001 J Exp Med 194:147-56, y Yamaguchi *et al.*, 1988 Nature 336:244-46). La UIP se inducirá mediante inyección intraperitoneal de bleomicina cada dos días durante 7 días para una composición constante de fibroproliferación subpleural en el pulmón de ratón (Swiderski *et al.* 1998 Am J Pathol 152: 821-28, y Shimizukawa *et al.*, 2003 Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 284: L526-32).

65 Los liposomas cargados con vitamina A que contienen ARNip interaccionan con la proteína de unión a retinol (RBP)

y proporcionan un suministro eficaz a las HSC a través del receptor de RBP. Estos liposomas se captan eficazmente mediante miofibroblastos activados que expresan receptor de RBP en los pulmones de ratones tratados con bleomicina.

5 Diseño del estudio

Ratones - C57 B1 macho

10 N inicial (BLM i.p.) - 40 (para el primer grupo piloto, 34 para el estudio, teniendo en cuenta una mortalidad prevista del 25 %)

N inicial (total) - 60

15

ARNip de prueba: compuestos de SERPINHI divulgados en el presente documento.

TABLA 8: Grupos:

N.º	Dosis de BLM, mg/kg de PC, en 0,1 ml de solución salina	Vía de admin. de BLM	Régimen de BLM	Dosis de ARNip, mg/kg de PC	Vía de admin. de ARNip	Régimen de ARNip	Terminación tras la última admin. de ARNip	N (antes de la administración de ARNip)
1	0,75	i.p.	días 0, 2, 4, 6	4,5	i.v.	2 al día	2 h	4
2	0,75	i.p.	días 0, 2, 4, 6	4,5	i.v.	2 al día	24 h	4
3	0,75	i.p.	días 0, 2, 4, 6	2,25	i.t.	2 al día	2 h	4
4	0,75	i.p.	días 0, 2, 4, 6	2,25	i.t.	2 al día	24 h	4
5		intacto	n/a	4,5	i.v.	2 al día	2 h	4
6		intacto	n/a	4,5	i.v.	2 al día	24 h	4
7		intacto	n/a	2,25	i.t.	2 al día	2 h	4
8		intacto	n/a	2,25	i.t.	2 al día	24 h	4
9	0,75	i.p.	días 0, 2, 4, 6	n/a	i.v. vehículo	2 al día	2 h	3
10	0,75	i.p.	días 0, 2, 4, 6	n/a	i.t. vehículo	2 al día	24 h	3
11		Intacto	n/a	n/a	intacto	n/a	cualquier momento	3

20 Fibrosis pulmonar inducida por bleomicina. Se inducirá fibrosis pulmonar de ratones C57BL/6 hembra de 12 semanas de edad mediante instilación intraperitoneal de clorato de bleomicina: 0,75 mg/kg de peso corporal disuelto en 0,1 ml de solución salina cada dos días durante 7 días, en los días 0, 2, 4 y 6.

25 Evaluación piloto del establecimiento de fibrosis. Se someten los ratones (N=30) a tratamiento con BLM en grupos, para permitir un intervalo de tiempo de una semana entre el primer grupo tratado (N=5) y el resto de los animales. En el día 14, se sacrifican dos ratones del primer grupo y se extirpan los pulmones para la tinción con HE rápida y evaluación histopatológica rápida de la fibrosis. Cuando se confirma la fibrosis de pulmón, se clasifican las ratas restantes en los grupos y se tratan con ARNip en el día 14 tras el primer tratamiento con BLM. En caso de que no se desarrolle fibrosis suficiente en los pulmones en el día 14, se sacrifican los ratones restantes del primer grupo tratado en el día 21, seguido por evaluación histopatológica rápida de la fibrosis. Se trata el resto de los animales con complejo de ARNip de prueba comenzando a partir del día 21 tras el tratamiento con BLM.

35 Administración de ARNip. En el día 14 o el día 21 tras la primera administración de BLM (a determinar durante el estudio, basándose en la evaluación piloto del establecimiento de fibrosis), se clasifican los animales en grupos, según el PC. A los animales de los grupos 1 y 2 se les administra por vía intravenosa (inyección en la vena de la cola) complejo de ARNip/vitA/Coatsome, a una concentración de ARNip de 4,5 mg/kg de PC. Se tratan los animales intactos de la misma edad (grupos 5 y 6) de la misma manera. Se usarán animales tratados con BLM (grupo 9) como control de vehículo de vitA-Coatsome. A las 24 horas, se repite la inyección a todos los animales, como anteriormente.

40 Los animales con BLM de los grupos 3 y 4, y los ratones intactos de los grupos 7 y 8, se anestesian con isoflurano

y se someten a instilación intratraqueal de ARNip 2,25 mg/kg de PC formulado en liposomas cargados con vitA. A los ratones del grupo 10 con BLM se les administra únicamente vehículo de vitA/Coatsome. Se repite la instilación intratraqueal tras 24 horas.

- 5 *Terminación del estudio.* Se sacrifican los animales de los grupos 1, 3, 5, 7, 9 a las 2 horas tras la segunda inyección o instilación de complejo de ARNip. Se sacrifica los animales de los grupos 2, 4, 6, 8, 10 a las 24 horas tras la segunda inyección o instilación de complejo de ARNip.

10 Tras el sacrificio de los animales, se someten los ratones a perfusión por vía transcardiaca con formalina tamponada neutra al 10 %. Se inflan los pulmones con 0,8-1,0 ml de NBF al 10 %, y se ligan las tráqueas. Se extirpan los pulmones y se fijan durante 24 h en NBF al 10 %. Se extirpa el hígado de cada animal y se fija en NBF al 10 % durante 24 h.

15 *Seccionamiento y evaluación.* Se preparan secciones consiguientes a partir de los pulmones y los hígados. Se tiñe la primera sección consiguiente con hematoxilina y eosina para la evaluación de la morfología del pulmón y el hígado, se tiñe la segunda sección con rojo sirio (tricromo) para identificar colágeno. Se somete la tercera sección consiguiente a hibridación *in situ* (ISH) para la detección de ARNip.

20 EJEMPLO 22: Actividad anti-fibrosis pulmonar *in vivo* de liposoma unido a VA que contiene ARNip

(1) Inducción de fibrosis pulmonar y administración de fármaco

25 A ratas S-D macho (8 ratas/grupo, 8 semanas de edad, Charles River Laboratories Japan, Inc.) se les administraron una vez 0,45 mg de bleomicina (BLM) disueltos en 0,1 ml de solución salina en el pulmón mediante canulación intratraqueal (MicroSprayer, Penn-Century, Inc.) con anestesia, para producir un modelo de fibrosis pulmonar por bleomicina. Con este método, se produce una fibrosis significativa en el pulmón generalmente tras aproximadamente 2 semanas. Se administró la formulación de liposoma (1,5 mg/kg como cantidad de ARNip, 1 ml/kg de volumen, es decir, 200  $\mu$ l para una rata de 200 g) o PBS (1 ml/kg de volumen) a las ratas a través de la vena de la cola, comenzando a partir de las 2 semanas tras la administración de bleomicina, durante un total de diez veces (cada dos días). Se sacrificaron las ratas a los dos días tras el último tratamiento, se realizó investigación histológica del tejido pulmonar (véase la figura 30). Se usó ANOVA de un factor y la prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni para la evaluación de la diferencia estadísticamente significativa.

35 La composición del liposoma fue HEDC/S-104/DOPE/colesterol/PEG-DMPE/diVA-PEG-diVA (20:20:30:25:5:2 % molar). Los detalles de ARNip fueron los siguientes:

Cadena S: 5'-idAB-rG-rA-rG-rA-rC-rA-rC-rA-rU-rG-rG-rG-rU-rG-25rC-25rU-25rA-  
25rU-25rA-C3-P-3'

Cadena AS: 5'-mU-rA-mU-rA-mG-rC-25rA-rC-mC-rC-mA-rU-mG-rU-mG-rU-mC-rU-  
mC-C3-C3-3'

40 en las que: rX representa ribonucleótidos; mX representa 2'-O-metil-ribonucleótidos; 25rX representa ribonucleótidos con uniones 2'-5'; C3 representa un espaciador de 1,3-propanodiol; idAB representa 1,2-didesoxi-D-ribosa invertida; P representa un grupo fosfato en el extremo 3'-terminal. El C3 de extremo 3'-terminal se introduce mediante espaciador de 1,3-propanodiol cargado en soporte. El grupo fosfato (P) de extremo 3'-terminal se introduce mediante el uso de espaciador de dietilsulfonilo (Pi) cargado en soporte.

45 (2) Investigación histológica

50 Se fijó en formalina una parte del pulmón extraído según un método de rutina, y se sometió a tinción con azán (Azocarmine, disolución azul de anilina y naranja G). Tal como se muestra mediante los resultados de la tinción con azán en la figura 31, en el grupo de administración de PBS (enfermedad), se observó una imagen fibrótica apreciable caracterizada por aumento del intersticio debido a una gran cantidad de fibrillas colagenosas teñidas de azul, mientras que en el grupo de administración de formulación (tratamiento), aparentemente se suprimió la fibrosis.

55 Tal como se muestra mediante los resultados de puntuación histológica (puntuación de T. Ashcroft) en la figura 32, en el grupo de administración de formulación (tratamiento), la puntuación de fibrosis se disminuyó significativamente.

EJEMPLO 23: Reducción *in vivo* de ARNm de HSP47 (modelo de DMN)

60 Se evaluó la actividad *in vivo* de los liposomas de HSP47 del ejemplo 22 en el modelo de daño hepático a corto plazo (denominado modelo rápido). En este modelo, el daño hepático a corto plazo inducido por tratamiento con un agente hepatotóxico tal como dimetilnitrosamina (DMN) viene acompañado de la elevación de los niveles de ARNm

de HSP47. Para inducir estos cambios, a ratas Sprague-Dawley macho se les inyectó por vía intraperitoneal DMN en seis días consecutivos. Al final del periodo de tratamiento con DMN, se aleatorizaron los animales a grupos basándose en el peso corporal de animales individuales. Se administró la muestra de liposoma como una única dosis i.v. (0,375 o 0,75 mg/kg, reflejando la dosis de ARNip) una hora tras la última inyección de DMN. Un día después, se extirparon lóbulos hepáticos y se determinaron los niveles de ARNm tanto de HSP47 como de GAPDH mediante ensayo de RT-PCR cuantitativa (TaqMan). Se normalizaron los niveles de ARNm de HSP47 con respecto a los niveles de GAPDH. Tal como se muestra en la figura 33, se detectó una reducción de ARNm robusta y dependiente de la dosis para HSP47 en el hígado. Tras una única dosis de 0,75 mg/kg de ND-L02-0101, se observó una reducción del 80 % de ARNm de HSP47. Incluso a la dosis menor, de 0,375 mg/kg, se observó una atenuación significativa del 40 %.

Los solicitantes se reservan el derecho a incorporar físicamente en esta solicitud todos y cada uno de los materiales e información de cualquier artículo, patente, solicitud de patente, u otro documento físico y electrónico.

Resultará fácilmente evidente para un experto en la técnica que pueden realizarse diversas sustituciones y modificaciones en la descripción divulgada en el presente documento sin apartarse del alcance y espíritu de la descripción. Por tanto, tales realizaciones adicionales están dentro del alcance de la presente descripción y las siguientes reivindicaciones. La presente descripción enseña a un experto en la técnica a someter a prueba diversas combinaciones y/o sustituciones de modificaciones químicas descritas en el presente documento para la generación de constructos de ácido nucleico con actividad mejorada para mediar en la actividad de iARN. Tal actividad mejorada puede incluir estabilidad mejorada, biodisponibilidad mejorada, y/o activación mejorada de respuestas celulares que median en iARN. Por tanto, las realizaciones específicas descritas en el presente documento no son limitativas y un experto en la técnica puede apreciar fácilmente que pueden someterse a prueba combinaciones específicas de las modificaciones descritas en el presente documento sin experimentación excesiva para identificar moléculas de ácido nucleico con actividad de iARN mejorada.

Las descripciones descritas de manera ilustrativa en el presente documento pueden ponerse en práctica de manera adecuada en ausencia de cualquier elemento o elementos, limitación o limitaciones, no divulgados específicamente en el presente documento. Por tanto, por ejemplo, los términos “un” y “una” y “el/la” y referentes similares en el contexto de describir la descripción (especialmente en el contexto de las siguientes reivindicaciones) deben interpretarse como que cubren tanto el singular como el plural, a menos que se indique lo contrario en el presente documento o lo contradiga claramente el contexto. Los términos “que comprende”, “que tiene”, “que incluye”, “que contiene”, etc. deben interpretarse de manera expansiva y sin limitación (por ejemplo, significando “que incluye, pero no se limita a”). Se pretende que la mención de intervalos de valores en el presente documento simplemente sirva como método abreviado para hacer referencia de manera individual a cada valor separado que se encuentra dentro del intervalo, a menos que se indique lo contrario en el presente documento, y cada valor separado se incorpora en la memoria descriptiva como si se mencionara individualmente en el presente documento. Todos los métodos descritos en el presente documento pueden realizarse en cualquier orden adecuado a menos que se indique lo contrario en el presente documento o lo contradiga claramente de otro modo el contexto. Se pretende que el uso de todos y cada uno de los ejemplos, o términos a modo de ejemplo (por ejemplo, “tal como”) proporcionados en el presente documento, simplemente ilustre mejor la descripción y no suponga una limitación sobre el alcance de la descripción a menos que se reivindique lo contrario. No debe interpretarse que ningún término en la memoria descriptiva indica que ningún elemento no reivindicado sea esencial para la puesta en práctica de la descripción. Adicionalmente, los términos y las expresiones empleados en el presente documento se han usado como términos de descripción y no de limitación, y no se pretende que el uso de tales términos y expresiones excluya ningún equivalente de las características mostradas y descritas o partes de las mismas, sino que se reconoce que diversas modificaciones son posibles dentro del alcance de la descripción reivindicada. Por tanto, debe entenderse que aunque la presente descripción se ha divulgado específicamente mediante realizaciones preferidas y características opcionales, los expertos en la técnica pueden recurrir a la modificación y variación de las descripciones realizadas divulgadas en el presente documento, y que se considera que tales modificaciones y variaciones están dentro del alcance de esta descripción.

La descripción se ha descrito de manera amplia y genérica en el presente documento. Cada una de las especies y agrupamientos subgenéricos más estrechos que se encuentran dentro de la divulgación genérica también forman parte de la descripción. Esto incluye la descripción genérica de la descripción con una condición o limitación negativa que elimina cualquier contenido del género, independientemente de si el material extraído se menciona específicamente en el presente documento o no. Otras realizaciones se encuentran dentro de las siguientes reivindicaciones. Además, cuando se describen características o aspectos de la descripción en términos de grupos de Markush, los expertos en la técnica reconocerán que la descripción también se describe de ese modo en términos de miembros individuales o subgrupos de miembros del grupo de Markush.

También se describen los siguientes puntos:

1. Composición farmacéutica que comprende un portador de fármaco y una molécula de ácido nucleico bicatenario, en la que el portador de fármaco comprende una cantidad específica de células estrelladas de un retinoide, y en la que la molécula de ácido nucleico bicatenario comprende la estructura:

5' (N)<sub>x</sub> - Z 3' (cadena antisentido)

3' Z'-(N')<sub>y</sub> -z" 5' (cadena sentido)

- 5 en la que cada uno de N y N' es un nucleótido que puede no estar modificado o estar modificado, o un resto no convencional;
- 10 en la que cada uno de (N)<sub>x</sub> y (N')<sub>y</sub> es un oligonucleótido en el que cada N o N' consecutivo está unido al siguiente N o N' mediante un enlace covalente;
- 15 en la que cada uno de Z y Z' está independientemente presente o ausente, pero si está presente incluye independientemente 1-5 nucleótidos o restos distintos de nucleótidos consecutivos o una combinación de los mismos unidos covalentemente al extremo 3'-terminal de la cadena en la que está presente;
- en la que z" puede estar presente o ausente, pero si está presente es un resto de ocupación de centros reactivos unido covalentemente al extremo 5'-terminal de (N')<sub>y</sub>;
- 20 en la que cada uno de x e y es independientemente un número entero de entre 18 y 40;
- en la que la secuencia de (N')<sub>y</sub> tiene complementariedad con respecto a la secuencia de (N)<sub>x</sub>; y
- 25 en la que (N)<sub>x</sub> incluye una secuencia antisentido con respecto a la secuencia codificante de ARNm para hsp47 humana mostrada a modo de ejemplo mediante SEQ ID NO: 1.
2. Composición farmacéutica según el punto 1, en la que el portador de fármaco comprende secuencias oligonucleotídicas seleccionadas del grupo que consiste en las secuencias SEQ ID NO: 60 y 127 (SERPINH1\_2) SEQ ID NO: 98 y 165 (SERPINH1\_45a) y SEQ ID NO: 101 y 168 (SERPINH1\_51).
- 30 3. Composición farmacéutica según el punto 1, en la que el retinoide consiste en una molécula seleccionada del grupo que consiste en vitamina A, ácido retinoico, retinal, tretinoína, adapaleno, palmitato de retinol y fenretinida (4-HPR).
- 35 4. Composición farmacéutica según el punto 1, en la que el portador de fármaco comprende además una molécula de retinoide conjugada con una molécula de polietilenglicol.
5. Composición farmacéutica según el punto 4, en la que la molécula de retinoide conjugada con molécula de polietilenglicol es diVA-PEG-diVA.
- 40 6. Composición farmacéutica según el punto 1, en la que el retinoide está al menos parcialmente expuesto en el exterior del portador de fármaco antes de que el portador de fármaco alcance la célula estrellada.
- 45 7. Composición farmacéutica según el punto 1, en la que el portador de fármaco está en una forma seleccionada del grupo que consiste en una micela polimérica, un liposoma, una emulsión, una microesfera y una nanoesfera.
8. Composición farmacéutica según el punto 7, en la que el portador de fármaco está en una forma de una vesícula lipídica que comprende una bicapa de moléculas lipídicas.
- 50 9. Composición farmacéutica según el punto 8, en la que el retinoide es del 0,2% en peso al 20% en peso de las moléculas lipídicas.
10. Composición farmacéutica según el punto 8, en la que las moléculas lipídicas comprenden HEDC
- 55 11. Composición farmacéutica según el punto 10, en la que las moléculas lipídicas comprenden S104.
12. Composición farmacéutica según el punto 1, en la que la molécula de ácido nucleico bicatenario está expuesta en la superficie exterior de la vesícula lipídica.
- 60 13. Composición farmacéutica según el punto 1, en la que la molécula de ácido nucleico bicatenario está encapsulada por la vesícula lipídica.
14. Composición farmacéutica según el punto 13, en la que la molécula de ácido nucleico bicatenario es resistente a nucleasas.
- 65 15. Composición farmacéutica según cualquiera de los puntos 1-14, en la que una cadena de la molécula de ácido nucleico bicatenario comprende SEQ ID NO: 127 y la segunda cadena comprende SEQ ID NO: 60.

16. Composición farmacéutica según el punto 15, en la que la cadena antisentido comprende SEQ ID NO: 127, y la cadena sentido comprende SEQ ID NO: 60.
- 5 17. Composición farmacéutica según el punto 16, en la que la cadena antisentido comprende además ribonucleótidos modificados con 2'-O-metilo; un 2'-5'-ribonucleótido en al menos una de las posiciones 1, 5, 6 o 7; y un resto distinto de nucleótido unido covalentemente al extremo 3'-terminal; y en la que la cadena sentido comprende además al menos un 2'-5'-ribonucleótido o ribonucleótido modificado con 2'-O-metilo; un resto distinto de nucleótido unido covalentemente al extremo 3'-terminal; y un resto de ocupación de centros reactivos unido covalentemente al extremo 5'-terminal.
- 10 18. Composición farmacéutica según el punto 16, en la que la cadena antisentido comprende además ribonucleótidos modificados con 2'-O-metilo en las posiciones 3, 5, 9, 11, 13, 15, 17 y 19; un 2'-5'-ribonucleótido en la posición 7; y un resto distinto de nucleótido unido covalentemente al extremo 3'-terminal; y en la que la cadena sentido comprende además cinco 2'-5'-ribonucleótidos consecutivos en las posiciones 3'-terminales 15, 16, 17, 18 y 19; un resto distinto de nucleótido unido covalentemente al extremo 3'-terminal; y un resto abásico invertido unido covalentemente al extremo 5'-terminal.
- 15 19. Composición farmacéutica según el punto 16, en la que la cadena antisentido comprende además ribonucleótidos modificados con 2'-O-metilo en las posiciones 1, 3, 5, 9, 11, 13, 15, 17 y 19; y un resto distinto de nucleótido C3C3 unido covalentemente al extremo 3'-terminal; y en la que la cadena sentido comprende además un resto distinto de nucleótido C3Pi unido covalentemente al extremo 3'-terminal; y un resto abásico invertido unido covalentemente al extremo 5'-terminal.
- 20 20. Composición farmacéutica según el punto 16, en la que la cadena antisentido comprende además ribonucleótidos modificados con 2'-O-metilo en las posiciones 1, 3, 5, 9, 11, 13, 15, 17 y 19; un 2'-5'-ribonucleótido en la posición 7; y un resto distinto de nucleótido C3Pi-C3OH unido covalentemente al extremo 3'-terminal; y en la que la cadena sentido comprende además cinco 2'-5'-ribonucleótidos consecutivos en las posiciones 3'-terminales 15, 16, 17, 18 y 19; un resto distinto de nucleótido C3Pi unido covalentemente al extremo 3'-terminal; y un resto abásico invertido unido covalentemente al extremo 5'-terminal.
- 25 30 21. Composición farmacéutica según el punto 16, en la que la cadena antisentido comprende además ribonucleótidos modificados con 2'-O-metilo en las posiciones 1, 3, 5, 9, 11, 13, 15, 17 y 19; un 2'-5'-ribonucleótido en la posición 7; y un resto distinto de nucleótido C3Pi-C3OH unido covalentemente al extremo 3'-terminal; y en la que la cadena sentido comprende además cinco 2'-5'-ribonucleótidos consecutivos en las posiciones 3'-terminales 15, 16, 17, 18 y 19; un resto distinto de nucleótido C3Pi unido covalentemente al extremo 3'-terminal; y un resto abásico invertido unido covalentemente al extremo 5'-terminal.
- 35 22. Composición farmacéutica según el punto 16, en la que la cadena antisentido comprende además ribonucleótidos modificados con 2'-O-metilo en las posiciones 1, 3, 5, 9, 11, 13, 15, 17 y 19; un 2'-5'-ribonucleótido en la posición 7; y un resto distinto de nucleótido C3Pi-C3OH unido covalentemente al extremo 3'-terminal; y en la que la cadena sentido comprende además ribonucleótidos modificados con 2'-O-metilo en las posiciones 7, 13, 16 y 18; un 2'-5'-ribonucleótido en la posición 9; un resto distinto de nucleótido C3 unido covalentemente al extremo 3'-terminal; y un resto abásico invertido unido covalentemente al extremo 5'-terminal.
- 40 45 23. Composición farmacéutica según cualquiera de los puntos 1-14, en la que una cadena de la molécula de ácido nucleico bicatenario comprende SEQ ID NO: 98 y la segunda cadena comprende SEQ ID NO: 165.
- 50 24. Composición farmacéutica según el punto 23, en la que la cadena sentido comprende SEQ ID NO: 98 y la cadena antisentido comprende SEQ ID NO: 165:
- 55 25. Composición farmacéutica según el punto 24, en la que la cadena sentido comprende además 2'-5'-ribonucleótidos en las posiciones en o cerca del extremo 3'-terminal; un resto distinto de nucleótido unido covalentemente al extremo 3'-terminal; y un resto de ocupación de centros reactivos unido covalentemente al extremo 5'-terminal; y la cadena antisentido comprende además un ribonucleótido modificado con 2'-O-metilo; un 2'-5'-ribonucleótido en al menos una de las posiciones 5, 6 o 7; y un resto distinto de nucleótido unido covalentemente al extremo 3'-terminal.
- 60 26. Composición farmacéutica según el punto 24, en la que la cadena sentido comprende además 2'-5'-ribonucleótidos en las posiciones 15, 16, 17, 18 y 19; un resto C3-OH 3' unido covalentemente al extremo 3'-terminal; y un resto de desoxirribonucleótido abásico invertido unido covalentemente al extremo 5'-terminal; y la cadena antisentido comprende además ribonucleótidos modificados con 2'-O-metilo en las posiciones 2, 4, 6, 8, 11, 13, 15, 17 y 19; un 2'-5'-ribonucleótido en la posición 7; y un resto C3Pi-C3OH unido covalentemente al extremo 3'-terminal.
- 65

27. Composición farmacéutica según cualquiera de los puntos 1-14, en la que una cadena de la molécula de ácido nucleico bicatenario comprende SEQ ID NO: 101 y la segunda cadena comprende SEQ ID NO: 168.
- 5 28. Composición farmacéutica según el punto 1, en la que la cadena sentido comprende SEQ ID NO: 101 y la cadena antisentido comprende SEQ ID NO: 168.
- 10 29. Composición farmacéutica según el punto 28, en la que la cadena sentido comprende además ribonucleótidos de pirimidina modificados con 2'-O-metilo; un 2'-5'-ribonucleótido opcional en una de la posición 9 o 10; un resto distinto de nucleótido unido covalentemente al extremo 3'-terminal; y un resto de ocupación de centros reactivos unido covalentemente al extremo 5'-terminal; y en la que la cadena antisentido comprende además un ribonucleótido modificado con 2'-O-metilo; un 2'-5'-ribonucleótido en al menos una de las posiciones 5, 6 o 7; y un resto distinto de nucleótido unido covalentemente al extremo 3'-terminal.
- 15 30. Composición farmacéutica según el punto 28, en la que la cadena sentido comprende además ribonucleótidos modificados con 2'-O-metilo en las posiciones 4, 11, 13 y 17; un 2'-5'-ribonucleótido en la posición 9; un resto distinto de nucleótido C3OH unido covalentemente al extremo 3'-terminal; y un resto de desoxirribonucleótido abásico invertido unido covalentemente al extremo 5'-terminal; y en la que la cadena antisentido comprende además ribonucleótidos modificados con 2'-O-metilo en las posiciones 1, 4, 8, 11 y 15; un 2'-5'-ribonucleótido en la posición 6; y un resto C3Pi-C3OH unido covalentemente al extremo 3'-terminal.
- 20 31. Composición farmacéutica según el punto 28, en la que la cadena sentido comprende además ribonucleótidos modificados con 2'-O-metilo en las posiciones 4, 11, 13 y 17; un resto distinto de nucleótido C3OH unido covalentemente al extremo 3'-terminal; y un resto de desoxirribonucleótido abásico invertido unido covalentemente al extremo 5'-terminal; y en la que la cadena antisentido comprende además ribonucleótidos modificados con 2'-O-metilo en las posiciones 1, 4, 8, 13 y 15; un 2'-5'-ribonucleótido en la posición 6; y un resto C3Pi-C3OH unido covalentemente al extremo 3'-terminal.
- 25 32. Composición farmacéutica según el punto 28, en la que la cadena sentido comprende además ribonucleótidos modificados con 2'-O-metilo en las posiciones 2, 4, 11, 13 y 17; un resto distinto de nucleótido C3OH unido covalentemente al extremo 3'-terminal; y un resto de desoxirribonucleótido abásico invertido unido covalentemente al extremo 5'-terminal; y en la que la cadena antisentido comprende además ribonucleótidos modificados con 2'-O-metilo en las posiciones 1, 4, 8, 11 y 15; un 2'-5'-ribonucleótido en la posición 6; y un resto distinto de nucleótido C3Pi-C3OH unido covalentemente al extremo 3'-terminal.
- 30 33. Composición farmacéutica según cualquiera de los puntos 1-32, la molécula de ácido nucleico bicatenario reduce la expresión de hsp47 en la célula estrellada.
- 35 34. Composición farmacéutica según cualquiera de los puntos 1-32, en el que la composición previene o trata una enfermedad asociada con hsp47.
- 40 35. Composición farmacéutica según cualquiera de los puntos 1-34, en el que la composición previene o trata una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en fibrosis de órganos y tejidos incluyendo hígado, pulmón, riñón, páncreas, piel, corazón, cerebro, intestino, colon, cuerdas vocales, peritoneo, ojo, músculo, médula ósea, hueso, ovario, uréter y útero; y cáncer y tejidos fibróticos asociados con cáncer.
- 45 36. Composición farmacéutica según cualquiera de los puntos 1-34, en la que la composición farmacéutica previene o trata fibrosis hepática.
- 50 37. Composición farmacéutica según cualquiera de los puntos 1-34, en la que la composición farmacéutica previene o trata fibrosis pulmonar.
- 55 38. Composición farmacéutica según cualquiera de los puntos 1-34, en la que la composición farmacéutica previene o trata fibrosis renal.
- 60 39. Composición farmacéutica según cualquiera de los puntos 1-34, en la que la composición previene o trata fibrosis peritoneal.
- 65 40. Composición farmacéutica según cualquiera de los puntos 1-34, en la que la composición previene o trata daño hepático crónico.
41. Composición farmacéutica según cualquiera de los puntos 1-34, en la que la composición previene o trata fibrillogénesis.
42. Composición farmacéutica según cualquiera de los puntos 1-34, en la que la composición previene o trata cirrosis hepática debida a hepatitis C tras trasplante de hígado o esteatohepatitis no alcohólica (NASH); fibrosis pulmonar idiopática; neumonía por radiación que conduce a fibrosis pulmonar; nefropatía diabética; esclerosis

peritoneal asociada con diálisis peritoneal ambulatoria continua (CAPD) o penfigoide cicatricial ocular.

- 5 43. Composición farmacéutica según cualquiera de los puntos 1-34, en la que la composición previene o trata cirrosis hepática debida a hepatitis C tras trasplante de hígado o esteatohepatitis no alcohólica (NASH).
44. Composición farmacéutica según cualquiera de los puntos 1-34, en la que la composición previene o trata fibrosis pulmonar idiopática.
- 10 45. Composición farmacéutica según cualquiera de los puntos 1-34, en la que la composición previene o trata neumonía por radiación que conduce a fibrosis pulmonar.
46. Composición farmacéutica según cualquiera de los puntos 1-34, en la que la composición previene o trata nefropatía diabética.
- 15 47. Composición farmacéutica según cualquiera de los puntos 1-34, en la que la composición previene o trata esclerosis peritoneal asociada con diálisis peritoneal ambulatoria continua (CAPD).
- 20 48. Composición farmacéutica según cualquiera de los puntos 1-34, en la que la composición previene o trata penfigoide cicatricial ocular.
49. Método para tratar o prevenir una enfermedad, comprendiendo el método administrar una cantidad eficaz de la composición farmacéutica según cualquiera de los puntos 1-48 a un sujeto que lo necesita.
- 25 50. Método del punto 49, en el que la enfermedad se selecciona del grupo que consiste en hepatitis, fibrosis hepática, cirrosis hepática, cáncer de hígado, pancreatitis, fibrosis pancreática, cáncer pancreático, cicatrización de las cuerdas vocales, fibrosis de la mucosa de las cuerdas vocales y fibrosis de la laringe.
51. Método del punto 49, en el que la enfermedad es hepatitis o fibrosis hepática.
- 30 52. Método del punto 49, en el que la enfermedad está asociada con infección crónica por el virus de la hepatitis C (VHC).
53. Método según el punto 49, en el que la preparación se administra por vía parental.

35

REIVINDICACIONES

1. Composición farmacéutica que comprende

5 (i) una molécula de ácido nucleico bicatenario y un portador de fármaco que comprende una mezcla de un retinoide y un lípido, en la que la molécula de ácido nucleico bicatenario comprende la estructura (A1):

(A1) 5' (N)<sub>x</sub> - Z 3' (cadena antisentido)

10 3' Z'-(N')<sub>y</sub> -z" 5' (cadena sentido)

en la que cada uno de N y N' es un nucleótido que puede no estar modificado o estar modificado, o un resto no convencional;

15 en la que cada uno de (N)<sub>x</sub> y (N')<sub>y</sub> es un oligonucleótido en el que cada N o N' consecutivo está unido al siguiente N o N' mediante un enlace covalente;

20 en la que cada uno de Z y Z' está independientemente presente o ausente, pero si está presente incluye independientemente 1-5 nucleótidos o restos distintos de nucleótidos consecutivos o una combinación de los mismos unidos covalentemente al extremo 3'-terminal de la cadena en la que está presente;

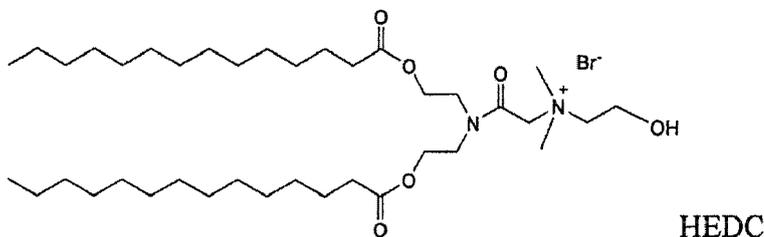
en la que z" puede estar presente o ausente, pero si está presente es un resto de ocupación de centros reactivos unido covalentemente al extremo 5'-terminal de (N')<sub>y</sub>;

25 en la que cada uno de x e y es independientemente un número entero de entre 18 y 40;

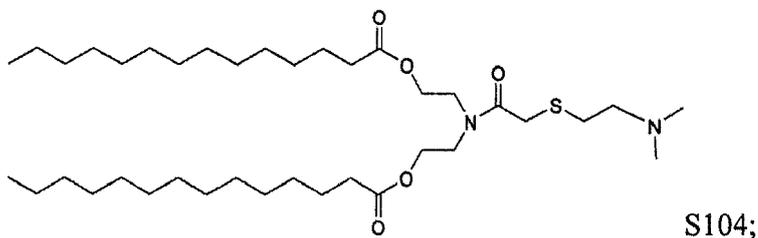
en la que la secuencia de (N')<sub>y</sub> tiene complementariedad con respecto a la secuencia de (N)<sub>x</sub>;

30 en la que (N)<sub>x</sub> incluye una secuencia antisentido con respecto a la secuencia codificante de ARNm para hsp47 humana mostrada a modo de ejemplo mediante SEQ ID NO: 1; y

en la que el lípido comprende un lípido seleccionado del grupo que consiste en

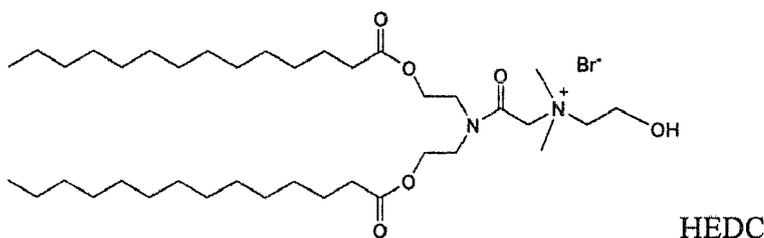


35 y

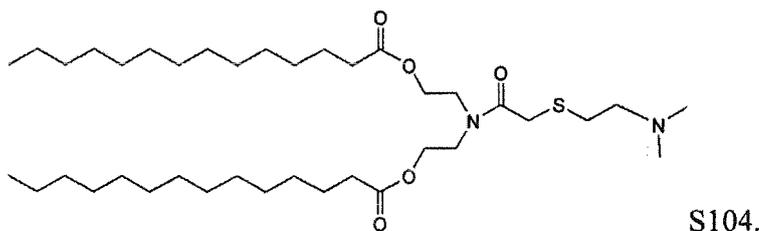


40 o

45 (ii) una molécula de ácido nucleico bicatenario que comprende una cadena sentido y una cadena antisentido en la que las cadenas sentido y antisentido se seleccionan de los oligonucleótidos descritos como SERPINH1\_2 (SEQ ID NO: 60 y 127), SERPINH1\_45a (SEQ ID NO: 98 y 165) y SERPINH1\_51 (SEQ ID NO: 101 y 168), y un portador de fármaco que comprende una mezcla de una vesícula lipídica y un retinoide o un conjugado de retinoide, en la que la vesícula lipídica comprende un lípido seleccionado del grupo que consiste en



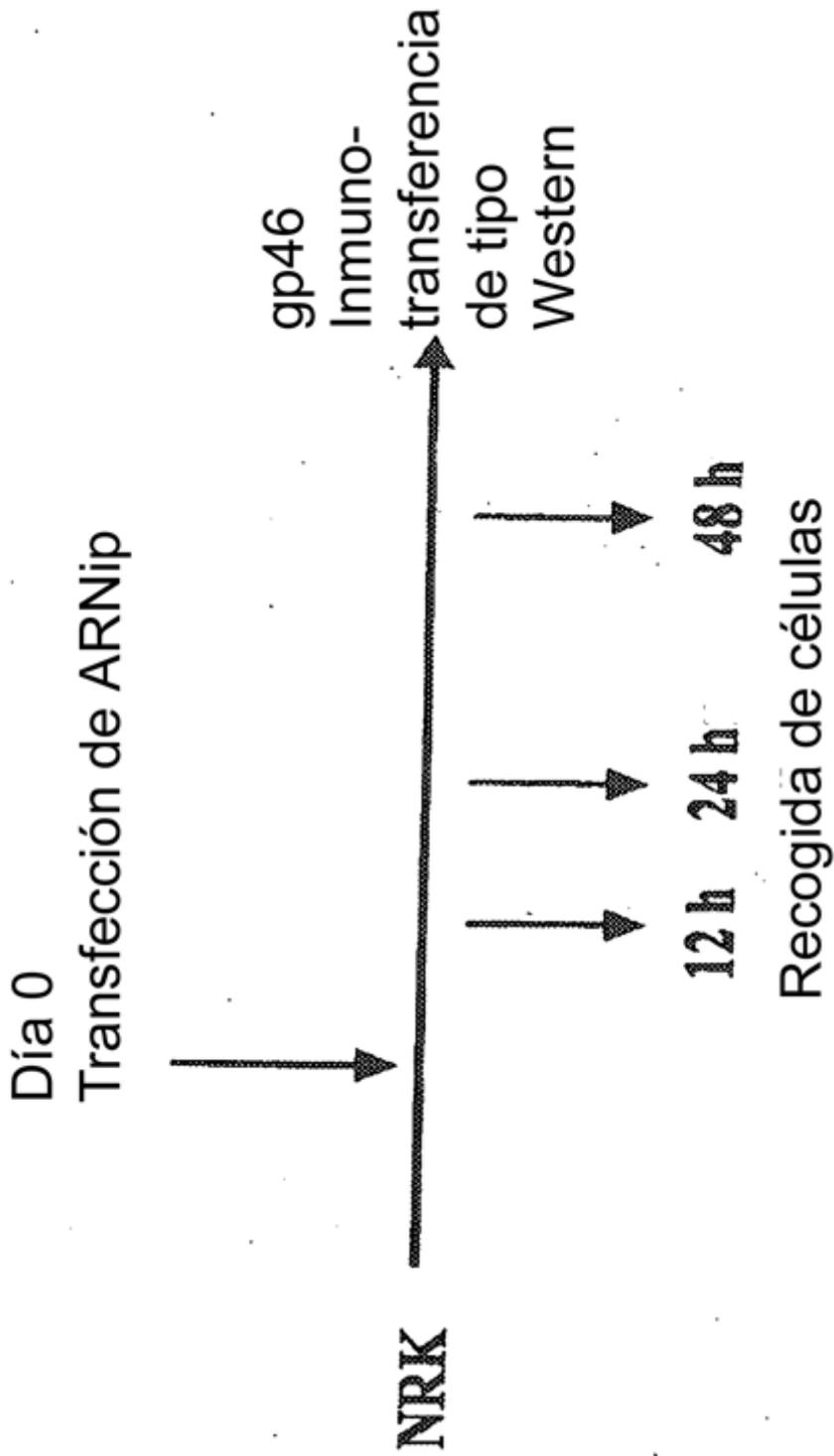
y



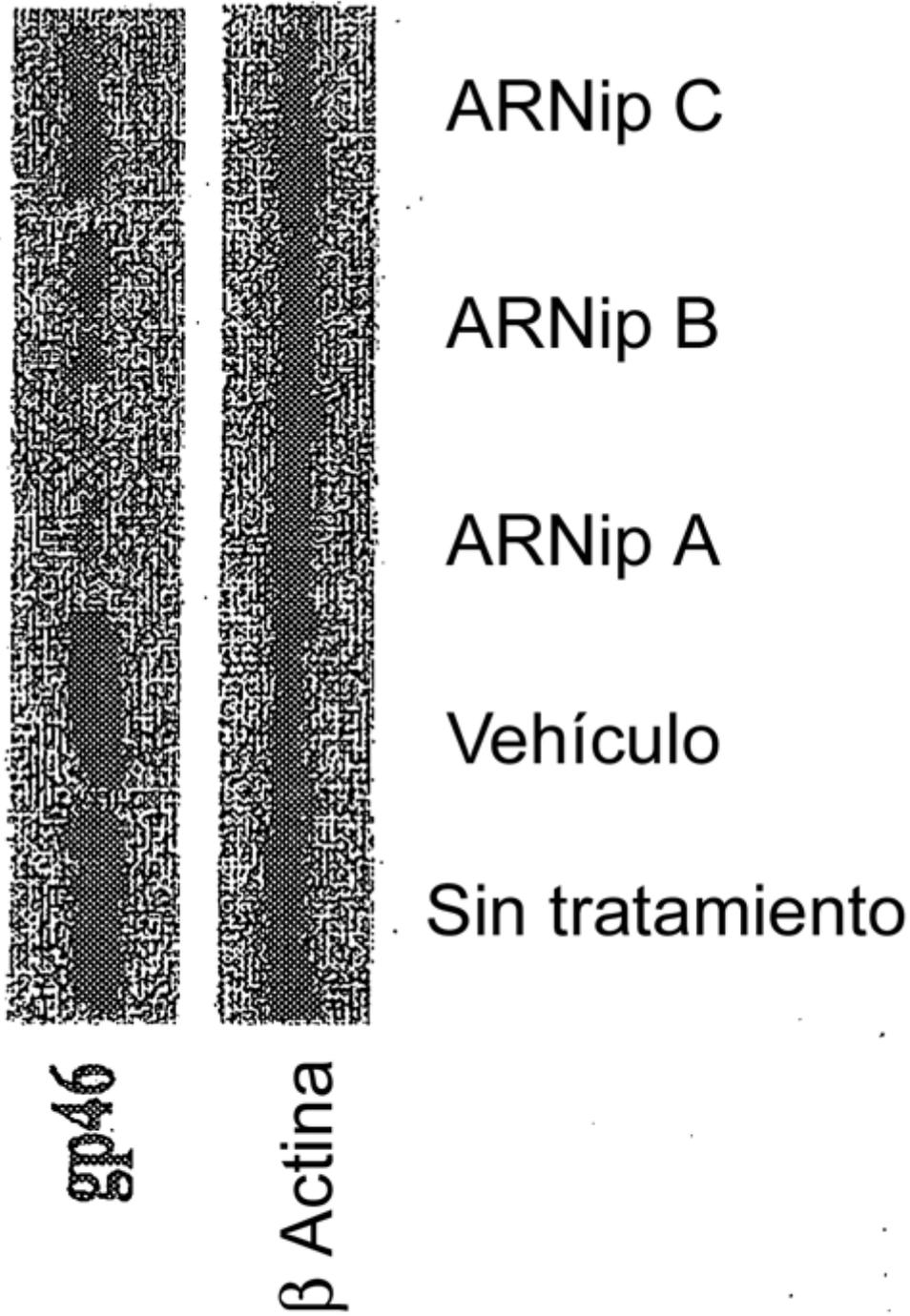
5

2. Composición farmacéutica según la reivindicación 1, en el que el conjugado de retinoide es un conjugado de PEG.
3. Composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en la que la cadena antisentido comprende SEQ ID NO: 127 y la cadena sentido comprende SEQ ID NO: 60; en la que la cadena antisentido comprende además ribonucleótidos modificados con 2'-O-metilo; un 2'-5'-ribonucleótido en al menos una de las posiciones 1, 5, 6 o 7; y un resto distinto de nucleótido unido covalentemente al extremo 3'-terminal; y en la que la cadena sentido comprende además al menos un 2'-5'-ribonucleótido o ribonucleótido modificado con 2'-O-metilo; un resto distinto de nucleótido unido covalentemente al extremo 3'-terminal; y un resto de ocupación de centros reactivos unido covalentemente al extremo 5'-terminal.
4. Composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en la que la cadena antisentido comprende SEQ ID NO: 127 y la cadena sentido comprende SEQ ID NO: 60; en la que la cadena antisentido comprende además ribonucleótidos modificados con 2'-O-metilo en las posiciones 3, 5, 9, 11, 13, 15, 17 y 19; un 2'-5'-ribonucleótido en la posición 7; y un resto distinto de nucleótido unido covalentemente al extremo 3'-terminal; y en la que la cadena sentido comprende además cinco 2'-5'-ribonucleótidos consecutivos en las posiciones 3'-terminales 15, 16, 17, 18 y 19; un resto distinto de nucleótido unido covalentemente al extremo 3'-terminal; y un resto abásico invertido unido covalentemente al extremo 5'-terminal.
5. Composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en la que la cadena antisentido comprende SEQ ID NO: 127 y la cadena sentido comprende SEQ ID NO: 60; en la que la cadena antisentido comprende además ribonucleótidos modificados con 2'-O-metilo en las posiciones 1, 3, 5, 9, 11, 13, 15, 17 y 19; y un resto distinto de nucleótido C3C3 unido covalentemente al extremo 3'-terminal; y en la que la cadena sentido comprende además un resto distinto de nucleótido C3Pi unido covalentemente al extremo 3'-terminal; y un resto abásico invertido unido covalentemente al extremo 5'-terminal.
6. Composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en la que la cadena antisentido comprende SEQ ID NO: 127 y la cadena sentido comprende SEQ ID NO: 60; en la que la cadena antisentido comprende además ribonucleótidos modificados con 2'-O-metilo en las posiciones 1, 3, 5, 9, 11, 13, 15, 17 y 19; un 2'-5'-ribonucleótido en la posición 7; y un resto distinto de nucleótido C3Pi-C3OH unido covalentemente al extremo 3'-terminal; y en la que la cadena sentido comprende además cinco 2'-5'-ribonucleótidos consecutivos en las posiciones 3'-terminales 15, 16, 17, 18 y 19; un resto distinto de nucleótido C3Pi unido covalentemente al extremo 3'-terminal; y un resto abásico invertido unido covalentemente al extremo 5'-terminal.
7. Composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en la que la cadena antisentido comprende SEQ ID NO: 127 y la cadena sentido comprende SEQ ID NO: 60; en la que la cadena antisentido comprende además ribonucleótidos modificados con 2'-O-metilo en las posiciones 1, 3, 5, 9, 11, 13, 15, 17 y 19; un 2'-5'-ribonucleótido en la posición 7; y un resto distinto de nucleótido C3Pi-C3OH unido covalentemente al extremo 3'-terminal; y en la que la cadena sentido comprende además ribonucleótidos modificados con 2'-O-metilo en las posiciones 7, 13, 16 y 18; un 2'-5'-ribonucleótido en la posición 9; un resto distinto de nucleótido C3 unido covalentemente al extremo 3'-terminal; y un resto abásico invertido unido covalentemente al extremo 5'-terminal.

8. Composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en la que la cadena sentido comprende SEQ ID NO: 98 y la cadena antisentido comprende SEQ ID NO: 165; en la que la cadena sentido comprende además 2'-5'-ribonucleótidos en las posiciones en o cerca del extremo 3'-terminal; un resto distinto de nucleótido unido covalentemente al extremo 3'-terminal; y un resto de ocupación de centros reactivos unido covalentemente al extremo 5'-terminal; y en la que la cadena antisentido comprende además un ribonucleótido modificado con 2'-O-metilo; un 2'-5'-ribonucleótido en al menos una de las posiciones 5, 6 o 7; y un resto distinto de nucleótido unido covalentemente al extremo 3'-terminal.
9. Composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en la que la cadena sentido comprende SEQ ID NO: 98 y la cadena antisentido comprende SEQ ID NO: 165; en la que la cadena sentido comprende además 2'-5'-ribonucleótidos en las posiciones 15, 16, 17, 18 y 19; un resto C3-OH 3' unido covalentemente al extremo 3'-terminal; y un resto de desoxirribonucleótido abásico invertido unido covalentemente al extremo 5'-terminal; y en la que la cadena antisentido comprende además ribonucleótidos modificados con 2'-O-metilo en las posiciones 2, 4, 6, 8, 11, 13, 15, 17 y 19; un 2'-5'-ribonucleótido en la posición 7; y un resto C3Pi-C3OH unido covalentemente al extremo 3'-terminal.
10. Composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en la que la cadena sentido comprende SEQ ID NO: 101 y la cadena antisentido comprende SEQ ID NO: 168; en la que la cadena sentido comprende además ribonucleótidos de pirimidina modificados con 2'-O-metilo; un 2'-5'-ribonucleótido opcional en una de la posición 9 o 10; un resto distinto de nucleótido unido covalentemente al extremo 3'-terminal; y un resto de ocupación de centros reactivos unido covalentemente al extremo 5'-terminal; y en la que la cadena antisentido comprende además un ribonucleótido modificado con 2'-O-metilo; un 2'-5'-ribonucleótido en al menos una de las posiciones 5, 6 o 7; y un resto distinto de nucleótido unido covalentemente al extremo 3'-terminal.
11. Composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en la que la cadena sentido comprende SEQ ID NO: 101 y la cadena antisentido comprende SEQ ID NO: 168; en la que la cadena sentido comprende además ribonucleótidos modificados con 2'-O-metilo en las posiciones 4, 11, 13 y 17; un 2'-5'-ribonucleótido en la posición 9; un resto distinto de nucleótido C3OH unido covalentemente al extremo 3'-terminal; y un resto de desoxirribonucleótido abásico invertido unido covalentemente al extremo 5'-terminal; y en la que la cadena antisentido comprende además ribonucleótidos modificados con 2'-O-metilo en las posiciones 1, 4, 8, 11 y 15; un 2'-5'-ribonucleótido en la posición 6; y un resto C3Pi-C3OH unido covalentemente al extremo 3'-terminal.
12. Composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en la que la cadena sentido comprende SEQ ID NO: 101 y la cadena antisentido comprende SEQ ID NO: 168; en la que la cadena sentido comprende además ribonucleótidos modificados con 2'-O-metilo en las posiciones 4, 11, 13 y 17; un resto distinto de nucleótido C3OH unido covalentemente al extremo 3'-terminal; y un resto de desoxirribonucleótido abásico invertido unido covalentemente al extremo 5'-terminal; y en la que la cadena antisentido comprende además ribonucleótidos modificados con 2'-O-metilo en las posiciones 1, 4, 8, 13 y 15; un 2'-5'-ribonucleótido en la posición 6; y un resto C3Pi-C3OH unido covalentemente al extremo 3'-terminal.
13. Composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en la que la cadena sentido comprende SEQ ID NO: 101 y la cadena antisentido comprende SEQ ID NO: 168; en la que la cadena sentido comprende además ribonucleótidos modificados con 2'-O-metilo en las posiciones 2, 4, 11, 13 y 17; un resto distinto de nucleótido C3OH unido covalentemente al extremo 3'-terminal; y un resto de desoxirribonucleótido abásico invertido unido covalentemente al extremo 5'-terminal; y en la que la cadena antisentido comprende además ribonucleótidos modificados con 2'-O-metilo en las posiciones 1, 4, 8, 11 y 15; un 2'-5'-ribonucleótido en la posición 6; y un resto distinto de nucleótido C3Pi-C3OH unido covalentemente al extremo 3'-terminal.



**FIG. 1**



**FIG. 2**

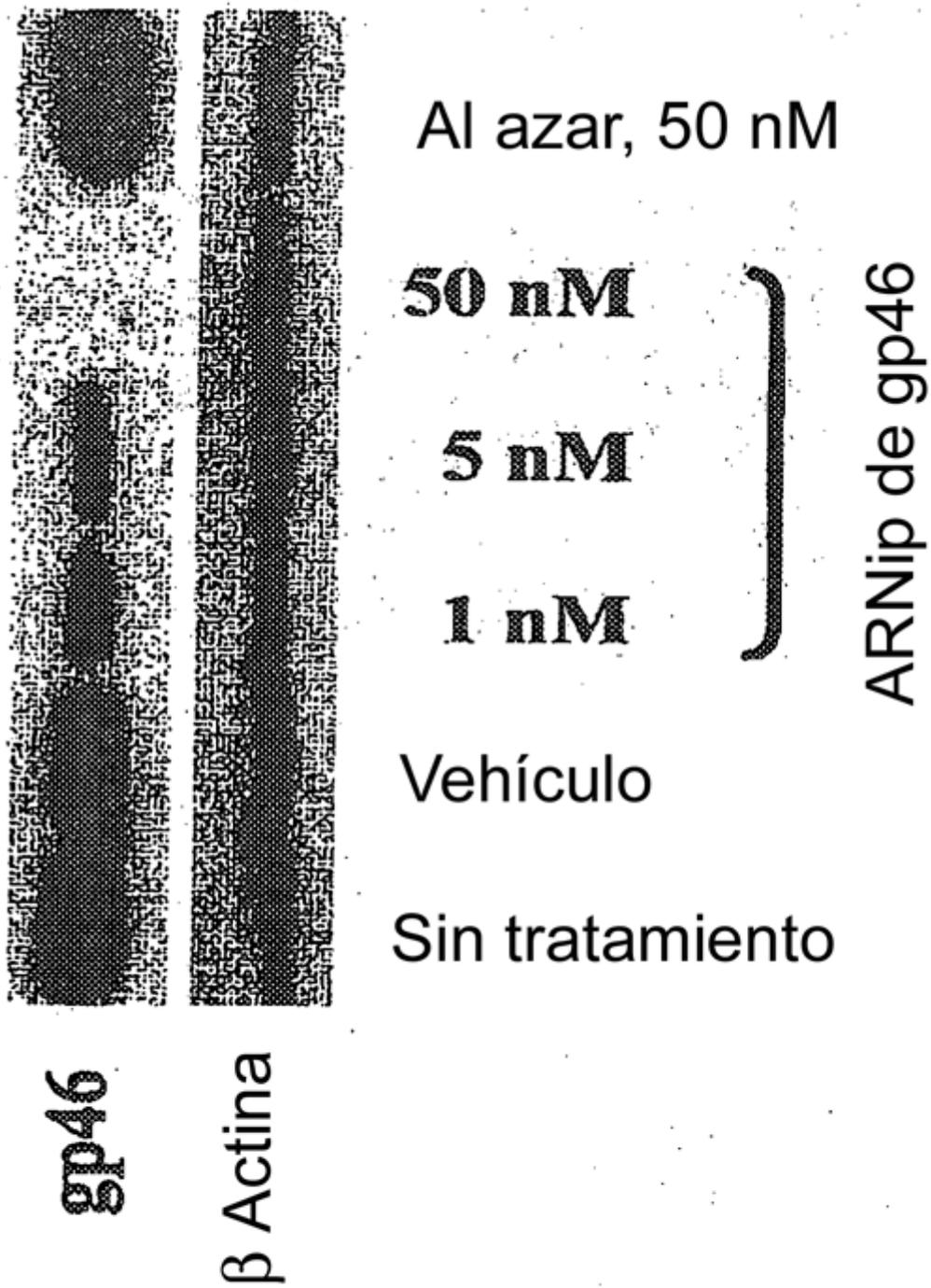
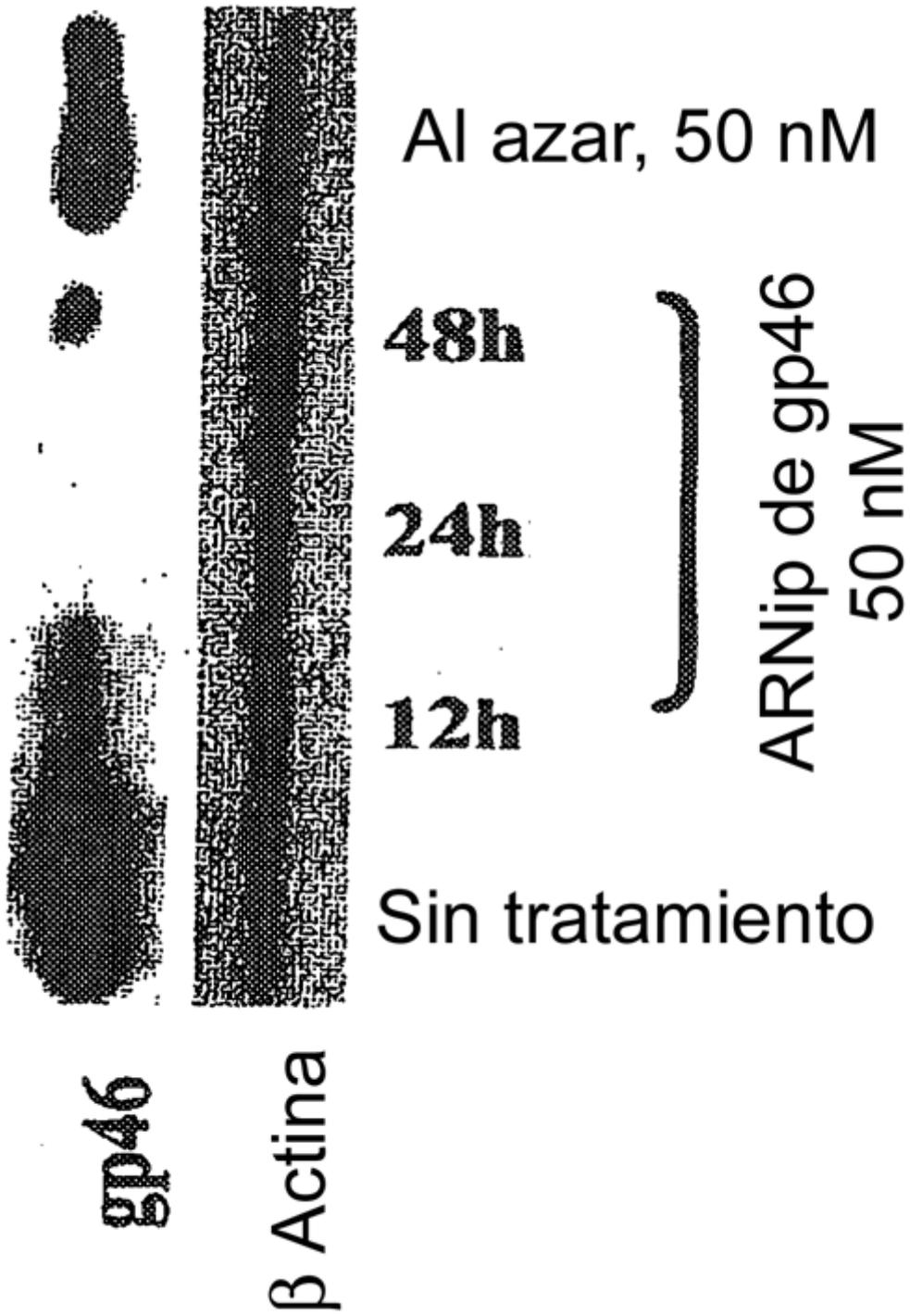


FIG. 3



**FIG. 4**

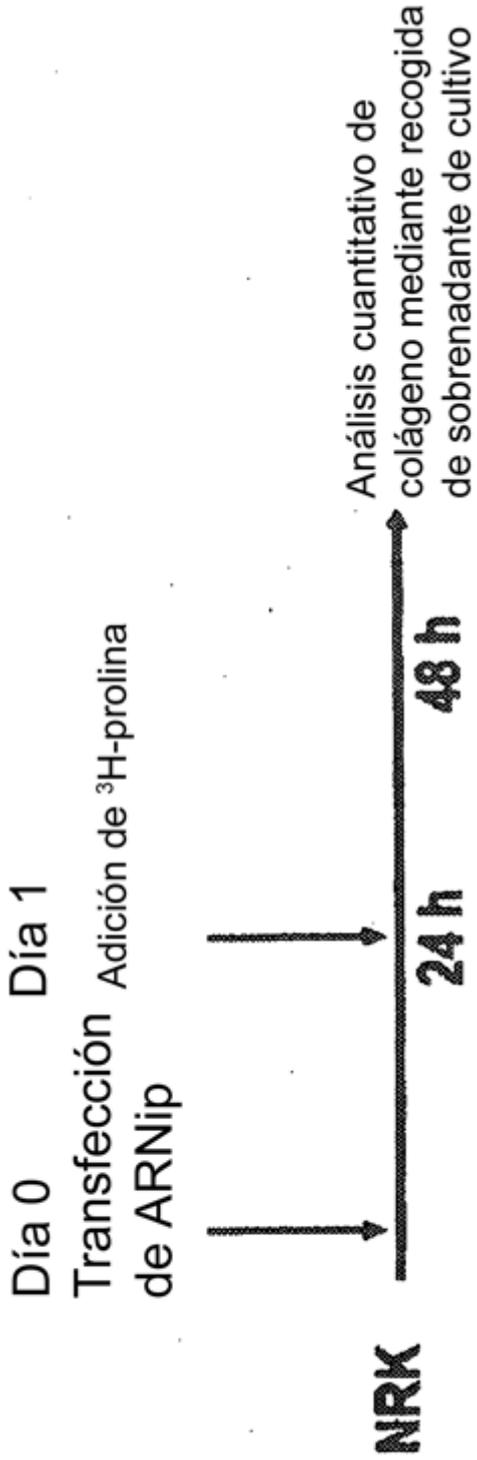


FIG. 5

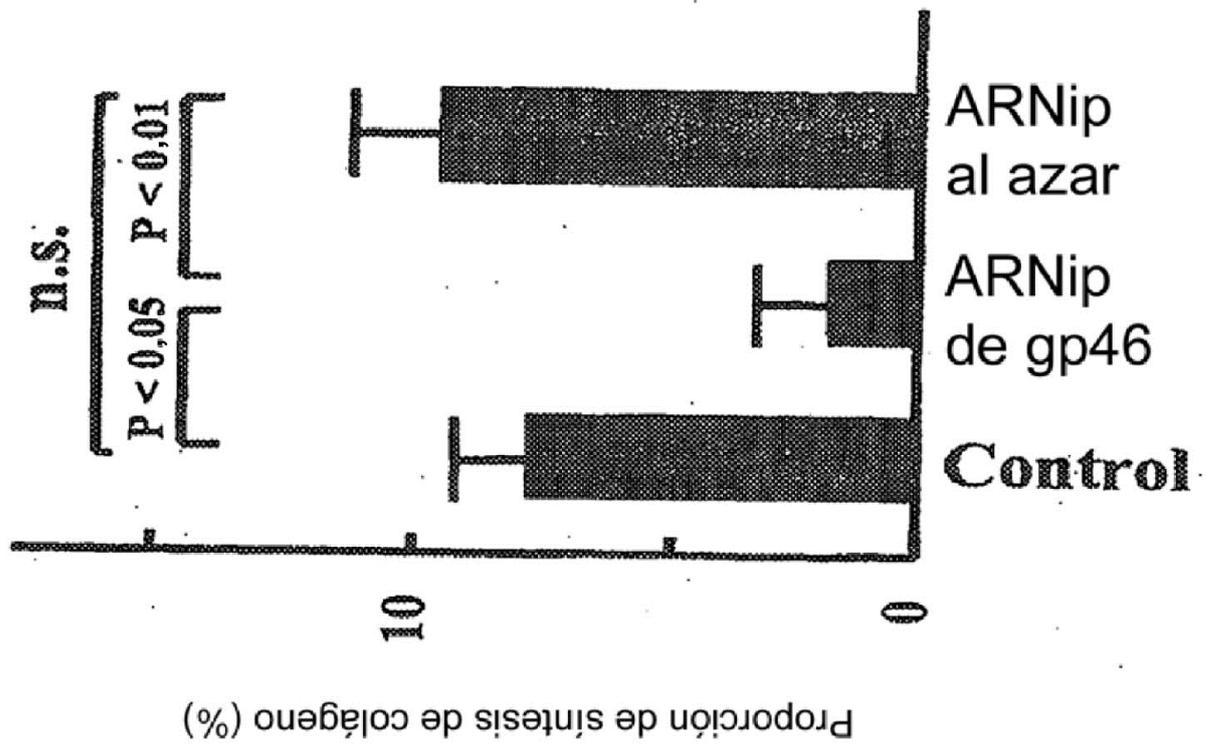
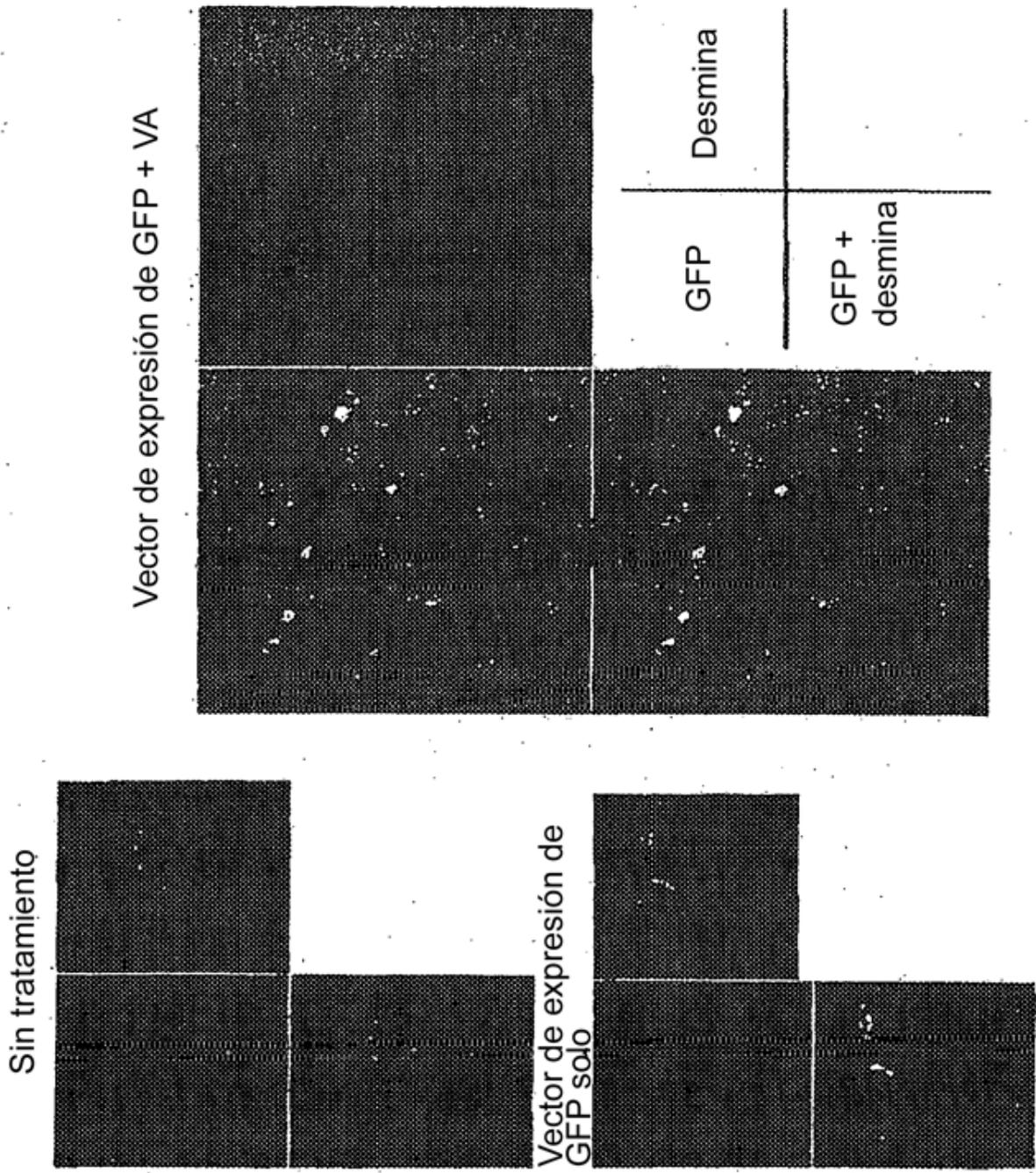


FIG. 6



**FIG. 7**

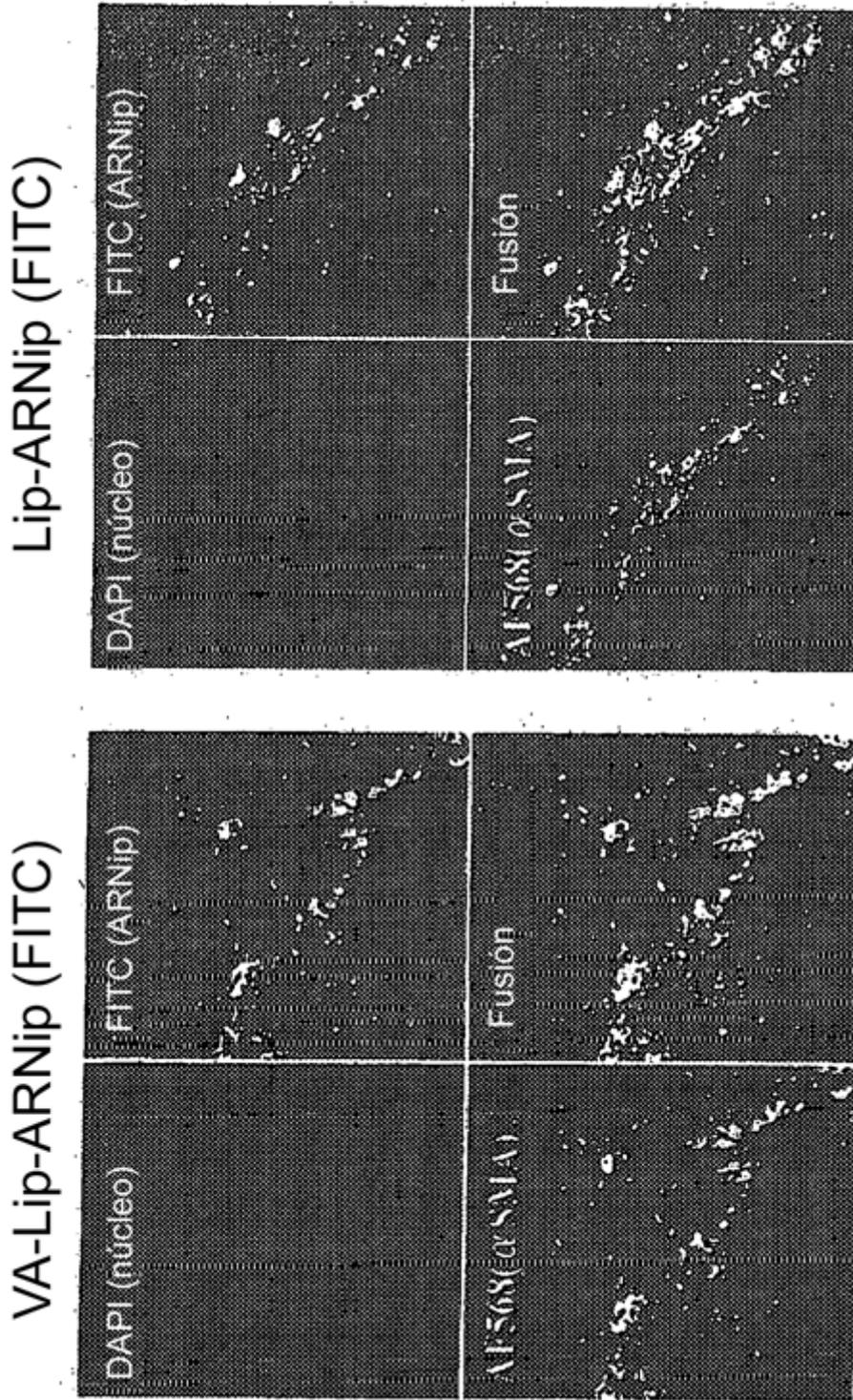
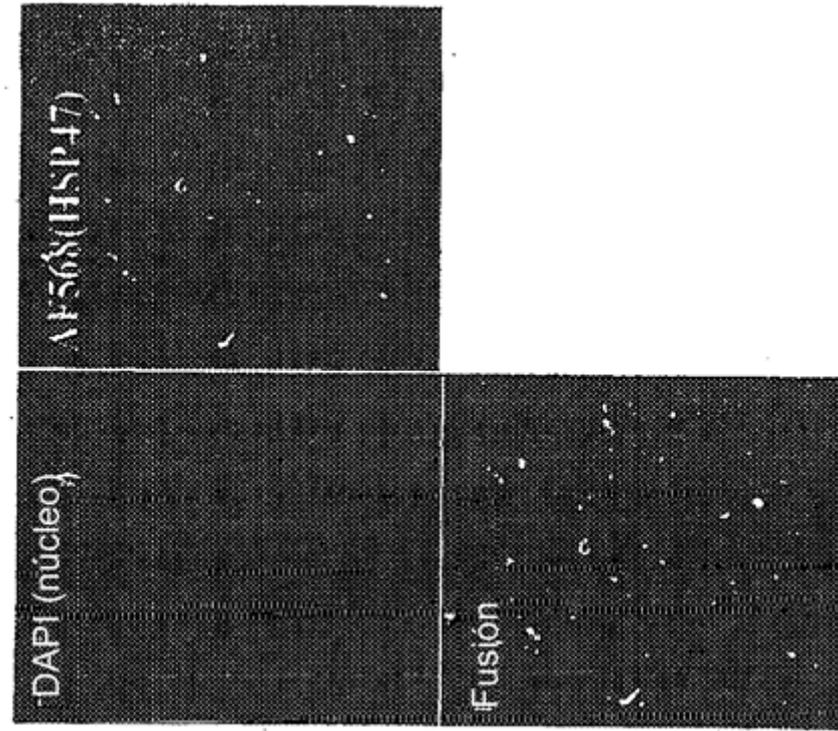


FIG. 8

VA-Lip-ARNip de gp46



VA-Lip-ARNip al azar

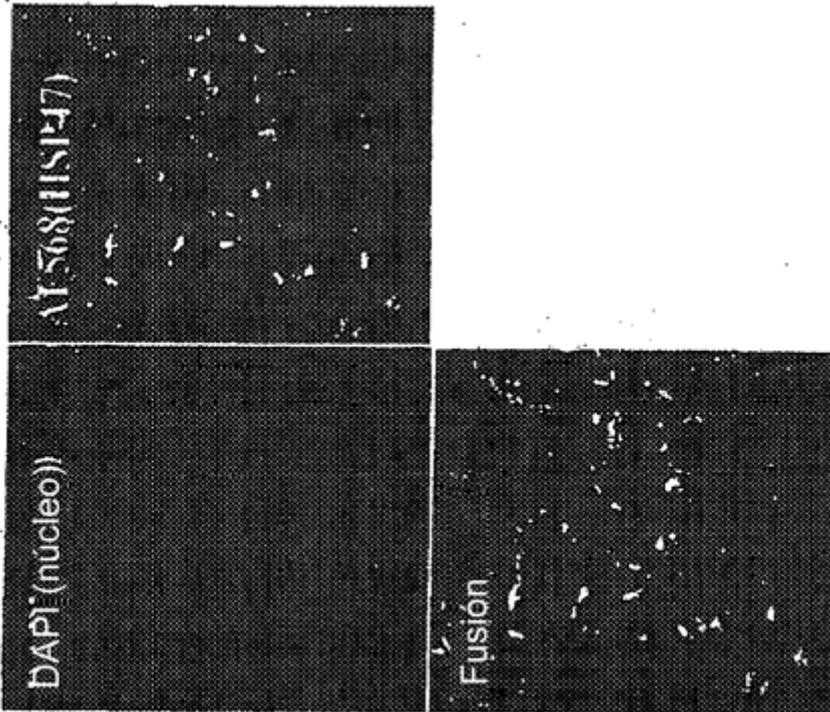


FIG. 9

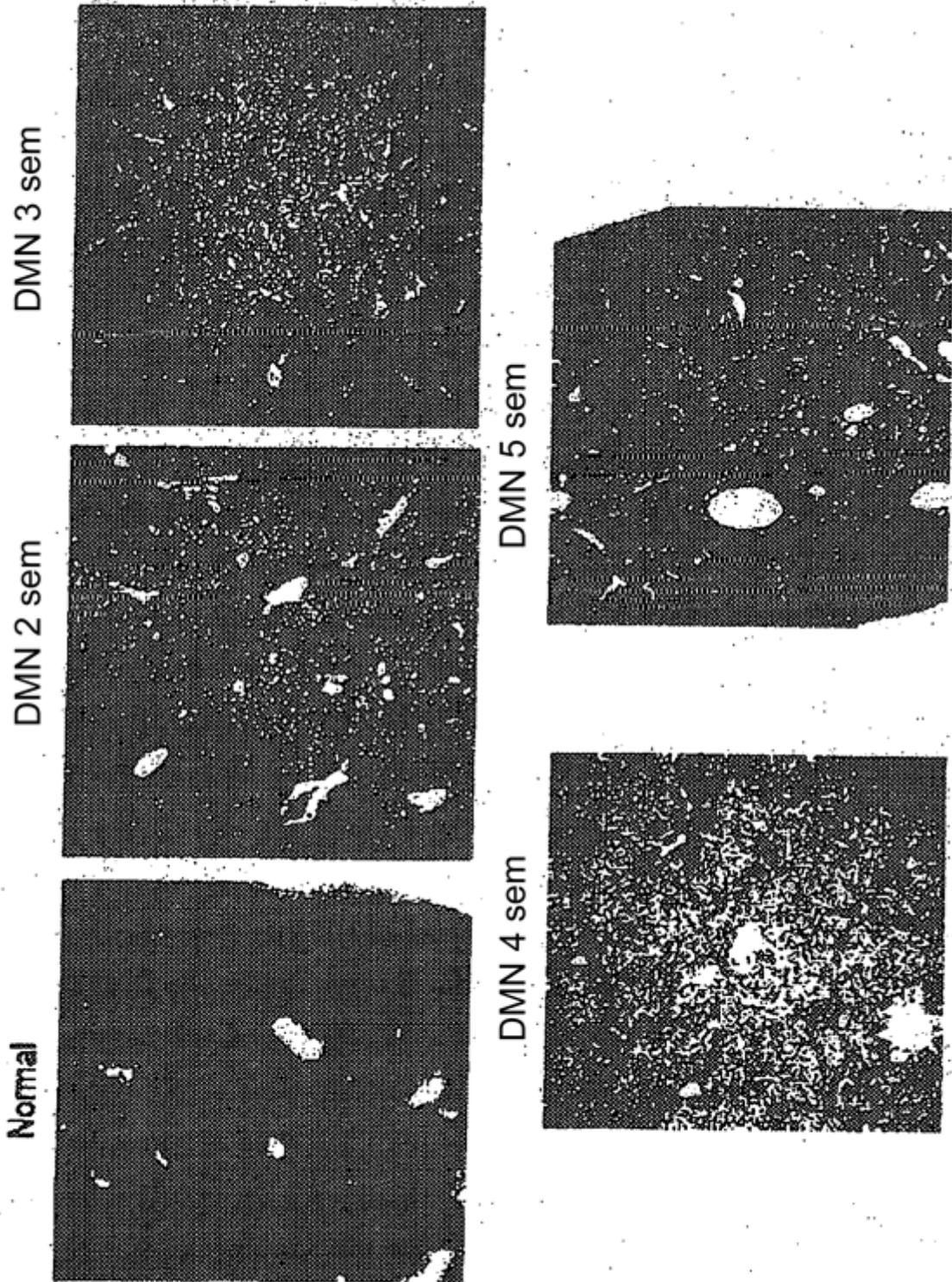


FIG. 10

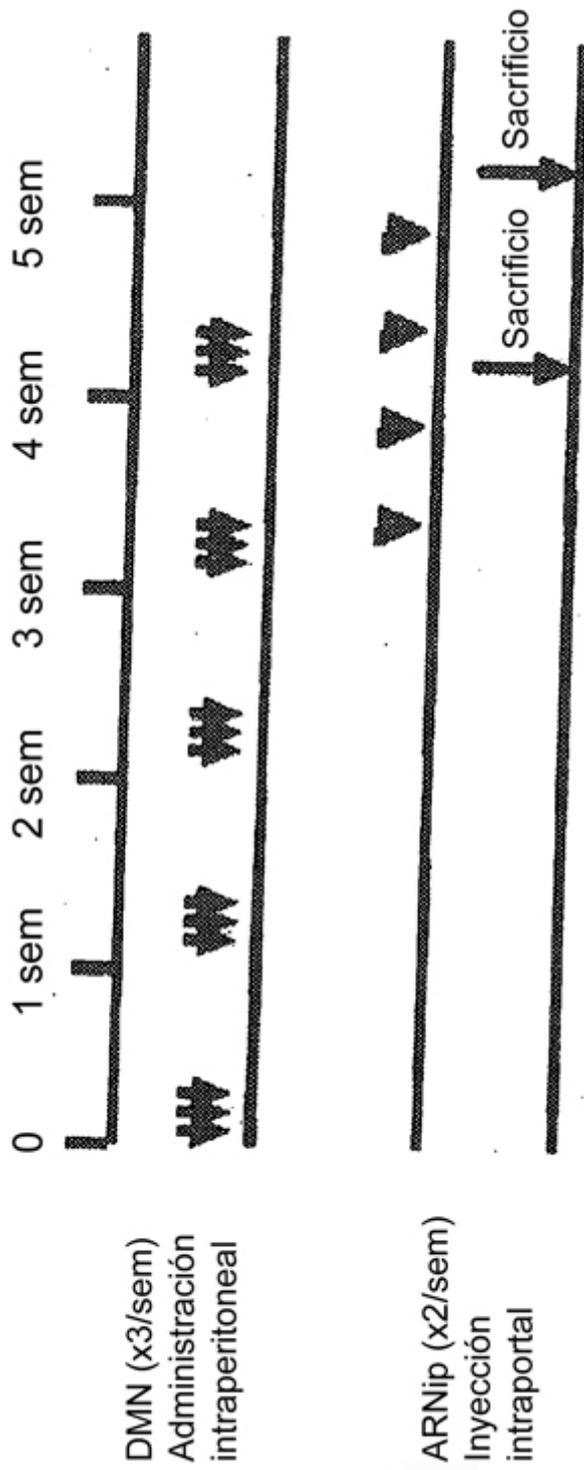


FIG. 11

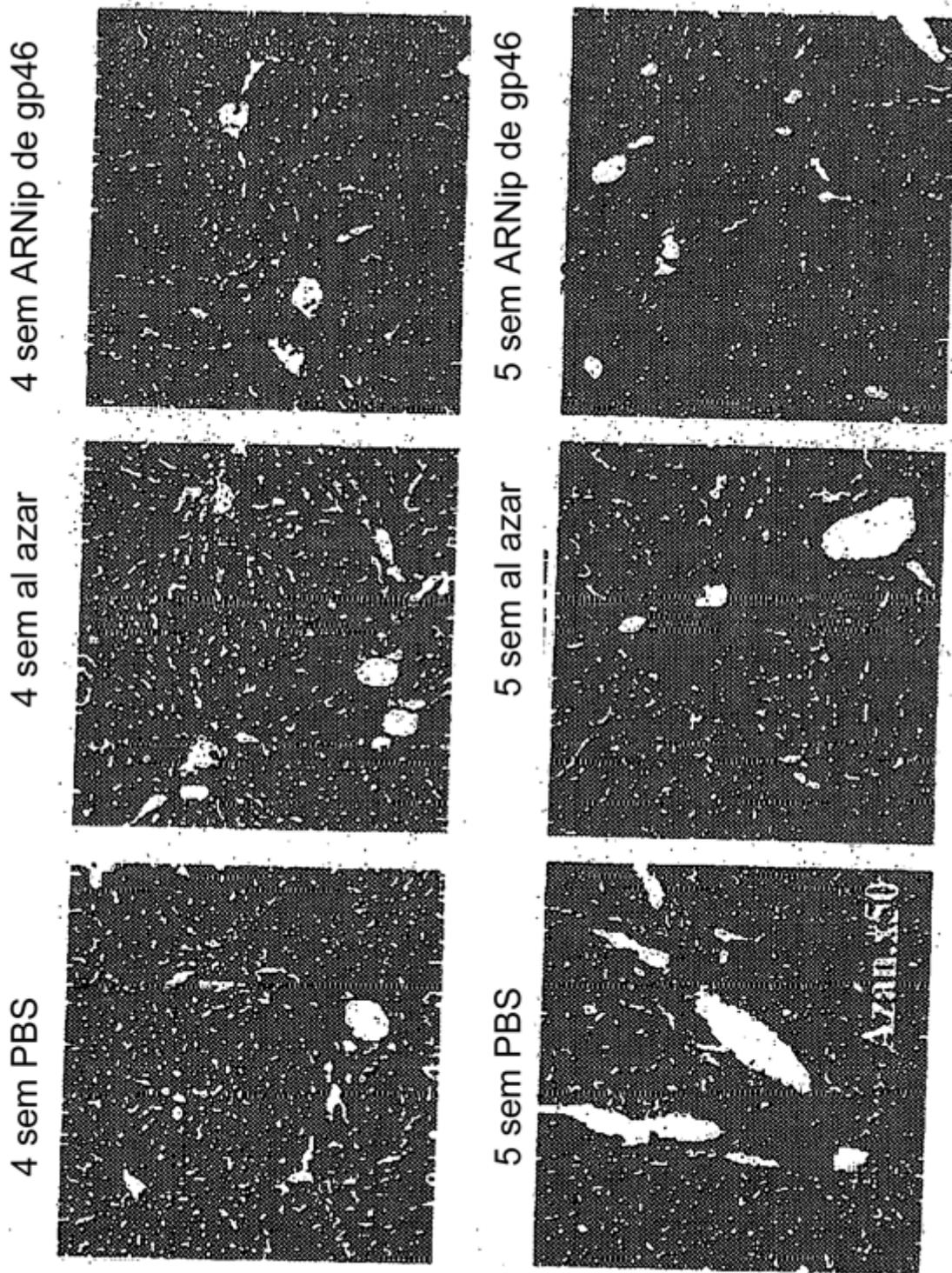
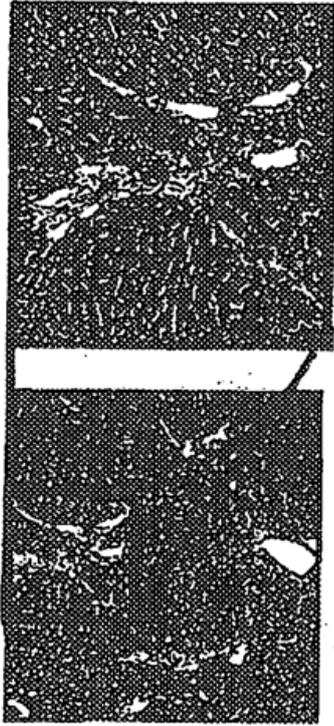


FIG. 12

Tinción con azán, imágenes  
obtenidas de 6 posiciones al azar



Azán.x50      Azán.x100



Medido escogiendo el área de  
colágeno azul usando NIH Image

FIG. 13

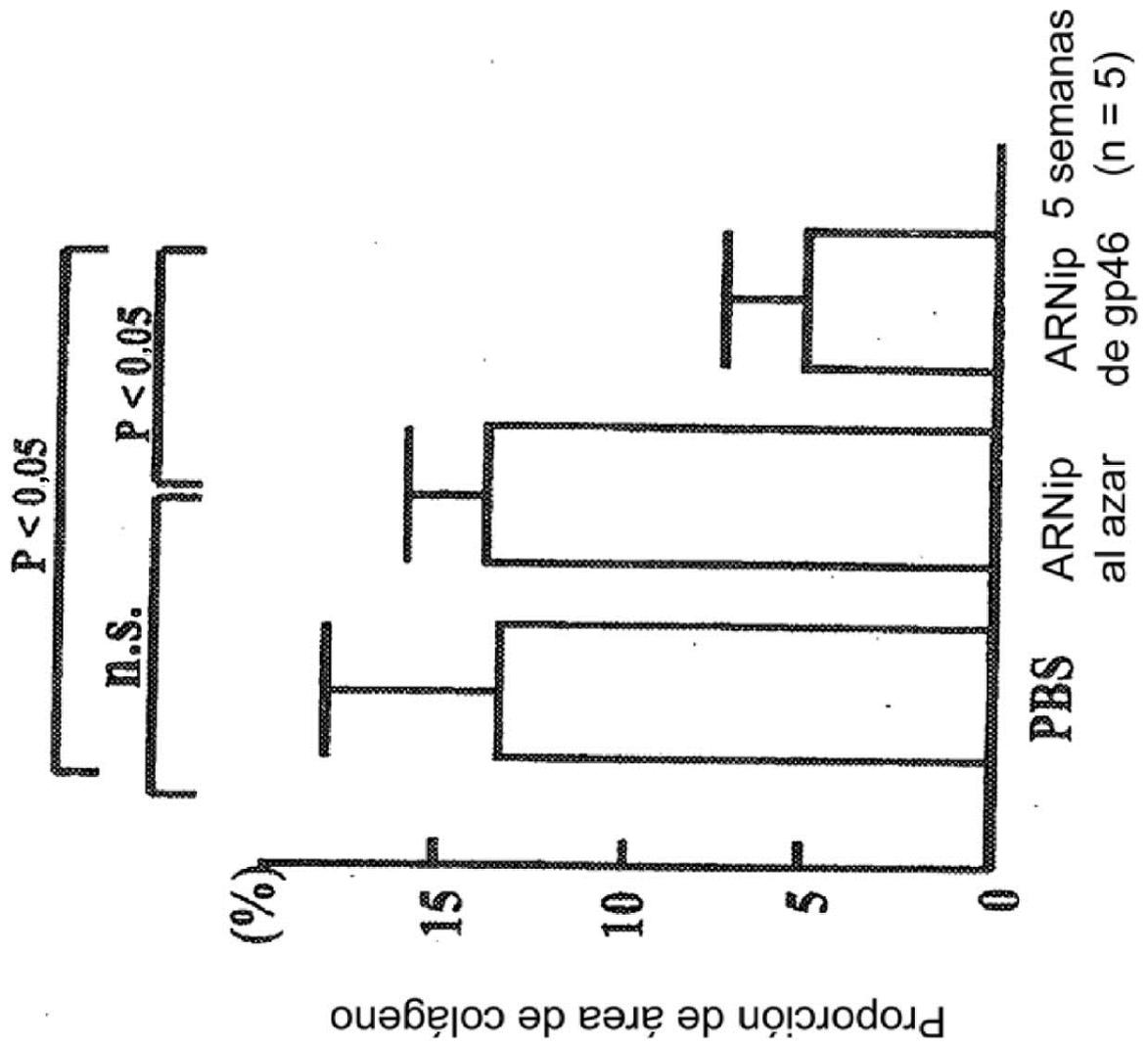


FIG. 14

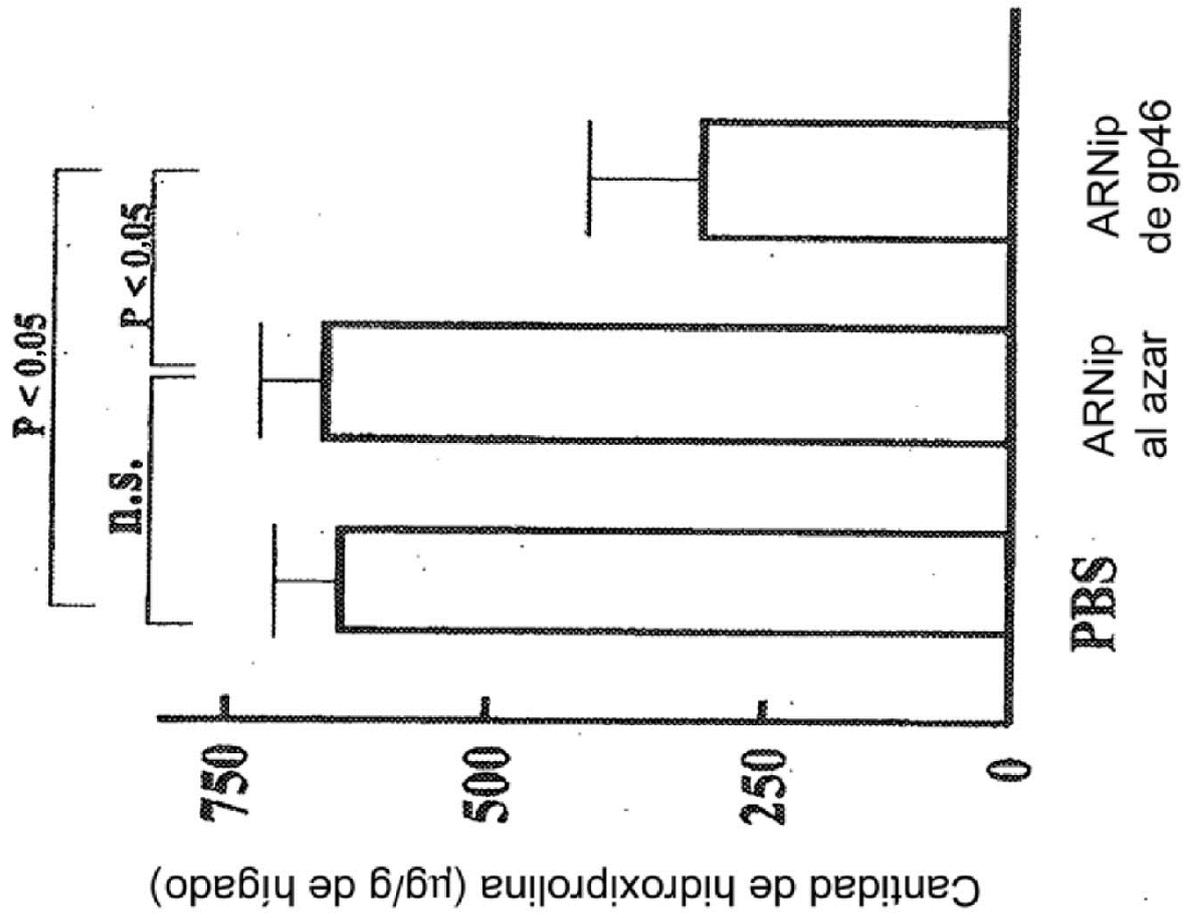


FIG. 15

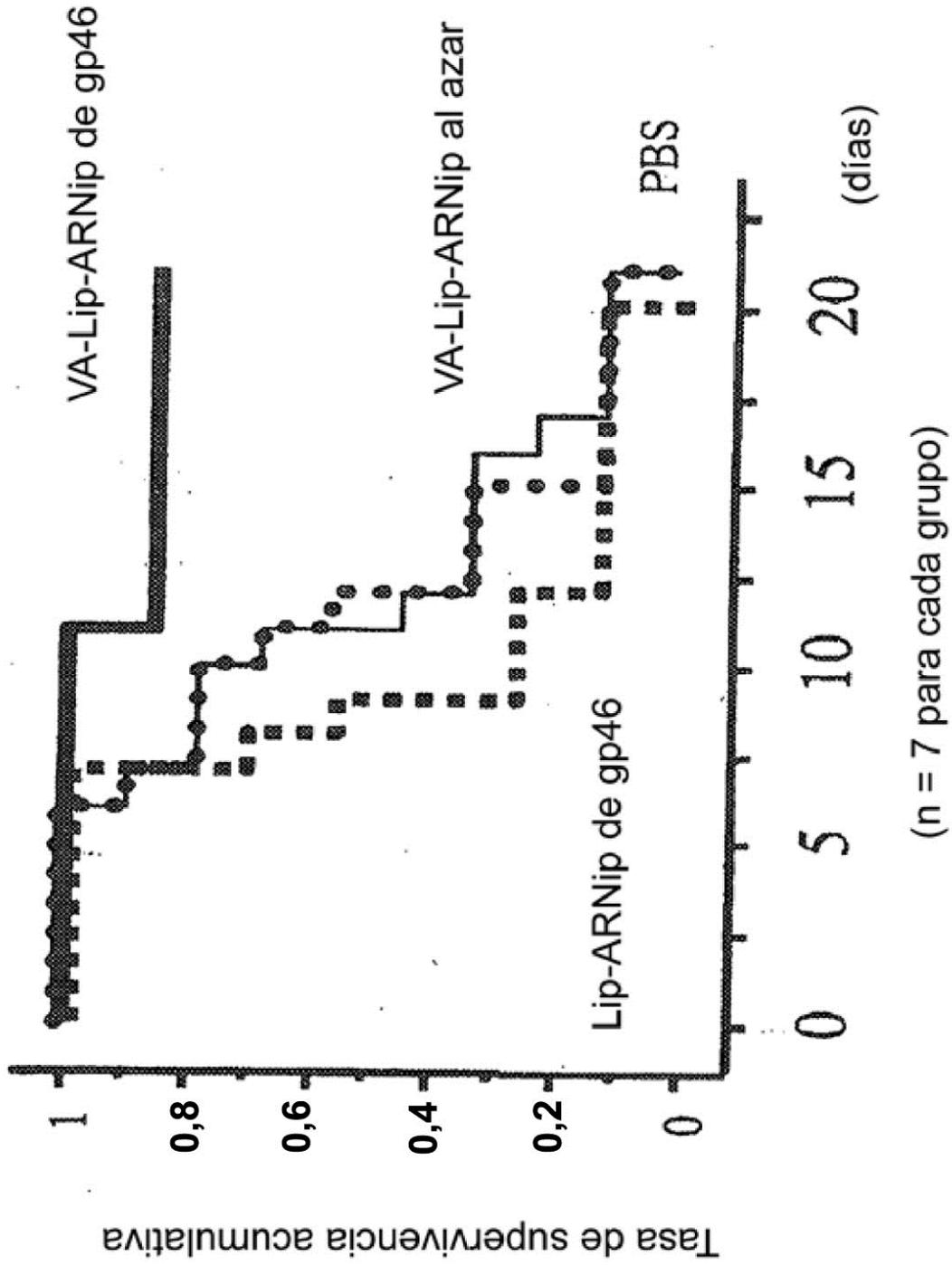


FIG. 16

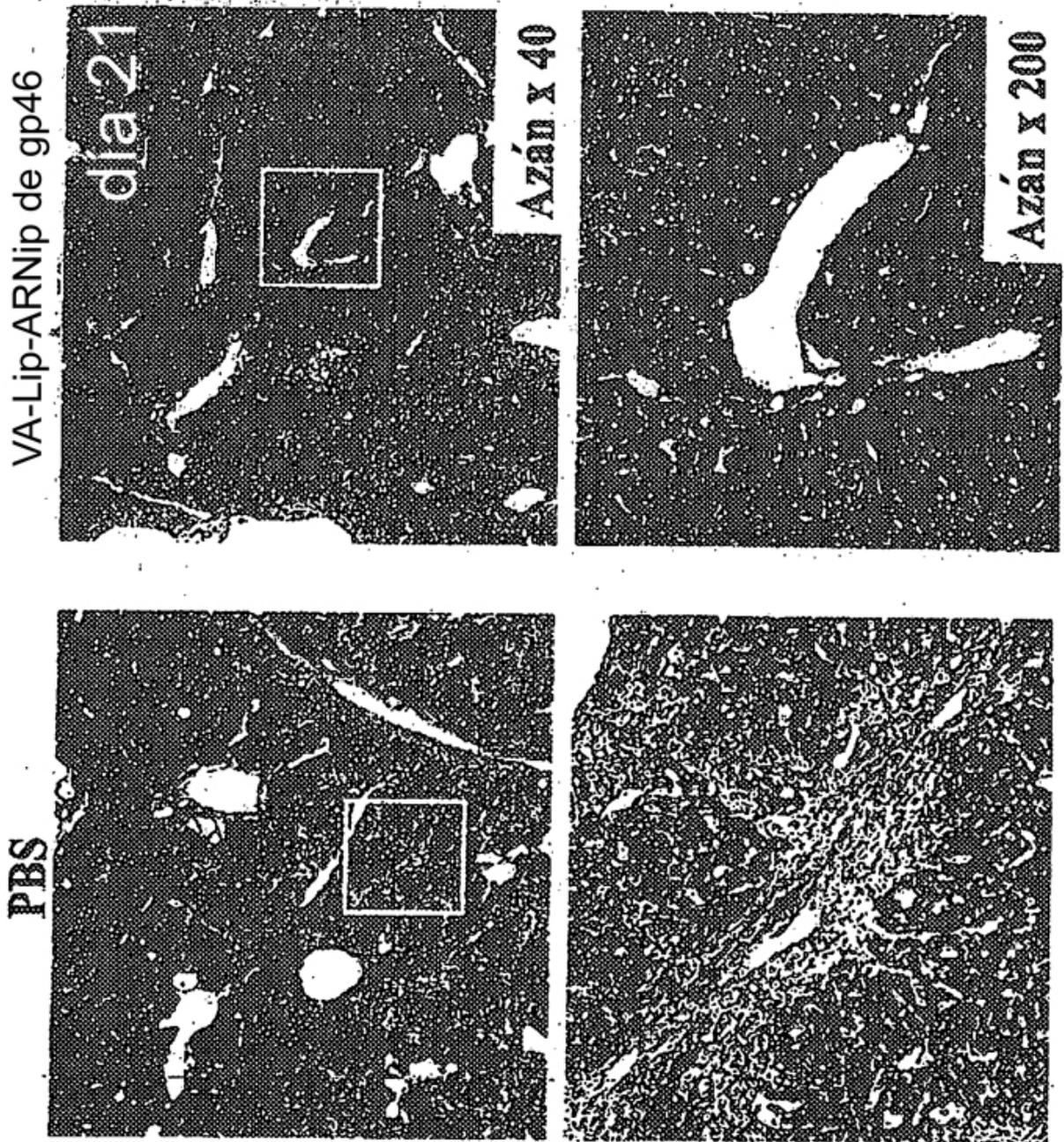


FIG. 17

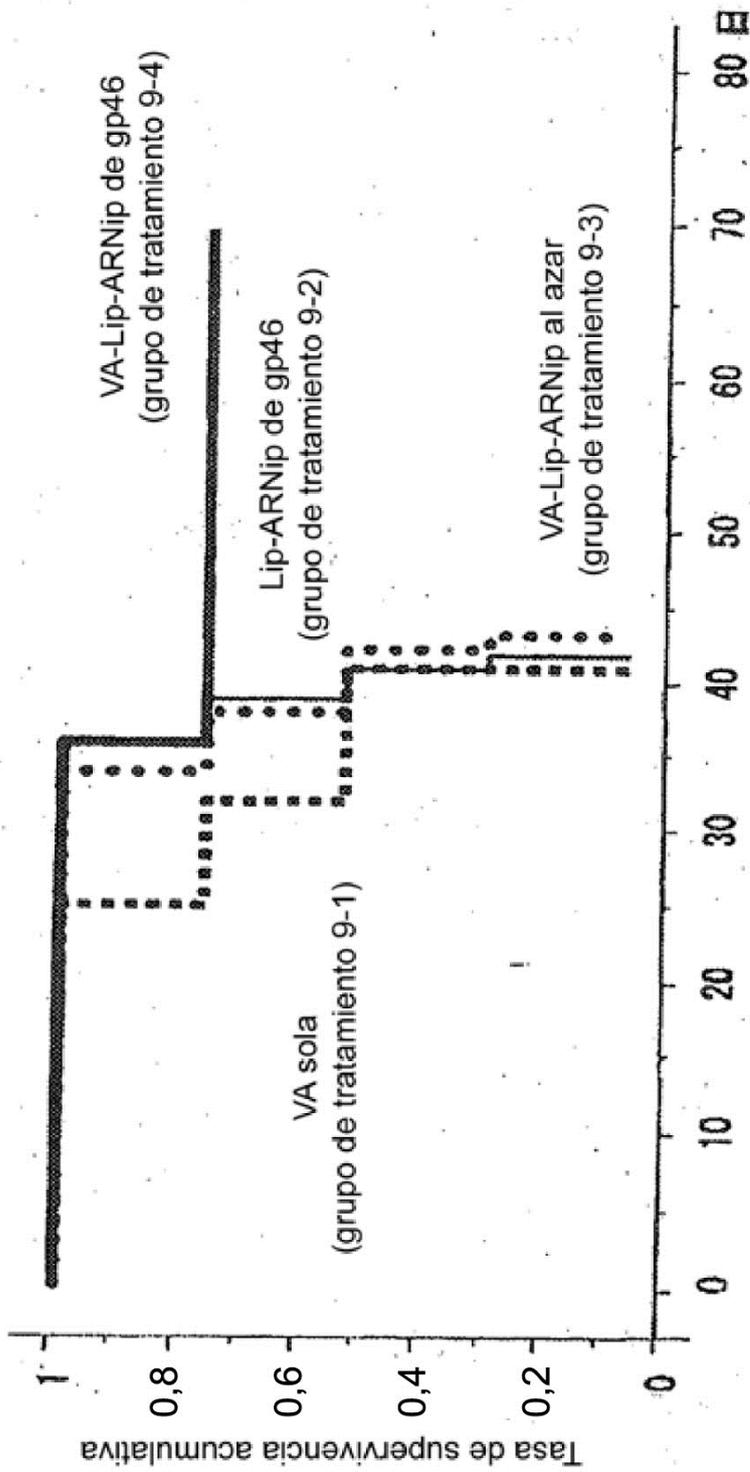


FIG. 18

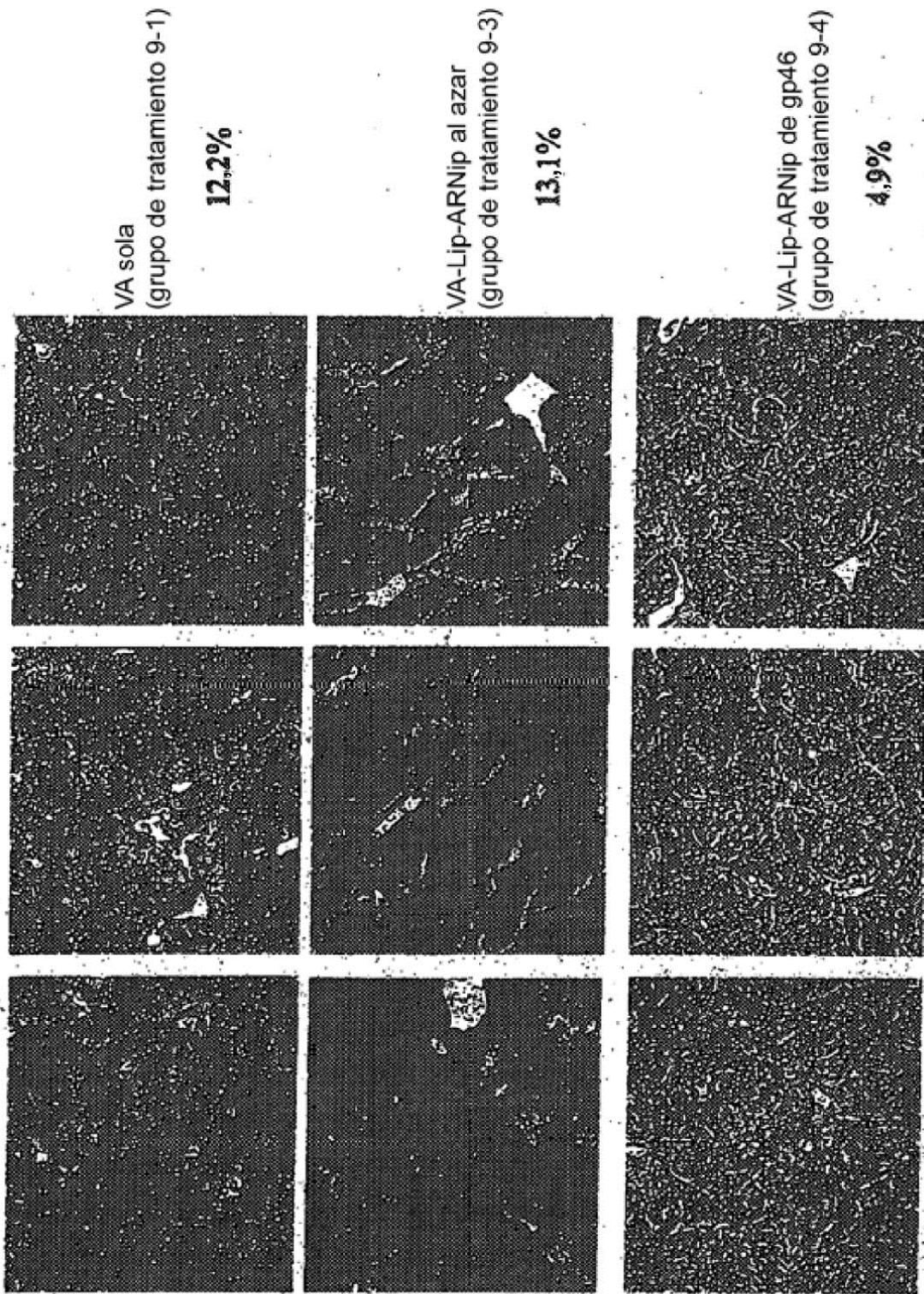


FIG. 19

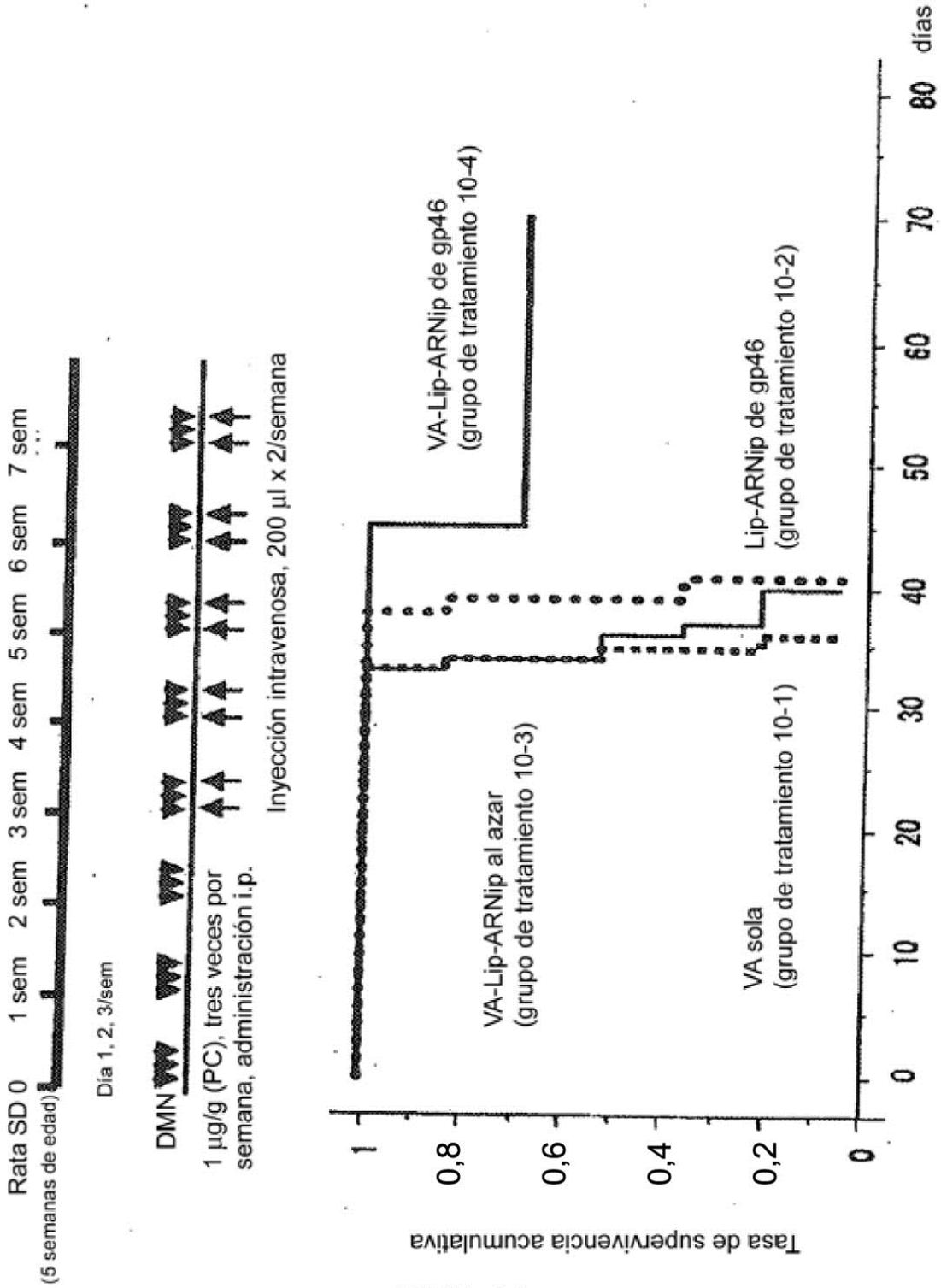


FIG. 20

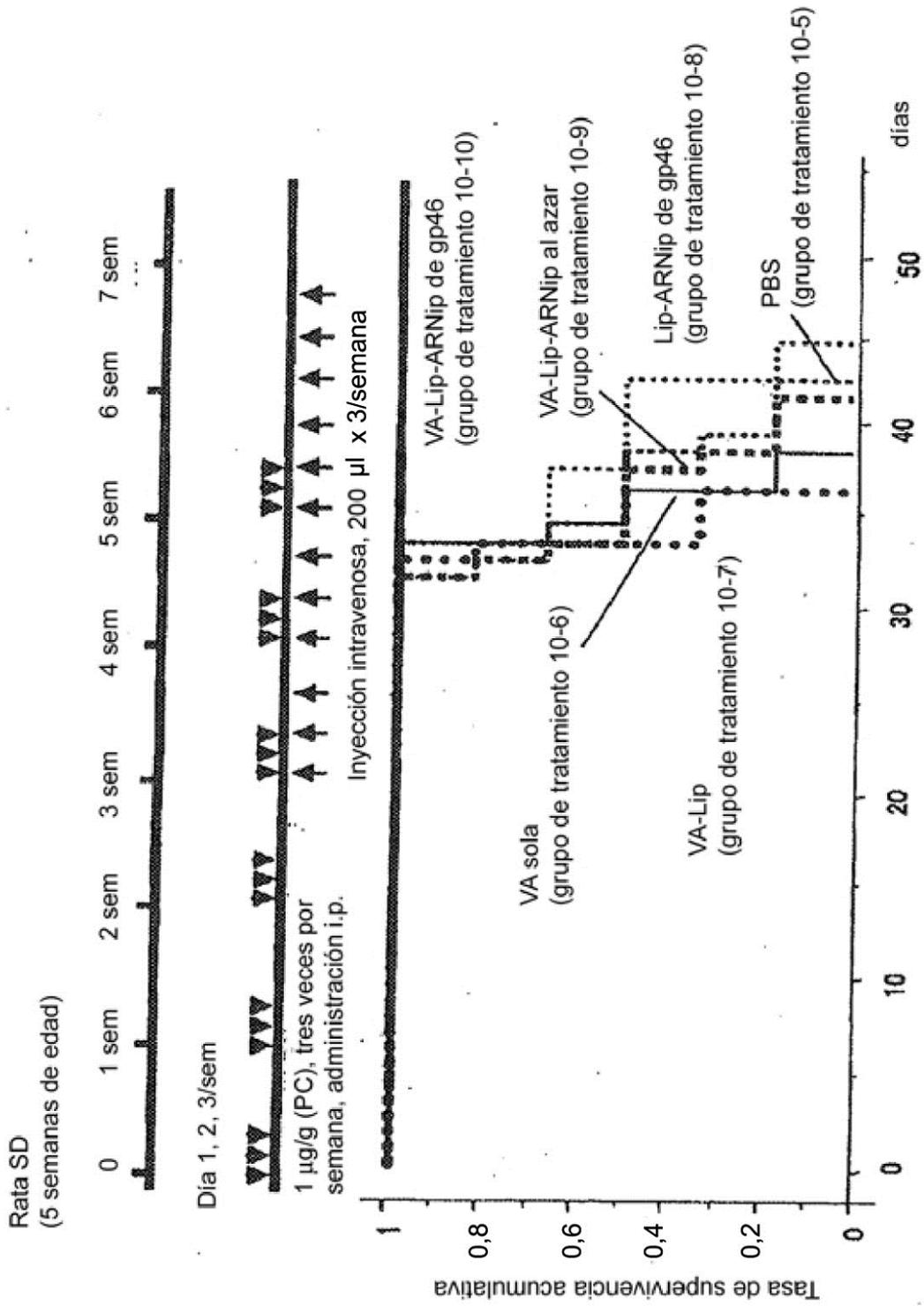
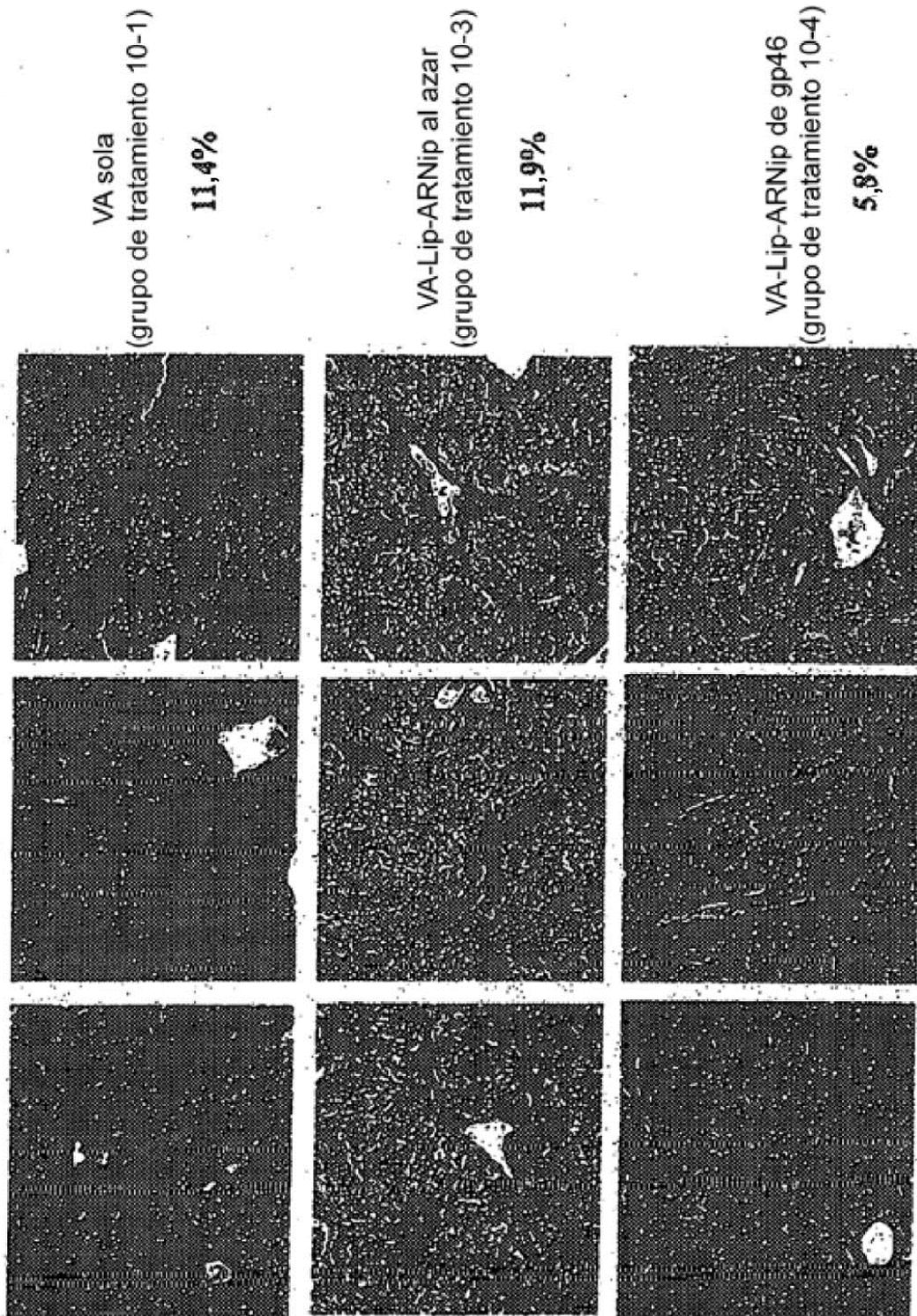


FIG. 21



**FIG. 22**

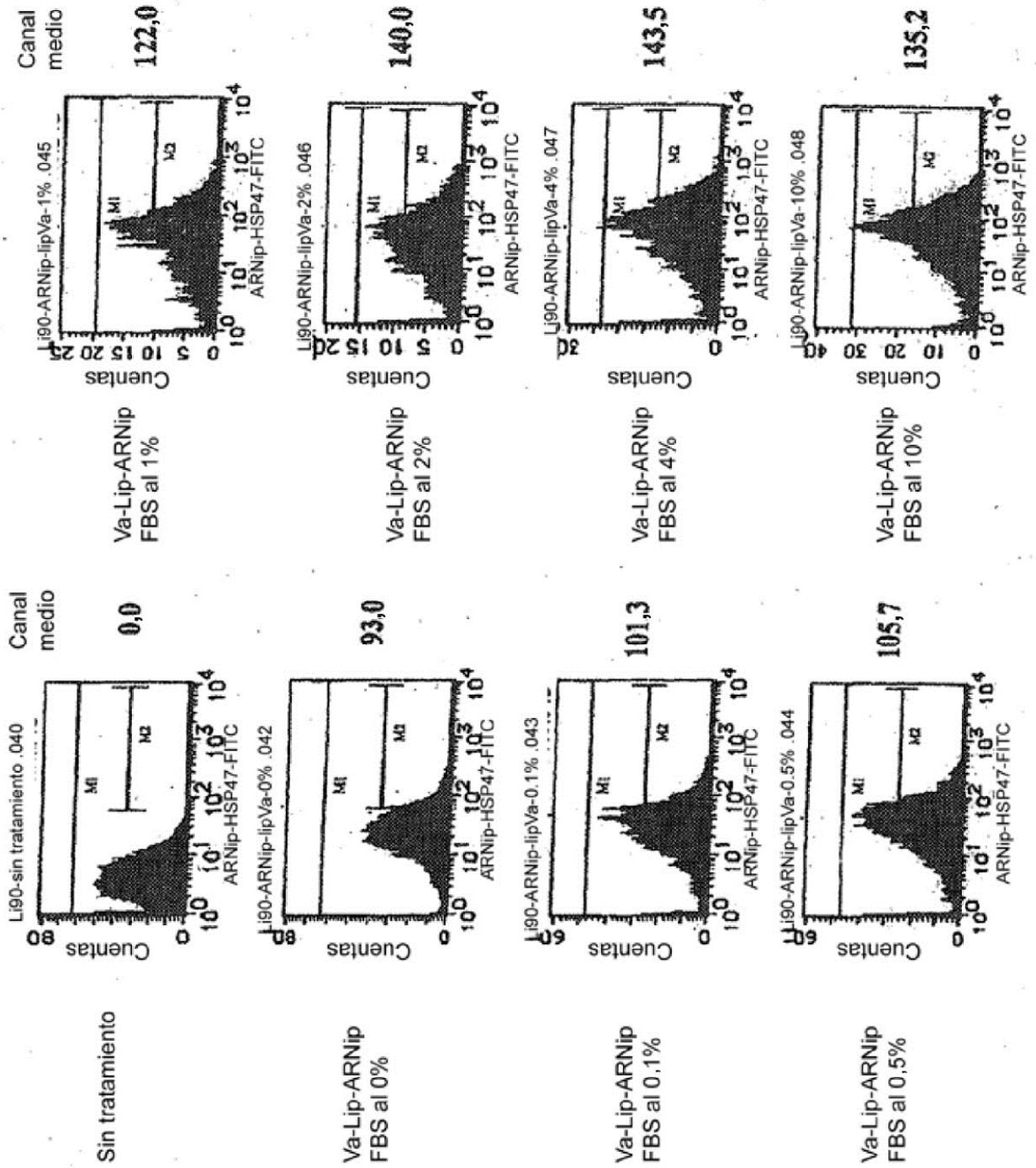


FIG. 23

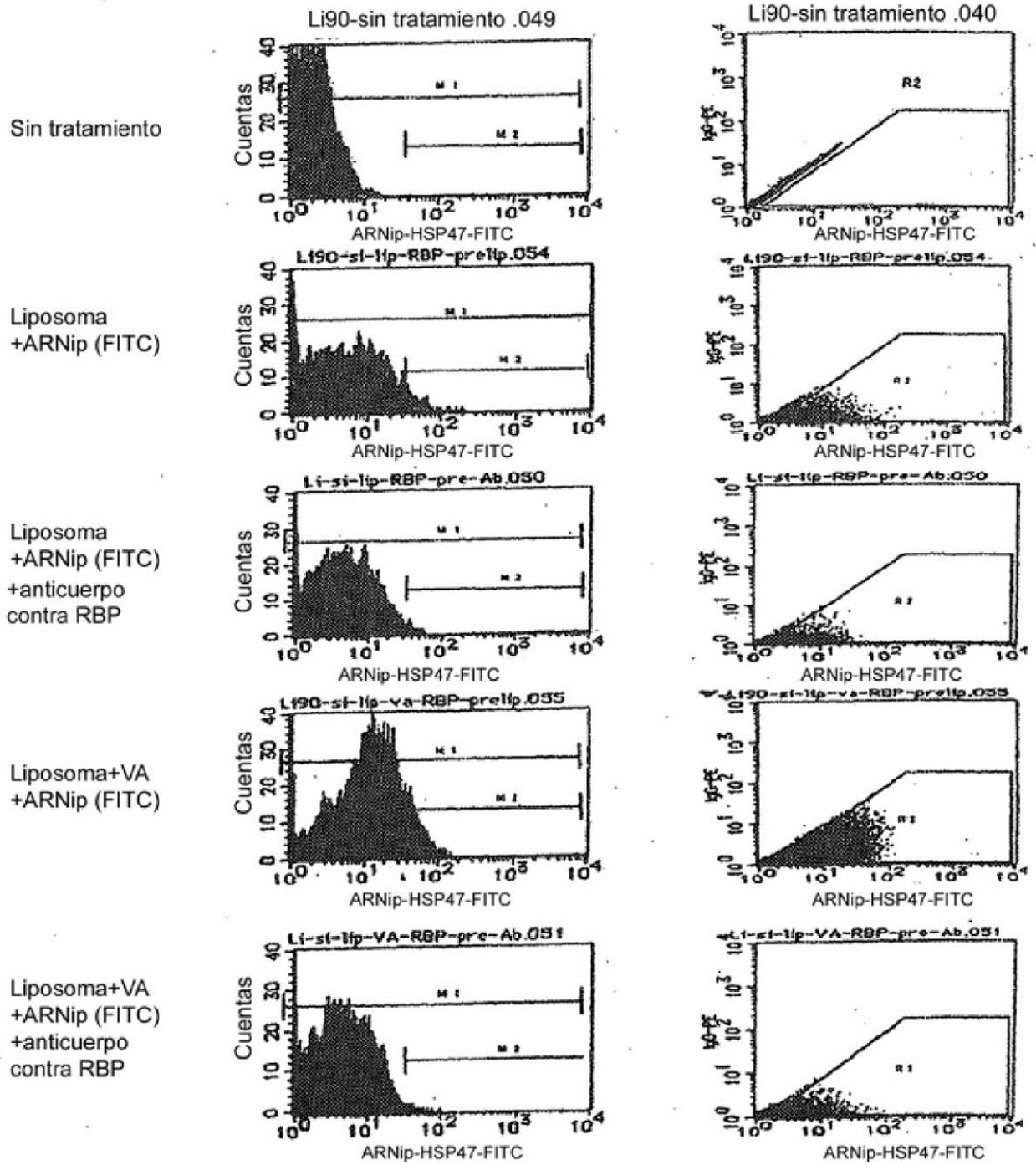
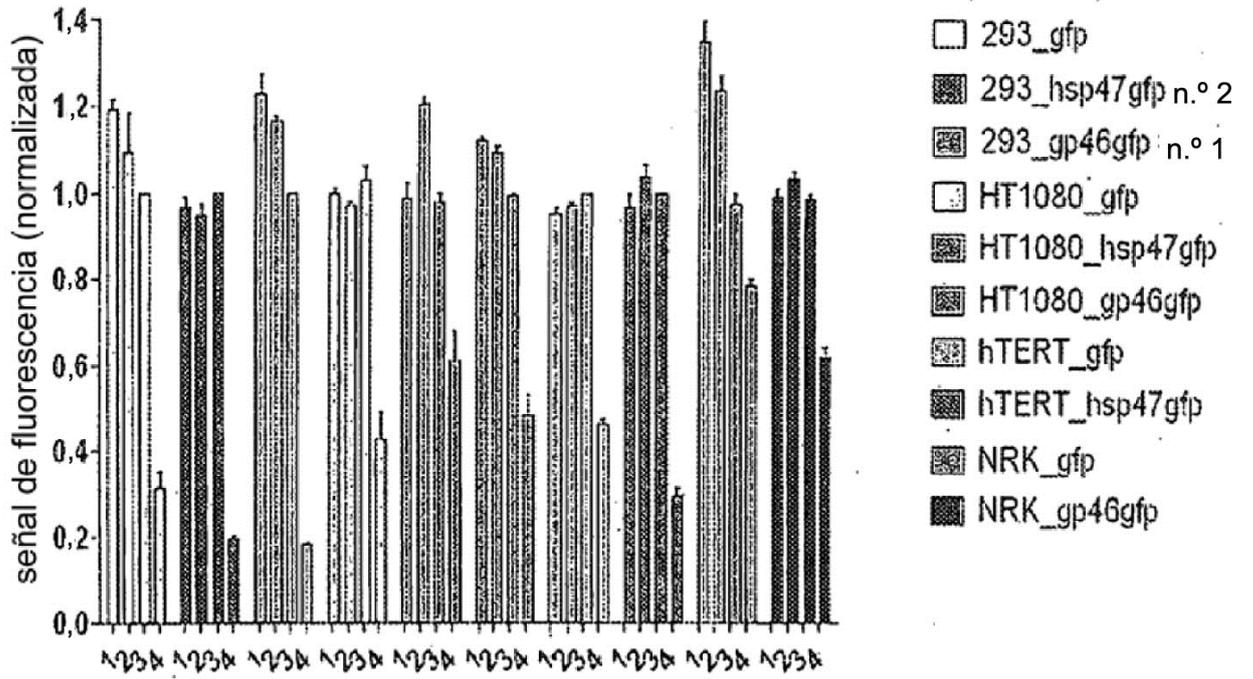


FIG. 24



Tratamiento:

1. sólo células
2. RNAiMAX
3. RNAiMAX + ARNip aleatorizado
4. RNAiMAX + siGFP

**FIG. 25**

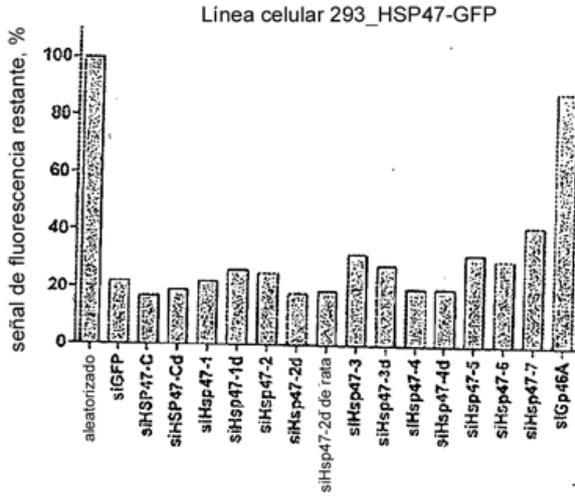


FIG. 26A

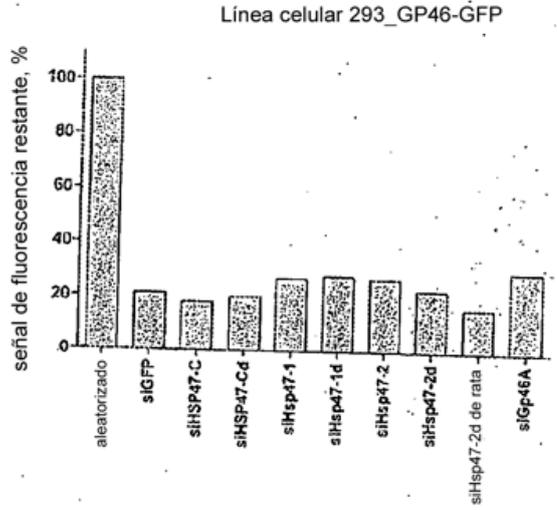


FIG. 26B

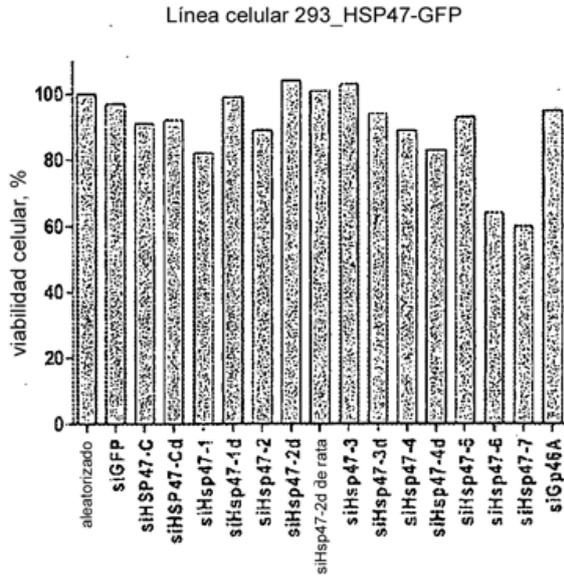


FIG. 26C

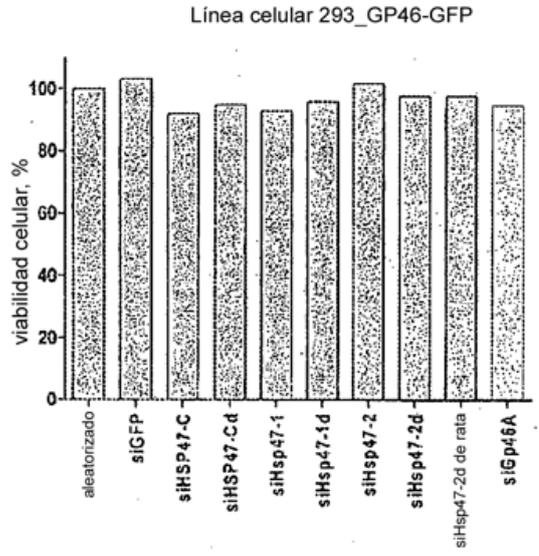
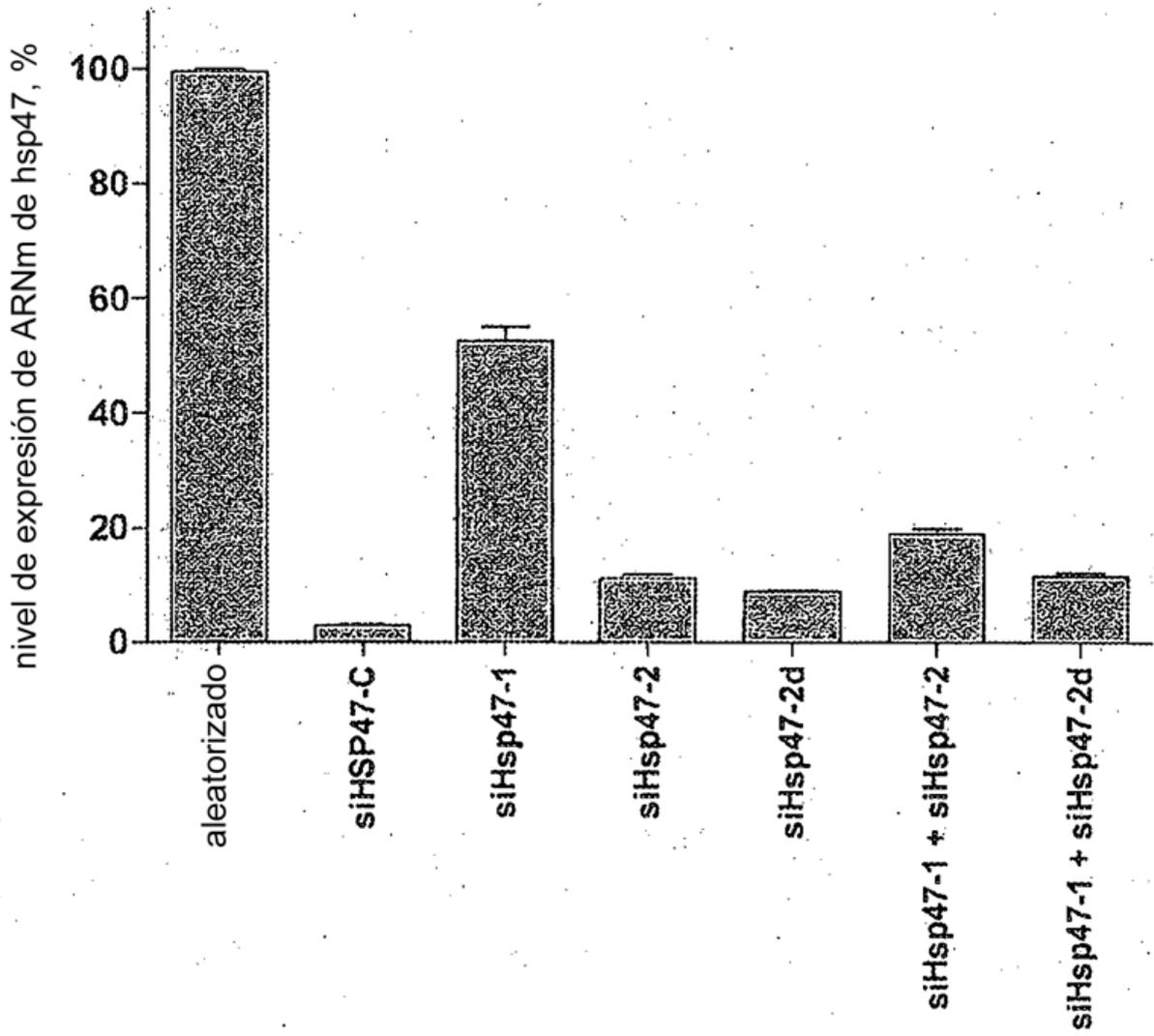


FIG. 26D



**FIG. 27**

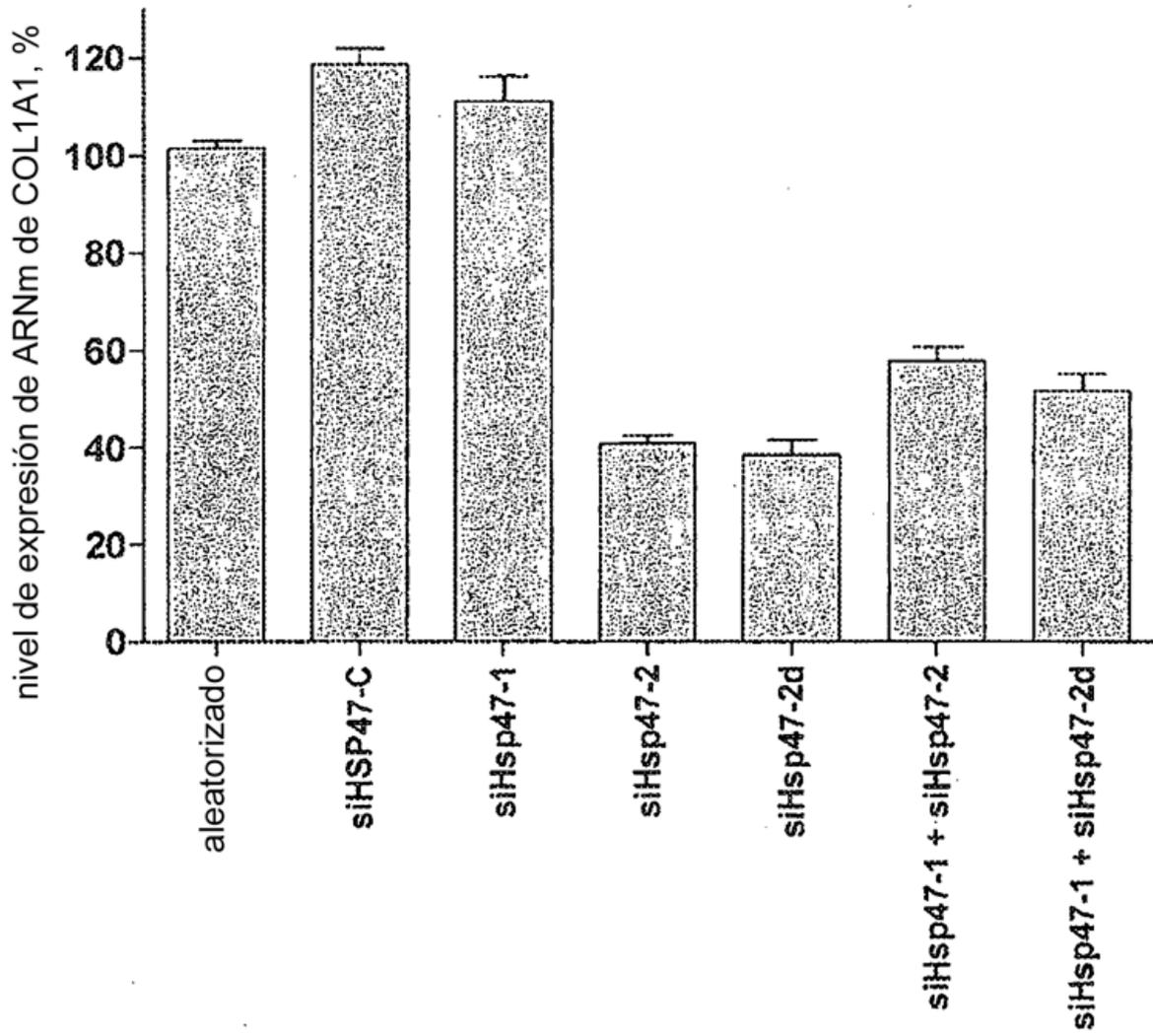


FIG. 28

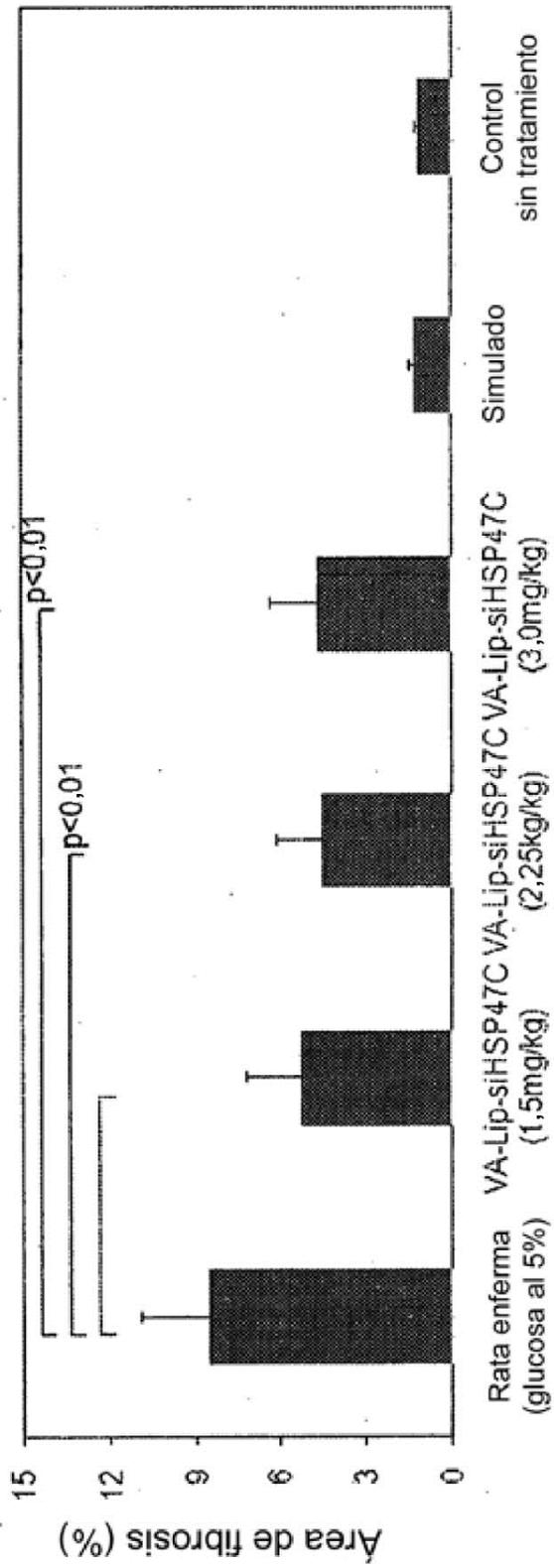


FIG. 29

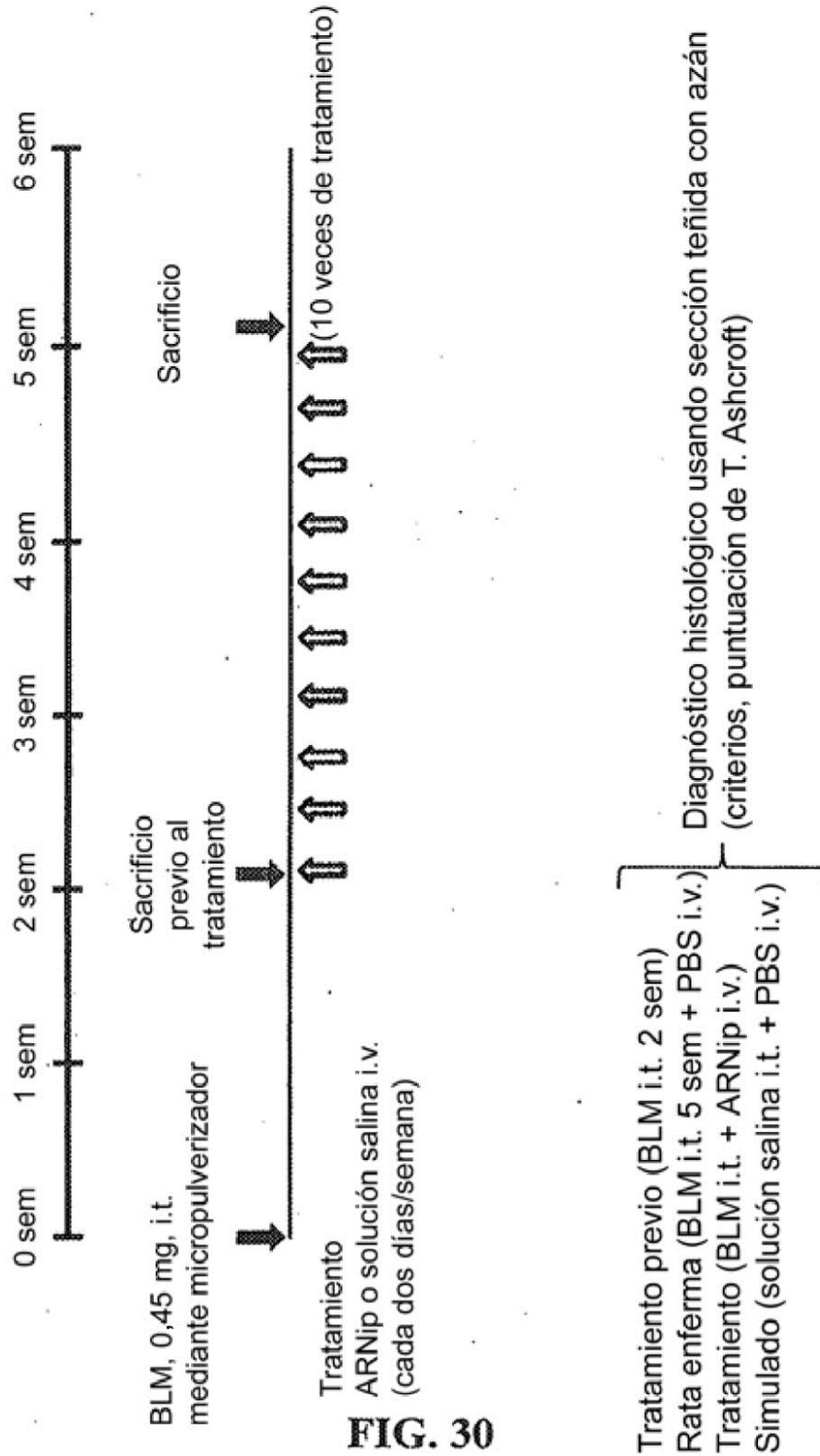
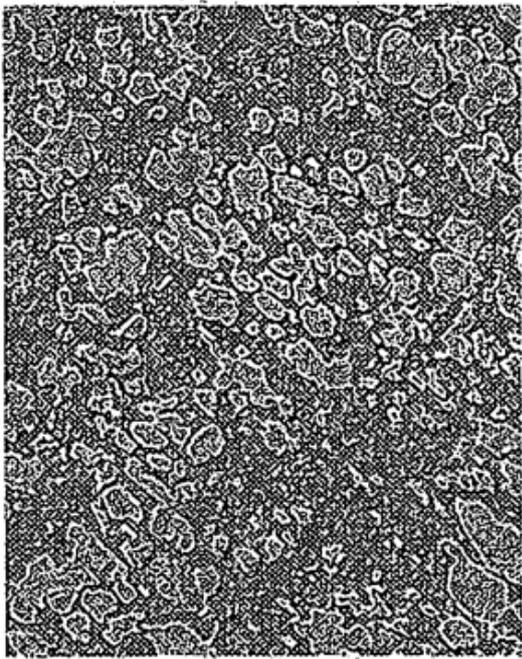
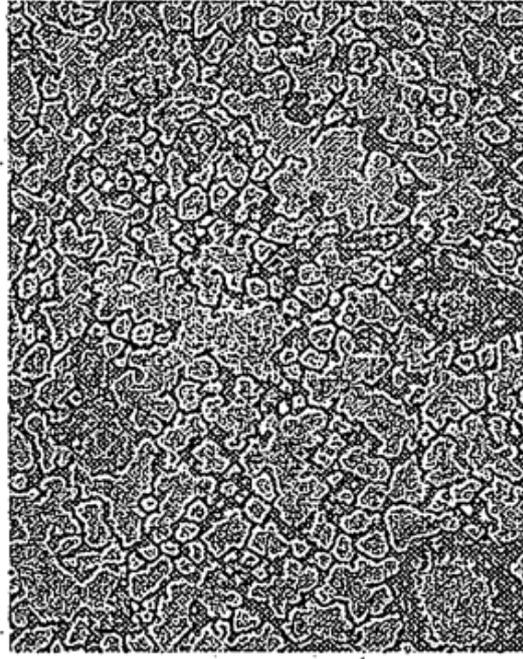


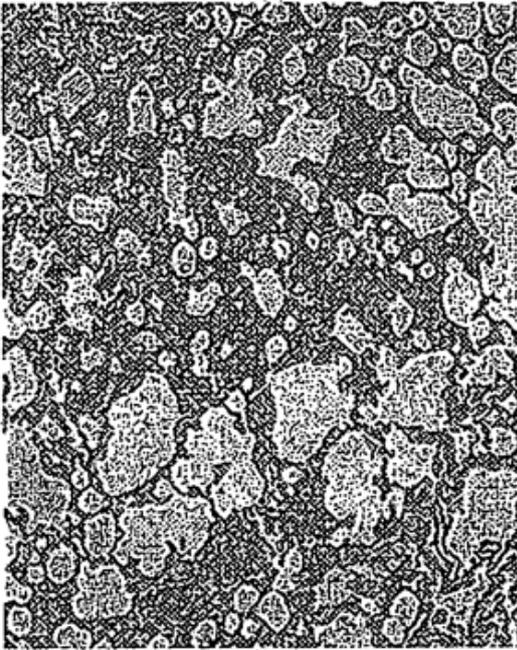
FIG. 30



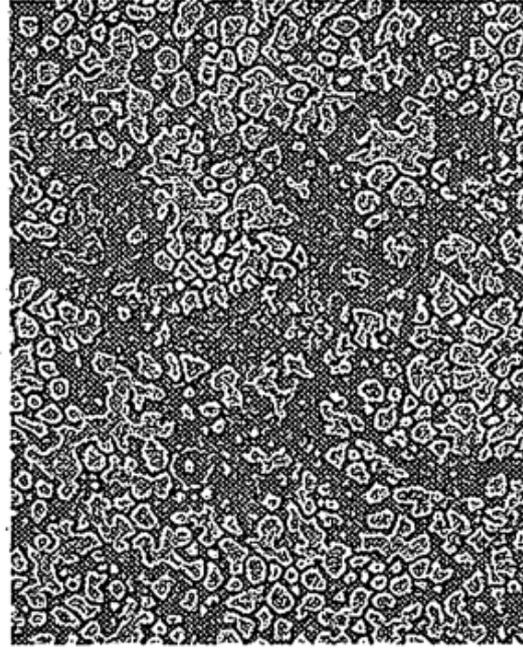
(b) Rata enferma



(d) Simulado



(a) Tratamiento previo



(c) Tratamiento

**FIG. 31**

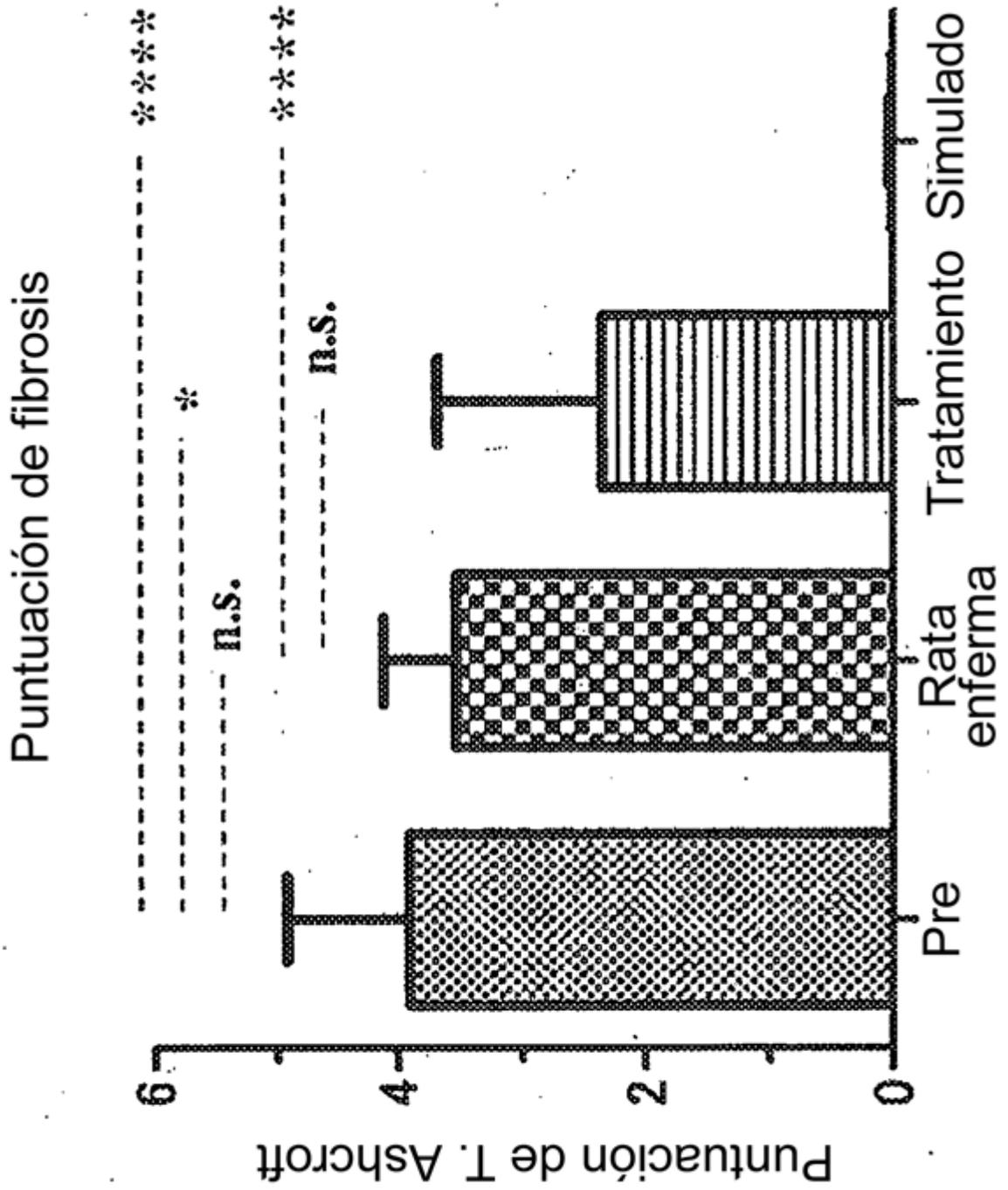


FIG. 32