



República Federativa do Brasil  
Ministério do Desenvolvimento, Indústria  
e do Comércio Exterior  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) PI 0712034-6 A2



(22) Data de Depósito: 18/05/2007  
(43) Data da Publicação: 10/01/2012  
(RPI 2140)

(51) Int.CI.:  
A61K 31/70

(54) Título: MODULAÇÃO DE RNAI DE AHA E USOS TERAPÉUTICOS DO MESMO

(30) Prioridade Unionista: 19/05/2006 US 60/801,840

(73) Titular(es): Alnylam Pharmaceuticals, Inc., The Scripps Research Institute

(72) Inventor(es): Birgit Bramlage, Hans-Peter Vornlocher, Pamela Tan, Rainer Constein, William Balch

(74) Procurador(es): Dannemann ,Siemsen, Bigler & Ipanema Moreira

(86) Pedido Internacional: PCT US2007069229 de 18/05/2007

(87) Publicação Internacional: WO 2007/137156de 29/11/2007

(57) Resumo: MODULAÇÃO DE RNAi DE AHA E USOS TERAPÉUTICOS DO MESMO. A presente presente invenção refere-se a um ácido ribonucléico bifilamentar (dsRNA) para inibir a expressão de um gene Aha (gene Ahal), compreendendo um filamento de antisentido tendo uma sequência de nucleotídeo que é menor que 30 nucleotídeos em comprimento, em geral 19-25 nucleotídeos em comprimento, e que é substancialmente complementar a pelo menos uma parte de um gene Aha. A invenção também refere-se a uma composição farmacêutica compreendendo o dsRNA junto com um veículo farmaceuticamente aceitável; métodos para tratar doenças causadas por expressão de Ahal e a expressão de um gene Aha usando a composição farmacêutica; e métodos para inibir a expressão de um gene Aha em uma célula.

*éóptico*

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "MODULAÇÃO DE RNAi DE Aha E USOS TERAPÊUTICOS DO MESMO".

CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção concerne a métodos de tratamento usando moduladores do Ativador do gene da ATPase da Proteína de Choque Térmico 90 (Aha). Mais especificamente, a invenção concerne a métodos de tratar distúrbios associados à atividade indesejada de Aha, administrando RNA de interferência curto que infra-regula a expressão de Aha, e agentes úteis neste.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

Ativador da ATPase 1 da Proteína de Choque Térmico 90 (aqui: Aha1) é um ativador da atividade de ATPase da Hsp90 e é capaz de estimular a atividade inerente de Hsp90 de levedura por 12 vezes e Hsp90 humana por 50 vezes (Panaretou, B. et al., Mol. Cell 2002, 10:1307–1318). Estudos bioquímicos mostraram que Aha1 liga à região mediana de Hsp90 (Panaretou et al., 2002, supra, Lotz, G. PÁG., et al., J. Biol. Chem. 2003, 278:17228–17235), e recentes estudos estruturais do complexo de núcleo de Aha1-Hsp90 sugerem que a co-chaperona promova uma troca conformacional na alça catalítica do segmento mediano (370–390) de Hsp90 que libera o Arg380 catalítico e facilita sua interação com a ATP no domínio de ligação de nucleotídeo N-terminal (Meyer, P. et al., EMBO J. 2004, 23:511–519).

A proteína de choque térmico da chaperona molecular 90 (Hsp90) é responsável pela ativação in vivo ou maturação das proteínas clientes específicas (Picard, D., Cell Mol. Life Sci. 2002, 59:1640–1648; Pearl, L. H., e Prodromou, C., Adv. Protein Chem. 2002, 59:157–185; Pratt, W. B., e Toft, D. O., Exp. Biol. Med. 2003, 228:111–133; Prodromou, C., e Pearl, L. H., Curr. Cancer Drug Targets 2003, 3:301–323). Crucial para tal ativação é a atividade essencial de ATPase da Hsp90 (Panaretou, B., et al., EMBO J. 1998, 17:4829–4836), que dirige um ciclo conformacional que envolve associação transiente dos domínios de ligação de nucleotídeo N-terminais dentro do dímero de Hsp90 (Prodromou, C., et al., EMBO J. 2000, 19:4383–4392).

Semelhante a uma chaperona molecular, HSP90 promove a maturação e mantém a estabilidade de um número grande de proteínas clientes conformacionalmente lábeis, a maioria destas está envolvida em processos biológicos que são frequentemente desordenados dentro das células tumorais, tais como transdução de sinal, progressão do ciclocelular e apoptose. Como resultado, e em contraste com outras terapêuticas alvejadas moleculares, os inibidores de HSP90 alcançam atividade anticâncer promissora mediante o rompimento simultâneo de muitos substratos oncogênicos dentro das células cancerosas (Whitesell L, e Dai C., Future Oncol. 2005; 1:529-540; WO 03/067262). Além disso, HSP90 tem estado implicada na degradação do Regulador de Condutância de Transmembrana de Fibrose Cística (CFTR). Mutações no gene de CFTR levam ao dobramento defeituoso e ubiquinação da proteína como consequência da atividade de ATPase da HSP90. Seguindo ubiquitinação, CFTR é degradado antes de poder alcançar seu sítio de atividade. Carência de CFTR ativo depois leva ao desenvolvimento de fibrose cística em sujeitos humanos tendo tal mutação. Portanto, a inibição da atividade de HSP90 pode ser benéfica para sujeitos sofrendo de câncer ou Fibrose Cística.

Hsp90 constitui cerca de 1-2% de proteína celular total (Pratt, 20 W. B., Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 1997, 37:297-326), e a inibição de tais quantidades grandes de proteína por meio de um antagonista ou inibidor potencialmente requereria a introdução de quantidades excessivas do inibidor ou antagonista em uma célula. Um método alternativo é a inibição de ativadores da atividade de ATPase da HSP90, tais como Aha1, que estão 25 presentes em quantidades menores. Infra-regulando a quantidade de Aha1 presente na célula, a atividade de HSP90 pode ser substancialmente diminuída.

Homologia de sequência significativa existe entre Aha 1 de Homo sapiens (NM\_012111.1), Mus musculus (NM\_146036.1) e Pan troglodytes (XM\_510094.1). Um homólogo de Aha 1 de Rattus norvegicus claro não foi identificado; porém, há um gene de Rattus norvegicus (XM\_223680.3) que foi denominado homólogo do ativador da proteína de choque térmico

ATPase 2 (Ahsa 2) em base de sua homologia de sequência à Ahsa 2 de levedura. Sua sequência é homóloga ao gene 1110064P04 de cDNA de RIKEN de *Mus musculus* (NM\_172391.3) que é por sua vez similar em sequência a Aha 1 de *Mus musculus* com exceção da mutilação N-terminal.

5 Um Ahsa 2 de *Homo sapiens* (NM\_152392.1) foi também prognosticado, mas homologia de sequência é limitada. As funções destes três genes posteriores não foram suficientemente elucidadas. Porém, existe uma região em que todas as sequências acima são idênticas, e que podem ser usadas como o alvo para agentes de RNAi. Pode ser vantajoso inibir a atividade de

10 mais de um gene de Aha.

Recentemente, moléculas de RNA bifilamentar (dsRNA) foram mostradas bloquear expressão do gene em um mecanismo regulador altamente conservado conhecido como interferência de RNA (RNAi). WO 99/32619 (Fire et al.) descreve o uso de um dsRNA de pelo menos 25 nucleotídeos em comprimento para inibir a expressão dos genes em *C. elegans*. dsRNA foi também mostrado degradar RNA alvo em outros organismos, incluindo plantas (vide, por exemplo, WO 99/53050, Waterhouse et al.; e WO 99/61631, Heifetz et al.), *Drosophila* (vide, por exemplo, Yang, D. et al., Curr. Biol. (2000) 10:1191-1200), e mamíferos (vide WO 00/44895, Limmer; e DE 101 00 586.5, Kreutzer et al.). Este mecanismo natural tem agora se tornado o foco para o desenvolvimento de uma classe nova de agentes farmacêuticos para tratar distúrbios que são causados pela regulação aberrante ou indesejada de um gene.

Apesar de avanços significativos no campo de RNAi e avanços no tratamento de processos patológicos mediados por HSP90, permanece uma necessidade por um agente que possa seletiva e eficientemente atenuar Atividade de ATPase da HSP90 usando a própria maquinaria de RNAi da célula. Tal agente possuirá atividade biológica alta e estabilidade in vivo, e eficazmente inibirá a expressão de um gene de Aha alvo, tal como Aha1, para o uso em tratar processos patológicos mediados direta ou indiretamente por expressão de Aha, por exemplo expressão de Aha1.

#### SUMÁRIO DA INVENÇÃO

A invenção fornece ácido ribonucléico bifilamentar (dsRNA), como também composições e métodos para inibir a expressão de um gene de Aha em uma célula ou mamífero usando tal dsRNA. A invenção também provê composições e métodos para tratar condições patológicas e doenças mediadas pela expressão de um gene de Aha, tais como em câncer ou fibrose cística. O dsRNA da invenção compreende um filamento de RNA (o filamento antisentido) tendo uma região que é menos de 30 nucleotídeos em comprimento, em geral 19-24 nucleotídeos em comprimento, e é substancialmente complementar a pelo menos parte de uma transcrição de mRNA de um gene de Aha.

Em um aspecto, a invenção fornece moléculas de ácido ribonucléico bifilamentar (dsRNA) para inibir a expressão de um gene de Aha. O dsRNA compreende pelo menos duas sequências que são complementares uma à outra. O dsRNA compreende um filamento sentido compreendendo uma primeira sequência e um filamento antisentido compreendendo uma segunda sequência. O filamento antisentido compreende uma sequência de nucleotídeo que é substancialmente complementar a pelo menos parte de um mRNA que codifica um gene de Aha, e a região de complementaridade é menos de 30 nucleotídeos em comprimento, em geral 19-24 nucleotídeos em comprimento. O dsRNA realiza clivagem de um mRNA que codifica um gene de Aha dentro da sequência alvo de um segundo dsRNA tendo um filamento sentido selecionado do grupo de SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 89, SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 93, SEQ ID NO: 95, SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 99, SEQ ID NO: 101,

SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 105, SEQ ID NO: 107, SEQ ID NO: 109, SEQ ID NO: 111, SEQ ID NO: 113, SEQ ID NO: 115, SEQ ID NO: 117, SEQ ID NO: 119, SEQ ID NO: 121, SEQ ID NO: 123, SEQ ID NO: 125, SEQ ID NO: 127, SEQ ID NO: 129, SEQ ID NO: 131, SEQ ID NO: 133, SEQ ID NO: 135,  
5 SEQ ID NO: 137, SEQ ID NO: 139, SEQ ID NO: 141, SEQ ID NO: 143, SEQ ID NO: 145, SEQ ID NO: 147, SEQ ID NO: 149, SEQ ID NO: 151, SEQ ID NO: 153, SEQ ID NO: 155, SEQ ID NO: 157, SEQ ID NO: 159, SEQ ID NO: 163, SEQ ID NO: 165, SEQ ID NO: 167, SEQ ID NO: 169, SEQ ID NO: 171, SEQ ID NO: 173, SEQ ID NO: 175, SEQ ID NO: 177, SEQ ID NO: 179, SEQ  
10 ID NO: 181, e SEQ ID NO: 183, e um filamento antisentido complementar ao último filamento sentido e selecionado do grupo de SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 36,  
15 SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 78, SEQ ID NO: 80, SEQ ID NO: 82, SEQ ID  
20 NO: 84, SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 90, SEQ ID NO: 92, SEQ ID NO: 94, SEQ ID NO: 96, SEQ ID NO: 98, SEQ ID NO: 100, SEQ ID NO: 102, SEQ ID NO: 104, SEQ ID NO: 106, SEQ ID NO: 108, SEQ ID NO: 110, SEQ ID NO: 112, SEQ ID NO: 114, SEQ ID NO: 116, SEQ ID NO: 118, SEQ ID NO: 120, SEQ ID NO: 122, SEQ ID NO: 124, SEQ ID NO: 126, SEQ  
25 ID NO: 128, SEQ ID NO: 130, SEQ ID NO: 132, SEQ ID NO: 134, SEQ ID NO: 136, SEQ ID NO: 138, SEQ ID NO: 140, SEQ ID NO: 142, SEQ ID NO: 144, SEQ ID NO: 146, SEQ ID NO: 148, SEQ ID NO: 150, SEQ ID NO: 152, SEQ ID NO: 154, SEQ ID NO: 156, SEQ ID NO: 158, SEQ ID NO: 160, SEQ ID NO: 164, SEQ ID NO: 166, SEQ ID NO: 168, SEQ ID NO: 170, SEQ ID  
30 NO: 172, SEQ ID NO: 174, SEQ ID NO: 176, SEQ ID NO: 178, SEQ ID NO: 180, SEQ ID NO: 182, e SEQ ID NO: 184 (vide Tabela 1 e Tabela 2). O gene de Aha é preferivelmente um gene de Aha1, e mais preferivelmente um

gene de Aha1 de *Homo sapiens*. O dsRNA, ao contatar com uma célula que expressa o gene de Aha, pode inibir a expressão do gene de Aha na dita célula em pelo menos 20%, ou pelo menos 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 85%, 90% ou 95%, por exemplo em células 5 HeLa e/ou MLE 12. O dsRNA pode ser diferente do dito segundo dsRNA, mas pode ter pelo menos 5, pelo menos 10, pelo menos 15, pelo menos 18, ou pelo menos 20 nucleotídeos contíguos por filamento em comum com uma das sequências de nucleotídeo acima mencionadas.

Preferivelmente, o segundo dsRNA é selecionado do grupo de 10 AL-DP-7301, AL-DP-7308, AL-DP-7318, AL-DP-7320, AL-DP-7322, AL-DP-7324, AL-DP-7325, AL-DP-7326, AL-DP-7327, AL-DP-7329, AL-DP-7331, AL-DP-7333, AL-DP-7340, AL-DP-7342, AL-DP-7303, AL-DP-7305, AL-DP-7307, AL-DP-7309, AL-DP-7316, e AL-DP-7337, AL-DP-7304, AL-DP-7312, AL-DP-7339, AL-DP-7344, AL-DP-7306, AL-DP-7317, AL-DP-7346, AL-DP-15 7310, AL-DP-7323, AL-DP-7335, AL-DP-7338, AL-DP-7341, AL-DP-7302, AL-DP-7315, AL-DP-7328, AL-DP-7330, AL-DP-7336, AL-DP-7345, AL-DP-9250, AL-DP-9251, AL-DP-9252, AL-DP-9253, AL-DP-9254, AL-DP-9255, AL-DP-9256, AL-DP-9257, AL-DP-9258, AL-DP-9259, AL-DP-9260, AL-DP-9261, AL-DP-9262, AL-DP-9263, AL-DP-9264, AL-DP-9265, AL-DP-9266, 20 AL-DP-9267, AL-DP-9268, AL-DP-9269, AL-DP-9270, AL-DP-9271, AL-DP-9272, AL-DP-9273, AL-DP-9274, AL-DP-9275, AL-DP-9276, AL-DP-9277, AL-DP-9279, AL-DP-9280, AL-DP-9281, AL-DP-9282, AL-DP-9283, AL-DP-9284, AL-DP-9285, AL-DP-9286, AL-DP-9287, AL-DP-9288, e AL-DP-9289 (vide Tabela 1 e Tabela 2).

25 Alternativamente, o próprio dsRNA pode ser selecionado do grupo de AL-DP-7301, AL-DP-7308, AL-DP-7318, AL-DP-7320, AL-DP-7322, AL-DP-7324, AL-DP-7325, AL-DP-7326, AL-DP-7327, AL-DP-7329, AL-DP-7331, AL-DP-7333, AL-DP-7340, AL-DP-7342, AL-DP-7303, AL-DP-7305, AL-DP-7307, AL-DP-7309, AL-DP-7316, e AL-DP-7337, AL-DP-7304, 30 AL-DP-7312, AL-DP-7339, AL-DP-7344, AL-DP-7306, AL-DP-7317, AL-DP-7346, AL-DP-7310, AL-DP-7323, AL-DP-7335, AL-DP-7338, AL-DP-7341, AL-DP-7302, AL-DP-7315, AL-DP-7328, AL-DP-7330, AL-DP-7336, AL-DP-7345, AL-DP-

7345, AL-DP-9250, AL-DP-9251, AL-DP-9252, AL-DP-9253, AL-DP-9254,  
AL-DP-9255, AL-DP-9256, AL-DP-9257, AL-DP-9258, AL-DP-9259, AL-DP-  
9260, AL-DP-9261, AL-DP-9262, AL-DP-9263, AL-DP-9264, AL-DP-9265,  
AL-DP-9266, AL-DP-9267, AL-DP-9268, AL-DP-9269, AL-DP-9270, AL-DP-  
5 9271, AL-DP-9272, AL-DP-9273, AL-DP-9274, AL-DP-9275, AL-DP-9276,  
AL-DP-9277, AL-DP-9279, AL-DP-9280, AL-DP-9281, AL-DP-9282, AL-DP-  
9283, AL-DP-9284, AL-DP-9285, AL-DP-9286, AL-DP-9287, AL-DP-9288, e  
AL-DP-9289 (vide Tabela 1 e Tabela 2).

O dsRNA pode compreender pelo menos um nucleotídeo modificado. Preferivelmente, o nucleotídeo modificado é selecionado do grupo de: um nucleotídeo de 2'-O-metil modificado, um nucleotídeo compreendendo um grupo 5'-fosforotioato, e um nucleotídeo terminal ligado a um derivado de colesterila ou grupo bisdecilamida de ácido dodecanóico. Alternativamente, o nucleotídeo modificado é selecionado do grupo de: um nucleotídeo 2'-deóxi-2'-flúor modificado, um nucleotídeo 2'-deóxi-modificado, um nucleotídeo bloqueado, um nucleotídeo abásico, nucleotídeo 2'-amino-modificado, nucleotídeo 2'-alquil-modificado, nucleotídeo de morfolino, um fosforamidato, e um nucleotídeo compreendendo base não-natural.

Em outro aspecto, a invenção fornece uma célula isolada compreendendo um dos dsRNAs da invenção. A célula é em geral uma célula mamífera, tal como uma célula humana. Outras modalidades da célula compreendendo um dsRNA da invenção são como fornecidas acima para outros aspectos da invenção.

Em ainda outro aspecto, uma composição farmacêutica para inhibir a expressão de um gene de Aha em um organismo é fornecida, compreendendo um dsRNA e um veículo farmaceuticamente aceitável, em que o dsRNA compreende pelo menos duas sequências que são complementares uma à outra, e em que um filamento sentido compreende uma primeira sequência e um filamento antisentido compreende uma segunda sequência  
30 compreendendo uma região de complementaridade que é substancialmente complementar a pelo menos uma parte de um mRNA que codifica um gene de Aha, e em que a dita região de complementaridade é menos de 30 nu-

cleotídeos em comprimento, e em que o dsRNA realiza clivagem de um mRNA que codifica um gene de Aha dentro da sequência alvo de um segundo dsRNA tendo um filamento sentido selecionado do grupo de SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ  
5 ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO:  
23, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 33, SEQ  
ID NO: 35, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO:  
45, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 53, SEQ  
ID NO: 55, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO:  
10 63, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 71, SEQ  
ID NO: 73, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO:  
81, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 89, SEQ  
ID NO: 91, SEQ ID NO: 93, SEQ ID NO: 95, SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO:  
99, SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 105, SEQ ID NO: 107,  
15 SEQ ID NO: 109, SEQ ID NO: 111, SEQ ID NO: 113, SEQ ID NO: 115, SEQ  
ID NO: 117, SEQ ID NO: 119, SEQ ID NO: 121, SEQ ID NO: 123, SEQ ID  
NO: 125, SEQ ID NO: 127, SEQ ID NO: 129, SEQ ID NO: 131, SEQ ID NO:  
133, SEQ ID NO: 135, SEQ ID NO: 137, SEQ ID NO: 139, SEQ ID NO: 141,  
SEQ ID NO: 143, SEQ ID NO: 145, SEQ ID NO: 147, SEQ ID NO: 149, SEQ  
20 ID NO: 151, SEQ ID NO: 153, SEQ ID NO: 155, SEQ ID NO: 157, SEQ ID  
NO: 159, SEQ ID NO: 163, SEQ ID NO: 165, SEQ ID NO: 167, SEQ ID NO:  
169, SEQ ID NO: 171, SEQ ID NO: 173, SEQ ID NO: 175, SEQ ID NO: 177,  
SEQ ID NO: 179, SEQ ID NO: 181, e SEQ ID NO: 183, e um filamento anti-  
sentido complementar ao último filamento sentido e selecionado do grupo de  
25 SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO:  
14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ  
ID NO: 24, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO:  
34, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 44, SEQ  
ID NO: 46, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO:  
30 54, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 62, SEQ  
ID NO: 64, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO:  
72, SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 78, SEQ ID NO: 80, SEQ

ID NO: 82, SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 90, SEQ ID NO: 92, SEQ ID NO: 94, SEQ ID NO: 96, SEQ ID NO: 98, SEQ ID NO: 100, SEQ ID NO: 102, SEQ ID NO: 104, SEQ ID NO: 106, SEQ ID NO: 108, SEQ ID NO: 110, SEQ ID NO: 112, SEQ ID NO: 114, SEQ ID NO: 5 116, SEQ ID NO: 118, SEQ ID NO: 120, SEQ ID NO: 122, SEQ ID NO: 124, SEQ ID NO: 126, SEQ ID NO: 128, SEQ ID NO: 130, SEQ ID NO: 132, SEQ ID NO: 134, SEQ ID NO: 136, SEQ ID NO: 138, SEQ ID NO: 140, SEQ ID NO: 142, SEQ ID NO: 144, SEQ ID NO: 146, SEQ ID NO: 148, SEQ ID NO: 150, SEQ ID NO: 152, SEQ ID NO: 154, SEQ ID NO: 156, SEQ ID NO: 158, 10 SEQ ID NO: 160, SEQ ID NO: 164, SEQ ID NO: 166, SEQ ID NO: 168, SEQ ID NO: 170, SEQ ID NO: 172, SEQ ID NO: 174, SEQ ID NO: 176, SEQ ID NO: 178, SEQ ID NO: 180, SEQ ID NO: 182, e SEQ ID NO: 184 (vide Tabela 1 e Tabela 2). Nisso, o gene de Aha pode ser um gene de Aha1, e preferivelmente um gene de Aha1 de *Homo sapiens*. O dsRNA compreendido na 15 composição farmacêutica pode, sob contato com uma célula que expressa o dito gene de Aha, inibir a expressão do dito gene de Aha na dita célula em pelo menos 20%, ou pelo menos 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55% 60%, 65%, 70%, 85%, 90% ou 95%, por exemplo em células HeLa e/ou MLE 12. O dsRNA pode ser diferente do dito segundo dsRNA, mas pode ter 20 pelo menos 5, pelo menos 10, pelo menos 15, pelo menos 18, ou pelo menos 20 nucleotídeos contíguos por filamento em comum com uma das sequências de nucleotídeo acima mencionadas.

Preferivelmente, o segundo dsRNA é selecionado do grupo de AL-DP-7301, AL-DP-7308, AL-DP-7318, AL-DP-7320, AL-DP-7322, AL-DP- 25 7324, AL-DP-7325, AL-DP-7326, AL-DP-7327, AL-DP-7329, AL-DP-7331, AL-DP-7333, AL-DP-7340, AL-DP-7342, AL-DP-7303, AL-DP-7305, AL-DP-7307, AL-DP-7309, AL-DP-7316, e AL-DP-7337, AL-DP-7304, AL-DP-7312, AL-DP-7339, AL-DP-7344, AL-DP-7306, AL-DP-7317, AL-DP-7346, AL-DP-7310, AL-DP-7323, AL-DP-7335, AL-DP-7338, AL-DP-7341, AL-DP-7302, 30 AL-DP-7315, AL-DP-7328, AL-DP-7330, AL-DP-7336, AL-DP-7345, AL-DP-9250, AL-DP-9251, AL-DP-9252, AL-DP-9253, AL-DP-9254, AL-DP-9255, AL-DP-9256, AL-DP-9257, AL-DP-9258, AL-DP-9259, AL-DP-9260, AL-DP-

9261, AL-DP-9262, AL-DP-9263, AL-DP-9264, AL-DP-9265, AL-DP-9266, AL-DP-9267, AL-DP-9268, AL-DP-9269, AL-DP-9270, AL-DP-9271, AL-DP-9272, AL-DP-9273, AL-DP-9274, AL-DP-9275, AL-DP-9276, AL-DP-9277, AL-DP-9279, AL-DP-9280, AL-DP-9281, AL-DP-9282, AL-DP-9283, AL-DP-  
5 9284, AL-DP-9285, AL-DP-9286, AL-DP-9287, AL-DP-9288, e AL-DP-9289 (vide Tabela 1 e Tabela 2).

Alternativamente, o dsRNA compreendido na própria composição farmacêutica pode ser selecionado do grupo de AL-DP-7301, AL-DP-7308, AL-DP-7318, AL-DP-7320, AL-DP-7322, AL-DP-7324, AL-DP-7325, AL-DP-7326, AL-DP-7327, AL-DP-7329, AL-DP-7331, AL-DP-7333, AL-DP-7340, AL-DP-7342, AL-DP-7303, AL-DP-7305, AL-DP-7307, AL-DP-7309, AL-DP-7316, e AL-DP-7337, AL-DP-7304, AL-DP-7312, AL-DP-7339, AL-DP-7344, AL-DP-7306, AL-DP-7317, AL-DP-7346, AL-DP-7310, AL-DP-7323, AL-DP-7335, AL-DP-7338, AL-DP-7341, AL-DP-7302, AL-DP-7315, AL-DP-7328, AL-DP-7330, AL-DP-7336, AL-DP-7345, AL-DP-9250, AL-DP-9251, AL-DP-9252, AL-DP-9253, AL-DP-9254, AL-DP-9255, AL-DP-9256, AL-DP-9257, AL-DP-9258, AL-DP-9259, AL-DP-9260, AL-DP-9261, AL-DP-9262, AL-DP-9263, AL-DP-9264, AL-DP-9265, AL-DP-9266, AL-DP-9267, AL-DP-9268, AL-DP-9269, AL-DP-9270, AL-DP-9271, AL-DP-9272, AL-DP-  
20 9273, AL-DP-9274, AL-DP-9275, AL-DP-9276, AL-DP-9277, AL-DP-9279, AL-DP-9280, AL-DP-9281, AL-DP-9282, AL-DP-9283, AL-DP-9284, AL-DP-9285, AL-DP-9286, AL-DP-9287, AL-DP-9288, e AL-DP-9289 (vide Tabela 1 e Tabela 2).

O dsRNA compreendido na composição farmacêutica pode  
25 compreender pelo menos um nucleotídeo modificado. Preferivelmente, o dito nucleotídeo modificado é selecionado do grupo de: um nucleotídeo de 2'-O-metil modificado, um nucleotídeo compreendendo um grupo 5'-fosforotioato, e um nucleotídeo terminal ligado a um derivado de colesterol ou grupo bisdecilamida de ácido dodecanóico. Alternativamente, o dito nucleotídeo modificado é selecionado do grupo de: um nucleotídeo 2'-deóxi-2'-flúor modificado, um nucleotídeo 2'-deóxi-modificado, um nucleotídeo bloqueado, um nucleotídeo abásico, nucleotídeo 2'-amino-modificado, nucleotí-  
30

deo 2'-alquil-modificado, nucleotídeo de morfolino, um fosforamidato, e um nucleotídeo compreendendo base não-natural.

Em ainda outro aspecto, um método para inibir a expressão de um gene de Aha em uma célula é fornecido, o método compreendendo:

- 5                         (a)     introduzir na célula um ácido ribonucléico bifilamentar (dsRNA), em que o dsRNA compreende pelo menos duas sequências que são complementares uma à outra e em que um filamento sentido compreende uma primeira sequência e um filamento antisentido compreende uma segunda sequência compreendendo uma região de complementaridade que
- 10                       é substancialmente complementar a pelo menos uma parte de um mRNA que codifica Aha1, e em que a dita região de complementaridade é menos de 30 nucleotídeos em comprimento e em que o dsRNA realiza clivagem de um mRNA que codifica um gene de Aha dentro da sequência alvo de um segundo dsRNA tendo um filamento sentido selecionado do grupo de SEQ
- 15                       ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 53,
- 20                       SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 89, SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 93, SEQ ID NO: 95, SEQ ID NO: 97, SEQ ID
- 25                       NO: 99, SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 105, SEQ ID NO: 107, SEQ ID NO: 109, SEQ ID NO: 111, SEQ ID NO: 113, SEQ ID NO: 115, SEQ ID NO: 117, SEQ ID NO: 119, SEQ ID NO: 121, SEQ ID NO: 123, SEQ ID NO: 125, SEQ ID NO: 127, SEQ ID NO: 129, SEQ ID NO: 131, SEQ ID NO: 133, SEQ ID NO: 135, SEQ ID NO: 137, SEQ ID NO: 139, SEQ ID NO:
- 30                       141, SEQ ID NO: 143, SEQ ID NO: 145, SEQ ID NO: 147, SEQ ID NO: 149, SEQ ID NO: 151, SEQ ID NO: 153, SEQ ID NO: 155, SEQ ID NO: 157, SEQ ID NO: 159, SEQ ID NO: 163, SEQ ID NO: 165, SEQ ID NO: 167, SEQ ID

NO: 169, SEQ ID NO: 171, SEQ ID NO: 173, SEQ ID NO: 175, SEQ ID NO: 177, SEQ ID NO: 179, SEQ ID NO: 181, e SEQ ID NO: 183, e um filamento antisentido complementar ao último filamento sentido e selecionado do grupo de SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ  
5 ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO:  
10 62, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 78, SEQ ID NO: 80, SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 90, SEQ ID NO: 92, SEQ ID NO: 94, SEQ ID NO: 96, SEQ ID NO: 98, SEQ ID NO: 100, SEQ ID NO: 102, SEQ ID NO: 104, SEQ ID NO: 106,  
15 SEQ ID NO: 108, SEQ ID NO: 110, SEQ ID NO: 112, SEQ ID NO: 114, SEQ ID NO: 116, SEQ ID NO: 118, SEQ ID NO: 120, SEQ ID NO: 122, SEQ ID NO: 124, SEQ ID NO: 126, SEQ ID NO: 128, SEQ ID NO: 130, SEQ ID NO: 132, SEQ ID NO: 134, SEQ ID NO: 136, SEQ ID NO: 138, SEQ ID NO: 140, SEQ ID NO: 142, SEQ ID NO: 144, SEQ ID NO: 146, SEQ ID NO: 148, SEQ  
20 ID NO: 150, SEQ ID NO: 152, SEQ ID NO: 154, SEQ ID NO: 156, SEQ ID NO: 158, SEQ ID NO: 160, SEQ ID NO: 164, SEQ ID NO: 166, SEQ ID NO: 168, SEQ ID NO: 170, SEQ ID NO: 172, SEQ ID NO: 174, SEQ ID NO: 176, SEQ ID NO: 178, SEQ ID NO: 180, SEQ ID NO: 182, e SEQ ID NO: 184; e  
25 (b) manter a célula produzida na etapa (a) durante um tempo suficiente para obter degradação da transcrição de mRNA de um gene de Aha, assim inibindo a expressão de um gene de Aha na célula. O gene de Aha é preferivelmente um gene de Aha1, e mais preferivelmente um gene de Aha1 de Homo sapiens. O dsRNA pode ser diferente do dito segundo dsRNA, mas pode ter pelo menos 5, pelo menos 10, pelo menos 15, pelo  
30 menos 18, ou pelo menos 20 nucleotídeos contíguos por filamento em comum com uma das sequências de nucleotídeo acima mencionadas.

Preferivelmente, o segundo dsRNA é selecionado do grupo de

AL-DP-7301, AL-DP-7308, AL-DP-7318, AL-DP-7320, AL-DP-7322, AL-DP-7324, AL-DP-7325, AL-DP-7326, AL-DP-7327, AL-DP-7329, AL-DP-7331, AL-DP-7333, AL-DP-7340, AL-DP-7342, AL-DP-7303, AL-DP-7305, AL-DP-7307, AL-DP-7309, AL-DP-7316, e AL-DP-7337, AL-DP-7304, AL-DP-7312,

5 AL-DP-7339, AL-DP-7344, AL-DP-7306, AL-DP-7317, AL-DP-7346, AL-DP-7310, AL-DP-7323, AL-DP-7335, AL-DP-7338, AL-DP-7341, AL-DP-7302, AL-DP-7315, AL-DP-7328, AL-DP-7330, AL-DP-7336, AL-DP-7345, AL-DP-9250, AL-DP-9251, AL-DP-9252, AL-DP-9253, AL-DP-9254, AL-DP-9255, AL-DP-9256, AL-DP-9257, AL-DP-9258, AL-DP-9259, AL-DP-9260, AL-DP-

10 9261, AL-DP-9262, AL-DP-9263, AL-DP-9264, AL-DP-9265, AL-DP-9266, AL-DP-9267, AL-DP-9268, AL-DP-9269, AL-DP-9270, AL-DP-9271, AL-DP-9272, AL-DP-9273, AL-DP-9274, AL-DP-9275, AL-DP-9276, AL-DP-9277, AL-DP-9279, AL-DP-9280, AL-DP-9281, AL-DP-9282, AL-DP-9283, AL-DP-9284, AL-DP-9285, AL-DP-9286, AL-DP-9287, AL-DP-9288, e AL-DP-9289

15 (vide Tabela 1 e Tabela 2).

Alternativamente, o próprio dsRNA é selecionado do grupo de AL-DP-7301, AL-DP-7308, AL-DP-7318, AL-DP-7320, AL-DP-7322, AL-DP-7324, AL-DP-7325, AL-DP-7326, AL-DP-7327, AL-DP-7329, AL-DP-7331, AL-DP-7333, AL-DP-7340, AL-DP-7342, AL-DP-7303, AL-DP-7305, AL-DP-7307, AL-DP-7309, AL-DP-7316, e AL-DP-7337, AL-DP-7304, AL-DP-7312, AL-DP-7339, AL-DP-7344, AL-DP-7306, AL-DP-7317, AL-DP-7346, AL-DP-7310, AL-DP-7323, AL-DP-7335, AL-DP-7338, AL-DP-7341, AL-DP-7302, AL-DP-7315, AL-DP-7328, AL-DP-7330, AL-DP-7336, AL-DP-7345, AL-DP-9250, AL-DP-9251, AL-DP-9252, AL-DP-9253, AL-DP-9254, AL-DP-9255, AL-DP-9256, AL-DP-9257, AL-DP-9258, AL-DP-9259, AL-DP-9260, AL-DP-9261, AL-DP-9262, AL-DP-9263, AL-DP-9264, AL-DP-9265, AL-DP-9266, AL-DP-9267, AL-DP-9268, AL-DP-9269, AL-DP-9270, AL-DP-9271, AL-DP-9272, AL-DP-9273, AL-DP-9274, AL-DP-9275, AL-DP-9276, AL-DP-9277, AL-DP-9279, AL-DP-9280, AL-DP-9281, AL-DP-9282, AL-DP-9283, AL-DP-9284, AL-DP-9285, AL-DP-9286, AL-DP-9287, AL-DP-9288, e AL-DP-9289.

20 Preferivelmente, o método é executado *in vitro*. Outras modalidades do método para inibir a expressão de um gene de Aha em uma célula são como

25

30

fornecidas acima para outros aspectos da invenção.

Em ainda outro aspecto, um método de tratar, impedir ou gerenciar processos patológicos mediados por expressão de Aha é fornecido, compreendendo administrar a um paciente em necessidade de tal tratamento, prevenção ou gerenciamento uma quantidade terapêutica ou profilaticamente eficaz de um dsRNA, em que o dsRNA compreende pelo menos duas sequências que são complementares uma à outra e em que um filamento sentido compreende uma primeira sequência e um filamento antisentido compreende uma segunda sequência compreendendo uma região de complementaridade que é substancialmente complementar a pelo menos uma parte de um mRNA que codifica Aha1, e em que a dita região de complementaridade é menos de 30 nucleotídeos em comprimento e em que o dsRNA realiza clivagem de um mRNA que codifica um gene de Aha dentro da sequência alvo de um segundo dsRNA tendo um filamento sentido selecionado do grupo de SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 89, SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 93, SEQ ID NO: 95, SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 99, SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 105, SEQ ID NO: 107, SEQ ID NO: 109, SEQ ID NO: 111, SEQ ID NO: 113, SEQ ID NO: 115, SEQ ID NO: 117, SEQ ID NO: 119, SEQ ID NO: 121, SEQ ID NO: 123, SEQ ID NO: 125, SEQ ID NO: 127, SEQ ID NO: 129, SEQ ID NO: 131, SEQ ID NO: 133, SEQ ID NO: 135, SEQ ID NO: 137, SEQ ID NO: 139, SEQ ID NO: 141, SEQ ID NO: 143, SEQ ID NO: 145, SEQ ID NO: 147, SEQ ID NO: 149, SEQ ID NO: 151, SEQ ID NO: 153, SEQ ID NO: 155, SEQ ID NO: 157, SEQ ID NO: 159, SEQ ID NO: 163, SEQ ID NO: 165, SEQ ID

NO: 167, SEQ ID NO: 169, SEQ ID NO: 171, SEQ ID NO: 173, SEQ ID NO: 175, SEQ ID NO: 177, SEQ ID NO: 179, SEQ ID NO: 181, e SEQ ID NO: 183, e um filamento antisentido complementar ao último filamento sentido e selecionado do grupo de SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10,  
5 SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 78, SEQ ID NO: 80, SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 90, SEQ ID NO: 92, SEQ ID NO: 94, SEQ ID NO: 96, SEQ ID NO: 98, SEQ ID NO: 100, SEQ ID NO: 102, SEQ ID NO:  
10 154, SEQ ID NO: 106, SEQ ID NO: 108, SEQ ID NO: 110, SEQ ID NO: 112, SEQ ID NO: 114, SEQ ID NO: 116, SEQ ID NO: 118, SEQ ID NO: 120, SEQ ID NO: 122, SEQ ID NO: 124, SEQ ID NO: 126, SEQ ID NO: 128, SEQ ID NO: 130, SEQ ID NO: 132, SEQ ID NO: 134, SEQ ID NO: 136, SEQ ID NO: 138, SEQ ID NO: 140, SEQ ID NO: 142, SEQ ID NO: 144, SEQ ID NO: 146,  
15 20 SEQ ID NO: 148, SEQ ID NO: 150, SEQ ID NO: 152, SEQ ID NO: 154, SEQ ID NO: 156, SEQ ID NO: 158, SEQ ID NO: 160, SEQ ID NO: 164, SEQ ID NO: 166, SEQ ID NO: 168, SEQ ID NO: 170, SEQ ID NO: 172, SEQ ID NO: 174, SEQ ID NO: 176, SEQ ID NO: 178, SEQ ID NO: 180, SEQ ID NO: 182, e SEQ ID NO: 184. O dsRNA pode ser diferente do dito segundo dsRNA,  
25 mas pode ter pelo menos 5, pelo menos 10, pelo menos 15, pelo menos 18, ou pelo menos 20 nucleotídeos contíguos por filamento em comum com uma das sequências de nucleotídeo acima mencionadas.

Preferivelmente, o segundo dsRNA é selecionado do grupo de AL-DP-7301, AL-DP-7308, AL-DP-7318, AL-DP-7320, AL-DP-7322, AL-DP-30 7324, AL-DP-7325, AL-DP-7326, AL-DP-7327, AL-DP-7329, AL-DP-7331, AL-DP-7333, AL-DP-7340, AL-DP-7342, AL-DP-7303, AL-DP-7305, AL-DP-7307, AL-DP-7309, AL-DP-7316, e AL-DP-7337, AL-DP-7304, AL-DP-7312,

AL-DP-7339, AL-DP-7344, AL-DP-7306, AL-DP-7317, AL-DP-7346, AL-DP-7310, AL-DP-7323, AL-DP-7335, AL-DP-7338, AL-DP-7341, AL-DP-7302, AL-DP-7315, AL-DP-7328, AL-DP-7330, AL-DP-7336, AL-DP-7345, AL-DP-9250, AL-DP-9251, AL-DP-9252, AL-DP-9253, AL-DP-9254, AL-DP-9255,  
5 AL-DP-9256, AL-DP-9257, AL-DP-9258, AL-DP-9259, AL-DP-9260, AL-DP-9261, AL-DP-9262, AL-DP-9263, AL-DP-9264, AL-DP-9265, AL-DP-9266, AL-DP-9267, AL-DP-9268, AL-DP-9269, AL-DP-9270, AL-DP-9271, AL-DP-9272, AL-DP-9273, AL-DP-9274, AL-DP-9275, AL-DP-9276, AL-DP-9277, AL-DP-9279, AL-DP-9280, AL-DP-9281, AL-DP-9282, AL-DP-9283, AL-DP-10 9284, AL-DP-9285, AL-DP-9286, AL-DP-9287, AL-DP-9288, e AL-DP-9289 (vide Tabela 1 e Tabela 2).

Alternativamente, o próprio dsRNA é selecionado do grupo de AL-DP-7301, AL-DP-7308, AL-DP-7318, AL-DP-7320, AL-DP-7322, AL-DP-7324, AL-DP-7325, AL-DP-7326, AL-DP-7327, AL-DP-7329, AL-DP-7331, 15 AL-DP-7333, AL-DP-7340, AL-DP-7342, AL-DP-7303, AL-DP-7305, AL-DP-7307, AL-DP-7309, AL-DP-7316, e AL-DP-7337, AL-DP-7304, AL-DP-7312, AL-DP-7339, AL-DP-7344, AL-DP-7306, AL-DP-7317, AL-DP-7346, AL-DP-7310, AL-DP-7323, AL-DP-7335, AL-DP-7338, AL-DP-7341, AL-DP-7302, AL-DP-7315, AL-DP-7328, AL-DP-7330, AL-DP-7336, AL-DP-7345, AL-DP-20 9250, AL-DP-9251, AL-DP-9252, AL-DP-9253, AL-DP-9254, AL-DP-9255, AL-DP-9256, AL-DP-9257, AL-DP-9258, AL-DP-9259, AL-DP-9260, AL-DP-9261, AL-DP-9262, AL-DP-9263, AL-DP-9264, AL-DP-9265, AL-DP-9266, AL-DP-9267, AL-DP-9268, AL-DP-9269, AL-DP-9270, AL-DP-9271, AL-DP-9272, AL-DP-9273, AL-DP-9274, AL-DP-9275, AL-DP-9276, AL-DP-9277, 25 AL-DP-9279, AL-DP-9280, AL-DP-9281, AL-DP-9282, AL-DP-9283, AL-DP-9284, AL-DP-9285, AL-DP-9286, AL-DP-9287, AL-DP-9288, e AL-DP-9289.

Outras modalidades do método compreendendo administrar um dsRNA da invenção são como fornecidas acima para outros aspectos da invenção.

Em ainda outro aspecto, um vetor para inibir a expressão de um 30 gene de Aha em uma célula é fornecido, o dito vetor compreendendo uma sequência reguladora operavelmente ligada a uma sequência de nucleotídeo que codifica pelo menos um filamento de um dsRNA, em que um dos

filamentos do dito dsRNA é substancialmente complementar a pelo menos uma parte de um mRNA que codifica Aha1 e em que o dito dsRNA é menos de 30 pares de base em comprimento e em que o dsRNA realiza clivagem de um mRNA que codifica um gene de Aha dentro da sequência alvo de um

5 segundo dsRNA tendo um filamento sentido selecionado do grupo de SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 89,

10 15 SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 93, SEQ ID NO: 95, SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 99, SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 105, SEQ ID NO: 107, SEQ ID NO: 109, SEQ ID NO: 111, SEQ ID NO: 113, SEQ ID NO: 115, SEQ ID NO: 117, SEQ ID NO: 119, SEQ ID NO: 121, SEQ ID NO: 123, SEQ ID NO: 125, SEQ ID NO: 127, SEQ ID NO: 129, SEQ ID NO: 131, SEQ ID NO: 133, SEQ ID NO: 135, SEQ ID NO: 137, SEQ ID NO: 139, SEQ ID NO: 141, SEQ ID NO: 143, SEQ ID NO: 145, SEQ ID NO: 147, SEQ ID NO: 149, SEQ ID NO: 151, SEQ ID NO: 153, SEQ ID NO: 155, SEQ ID NO: 157, SEQ ID NO: 159, SEQ ID NO: 163, SEQ ID NO: 165, SEQ ID NO: 167, SEQ ID NO: 169, SEQ ID NO: 171, SEQ ID NO: 173, SEQ ID NO: 175, SEQ ID NO:

20 25 30 35 40 45 50 55 60 65 70 75 80 85 90 95 100 105 110 115 120 125 130 135 140 145 150 155 160 165 170 175 180 185 190 195 200 205 210 215 220 225 230 235 240 245 250 255 260 265 270 275 280 285 290 295 300 305 310 315 320 325 330 335 340 345 350 355 360 365 370 375 380 385 390 395 400 405 410 415 420 425 430 435 440 445 450 455 460 465 470 475 480 485 490 495 500 505 510 515 520 525 530 535 540 545 550 555 560 565 570 575 580 585 590 595 600 605 610 615 620 625 630 635 640 645 650 655 660 665 670 675 680 685 690 695 700 705 710 715 720 725 730 735 740 745 750 755 760 765 770 775 780 785 790 795 800 805 810 815 820 825 830 835 840 845 850 855 860 865 870 875 880 885 890 895 900 905 910 915 920 925 930 935

177, SEQ ID NO: 179, SEQ ID NO: 181, e SEQ ID NO: 183, e um filamento antisentido complementar ao último filamento sentido e selecionado do grupo de SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO:

62, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 70, SEQ  
ID NO: 72, SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 78, SEQ ID NO:  
80, SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 88, SEQ  
ID NO: 90, SEQ ID NO: 92, SEQ ID NO: 94, SEQ ID NO: 96, SEQ ID NO:  
5 98, SEQ ID NO: 100, SEQ ID NO: 102, SEQ ID NO: 104, SEQ ID NO: 106,  
SEQ ID NO: 108, SEQ ID NO: 110, SEQ ID NO: 112, SEQ ID NO: 114, SEQ  
ID NO: 116, SEQ ID NO: 118, SEQ ID NO: 120, SEQ ID NO: 122, SEQ ID  
NO: 124, SEQ ID NO: 126, SEQ ID NO: 128, SEQ ID NO: 130, SEQ ID NO:  
132, SEQ ID NO: 134, SEQ ID NO: 136, SEQ ID NO: 138, SEQ ID NO: 140,  
10 SEQ ID NO: 142, SEQ ID NO: 144, SEQ ID NO: 146, SEQ ID NO: 148, SEQ  
ID NO: 150, SEQ ID NO: 152, SEQ ID NO: 154, SEQ ID NO: 156, SEQ ID  
NO: 158, SEQ ID NO: 160, SEQ ID NO: 164, SEQ ID NO: 166, SEQ ID NO:  
168, SEQ ID NO: 170, SEQ ID NO: 172, SEQ ID NO: 174, SEQ ID NO: 176,  
SEQ ID NO: 178, SEQ ID NO: 180, SEQ ID NO: 182, e SEQ ID NO: 184. O  
15 dsRNA pode ser diferente do dito segundo dsRNA, mas pode ter pelo me-  
nos 5, pelo menos 10, pelo menos 15, pelo menos 18, ou pelo menos 20  
nucleotídeos contíguos por filamento em comum com uma das sequências  
de nucleotídeo acima mencionadas.

Preferivelmente, o segundo dsRNA é selecionado do grupo de:  
20 AL-DP-7301, AL-DP-7308, AL-DP-7318, AL-DP-7320, AL-DP-7322, AL-DP-  
7324, AL-DP-7325, AL-DP-7326, AL-DP-7327, AL-DP-7329, AL-DP-7331,  
AL-DP-7333, AL-DP-7340, AL-DP-7342, AL-DP-7303, AL-DP-7305, AL-DP-  
7307, AL-DP-7309, AL-DP-7316, e AL-DP-7337, AL-DP-7304, AL-DP-7312,  
AL-DP-7339, AL-DP-7344, AL-DP-7306, AL-DP-7317, AL-DP-7346, AL-DP-  
25 7310, AL-DP-7323, AL-DP-7335, AL-DP-7338, AL-DP-7341, AL-DP-7302,  
AL-DP-7315, AL-DP-7328, AL-DP-7330, AL-DP-7336, AL-DP-7345, AL-DP-  
9250, AL-DP-9251, AL-DP-9252, AL-DP-9253, AL-DP-9254, AL-DP-9255,  
AL-DP-9256, AL-DP-9257, AL-DP-9258, AL-DP-9259, AL-DP-9260, AL-DP-  
9261, AL-DP-9262, AL-DP-9263, AL-DP-9264, AL-DP-9265, AL-DP-9266,  
30 AL-DP-9267, AL-DP-9268, AL-DP-9269, AL-DP-9270, AL-DP-9271, AL-DP-  
9272, AL-DP-9273, AL-DP-9274, AL-DP-9275, AL-DP-9276, AL-DP-9277,  
AL-DP-9279, AL-DP-9280, AL-DP-9281, AL-DP-9282, AL-DP-9283, AL-DP-

9284, AL-DP-9285, AL-DP-9286, AL-DP-9287, AL-DP-9288, e AL-DP-9289 (vide Tabela 1 e Tabela 2). Outras modalidades do vetor da invenção são como fornecidas acima para outros aspectos da invenção.

5 Em ainda outro aspecto, uma célula isolada compreendendo o vetor acima é fornecida. Outras modalidades da célula compreendendo um vetor da invenção são como fornecidas acima para outros aspectos da invenção.

TABELA 1: AGENTES DE RNAi PARA A INFRA-REGULAÇÃO  
 10 DE AHA 1 DE HOMO SAPIENS (NM\_012111.1), MUS MUSCULUS (NM\_146036.1) E PAN TROGLODYTES (XM\_510094.1), E INTERAÇÕES NÃO-ALVO MÍNIMAS EM CÉLULAS DE RATO; AL-DP-7561, AL-DP-7562, AL-DP-7563 E AL-DP-7564 SÃO ADICIONALMENTE REATIVOS CRUZADOS PARA AHA 2A DE MUS MUSCULUS (NM\_172391.3) E RATTUS  
 15 NORVEGICUS (XM\_223680.3)

Identificador duplo	Sequência de filamento sentido <sup>1</sup>	SEQ ID NO:	Sequência de filamento antisentido <sup>1</sup>	SEQ ID NO:
AL-DP-7299	auugguccacggauaaag-cuTT		agcuuaauccguggacca-auTT	
AL-DP-7300	gugaguaagcuugaug-gagTT		cuccaucaagcuuacu-acacTT	
AL-DP-7301	aguaaaaauccccacuuu-guTT		acaaggugggauuuuga-cuTT	
AL-DP-7302	aaaucucguggccuuua-augTT		cauuuaaggcacgaa-gauuuTT	
AL-DP-7303	gagauuagugugagc-cuugTT		caaggcucacacuaau-cucTT	
AL-DP-7304	aaucucguggccuuuaau-gaTT		ucauuuaaggcacgaa-gauuTT	
AL-DP-7305	agauuagugugagc-cuugcTT		gcaaggcucacacuaau-cuTT	
AL-DP-7306	cgggcggacgccaccaacgTT		cguugguggc-guccgcccgTT	
AL-DP-7307	ggcggacgccaccaacgucTT		gacguugguggc-guccgccTT	

Identificador duplo	Sequência de filamento sentido <sup>1</sup>	SEQ ID NO:	Sequência de filamento antisentido <sup>1</sup>	SEQ ID NO:
AL-DP-7308	gggcggacgccaccaacguTT		acguugguggc-guccgcccTT	
AL-DP-7309	caacguacaacaacuggcacTT		gugccaguuguugac-guugTT	
AL-DP-7310	gcgggcggacgccaccaacTT		guugguggc-guccgccccgCTT	
AL-DP-7311	aucucguggccuuuauga-aTT		uucauuuaaggccacga-gauTT	
AL-DP-7312	acguacaacaacuggca-cugTT		cagugccaguuguugac-guTT	
AL-DP-7313	accaacguacaacaacuggcTT		gccaguuguugacguug-guTT	
AL-DP-7314	acgcugggaucguggag-gagTT		cuccuccacgauccagc-guTT	
AL-DP-7315	agacccacgcuggauc-gugTT		cacgauccagcgugggu-cuTT	
AL-DP-7316	gacccacgcuggauc-guggTT		ccacgauccagcgugg-gucTT	
AL-DP-7317	gaauuuuacaucagcacc-cuTT		aggugcugauguaa-auucTT	
AL-DP-7318	gggaauuuuacaucag-caccTT		ggugcugauguaa-auucccTT	
AL-DP-7319	ugggaauuuuacaucag-cacTT		gugcugauguaaaauucc-caTT	
AL-DP-7320	ccaacguacaacaacuggcaTT		ugccaguuguugac-guuggTT	
AL-DP-7321	aaguggggugaggga-gaccTT		ggucucccucacccca-cuuTT	
AL-DP-7322	acacaaaucucguggc-cuuTT		aaggccacgagauuugu-guTT	
AL-DP-7323	acccacgcuggaucgug-gaTT		uccacgauccagcgugg-guTT	
AL-DP-7324	gagucaaaauccccac-cuugTT		caaguggggauuuuuga-cucTT	
AL-DP-7325	gagcucuauagaguguua-aTT		uaaacacucuauagag-cucTT	
AL-DP-7326	ggcagcgguacuacuuu-gaTT		ucaaaguaguaccg-cugccTT	

Identificador duplo	Sequência de filamento sentido <sup>1</sup>	SEQ ID NO:	Sequência de filamento antisentido <sup>1</sup>	SEQ ID NO:
AL-DP-7327	gacacaaaucucguggc-cuTT		aggccacgagauuugu-gucTT	
AL-DP-7328	agcgggcggacgccaccaaTT		uugguggcguccgcccgc-cuTT	
AL-DP-7329	caaaauccccacuuugua-agTT		cuuacaagugggg-gauuuugTT	
AL-DP-7330	gagacccacgcuggauc-guTT		acgauccagcgugggu-cucTT	
AL-DP-7331	gagccuugccaaagau-gagTT		cucaucuuuggcaagg-cucTT	
AL-DP-7332	ugacacaaaucuc-guggccTT		ggccacgagauuugugu-caTT	
AL-DP-7333	ggagcucuauagagu-guuuTT		aaacacucuauagag-cuccTT	
AL-DP-7334	cccacgcuggaucgug-gagTT		cuccacgauccagc-gugggTT	
AL-DP-7335	gauccccuaauuugucu-gauTT		aucagacaaaauuggg-gaucTT	
AL-DP-7336	gagauccccuaauuugu-cugTT		cagacaaaauuggggau-cucTT	
AL-DP-7337	agccugacacaaaucuc-guTT		acgagauuugugucagg-cuTT	
AL-DP-7338	agauccccuaauuugucu-gaTT		ucagacaaaauuggggau-cuTT	
AL-DP-7339	agggagacccacgcug-gauTT		auccagcgugggucucc-cuTT	
AL-DP-7340	gagggagacccacgcug-gaTT		uccagcgugggucucc-cucTT	
AL-DP-7341	gccaaguggggugagg-gagTT		cucccucacccca-cuuggcTT	
AL-DP-7342	uggcagcgguacua-cuuugTT		caaaguaguaccgcugc-caTT	
AL-DP-7343	ugagggagacccacg-cuggTT		ccagcgugggucuccu-caTT	
AL-DP-7344	aguggagauuagugu-gagcTT		gcucacacuaauucucca-cuTT	
AL-DP-7345	aggagcucuauagagu-guuuTT		aacacucuauagagcuc-cuTT	

Identificador duplo	Sequência de filamento sentido <sup>1</sup>	SEQ ID NO:	Sequência de filamento antisentido <sup>1</sup>	SEQ ID NO:
AL-DP-7346	agcgguaucuuacuuu-gagggTT		cccucaaaguaguaccg-cuTT	
AL-DP-7561	cgcuggaucguggaggagcTT		gcuccuccacgauc-cagcgTT	
AL-DP-7562	gcuggaucguggaggagcgTT		cgcuccuccacgauc-cagcTT	
AL-DP-7563	cuggaucguggaggagcgTT		ccgcuccuccacgauc-cagTT	
AL-DP-7564	uggaucguggaggagcgTT		cccgcuucccacgauc-caTT	

<sup>1</sup> letras maiúsculas = desoxirribonucleotídeos; letras minúsculas = ribonucleotídeos

TABELA 2: AGENTES DE RNAi PARA A INFRA-REGULAÇÃO  
DE AHA 1 DE HOMO SAPIENS (NM\_012111.1), MUS MUSCULUS  
5 (NM\_146036.1) E PAN TROGLODYTES (XM\_510094.1), E INTERAÇÕES  
NÃO-ALVO MÍNIMAS EM CÉLULAS HUMANAS

Identificador duplo	Sequência de filamento sentido <sup>1</sup>	SEQ ID NO:	Sequência de filamento antisentido <sup>1</sup>	SEQ ID NO:
AL-DP-9250	gccugacacaaaucuc-gugTT		cacgagauuugugu-caggcTT	
AL-DP-9251	ccugacacaaaucuc-guggTT		ccacgagauuugugu-caggTT	
AL-DP-9252	acgccaccaacguacaaca-aTT		uuguugacguugguggc-guTT	
AL-DP-9253	agcucuuauagaguguuu-acTT		guaaacacucuuauagag-cuTT	
AL-DP-9254	gggcuggcagcgguacu-acTT		guaguaccgcugc-cagcccTT	
AL-DP-9255	cuggcagcgguacua-cuuuTT		aaaguaguaccgcugc-cagTT	
AL-DP-9256	ggaugaaguggagauua-guTT		acuaaucuccacuu-cauccTT	

Identificador duplo	Sequência de filamento sentido <sup>1</sup>	SEQ ID NO:	Sequência de filamento antisentido <sup>1</sup>	SEQ ID NO:
AL-DP-9257	accagaggagcucuaua-gaTT		ucuauagagcuccucug-guTT	
AL-DP-9258	aaggaggagauuagugu-gagTT		cucacacuaaucucca-cuuTT	
AL-DP-9259	gaggagcucuauagagu-guTT		acacucuauagagcuc-cucTT	
AL-DP-9260	gggagacccacgcug-gaucTT		gauccagcgugggu-cucccTT	
AL-DP-9261	ugagccugacacaaau-cucTT		gagauuugugucaggcu-caTT	
AL-DP-9262	gcggacgccaccaacgu-caTT		ugacguugguggc-guccgcTT	
AL-DP-9263	cggacgcccaccaacguca-aTT		uugacguugguggc-guccgTT	
AL-DP-9264	gaaguggagauuagugu-gaTT		ucacacuaaucucca-cuucTT	
AL-DP-9265	cucguggccuuuaauga-aggTT		ccuucauuuaggccac-gagTT	
AL-DP-9266	ucguggccuuuaaugaag-gaTT		uccuucauuuaggccac-gaTT	
AL-DP-9267	aaugggaauuuacau-cagcTT		gcugauguaauucc-cauuTT	
AL-DP-9268	ggaauuuacaucag-cacccTT		ggugcugauguaauucccTT	
AL-DP-9269	ggagauuagugugagc-cuuTT		aaggcucacacuaau-cuccTT	
AL-DP-9270	cacaaaucucguggccuu-aTT		uaaggccacgagauuu-gugTT	
AL-DP-9271	acaaaucucguggccuu-aTT		uuaggccacgagauuu-guTT	
AL-DP-9272	ggagacccacgcug-gaucgTT		cgauccagcgugggu-cuccTT	

Identificador duplo	Sequência de filamento sentido <sup>1</sup>	SEQ ID NO:	Sequência de filamento antisentido <sup>1</sup>	SEQ ID NO:
AL-DP-9273	ggacgccaccaacguacaTT		guugacguugguggc-guccTT	
AL-DP-9274	gaugaaguggagauua-gugTT		cacuaaucuccacuu-caucTT	
AL-DP-9275	gugagccuugccaaa-gaugTT		caucuuuggcaaggcu-cacTT	
AL-DP-9276	caaugaauuggagaguca-guTT		acugacucuccauu-cauugTT	
AL-DP-9277	auuagugugagccuugc-caTT		uggcaaggcucacacua-auTT	
AL-DP-9278	agaugagccugacacaa-auTT		auuugugucaggcuau-cuTT	
AL-DP-9279	uagugugagccuugccaa-aTT		uuuggcaaggcucaca-cuaTT	
AL-DP-9280	uuugccaccaucaccuu-gaTT		ucaaggugaugguggca-aaTT	
AL-DP-9281	acggagagagaugcua-aTT		uugaagcaucucucucc-guTT	
AL-DP-9282	cggagagagaugcuaa-aTT		uuugaagcaucucu-cuccgTT	
AL-DP-9283	aaaaucccccacuuguaa-gaTT		ucuuacaaguggg-gauuuuTT	
AL-DP-9284	auccccaaauuugucu-gaugTT		caucagacaaaauuggg-gauTT	
AL-DP-9285	ucaaaaauccccacuugua-aTT		uuacaaguggggauuuu-gaTT	
AL-DP-9286	aaauccccacuuguaa-gauTT		aucuuacaaguggg-gauuuuTT	
AL-DP-9287	ucccccaauuugucugau-gaTT		ucaucagacaaaauuggg-gaTT	
AL-DP-9288	auggccaaguggggu-gaggTT		ccucaccccacuuggc-cauTT	

Identificador duplo	Sequência de filamento sentido <sup>1</sup>	SEQ ID NO:	Sequência de filamento antisentido <sup>1</sup>	SEQ ID NO:
AL-DP-9289	ggagucaaaaucucca-cuuTT		aaggugggauuuuga-cuccTT	

<sup>1</sup> letras maiúsculas = desoxirribonucleotídeos; letras minúsculas = ribonucleotídeos

#### BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

Nenhuma Figura é apresentada.

5

#### DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

A invenção fornece ácido ribonucléico bifilamentar (dsRNA), como também composições e métodos para inibir a expressão de um gene de Aha em uma célula ou mamífero usando o dsRNA. A invenção também provê composições e métodos para tratar condições patológicas e doenças em um mamífero causadas pela expressão de um gene de Aha usando dsRNA. dsRNA direciona a degradação sequência-específica de mRNA através de um processo conhecido como interferência de RNA (RNAi).

O dsRNA da invenção compreende um filamento de RNA (o filamento antisentido) tendo uma região que é menos de 30 nucleotídeos em comprimento, em geral 19-24 nucleotídeos em comprimento, e é substancialmente complementar a pelo menos parte de uma transcrição de mRNA de um gene de Aha. O uso destes dsRNAs permite a degradação alvejada de mRNAs de genes que estão implicados na replicação e/ou manutenção das

células cancerosas em mamíferos, e/ou na degradação do Regulador de Condutância de Transmembrana de Fibrose Cística (CFTR) desdobrado. Usando ensaios com base em célula e animais, os inventores presentes demonstraram que dosagens muito baixas destes dsRNAs específica e eficientemente podem mediar RNAi, resultando em inibição significativa da expressão de um gene de Aha. Desse modo, os métodos e composições da invenção compreendendo estes dsRNAs são úteis para tratar processos patológicos mediados por expressão de Aha, por exemplo câncer e/ou fibrose cística, alvejando um gene envolvido na degradação da proteína.

10

15

20

25

A descrição detalhada a seguir descreve como fazer e usar o dsRNA e composições contendo dsRNA para inibir a expressão de um gene de Aha, como também composições e métodos para tratar doenças e distúrbios causados pela expressão de um gene de Aha, tais como câncer e/ou fibrose cística. As composições farmacêuticas da invenção compreendem um dsRNA tendo um filamento antisentido compreendendo uma região de complementaridade que é menos de 30 nucleotídeos em comprimento, em geral 19-24 nucleotídeos em comprimento, e é substancialmente complementar a pelo menos parte de uma transcrição de RNA de um gene de Aha, junto com um veículo farmaceuticamente aceitável.

Consequentemente, certos aspectos da invenção fornecem composições farmacêuticas que compreendem o dsRNA da invenção junto com um veículo farmaceuticamente aceitável, métodos de usar as composições para inibir expressão de um gene de Aha, e métodos de usar as composições farmacêuticas para tratar doenças causadas por expressão de um gene de Aha.

#### DEFINIÇÕES

Para conveniência, o significado de certos termos e frases usados no relatório descritivo, exemplos, e reivindicações em anexo, é fornecido abaixo. Se houver uma discrepância evidente entre o uso de um termo em outras partes deste relatório descritivo e sua definição fornecida nesta seção, a definição nesta seção prevalecerá.

"G", "C", "A", "T" e "U" (independente se escritos em letras maiúsculas ou letras minúsculas), cada em geral representa um nucleotídeo contendo guanina, citosina, adenina, timina, e uracila como uma base, respectivamente. Porém, será entendido que o termo "ribonucleotídeo" ou "nucleotídeo" pode também referir-se a um nucleotídeo modificado, como mais detalhado abaixo, ou uma porção de substituição do substituto. A pessoa versada é bem ciente que guanina, citosina, adenina, timina, e uracila podem ser substituídas por outras porções sem substancialmente alterar as propriedades de pareamento de base de um oligonucleotídeo compreendendo um nucleotídeo carregando tal porção de substituição. Por exemplo,

sem limitação, um nucleotídeo compreendendo inosina como sua base pode parear em base com nucleotídeos contendo adenina, citosina, ou uracila. Consequentemente, nucleotídeos contendo uracila, guanina, ou adenina podem ser substituídos nas sequências de nucleotídeo da invenção por um 5 nucleotídeo contendo, por exemplo, inosina. Sequências compreendendo tais porções de substituição são modalidades da invenção.

Como aqui usado, "gene de Aha" refere-se ao Ativador dos genes de ATPase da Proteína de Choque Térmico 90. "Aha1" refere-se ao Ativador dos genes de ATPase 1 da Proteína de Choque Térmico 90, exemplos não-exaustivos destes são encontrados sob os números de acesso do Genbank NM\_012111.1 (*Homo sapiens*), NM\_146036.1 (*Mus musculus*), e XM\_510094.1 (*Pan troglodytes*). "Aha2" refere-se ao Ativador putativo dos genes de ATPase 2 da Proteína de Choque Térmico 90, também conhecido como Ahsa2, exemplos não-exaustivos destes podem ser encontrados sob 10 os números de acesso do Genbank NM\_172391.3 (*Mus musculus*) e XM\_223680.3 (*Rattus norvegicus*).

Como aqui usado, "sequência alvo" refere-se a uma porção contígua da sequência de nucleotídeo de uma molécula de mRNA formada durante a transcrição de um gene de Aha, incluindo mRNA que é um produto 20 do processamento de RNA de um produto de transcrição primário. A sequência alvo de qualquer agente de RNAi dado da invenção significa uma sequência de mRNA de nucleotídeos X que são alvejados pelo agente de RNAi em virtude da complementaridade do filamento antisentido do agente de RNAi para tal sequência e com a qual o filamento antisentido pode hibridar quando colocado em contato com o mRNA, em que X é o número de 25 nucleotídeos no filamento antisentido mais o número de nucleotídeos em uma extensão unifilamentar do filamento sentido, se houver.

Como aqui usado, o termo "filamento compreendendo uma sequência" refere-se a um oligonucleotídeo compreendendo uma cadeia de 30 nucleotídeos que é descrita pela sequência referida usando a nomenclatura de nucleotídeo padrão.

Como aqui usado, e a menos que do contrário indicado, o termo

"complementar", quando usado para descrever uma primeira sequência de nucleotídeo em relação a uma segunda sequência de nucleotídeo, refere-se à habilidade de um oligonucleotídeo ou polinucleotídeo compreendendo a primeira sequência de nucleotídeo para hibridar e formar uma estrutura duplex sob certas condições com um oligonucleotídeo ou polinucleotídeo compreendendo a segunda sequência de nucleotídeo, como será entendido pela pessoa versada. Tais condições podem, por exemplo, ser condições rigorosas onde condições rigorosas podem incluir: 400 mM de NaCl, 40 mM de PIPES pH 6,4, 1 mM de EDTA, 50°C ou 70°C durante 12-16 horas seguidas por lavagem. Outras condições, tais como condições fisiologicamente relevantes que podem ser encontradas dentro de um organismo, podem aplicar-se. A pessoa versada poderá determinar o conjunto de condições mais apropriado para um teste de complementaridade de duas sequências de acordo com a última aplicação dos nucleotídeos hibridados.

Este inclui pareamento de base do oligonucleotídeo ou polinucleotídeo compreendendo a primeira sequência de nucleotídeo com o oligonucleotídeo ou polinucleotídeo compreendendo a segunda sequência de nucleotídeo no comprimento inteiro da primeira e segunda sequência de nucleotídeo. Tais sequências podem ser referidas como "completamente complementares" com respeito uma à outra aqui. Porém, onde uma primeira sequência for referida como "substancialmente complementar" com respeito a uma segunda sequência aqui, as duas sequências podem ser completamente complementares, ou elas podem formar um ou mais, mas em geral não mais que 4, 3 ou 2 pares de base não-pareados sob hibridação, enquanto retendo a habilidade para hibridar sob as condições mais relevantes com sua última aplicação. Porém, onde dois oligonucleotídeos forem projetados para formar, sob hibridação, uma ou mais extensões unifilamentares, tais extensões não devem ser consideradas como disparidades com respeito à determinação de complementaridade. Por exemplo, um dsRNA compreendendo um oligonucleotídeo de 21 nucleotídeos em comprimento e outro oligonucleotídeo de 23 nucleotídeos em comprimento, em que o oligonucleotídeo mais longo compreende uma sequência de 21 nucleotídeos que é com-

pletamente complementar ao oligonucleotídeo mais curto, ainda pode ser referido como "completamente complementar" para o propósito da invenção.

- Sequências "complementares", como aqui usadas, podem também incluir, ou ser formadas completamente de pares de base de não-Watson-Crick e/ou pares de base formados de nucleotídeos não-naturais e modificados, em até onde os requerimentos acima com respeito a sua habilidade para hibridar forem satisfeitos.

Os termos "complementar", "completamente complementar" e "substancialmente complementar" aqui pode ser usado com respeito ao pareamento de bases entre o filamento sentido e o filamento antisentido de um dsRNA, ou entre o filamento antisentido de um dsRNA e uma sequência alvo, como será entendido do contexto de seu uso.

Como aqui usado, um polinucleotídeo que é "substancialmente complementar a pelo menos parte de" um RNA mensageiro (mRNA) refere-se a um polinucleotídeo que é substancialmente complementar a uma porção contígua do mRNA de interesse (por exemplo, Aha1 de codificação). Por exemplo, um polinucleotídeo é complementar a pelo menos uma parte de um mRNA de Aha1 se a sequência for substancialmente complementar a uma porção não-interrompida de um mRNA que codifica Aha1.

O termo "RNA bifilamentar" ou "dsRNA", como aqui usado, refere-se a um complexo de moléculas de ácido ribonucléico, tendo uma estrutura dúplex que compreende dois filamentos de ácido nucléico antiparalelos e substancialmente complementares, como definidos acima. Os dois filamentos que formam a estrutura dúplex podem ser porções diferentes de uma molécula de RNA maior, ou eles podem ser moléculas de RNA separadas. Onde os dois filamentos fizerem parte de uma molécula maior, e portanto estarem conectados por uma cadeia não-interrompida de nucleotídeos entre a terminação 3' de um filamento e a terminação 5' do respectivo outro filamento que forma a estrutura dúplex, a cadeia de RNA de conexão é referida como um "alça de alfinete". Onde os dois filamentos estiverem conectados covalentemente por meio diferente de uma cadeia não-interrompida de nucleotídeos entre a terminação 3' de um filamento e a terminação 5' do

respectivo outro filamento que forma a estrutura dúplex, a estrutura de conexão é referida como um "ligante". Os filamentos de RNA podem ter o mesmo número ou diferente de nucleotídeos. O número máximo de pares de base é o número de nucleotídeos no filamento mais curto do dsRNA nos 5 qualquer extensão que esteja presente no duplex. Além da estrutura duplex, um dsRNA pode compreender uma ou mais extensões de nucleotídeo.

Como aqui usado, uma "extensão de nucleotídeo" refere-se ao nucleotídeo não-pareado ou nucleotídeos que se protraem da estrutura duplex de um dsRNA quando uma terminação 3' de um filamento do dsRNA estende-se além da terminação 5' do outro filamento, ou vice-versa. "Cega" ou "terminação cega" significa que não há nenhum nucleotídeo não-pareado naquela terminação do dsRNA, isto é, nenhuma extensão de nucleotídeo. Um dsRNA "com terminação cega" é um dsRNA que não tem nenhuma extensão de nucleotídeo em qualquer terminação da molécula.

O termo "filamento antisentido" refere-se ao filamento de um dsRNA que inclui uma região que é substancialmente complementar a uma sequência alvo. Como aqui usado, o termo "região de complementaridade" refere-se à região no filamento antisentido que é substancialmente complementar a uma sequência, por exemplo uma sequência alvo, como definida aqui. Onde a região de complementaridade não for completamente complementar à sequência alvo, as disparidades são mais toleradas nas regiões terminais e, se presente, estão em geral em uma região ou regiões terminais, por exemplo, dentro de 6, 5, 4, 3, ou 2 nucleotídeos dos términos 5' 20 e/ou 3'. O mais preferivelmente, as disparidades estão localizadas dentro de 6, 5, 4, 3, ou 2 nucleotídeos do término de 5' do filamento antisentido e/ou 25 do término de 3' do filamento sentido.

O termo "filamento sentido", como aqui usado, refere-se ao filamento de um dsRNA que inclui uma região que é substancialmente complementar a uma região do filamento antisentido.

"Introduzir em uma célula", quando referir-se a um dsRNA, significa facilitar absorção ou absorvimento na célula, como é entendido por

aqueles versados na técnica. Absorção ou absorvimento de dsRNA pode ocorrer através de processos celulares difusivos ou ativos sem ajuda, ou por agentes ou dispositivos auxiliares. O significado deste termo não é limitado a células in vitro; um dsRNA pode também ser "introduzido em uma célula",

5 em que a célula faz parte de um organismo vivo. Em tal circunstância, a introdução na célula incluirá a liberação ao organismo. Por exemplo, para liberação in vivo, o dsRNA pode ser injetado em um sítio de tecido ou administrado sistemicamente. Introdução in vitro em uma célula inclui métodos conhecidos na técnica tais como eletroporação e lipofecção.

10 Os termos "silêncio" e "inibir a expressão de", em até onde eles referirem a um gene de Aha, por exemplo um gene de Aha1, aqui se referem a pelo menos supressão parcial da expressão de um gene de Aha, por exemplo um gene de Aha1, como manifestada por uma redução da quantidade de mRNA transscrito de um gene de Aha que pode ser isolado de uma  
15 primeira célula ou grupo de células em que um gene de Aha é transscrito e que tem ou foi tratado de modo que a expressão de um gene de Aha é inibida, quando comparada a uma segunda célula ou grupo de células substancialmente idênticas à primeira célula ou grupo de células mas que tem ou não foi tratadas assim (células de controle). Preferivelmente, as células são  
20 células HeLa ou MLE 12. O grau de inibição usualmente é expressado em termos de

$$\frac{(\text{mRNA em células de controle}) - (\text{mRNA em células tratadas})}{100 \%}$$

mRNA em células de controle

25 Alternativamente, o grau de inibição pode ser dado em termos de uma redução de um parâmetro que é ligado funcionalmente a transcrição do gene de Aha, por exemplo a quantidade de proteína codificada por um gene de Aha que é segregado por uma célula, ou encontrado na solução após lise de tais células, ou o número de células que exibem um certo fenótipo, por exemplo apoptose ou CFTR de superfície celular. Em princípio, silenciamento de gene de Aha pode ser determinado em qualquer célula que expresse o alvo, constitutivamente ou através de engenharia genômica, e

por qualquer ensaio apropriado. Porém, quando uma referência for necessária para determinar se um dsRNA dado inibe a expressão de um gene de Aha em um certo grau e portanto é abrangido pela invenção imediata, os ensaios fornecidos nos Exemplos abaixo servirão como tal referência.

5           Por exemplo, em certas circunstâncias, expressão de um gene de Aha, por exemplo um gene de Aha1, é suprimida em pelo menos cerca de 20%, 25%, 35%, ou 50% por administração do oligonucleotídeo bifilamentar da invenção. Em alguma modalidade, um gene de Aha, por exemplo um gene de Aha1, é suprimido em pelo menos cerca de 60%, 70%, ou 80%

10          por administração do oligonucleotídeo bifilamentar da invenção. Em algumas modalidades, um gene de Aha, por exemplo um gene de Aha1, é suprimido em pelo menos cerca de 85%, 90%, ou 95% por administração do oligonucleotídeo bifilamentar da invenção. Tabela 6 provê valores para inibição da expressão de Aha1 usando várias moléculas de dsRNA da invenção.

15          Como aqui usado no contexto de expressão de Aha, por exemplo Expressão de Aha1, os termos "tratar", "tratamento", e outros, referem-se a alívio ou mitigação de processos patológicos mediados por expressão de Aha. No contexto da presente invenção enquanto refere-se a quaisquer das outras condições recitadas aqui abaixo (diferentes de processos patológicos mediados por expressão de Aha), os termos "tratar", "tratamento", e outros intencionam aliviar ou mitigar pelo menos um sintoma associado a tal condição, ou reduzir ou inverter a progressão de tal condição.

          Como aqui usado, as frases "quantidade terapeuticamente eficaz" e "quantidade profilaticamente eficaz" referem-se a uma quantidade que fornece um benefício terapêutico no tratamento, prevenção, ou gerenciamento de processos patológicos mediados por expressão de Aha ou um sintoma evidente de processos patológicos mediados por expressão de Aha. A quantidade específica que é terapeuticamente eficaz pode ser facilmente determinada por médico usual, e pode variar, dependendo de fatores conhecidos na técnica, tais como, por exemplo o tipo de processos patológicos mediados por expressão de Aha, a história do paciente e idade, o estágio dos processos patológicos mediados por expressão de Aha, e a administra-

ção de outros processos antipatológicos mediados por agentes de expressão de Aha.

Como aqui usado, uma "composição farmacêutica" compreende uma quantidade farmacologicamente eficaz de um dsRNA e um veículo farmaceuticamente aceitável. Como aqui usado, "quantidade farmacologicamente eficaz", "quantidade terapeuticamente eficaz" ou simplesmente "quantidade eficaz" referem-se àquela quantidade de um RNA eficaz para produzir o resultado farmacológico, terapêutico ou preventivo intencionado. Por exemplo, se um tratamento clínico dado for considerado eficaz quando houver pelo menos uma redução de 25% em um parâmetro mensurável associado a uma doença ou distúrbio, uma quantidade terapeuticamente eficaz de um fármaco para o tratamento daquela doença ou distúrbio é a quantidade necessária para realizar pelo menos uma redução de 25% naquele parâmetro.

O termo "veículo farmaceuticamente aceitável" refere-se ao veículo para administração de um agente terapêutico. Tais veículos incluem, mas não são limitados a, solução salina, solução salina tamponada, dextrose, água, glicerol, etanol, e combinações dos mesmos. O termo especificamente exclui meio de cultura de célula. Para fármacos administrados oralmente, os veículos farmaceuticamente aceitáveis incluem, mas não são limitados a excipientes farmaceuticamente aceitáveis tais como diluentes inertes, agentes desintegrantes, agentes de ligação, agentes lubrificantes, agentes adoçantes, agentes flavorizantes, agentes de coloração e conservantes. Diluentes inertes adequados incluem carbonato de sódio e cálcio, fosfato de sódio e cálcio, e lactose, enquanto amido de milho e ácido algínico são agentes desintegrantes adequados. Agentes de ligação podem incluir amido e gelatina, enquanto o agente lubrificante, se presente, em geral será estearato de magnésio, ácido esteárico ou talco. Se desejado, os comprimidos podem ser revestidos com um material tal como monoestearato de glicerila ou diestearato de glicerila, para retardar a absorção no trato gastrointestinal.

Como aqui usado, uma "célula transformada" é uma célula à qual um vetor foi introduzido do qual uma molécula de dsRNA pode ser ex-

pressada.

#### ÁCIDO RIBONUCLÉICO BIFILAMENTAR (dsRNA)

Em uma modalidade, a invenção fornece moléculas de ácido ribonucléico bifilamentar (dsRNA) para inibir a expressão de um gene de Aha, por exemplo um gene de Aha1, em uma célula ou mamífero, em que o dsRNA compreende um filamento antisentido compreendendo uma região de complementaridade que é complementar a pelo menos uma parte de um mRNA formado na expressão de um gene de Aha, por exemplo um gene de Aha1, e em que a região de complementaridade é menos de 30 nucleotídeos em comprimento, em geral 19-24 nucleotídeos em comprimento. O dsRNA pode ser idêntico a um dos dsRNAs mostrados na Tabela 1 e Tabela 2, ou pode realizar clivagem de um mRNA que codifica um gene de Aha dentro da sequência alvo de um dos dsRNAs mostrados na Tabela 1 e Tabela 2. Preferivelmente, o dsRNA tem pelo menos 5, pelo menos 10, pelo menos 15, pelo menos 18, ou pelo menos 20 nucleotídeos contíguos por filamento em comum com pelo menos um filamento, mas preferivelmente ambos os filamentos, de um dos dsRNAs mostrados na Tabela 1 e Tabela 2. dsRNAs alternativos que alvejam outro lugar na sequência alvo de um dos dsRNAs fornecidos na Tabela 1 e Tabela 2 podem ser facilmente determinados usando a sequência alvo e a sequência de Aha1 de flanqueamento.

O dsRNA compreende dois filamentos de RNA que são suficientemente complementares para hibridarem-se para formar uma estrutura dúplex. Um filamento do dsRNA (o filamento antisentido) compreende uma região de complementaridade que é substancialmente complementar, e em geral completamente complementar, a uma sequência alvo, derivada da sequência de um mRNA formada durante a expressão de um gene de Aha, o outro filamento (o filamento sentido) compreende uma região que é complementar ao filamento antisentido, de modo que os dois filamentos hibridam-se e formam uma estrutura dúplex quando combinados sob condições adequadas. Em geral, a estrutura dúplex é entre 15 e 30, mais em geral entre 18 e 25, ainda mais em geral entre 19 e 24, e mais em geral entre 19 e

21 pares de base em comprimento. Similarmente, a região de complementaridade para a sequência alvo é entre 15 e 30, mais em geral entre 18 e 25, ainda mais em geral entre 19 e 24, e mais em geral entre 19 e 21 nucleotídeos em comprimento. O dsRNA da invenção pode também compreender  
5 uma ou mais extensões de nucleotídeo unifilamentar. O dsRNA pode ser sintetizado por métodos padrões conhecidos na técnica como também debatidos abaixo, por exemplo, por uso de um sintetizador de DNA automatizado, tal como está comercialmente disponível, por exemplo, de Biosearch, Applied Biosystems, Inc. Em uma modalidade preferida, um gene de Aha é  
10 o gene de Aha1 humano. Em modalidades específicas, o primeiro filamento do dsRNA compreende as sequências de sentido dos agentes de RNAi AL-DP-7301 - AL-DP-7346 e AL-DP-7561 - AL-DP-7564 (Tabela 1), e AL-DP-9250 - AL-DP-9289 (Tabela 2), e a segunda sequência é selecionada do grupo que consiste nas sequências de antisentido de AL-DP-7301 - AL-DP-  
15 7346 e AL-DP-7561 - AL-DP-7564 (Tabela 1) e AL-DP-9250 - AL-DP-9289 (Tabela 2).

Em outras modalidades, o dsRNA compreende pelo menos uma sequência de nucleotídeo selecionada dos grupos de sequências fornecidas acima para os agentes de RNAi AL-DP-7301 - AL-DP-7346 e AL-DP-7561 -  
20 AL-DP-7564 (Tabela 1) e AL-DP-9250 - AL-DP-9289 (Tabela 2). Em outras modalidades, o dsRNA compreende pelo menos duas sequências selecionadas deste grupo, em que uma das pelo menos duas sequências é complementar à outra das pelo menos duas sequências, e uma das pelo menos duas sequências é substancialmente complementar a uma sequência de um mRNA gerada na expressão de um gene de Aha, por exemplo um gene de Aha1. Em geral, o dsRNA compreende dois oligonucleotídeos, em que um oligonucleotídeo pode ser descrito como o filamento sentido em um dos agentes de RNAi AL-DP-7301 - AL-DP-7346 e AL-DP-7561 - AL-DP-7564 (Tabela 1), e AL-DP-9250 - AL-DP-9289 (Tabela 2), e o segundo oligonucleo-  
25 tídeo pode ser descrito como o filamento antisentido em um dos agentes de RNAi AL-DP-7301 - AL-DP-7346 e AL-DP-7561 - AL-DP-7564 (Tabela 1), e AL-DP-9250 - AL-DP-9289 (Tabela 2).

A pessoa versada está bem ciente que dsRNAs compreendendo uma estrutura dúplex de entre 20 e 23, mas especificamente 21, pares de base foram aclamadas como particularmente eficazes em induzir interferência de RNA (Elbashir et al., EMBO 2001, 20:6877-6888). Porém, outros 5 descobriram que dsRNAs mais curtos ou mais longos podem ser eficazes também. Nas modalidades descritas acima, em virtude da natureza das sequências de oligonucleotídeo fornecidas para os agentes de RNAi AL-DP-7301 - AL-DP-7346 e AL-DP-7561 - AL-DP-7564 (Tabela 1), e AL-DP-9250 - AL-DP-9289 (Tabela 2), os dsRNAs da invenção podem compreender pelo 10 menos um filamento de um comprimento de no mínimo 21 nt. Pode ser razoavelmente esperado que dsRNAs mais curtos compreendendo uma das sequências fornecidas aqui para os agentes de RNAi AL-DP-7301 - AL-DP-7346 e AL-DP-7561 - AL-DP-7564 (Tabela 1), e AL-DP-9250 - AL-DP-9289 (Tabela 2), menos apenas alguns nucleotídeos em uma ou ambas terminações 15 possam ser similarmente eficazes quando comparados aos dsRNAs descritos acima. Consequentemente, dsRNAs compreendendo uma sequência parcial de pelo menos 15, 16, 17, 18, 19, 20, ou mais nucleotídeos contíguos de uma das sequências dos agentes de RNAi AL-DP-7301 - AL-DP-7346 e AL-DP-7561 - AL-DP-7564 (Tabela 1), e AL-DP-9250 - AL-DP- 20 9289 (Tabela 2), e diferindo em sua habilidade para inibir a expressão de um gene de Aha, por exemplo um gene de Aha1, em um ensaio de FACS como descrito aqui abaixo em não mais que 5, 10, 15, 20, 25, ou 30% de inibição de um dsRNA compreendendo a sequência total, é contemplado pela invenção.

25 Outros dsRNAs que clivam dentro da sequência alvo dos agentes de RNAi AL-DP-7301 - AL-DP-7346 e AL-DP-7561 - AL-DP-7564 (Tabela 1), e AL-DP-9250 - AL-DP-9289 (Tabela 2), podem ser facilmente feitos usando a sequência de gene de Aha1 e a respectivo sequência alvo. Os agentes de RNAi fornecidos na Tabela 1 e Tabela 2 identificam um sítio no 30 mRNA de Aha1 que é suscetível à clivagem com base em RNAi. Como tal a presente invenção inclui agentes de RNAi que alvejam dentro da sequência alvejada por um dos agentes da presente invenção. Como aqui usado um

dsRNA é dito alvejar dentro da sequência de um segundo dsRNA se o dsRNA clivar a mensagem em qualquer lugar dentro do mRNA sendo complementar ao filamento antisentido do segundo dsRNA. Um tal dsRNA em geral terá pelos menos 5, pelo menos 10, pelo menos 15, pelo menos 18, ou pelo 5 menos 20 nucleotídeos contíguos de uma das sequências fornecidas na Tabela 1 e Tabela 2 acopladas às sequências de nucleotídeo adicionais tiradas da região contígua para a sequência selecionada em um mRNA que codifica um gene de Aha. Por exemplo, os 15 nucleotídeos mais da 3' da sequência alvo de AL-DP-7301 combinados com os próximos 6 nucleotídeos do gene 10 de Aha1 alvo produzem um agente de filamento simples de 21 nucleotídeos que são com base em uma das sequências fornecidas na Tabela 1 e Tabela 2.

Preferivelmente, o segundo dsRNA é selecionado do grupo de dsRNAs que tem uma certa atividade na inibição da expressão de um gene 15 de Aha em um ensaio adequado, tal como os ensaios descritos aqui. Por conseguinte, em certas modalidades preferidas, o segundo dsRNA é selecionado do grupo de AL-DP-7301, AL-DP-7308, AL-DP-7318, AL-DP-7320, AL-DP-7322, AL-DP-7324, AL-DP-7325, AL-DP-7326, AL-DP-7327, AL-DP- 20 7329, AL-DP-7331, AL-DP-7333, AL-DP-7340, AL-DP-7342, AL-DP-7303, AL-DP-7305, AL-DP-7307, AL-DP-7309, AL-DP-7316, e AL-DP-7337, AL- DP-7304, AL-DP-7312, AL-DP-7339, AL-DP-7344, AL-DP-7306, AL-DP- 25 7317, AL-DP-7346, AL-DP-7310, AL-DP-7323, AL-DP-7335, AL-DP-7338, AL-DP-7341, AL-DP-7302, AL-DP-7315, AL-DP-7328, AL-DP-7330, AL-DP- 30 7336, AL-DP-7345, AL-DP-9250, AL-DP-9251, AL-DP-9252, AL-DP-9253, AL-DP-9254, AL-DP-9255, AL-DP-9256, AL-DP-9257, AL-DP-9258, AL-DP- 9259, AL-DP-9260, AL-DP-9261, AL-DP-9262, AL-DP-9263, AL-DP-9264, AL-DP-9265, AL-DP-9266, AL-DP-9267, AL-DP-9268, AL-DP-9269, AL-DP- 9270, AL-DP-9271, AL-DP-9272, AL-DP-9273, AL-DP-9274, AL-DP-9275, AL-DP-9276, AL-DP-9277, AL-DP-9279, AL-DP-9280, AL-DP-9281, AL-DP- 9282, AL-DP-9283, AL-DP-9284, AL-DP-9285, AL-DP-9286, AL-DP-9287, AL-DP-9288, e AL-DP-9289.

O dsRNA da invenção pode conter uma ou mais disparidades

para a sequência alvo. Em uma modalidade preferida, o dsRNA da invenção contém não mais que 3 disparidades. Se o filamento antisentido do dsRNA contiver disparidades para uma sequência alvo, é preferível que a área de disparidade não esteja localizada no centro da região de complementaridade. Se o filamento antisentido do dsRNA contiver disparidades para a sequência alvo, é preferível que a disparidade esteja restringida a 5 nucleotídeos de qualquer terminação, por exemplo 5, 4, 3, 2, ou 1 nucleotídeo da terminação 5' ou 3' da região de complementaridade, e preferivelmente da terminação 5'. Por exemplo, para um filamento de dsRNA de 23 nucleotídeos que é complementar a uma região de um gene de Aha, o dsRNA em geral não contenha nenhuma disparidade dentro dos 13 nucleotídeos centrais. Em outra modalidade, o filamento antisentido do dsRNA não contém nenhuma disparidade na região das posições 1, ou 2, às posições 9, ou 10, do filamento antisentido (contando de 5'-3'). Os métodos descritos dentro da invenção podem ser usados para determinar se um dsRNA que contém uma disparidade para uma sequência alvo é eficaz em inibir a expressão de um gene de Aha. Consideração da eficácia dos dsRNAs com disparidades em inibir expressão de um gene de Aha é importante, especialmente se a região particular de complementaridade em um gene de Aha for conhecida ter variação de sequência polimórfica dentro da população.

Em uma modalidade, pelo menos uma terminação do dsRNA tem uma extensão de nucleotídeo unifilamentar de 1 a 4, em geral 1 ou 2 nucleotídeos. dsRNAs tendo pelo menos uma extensão de nucleotídeo tem inesperadamente propriedades inibidoras superiores que suas contrapartes com terminação cega. Além disso, os inventores presentes descobriram que a presença de apenas uma extensão de nucleotídeo fortalece a atividade de interferência do dsRNA, sem afetar sua estabilidade geral. dsRNA tendo apenas uma extensão provaram particularmente estável e eficaz *in vivo*, como também em uma variedade de células, meios de cultura de célula, sangue, e soro. Em geral, a extensão unifilamentar fica localizada na terminação 3'-terminal do filamento antisentido ou, alternativamente, na terminação 3'-terminal do filamento sentido. O dsRNA pode também ter uma termi-

nação cega, em geral localizada na terminação 5' do filamento antisentido. Tais dsRNAs melhoraram a estabilidade e a atividade inibidora, desse modo permitindo administração em baixas dosagens, isto é, menos que 5 mg/kg peso do corpo do recipiente por dia. Em geral, o filamento antisentido do 5 dsRNA tem uma extensão de nucleotídeo na terminação 3', e a terminação 5' é cego. Em outra modalidade, um ou mais dos nucleotídeos na extensão são substituídos com um tiofosfato de nucleosídeo.

Em ainda outra modalidade, o dsRNA é quimicamente modificado para intensificar a estabilidade. Os ácidos nucléicos da invenção podem ser sintetizados e/ou modificados por métodos bem estabelecidos na técnica, tais como aqueles descritos em "Current protocols in nucleic acid chemistry", Beaucage, S. L. et al. (Edrs.), John Wiley & Sons, Inc., Nova Iorque, NY, USA, que é por este meio incorporado aqui por referência. Exemplos específicos de compostos de dsRNA preferidos úteis nesta invenção incluem dsRNAs contendo cadeias principais modificadas ou nenhuma ligação de internucleosídeo natural. Como definidos neste relatório descritivo, os dsRNAs tendo cadeias principais modificadas incluem aqueles que retêm um átomo de fósforo na cadeia principal e aqueles que não têm um átomo de fósforo na cadeia principal. Para o propósito deste relatório descritivo, e 10 como às vezes referido na técnica, dsRNAs modificados não tendo um átomo de fósforo em sua cadeia principal de internucleosídeo podem também ser considerados ser oligonucleosídeos.

15

20

Cadeias principais de dsRNA modificadas preferidas incluem, por exemplo, fosforotioatos, fosforotioatos de quiral, fosforoditioatos, fosfo- 25 triésteres, aminoalquilfosfotriésteres, fosfonatos de metila e outros de alquila incluindo fosfonatos de 3'-alquíleno e fosfonatos de quiral, fosfinatos, fosforamidatos incluindo fosforamidato de 3'-amino e aminoalquilfosforamidatos, tionofosforamidatos, tionalquilfosfonatos, tionalquilfosfotriésteres, e bora- 30 nofosfatos tendo ligações 3'-5' normais, análogos ligados de 2'-5' destes, e aqueles tendo polaridade invertida em que os pares adjacentes das unidades de nucleosídeo são ligados 3'-5' a 5'-3' ou 2'-5' a 5'-2'. Vários sais, sais misturados e formas de ácidos livres são também inclusos.

Patentes U. S. representativas que ensinam a preparação das ligações contendo fósforo acima incluem, mas não são limitadas a, Pat. U. S. Nos. 3.687.808; 4.469.863; 4.476.301; 5.023.243; 5.177.195; 5.188.897; 5.264.423; 5.276.019; 5.278.302; 5.286.717; 5.321.131; 5.399.676; 5 5.405.939; 5.453.496; 5.455.233; 5.466.677; 5.476.925; 5.519.126; 5.536.821; 5.541.316; 5.550.111; 5.563.253; 5.571.799; 5.587.361; e 5.625.050, cada uma destas é aqui incorporada por referência.

Cadeias principais de dsRNA modificadas preferidas que não incluem um átomo de fósforo nelas têm cadeias principais que são formadas 10 por ligações de internucleosídeo de alquila ou cicloalquila de cadeia curta, heteroátomos misturados e ligações de internucleosídeo de alquila ou de cicloalquila, ou uma ou mais ligações de internucleosídeo heteroatômico ou heterocíclico de cadeia curta. Estas incluem aquelas tendo ligações de morfolino (formado na parte da porção de açúcar de um nucleosídeo); cadeias 15 principais de siloxano; cadeias principais de sulfeto, sulfóxido e sulfona; cadeias principais de formacetila e tioformacetila; cadeias principais de formacetila de metileno e tioformacetila; cadeias principais contendo alqueno; cadeias principais de sulfamato; cadeias principais de metileneimino e metilenoidrazino; cadeias principais de sulfonato e sulfonamida; cadeias principais 20 de amida; e similares tendo partes de componentes de N, O, S e CH<sub>2</sub> misturadas.

Patente U. S. representativa que ensina a preparação dos oligonucleosídeos acima incluem, mas não são limitadas a, Pat. U. S. Nos. 5.034.506; 5.166.315; 5.185.444; 5.214.134; 5.216.141; 5.235.033; 25 5.64.562; 5.264.564; 5.405.938; 5.434.257; 5.466.677; 5.470.967; 5.489.677; 5.541.307; 5.561.225; 5.596.086; 5.602.240; 5.608.046; 5.610.289; 5.618.704; 5.623.070; 5.663.312; 5.633.360; 5.677.437; e, 5.677.439, cada uma destas é aqui incorporada por referência.

Em outros miméticos de dsRNA preferidos, tanto o açúcar como 30 a ligação de internucleosídeo, isto é, a cadeia principal, das unidades de nucleotídeo são substituídos com grupos novos. As unidades de base são mantidas para hibridação com um composto alvo de ácido nucléico apropri-

ado. Um tal composto oligomérico, um dsRNA mimético que foi mostrado ter propriedades de hibridação excelentes, é referido como um ácido nucléico de peptídeo (PNA). Em compostos de PNA, a cadeia principal de açúcar de um dsRNA é substituída com uma amida contendo a cadeia principal, em particular uma cadeia principal de aminoetilglicina. As nucleobases são retiradas e são direta ou indiretamente ligadas aos átomos de nitrogênio de aza da porção de amida da cadeia principal. Patente U. S. representativo que ensinam a preparação dos compostos de PNA incluem, mas não são limitadas a, Pat. U. S. Nos. 5.539.082; 5.714.331; e 5.719.262, cada uma destas 10 é aqui incorporada por referência. Mais ensinamento de compostos de PNA podem ser encontrados em Nielsen et al., Sience, 1991, 254, 1497-1500.

A maioria das modalidades preferidas da invenção são dsRNAs com cadeias principais de fosforotioato e oligonucleosídeos com cadeias principais de heteroátomo, e em particular -CH<sub>2</sub>-NH-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-N(CH<sub>3</sub>)-O-CH<sub>2</sub>- [conhecidas como uma cadeia principal de metileno (metilimino) ou MMI], -CH<sub>2</sub>-O-N(CH<sub>3</sub>)-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-N(CH<sub>3</sub>)-N(CH<sub>3</sub>)-CH<sub>2</sub>- e -N(CH<sub>3</sub>)-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>- [em que a cadeia principal de fosfodiéster nativa é representada como -O-P-O-CH<sub>2</sub>-] da Pat. U. S. No. 5.489.677 acima referida, e as cadeias principais de amida da Pat. U. S. No. 5.602.240 acima referida. Também preferidos 15 são dsRNAs tendo estruturas de cadeia principal de morfolino da Pat. U. S. No. 5.034.506 acima referida.

DsRNAs modificados podem também conter uma ou mais porções de açúcar substituídas. DsRNAs preferidos compreendem um dos seguintes na posição 2': OH; F; O-, S-, ou N-alquila; O-, S-, ou N-alquenila; O-, S- ou N-alquinila; ou O-alquil-O-alquila, em que a alquila, alquenila e alquinila podem ser C<sub>1</sub> a C<sub>10</sub> alquila ou C<sub>2</sub> a C<sub>10</sub> alquenila e alquinila substituídas ou insubstituídas. Particularmente preferidos são O[(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>O]<sub>m</sub>CH<sub>3</sub>, O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>OCH<sub>3</sub>, O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>NH<sub>2</sub>, O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CH<sub>3</sub>, O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>ONH<sub>2</sub>, e 25 O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>ON[(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CH<sub>3</sub>]<sub>2</sub>, onde n e m são de 1 a cerca de 10. Outros dsRNAs preferidos compreendem um dos seguintes na posição 2': C<sub>1</sub> a C<sub>10</sub> alquila inferior, alquila inferior substituída, alcarila, aralquila, O-alcarila ou O-30 aralquila, SH, SCH<sub>3</sub>, OCN, Cl, Br, CN, CF<sub>3</sub>, OCF<sub>3</sub>, SOCH<sub>3</sub>, SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, ONO<sub>2</sub>,

NO<sub>2</sub>, N<sub>3</sub>, NH<sub>2</sub>, heterocicloalquila, heterocicloalcarila, aminoalquilamino, polialquilamino, silila substituída, um grupo de clivagem de RNA, um grupo repórter, um intercalator, um grupo para melhorar as propriedades farmacocinéticas de um dsRNA, ou um grupo para melhorar as propriedades farmacodinâmicas de um dsRNA, e outros substituintes tendo propriedades similares. Uma modificação preferida inclui 2'-metoxietóxi (2'-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>, também conhecido como 2'-O-(2-metoxietil) ou 2'-MOE (Martin et al., Helv. Chim. Acta, 1995, 78, 486-504) isto é, um grupo alcóxi-alcóxi. Uma modificação preferida também inclui 2'-dimetilaminooxietóxi, isto é, um grupo O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>ON(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, também conhecido como 2'-DMAOE, como descrito nos exemplos mais abaixo, e 2'-dimetilaminoetoxietóxi (também conhecido na técnica como 2'-O-dimetilaminoetoxietila ou 2'-DMAEOE), isto é, 2'-O-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-N(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>, também descrito nos exemplos mais abaixo.

Outras modificações preferidas incluem 2'-metóxi (2'-OCH<sub>3</sub>), 2'-aminopropóxi (2'-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>) e 2'-flúor (2'-F). Modificações similares podem também ser feita nas outras posições no dsRNA, particularmente na posição 3' do açúcar no nucleotídeo terminal 3' ou em dsRNAs ligados 2'-5' e na posição 5' do nucleotídeo terminal 5'. DsRNAs pode também ter miméticos de açúcar tais como porções de ciclobutila no lugar do açúcar de pentofuranosila. Patente U. S. representativo que ensina a preparação de tais estruturas de açúcar modificada incluem, mas não são limitadas a, Pat. U. S. Nos. 4.981.957; 5.118.800; 5.319.080; 5.359.044; 5.393.878; 5.446.137; 5.466.786; 5.514.785; 5.519.134; 5.567.811; 5.576.427; 5.591.722; 5.597.909; 5.610.300; 5.627.053; 5.639.873; 5.646.265; 5.658.873; 5.670.633; e 5.700.920, algumas destas são de propriedade comum com o pedido de patente imediato, e cada uma destas é aqui incorporada por referência em sua totalidade.

DsRNAs podem também incluir modificações ou substituições da nucleobase (frequentemente referidas na técnica simplesmente como "base"). Como aqui usado, nucleobases "inalteradas" ou "naturais" incluem as bases de purina adenina (A) e guanina (G), e as bases de pirimidina timina (T), citosina (C) e uracila (U). Nucleobases modificadas incluem outras

nucleobases sintéticas e naturais tais como 5-metilcitosina (5-me-C), 5-hidroximetila citosina, xantina, hipoxantina, 2-aminoadenina, 6-metil e outros derivados de alquila da adenina e guanina, 2-propila e outros derivados de alquila da adenina e guanina, 2-tiouracila, 2-tiotimina e 2-tiocitosina, 5-5 halouracila e citosina, 5-propinil uracila e citosina, 6-azo uracila, citosina e timina, 5-uracila (pseudouracila), 4-tiouracila, 8-halo, 8-amino, 8-tiol, 8-tioalquila, 8-hidroxila e outras adeninas e guaninas 8-substituídas, 5-halo, particularmente 5-bromo, 5-trifluorometila e outras uracilas e citosinas 5-substituídas, 7-metilguanina e 7-metiladenina, 8-azaguanina e 8-10 azaadenina, 7-deazaguanina e 7-daazaadenina e 3-deazaguanina e 3-deazaadenina. Nucleobases também incluem aquelas descrevendas na Pat. U. S. No. 3.687.808, aquelas descrevendas em Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering, páginas 858-859, Kroschwitz, J. L, ed. John Wiley & Sons, 1990, aquelas descrevendas por Englisch et al., Ange-15 wandte Chemie, International Edition, 1991, 30, 613, e aquelas descrevendas por Sanghvi, Y S., Capítulo 15, DsRNA Research and Applications, páginas 289-302, Crooke, S. T. e Lebleu, B., Ed., CRC Press, 1993. Certas destas nucleobases são particularmente úteis para aumentar a afinidade de ligação dos compostos oligoméricos da invenção. Estes incluem pirimidinas 5-20 substituídas, 6-azapirimidinas e N-2, N-6 e O-6 purinas substituídas, incluin- do 2-aminopropiladenina, 5-propiniluracila e 5-propinilcitosina. Substituição de 5-metilcitosina foram mostradas aumentar a estabilidade do duplex de ácido nucléico em 0,6-1, graus C (Sanghvi, Y. S., Crooke, S. T. e Lebleu, B., Eds., DsRNA Research and Applications, CRC Press, Boca Raton, 1993, 25 págs. 276-278) e as substituições de base são presentemente preferidas, até mesmo mais particularmente quando combinadas com modificações de açúcar de 2'-O-metoxietila.

Patentes U. S. representativas que ensinam a preparação de certas nucleobases modificadas acima observadas como também outras 30 nucleobases modificadas incluem, mas não são limitadas, à Pat. U. S. No. 3.687.808 acima observada, como também a Pat. U. S. Nos. 4.845.205; 5.130.30; 5.134.066; 5.175.273; 5.367.066; 5.432.272; 5.457.187;

5.459.255; 5.484.908; 5.502.177; 5.525.711; 5.552.540; 5.587.469; 5.594.121. 5.596.091; 5.614.617; e 5.681.941, cada uma destas é aqui incorporada por referência, e Pat. U. S. No. 5.750.692, também aqui incorporada por referência.

5 Outra modificação dos dsRNAs da invenção envolve ligar quimicamente ao dsRNA uma ou mais porções ou conjugados que intensificam a atividade, distribuição celular ou absorção celular do dsRNA. Tais porções incluem mas não são limitadas a porções de lipídio tais como uma porção de colesterol (Letsinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 199, 86, 6553-10 6556), ácido cólico (Manoharan et al., Biorg. Med. Chem. Let., 1994 4 1053-1060), um tioéter, por exemplo, berilo-S-tritíliol (Manoharan et al., Ann. N. I. Acad. Sci., 1992, 660, 306-309; Manoharan et al., Biorg. Med. Chem. Let., 1993, 3, 2765-2770), um tiocolosterol (Oberhauser et al., Nucl. Acids Res., 1992, 20, 533-538), uma cadeia alifática, por exemplo, dodecandiol ou resíduos de undecila (Saison-Behmoaras et al., EMBO J, 1991, 10, 1111-1118; Kabanov et al., FEBS Lett., 1990, 259, 327-330; Svinarchuk et al., Biochimie, 1993, 75, 49-54), um fosfolipídeo, por exemplo, di-hexadecil-rac-glicerol ou trietil-amônio 1,2-di-O-hexadecil-rac-glicero-3-h-fosfonato (Manoharan et al., Tetrahedron Lett., 1995, 36, 3651-3654; Shea et al., Nucl. Acids Res., 20 1990, 18, 3777-3783), uma poliamina ou uma cadeia de polietileno glicol (Manoharan et al., Nucleosides & Nucleotides, 1995, 14, 969-973), ou ácido acético de adamantano (Manoharan et al., Tetrahedron Lett., 1995, 36, 3651-3654), uma porção de palmitila (Mishra et al., Biochim. Biophys. Acta, 1995, 1264, 229-237), ou uma porção de octadecilamina ou de hexilamino-25 carboniloxicolesterol (Crooke et al., J. Pharmacol. Exp. Ther., 1996, 277, 923-937).

Patentes U. S. Representativas quem ensinam a preparação de talis conjugados de dsRNA incluem. mas não são limitadas a. Pat. U. S. Nos. 4.828.979; 4.948.882; 5.218.105; 5.525.465; 5.541.313; 5.545.730; 30 5.552.538; 5.578.717. 5.580.731; 5.591.584; 5.109.124; 5.118.802; 5.138.045; 5.414.077; 5.486.603; 5.512.439; 5.578.718; 5.608.046; 4.587.044; 4.605.735; 4.667.025; 4.762.779; 4.789.737; 4.824.941;

4.835.263; 4.876.335; 4.904.582; 4.958.013; 5.082.830; 5.112.963;  
5.214.136; 5.082.830; 5.112.963; 5.214.136; 5.245.022; 5.254.469;  
5.258.506; 5.262.536; 5.272.250; 5.292.873; 5.317.098; 5.371.241.  
5.391.723; 5.416.203. 5.451.463; 5.510.475; 5.512.667; 5.514.785;  
5 5.565.552; 5.567.810; 5.574.142; 5.585.481; 5.587.371; 5.595.726;  
5.597.696; 5.599.923; 5.599.928 e 5.688.941, cada uma destas é aqui incorporada por referência.

Não é necessário para todas as posições em um composto dado serem modificadas uniformemente, e de fato mais que uma das modificações acima mencionadas podem ser incorporadas em um composto sozinho ou até mesmo a um nucleosídeo só dentro de um dsRNA. A presente invenção também inclui compostos de dsRNA que são compostos quiméricos. Compostos "quiméricos" de dsRNA ou "quimeras", no contexto desta invenção, são compostos de dsRNA, particularmente dsRNAs contendo duas ou mais regiões quimicamente distintas, cada composta de pelo menos uma unidade de monômero, isto é, um nucleotídeo no caso de um composto de dsRNA. Estes dsRNAs tipicamente contêm pelo menos uma região em que o dsRNA é modificado para conferir no dsRNA resistência aumentada à degradação de nuclease, absorção celular aumentada, e/ou afinidade aumentada de ligação pelo ácido nucléico alvo. Uma região adicional do dsRNA pode servir como um substrato para enzimas capazes de clivar RNA:DNA ou híbridos de RNA:RNA. Por via de exemplo, RNase H é uma endonuclease celular que cliva o filamento de RNA de um duplex de RNA:DNA. Portanto, ativação de RNase H resulta na clivagem do alvo de RNA, assim grandemente intensificando a eficiência da inibição de dsRNA da expressão do gene. Por conseguinte, resultados comparáveis podem ser frequentemente obtidos com dsRNAs mais curtos quando dsRNAs quiméricos forem usados, comparados às deoxidsRNAs de fosforotioato hibridando com a mesma região alvo. Clivagem do alvo de RNA pode ser detectada 10 habitualmente através de eletroforese em gel e, se necessário, técnicas de hibridação de ácido nucléico associadas conhecidas na técnica.

Em certas circunstâncias, o dsRNA pode ser modificados por

um grupo não-ligante. Várias moléculas não-ligantes foram conjugadas com os dsRNAs para intensificar a atividade, distribuição celular ou absorção celular do dsRNA, e procedimentos para executar tais conjugações estão disponíveis na literatura científica. Tais porções não-ligantes incluíram porções de lipídio, tais como colesterol (Letsinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, 86:6553), ácido cólico (Manoharan et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1994, 4:1053), um tioéter, por exemplo, hexil-S-tritiltiol (Manoharan et al., *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1992, 660:306; Manoharan et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1993, 3:2765), um tiocolosterol (Oberhauser et al., *Nucl. Acids Res.*, 1992, 20:533), uma cadeia alifática, por exemplo, dodecandiol ou resíduos de undecila (Saison-Behmoaras et al., *EMBO J.*, 1991, 10:111; Kabanov et al., *FEBS Lett.*, 1990, 259:327; Svinarchuk et al., *Biochimie*, 1993, 75:49), um fosfolipídeo, por exemplo, di-hexadecil-rac-glicerol ou 1,2-di-O-hexadecil-rac-glicero-3-h-fosfonato de trietilamônio (Manoharan et al., *Tetrahedron Lett.*, 1995, 36:3651; Shea et al., *Nucl. Acids Res.*, 1990, 18:3777), uma cadeia de poliamina ou uma de polietileno glicol (Manoharan et al., *Nucleosides & Nucleotides*, 1995, 14:969), ou ácido acético de adamantano (Manoharan et al., *Tetrahedron Lett.*, 1995, 36:3651), uma porção de palmitila (Misra et al., *Biochim. Biophys. Acta*, 1995, 1264:229), ou uma octadecilamina ou porção de hexilamino-carbonil-oxicolesterol (Crooke et al., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1996, 277:923). Patentes dos Estados Unidos representativas que ensinam a preparação de tais conjugados de dsRNA foram listadas acima. Protocolos de conjugação típicos envolvem a síntese de dsRNAs que carrega um aminoligante a uma ou mais posições da sequência. O grupo amino é depois reagido com a molécula que é conjugada usando reagentes apropriados de acoplamento ou ativadores. A reação de conjugação ou pode ser executada ainda com o dsRNA ligado ao suporte sólido ou seguindo clivagem do dsRNA na fase de solução. Purificação do conjugado de dsRNA por HPLC tipicamente fornece o conjugado puro.

30 AGENTES DE RNAi CODIFICADO POR VETOR

O dsRNA da invenção pode também ser expressado de vetores virais intracelularmente recombinantes *in vivo*. Os vetores virais recombinan-

tes da invenção compreendem sequências que codificam o dsRNA da invenção e qualquer promotor adequado para expressar as sequências de dsRNA. Promotores adequados incluem, por exemplo, as sequências de promotor Pol III de U6 ou H1 e o promotor de citomegalovírus. Seleção de 5 outros promotores adequados está dentro da habilidade na técnica. Os vetores virais recombinantes da invenção podem também compreender promotores induzíveis ou reguláveis para expressão do dsRNA em um tecido particular ou em um ambiente intracelular particular. O uso de vetores virais recombinantes para liberar dsRNA da invenção para as células *in vivo* é debatido em mais detalhe abaixo.

10

dsRNA da invenção pode ser expressado de um vetor viral recombinante ou como duas moléculas de RNA separadas, complementares, ou como uma molécula de RNA simples com duas regiões complementares.

Qualquer vetor viral capaz de aceitar as sequências de codificação para a(s) molécula(s) de dsRNA a ser(em) expressada(s) pode ser usado, por exemplo vetores derivados de adenovírus (AV); adenovírus associado (AAV); retrovírus (por exemplo, lentivírus (LV), Rhabdovírus, vírus de leucemia murina); vírus do herpes, e outros. O tropismo dos vetores virais pode ser modificado mediante pseudotipagem dos vetores com proteínas de envelope ou outros抗ígenos de superfície de outros vírus, ou substituindo a proteína de capsídeo virais diferentes, conforme apropriado.

15

20

Por exemplo, vetores lentivirais da invenção podem ser pseudotipado com proteínas de superfície de vírus de estomatite vesicular (VSV), raivas, Ebola, Mokola, e outros. Vetores de AAV da invenção podem ser feitos para alvejar células diferentes criando os vetores para expressar sorotipos diferentes da proteína de capsídeo. Por exemplo, um vetor de AAV que expressa um capsídeo de sorotipo 2 em um genoma de sorotipo 2 é chamado AAV 2/2. Este gene de capsídeo de sorotipo 2 no vetor AAV 2/2 pode ser substituído por um gene de capsídeo de sorotipo 5 para produzir um vetor 25 AAV 2/5. Técnicas para construir vetores de AAV que expressam sorotipos de proteína de capsídeo diferentes estão dentro da habilidade na técnica; vide, por exemplo, Rabinowitz J E et al. (2002), *J Virol* 76:791-801, a des-

30

creveção inteira desta é aqui incorporada por referência.

Seleção de vetores virais recombinantes adequados para o uso na invenção, métodos para inserir sequências de ácido nucléico para expressar o dsRNA no vetor, e métodos de liberar o vetor viral para as células de interesse estão dentro da habilidade na técnica. Vide, por exemplo, Dornburg R (1995), Gene Therap. 2: 301-310; Egilitis M A (1988), Biotechniques 6: 608-614; Miller A D (1990), Hum Gene Therap. 1: 5-14; Anderson W F (1998), Nature 392: 25-30; e Rubinson D A et al., Nat. Genet. 33: 401-406, as descreveções inteiras destas são aqui incorporadas por referência.

Vetores virais preferidos são aqueles derivados de AV e AAV. Em uma modalidade particularmente preferida, o dsRNA da invenção é expressado como duas moléculas de RNA unifilamentar complementares separadas de um vetor de AAV compreendendo, por exemplo, os promotores de RNA recombinante de U6 ou H1, ou o promotor do citomegalovírus (CMV).

Um vetor de AV adequado para expressar o dsRNA da invenção, um método para construir o vetor de AV recombinante, e um método para liberar o vetor em células alvas, são descritos em Xia H et al. (2002), Nat. Biotech. 20: 1006-1010.

Vetores de AAV adequados para expressar o dsRNA da invenção, métodos para construir o vetor de AV recombinante, e métodos para liberar os vetores em células alvas são descritos em Samulski R et al. (1987), J. Virol. 61: 3096-3101; Fisher K J et al. (1996), J. Virol. 70: 520-532; Samulski R et al. (1989), J. Virol. 63: 3822-3826; Pat. U. S. No. 5.252.479; Pat. U. S. No. 5.139.941; Pedido de Patente Internacional No. WO 94/13788; e Pedido de Patente Internacional No. WO 93/24641, as descreveções inteiras destes são aqui incorporadas por referência.

#### COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS COMPREENDENDO Ds-RNA

Em uma modalidade, a invenção fornece composições farmacêuticas compreendendo um dsRNA, como descrito aqui, e um veículo farmaceuticamente aceitável. A composição farmacêutica compreendendo o

dsRNA é útil para tratar uma doença ou distúrbio associado à expressão ou atividade de um gene de Aha, tal como processos patológicos mediados por expressão de Aha1. Tais composições farmacêuticas são formuladas com base no modo de liberação. Um exemplo são composições que são formuladas para administração sistêmica por meio de liberação parenteral.

As composições farmacêuticas da invenção são administradas em dosagens suficientes para inibir expressão de um gene de Aha. Os inventores presentes surpreendentemente descobriram que, por causa de sua eficiência melhorada, as composições compreendendo o dsRNA da invenção podem ser administradas em baixas dosagens. Uma dosagem máxima de 5 mg de dsRNA por quilograma do peso do corpo do recipiente por dia é suficiente para inibir ou completamente suprimir a expressão de um gene de Aha.

Em geral, uma dose adequada de dsRNA estará na faixa de 0,01 micrograma a 5,0 miligramas por quilograma do peso do corpo do recipiente por dia, em geral na faixa de 1 micrograma a 1 mg por quilograma do peso do corpo por dia. A composição farmacêutica pode ser administrada uma vez diariamente, ou o dsRNA pode ser administrado como duas, três, ou mais subdoses em intervalos apropriados ao longo do dia ou até mesmo usando infusão ou liberação contínua através de uma formulação de liberação controlada. Em cujo caso, o dsRNA contido em cada subdose deve ser correspondentemente menor para alcançar a dosagem diária total. A unidade de dosagem pode também ser composta para liberação durante vários dias, por exemplo, usando uma formulação de liberação contínua convencional que fornece liberação contínua do dsRNA em vários períodos do dia. Formulações de liberação sustentada são bem-conhecidas na técnica e são particularmente úteis para liberação vaginal dos agentes, tais como poderiam ser usadas com os agentes da presente invenção. Nesta modalidade, a unidade de dosagem contém um múltiplo correspondente da dose diária.

O artesão versado apreciará que certos fatores podem influenciar a dosagem e regulação requeridas para eficazmente tratar um sujeito, incluindo mas não-limitado à severidade da doença ou distúrbio, tratamentos

anteriores, a saúde geral e/ou idade do sujeito, e outras doenças presentes. Além disso, tratamento de um sujeito com uma quantidade terapeuticamente eficaz de uma composição pode incluir um tratamento simples ou uma série de tratamentos. Estimativas de dosagens eficazes e meias-vidas *in vivo* para os dsRNAs individuais abrangidos pela invenção podem ser feitas usando metodologias convencionais ou em base da testagem *in vivo* usando um modelo animal apropriado, como descrito em outro lugar aqui.

5 Avanços em genéticas de camundongo têm gerado vários modelos de camundongo para o estudo de várias doenças humanas, tais como processos patológicos mediados por expressão de Aha. Tais modelos são usados para testagem *in vivo* de dsRNA, como também para determinar 10 uma dose terapeuticamente eficaz.

A presente invenção também inclui composições e formulações farmacêuticas que incluem os compostos de dsRNA da invenção. As composições farmacêuticas da presente invenção podem ser administradas de vários modos dependendo se tratamento local ou sistêmico é desejado e da área a ser tratada. Administração pode ser tópica, pulmonar, por exemplo, por inalação ou insuflação de pós ou aerossóis, incluindo através de nebulizador; intratraqueana, intranasal, epidérmica e transdérmica, oral ou parenteral. Administração parenteral inclui injeção ou infusão intravenosa, intra-20 arterial, subcutânea, intraperitoneal ou intramuscular; ou intracraniano, por exemplo, administração intratecal ou intraventricular.

Composições e formulações farmacêuticas para administração tópica podem incluir emplastos transdérmicos, ungues, loções, cremes, 25 géis, gotas, supositórios, pulverizações, líquidos e pós. Veículos farmacêuticos convencionais, bases aquosas, em pó ou oleosas, espessantes e outros podem ser necessários ou desejáveis. Preservativos revestidos, luvas e outros podem também ser úteis. Formulações tópicas preferidas incluem aquelas em que os dsRNAs da invenção estão em admistão com um agente de liberação tópico tal como lipídios, lipossomas, ácidos graxos, ésteres de ácido 30 graxo, esteróides, agentes quelantes e tensoativos. Lipídios e lipossomas preferidos incluem neutro (por exemplo dioleoilfosfatidil etanolamina =

NARCÓTICO, dimiristoilfosfatidil colina = DMPC, distearolifosfatidil colina) negativo (por exemplo dimiristoilfosfatidil glicerol = DMPG) e catiônico (por exemplo dioleoiltetrametilaminopropila = DOTAP e dioleoifosfatidil etanolamina = DOTMA). DsRNAs da invenção podem ser encapsulados dentro de 5 lipossomas ou podem formar complexos com estes, em particular para lipossomas catiônicos. Alternativamente, dsRNAs podem ser complexados em lipídios, em particular em lipídios catiônicos. Ácidos graxos e ésteres preferidos incluem mas não são limitados a ácido araquidônico, ácido oléico, ácido eicosanóico, ácido láurico, ácido caprílico, ácido cáprico, ácido mirístico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido linoléico, ácido linolênico, dicaprato, tricaprato, monooleína, dilaurina, gliceril 1-monocaprato, 1-dodecilazaciclo-heptan-2-ona, um acilcarnitina, um acilcolina, ou um éster de C<sub>1-10</sub> alquila (por exemplo isopropilmiristato IPM), monoglicerídeo, diglicerídeo ou sal farmaceuticamente aceitável dos mesmos. As formulações tópicas 10 são descritas em detalhes no pedido de patente U. S. No. 09/315.298 depositado em 20 de maio de 1999, que é incorporado aqui por referência 15 em sua totalidade.

Composições e formulações para administração oral incluem pós ou grânulos, microparticulados, nanoparticulados, suspensões ou soluções 20 em água ou meios não-aquosos, cápsulas, cápsulas de gel, sachês, comprimidos ou minicomprimidos. Espessantes, agentes flavorizantes, diluentes, emulsificantes, auxiliares de dispersão ou aglutinantes podem ser desejáveis. Formulações orais preferidas são aquelas em que os dsRNAs da invenção são administrados junto com um ou mais intensificadores de 25 penetração, tensoativos, e quelantes. Tensoativos preferidos incluem ácidos graxos e/ou ésteres ou sais dos mesmos, ácidos biliares e/ou sais dos mesmos. Ácidos biliares/sais preferidos incluem ácido quenodeoxicólico (CDCA) e ácido ursodeoxiquenodeoxicólico (UDCA), ácido cólico, ácido desidrocólico, ácido deoxicólico, ácido glucólico, ácido glicólico, ácido glicodeoxicólico, ácido taurocólico, ácido taurodeoxicólico, tauro-24,25-diidrofusidato de sódio e glicodiidrofusidato de sódio. Ácidos graxos preferidos 30 incluem ácido araquidônico, ácido undecanóico, ácido oléico, ácido láurico,

ácido caprílico, ácido cáprico, ácido mirítico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido linoléico, ácido linolênico, dicaprato, tricaprato, monooleína, dilaurina, 1-monocaprato de glicerila, 1-dodecilazaciclo-heptan-2-oná, um acilcarnitina, um acilcolina, ou um monoglycerídeo, um diglycerídeo ou um sal farmaceuticamente aceitável dos mesmos (por exemplo sódio). Também preferidas são combinações de intensificadores de penetração, por exemplo, ácidos graxos/sais em combinação com ácidos biliares/sais. Uma combinação particularmente preferida é o sal de sódio de ácido láurico, ácido cáprico e UDCA. Intensificadores de penetração também incluem polioxetileno-9-lauril éter, polioxetileno-20-cetil éter. DsRNAs da invenção podem ser liberados oralmente, em forma granular incluindo partículas secadas pulverizadas, ou complexados para formar micro ou nanopartículas. Agentes complexadores de DsRNA incluem poliamino ácidos; poliimininas; poliacrilatos; polialquilacrilatos, polioxetanos, polialquilcianoacrilatos; gelatinas cationizadas, albuminas, amidos, acrilatos, polietilenoglicóis (PEG) e amidos; polialquilcianoacrilatos; poliimininas derivatizada de DEAE, polulananas, celuloses e amidos. Agentes complexadores particularmente preferidos incluem quitosana, N-trimetilquitosana, poli-L-lisina, poli-histidina, poliornitina, poliesperminas, pvi-amina, polivinilpiridina, politiodietilaminometiletileno P (TDAE), poliaminoestreno (por exemplo p-amino), poli(metilcianoacrilato), poli(etilcianoacrilato), poli(butilcianoacrilato), poli(isobutilcianoacrilato), poli(iso-hexilcinaoacrilato), DEAE-metacrilato, DEAE-hexilacrilato, DEAE-acrilamida, DEAE-albumina e DEAE-dextrana, polimetilacrilato, poli-hexilacrilato, poli(ácido D,L-láctico), poli(ácido DL-láctico-co-glólico (PLGA)), alginato, e polietilenoglicol (PEG).

Formulações orais para dsRNAs e sua preparação são descritas em detalhes no pedido de patente U. S. No. 08/886,829 (depositado em 1º de julho de 1997), No. 09/108.673 (depositado em 1º de julho de 1998), No. 09/256.515 (depositado em 23 de fevereiro de 1999), No. 09/082.624 (depositado em 21 de maio de 1998) e No. 09/315.298 (depositado em 20 de maio de 1999), cada um destes é incorporado aqui por referência em sua totalidade.

tratecal ou intraventricular podem incluir soluções aquosas estéreis que podem também conter tampões, diluentes e outros aditivos adequados tais como, mas não-limitados a, intensificadores de penetração, compostos veiculares e outros veículos ou excipientes farmaceuticamente aceitáveis.

5                  Composições farmacêuticas da presente invenção incluem, mas não são limitadas a, soluções, emulsões, e formulações contendo lipossoma. Estes composições podem ser geradas de uma variedade de componentes que incluem, mas não são limitados a, líquidos pré-formados, sólidos auto-emulsionantes e semissólidos auto-emulsionantes.

10                As formulações farmacêuticas da presente invenção, que podem ser convenientemente apresentadas em forma de dosagem de unidade, podem ser preparadas de acordo com técnicas convencionais bem-conhecidas na indústria farmacêutica. Tais técnicas incluem a etapa de trazer em associação os componentes ativos com o(s) veículo(es) farmacêutico(s) ou exciente(s). Em geral, as formulações são preparadas trazendo uniforme e intimamente em associação os componentes ativos com veículos líquidos ou veículos sólidos finamente divididos ou ambos, e depois, se necessário, modelando o produto.

15                As composições da presente invenção podem ser formuladas em quaisquer de muitas possíveis formas de dosagem tais como, mas não-limitadas a, comprimidos, cápsulas, cápsulas de gel, xaropes líquidos, géis macios, supositórios, e enemas. As composições da presente invenção podem também ser formuladas como suspensões em meios aquosos, não-aquosos ou misturados. Suspensões aquosas podem também conter substâncias que aumentam a viscosidade da suspensão incluindo, por exemplo, carboximetilcelulose sódica, sorbitol e/ou dextrana. A suspensão pode também conter estabilizantes.

20                Em uma modalidade da presente invenção as composições farmacêuticas podem ser formuladas e usadas como espumas. Espumas farmacêuticas incluem formulações tais como, mas não-limitadas a, emulsões, microemulsões, cremes, geléias e lipossomas. Embora basicamente similares em natureza estas formulações variem nos componentes e na

consistência do produto final. A preparação de tais composições e formulações é em geral conhecidas àqueles versados nas técnicas farmacêuticas e de formulação e podem ser aplicadas à formulação das composições da presente invenção.

5                   **EMULSÕES**

As composições da presente invenção podem ser preparadas e formuladas como emulsões. Emulsões são tipicamente sistemas heterogêneos de um líquido disperso em outro na forma de gotículas que usualmente excedem 0,1 µm em diâmetro (Idson, em *Pharmaceutical Dosage Forms*,  
10 Lieberman, Rieger e Bunker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nova Iorque, N. I., volume 1, pág., 199; Rosoff, em *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger e Bunker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nova Iorque, N. I., Volume 1, pág., 245; Block in *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger e Bunker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nova Iorque, N. I., volu-  
15 me 2, pág., 335; Higuchi et al., em *Remington's Pharmaceutical Sciences*, Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1985, pág., 301). Emulsões são frequen-temente sistemas bifásicos compreendendo duas fases líquidas imiscíveis intimamente misturadas e dispersas entre si. Em geral, emulsões podem ser ou a variedade de água-em-óleo (a/o) ou óleo-em-água (o/a). Quando uma  
20 fase aquosa for dividida finamente e dispersa como gotículas minuciosas em uma fase oleosa de volume, a composição resultante é chamada uma emul-são de água-em-óleo (a/o). Alternativamente, quando uma fase oleosa for dividida finamente e dispersa como gotículas minuciosas em uma fase a-  
quosa de volume, a composição resultante é chamada uma emulsão de ó-  
leo-em-água (o/a). Emulsões podem conter componentes adicionais além  
25 das fases dispersas, e o fármaco ativo que pode estar presente como uma solução ou na fase aquosa, fase oleosa ou si mesmo como uma fase sepa-rada. Excipientes farmacêuticos tais como emulsificantes, estabilizantes, corantes, e antioxidantes podem também estar presentes, quando necessá-  
rio, nas emulsões. Emulsões farmacêuticas podem também ser emulsões  
30 múltiplas tais como as que são compreendidas de mais de duas fases, por exemplo, no caso de emulsões de óleo-em-água-em-óleo (o/a/o) e áqua-

em-óleo-em-água (a/o/a). Tais formulações complexas frequentemente fornecem certas vantagens que as emulsões binárias simples não fornecem. Emulsões múltiplas em que as gotículas de óleo individuais de uma emulsão de o/a incluem gotículas de água pequenas constituem uma emulsão de 5 a/o/a. Igualmente um sistema de gotículas de óleo incluídas nos glóbulos de água estabilizados em uma fase contínua oleosa fornece uma emulsão de o/a/o.

Emulsões são caracterizadas por pouca estabilidade termodinâmica ou nenhuma. Frequentemente, a fase dispersa ou descontínua da 10 emulsão é bem dispersa na fase externa ou contínua e mantida nesta forma através dos meios de emulsificantes ou da viscosidade da formulação. Qualquer uma das fases da emulsão pode ser um semissólido ou um sólido, como é o caso de bases de unguento do estilo de emulsão e cremes. Outros meios de estabilizar emulsões requerem o uso de emulsificantes que podem 15 ser incorporados em qualquer fase da emulsão. Emulsificantes podem ser classificados amplamente em quatro categorias: tensoativos sintéticos, emulsificantes de ocorrência natural, bases de absorção, e sólidos finamente dispersos (Idson, em *Pharmaceuticals Dosage Forms*, Lieberman, Rieger e Bunker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nova Iorque, N. I., volume 1, pág., 20 199).

Tensoativos sintéticos, também conhecidos como agentes ativos de superfície, encontraram ampla aplicabilidade na formulação de emulsões e foram revisados na literatura (Rieger, em *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger e Bunker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nova Iorque, N. I., volume 1, pág., 285; Idson, em *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger e Bunker (Eds.), Marcel Dekker, Inc., Nova Iorque, N. I., 1988, volume 1, pág., 199). Tensoativos são tipicamente anfifílicos e compreendem um hidrófilo e uma porção hidrofóbica. A razão da natureza hidrofílico para hidrofóbica do tensoativo foi denominado o equilíbrio hidrófilo/lipófilo (HLB) e é uma valiosa ferramenta na categorização e seleção de tensoativos na preparação das formulações. Tensoativos podem ser classificados em classes diferentes com base na natureza do grupo hidrófilo: não-

iônico, aniônico, catiônico e anfotérico (Rieger, em *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger e Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nova Iorque, N. I., volume 1, pág., 285).

Emulsificantes de ocorrência natural usados em formulações de emulsão incluem lanolina, cera de abelha, fosfatídeos, lecitina e acácia. Bases de absorção possuem propriedades hidrofílicos de modo que elas podem absorver água para formar emulsões de a/o ainda retendo suas consistências semissólidas, tais como lanolina anidra e petrolato hidrófilo. Sólidos finamente divididos têm também sido especialmente usados como emulsificantes finos em combinação com tensoativos e em preparações viscosas. Estes incluem sólidos inorgânicos polares, tais como hidróxidos de metal pesado, argila não-intumescente tal como bentonita, atapulgita, hectorita, caulim, montmorilonita, silicato de alumínio coloidal e silicato de alumínio de magnésio coloidal, pigmentos e sólidos não-polares tais como carbono ou triestearato de glicerila.

Uma variedade grande de materiais não-emulsificantes é também incluída nas formulações de emulsão e contribui para as propriedades das emulsões. Estes incluem gorduras, óleos, ceras, ácidos graxos, alcoóis graxos, ésteres graxos, umectantes, colóides hidrófilos, conservantes e antioxidantes (Block, em *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger e Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nova Iorque, N. I., volume 1, pág., 335; Idson, em *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger e Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nova Iorque, N. I., volume 1, pág., 199).

Colóides hidrófilos ou hidrocolóides incluem gomas de ocorrência natural e polímeros sintéticos tais como polissacarídeos (por exemplo, acácia, ágar, ácido algínico, carragenina, goma guar, goma caraia, e traganato), derivados de celulose (por exemplo, carboximetilcelulose e carboxi-propilcelulose), e polímeros sintéticos (por exemplo, carbômeros, éteres de celulose, e polímeros de carboxivinil). Estes dispersam ou intumescem em água para formar soluções coloidais que estabilizam as emulsões formadoras filmes interfaciais fortes ao redor das gotículas de fase dispersa e aumentar a viscosidade da fase externa.

Uma vez que as emulsões frequentemente contêm vários componentes tais como carboidratos, proteínas, esteróis e fosfatídeos que podem facilmente suportar o crescimento de micróbios, estas formulações frequentemente incorporam conservantes. Conservantes comumente usados 5 incluídos nas formulações de emulsão incluem metil parabeno, propil parabeno, sais de amônio quaternário, cloreto de benzalcônio, ésteres de ácido p-hidroxibenzólico, e ácido bórico. Antioxidantes são também comumente adicionados às formulações de emulsão para impedir deterioração da formulação. Antioxidantes usados podem ser descontaminantes de radicais livres 10 tais como tocoferóis, galatos de alquila, hidroxianisol butilado, hidroxitolueno butilado, ou agentes redutores tais como ácido ascórbico e metabissulfito de sódio, e sinergistas de antioxidante tais como ácido cítrico, ácido tartárico, e lecitina.

A aplicação das formulações de emulsão por meio vias dermatológicas, orais e parenterais e métodos para sua fabricação foi revisada na literatura (Idson, em *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger e Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nova Iorque, N. I., volume 1, pág., 199). Formulações de emulsão para liberação oral foram muito extensamente usadas por causa da facilidade de formulação, como também eficácia de 20 um ponto de vista de absorção e de biodisponibilidade (Rosoff, em *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger e Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nova Iorque, N. I., volume 1, pág., 245; Idson, em *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger e Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nova Iorque, N. I., volume 1, pág., 199). Laxantes de base de óleo 25 mineral, vitaminas solúveis em água e preparações nutritivas graxas altas estão entre os materiais que foram comumente administrados de forma oral como emulsões de o/a.

Em uma modalidade da presente invenção, as composições de dsRNAs e ácidos nucléicos são formuladas como microemulsões. Um microemulsão pode ser definida como um sistema de água, óleo e anfifílico que é uma solução simples opticamente isotrópica e termodinamicamente líquida estável (Rosoff, em *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rie-

ger e Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nova Iorque, N. I., volume 1, pág., 245). Tipicamente, as microemulsões são sistemas que são preparados dispersando um óleo primeiro em uma solução de tensoativo aquosa e depois adicionando uma quantidade suficiente de um quarto componente, 5 em geral um álcool de comprimento de intermediário de cadeia para formar um sistema transparente. Portanto, as microemulsões foram também descritas como dispersões termodinamicamente estáveis, isotropicamente claras de dois líquidos imiscíveis que são estabilizados por filmes interfaciais de moléculas ativas de superfície (Leung e Shah, em: Controlled Release of 10 Drugs: Polymers and Aggregate Systems, Rosoff, M., Ed., 1989, VCH Publishers, Nova Iorque, páginas 185-215). Microemulsões são comumente preparadas por meio de uma combinação de três a cinco componentes que incluem óleo, água, tensoativo, co-tensoativo e eletrólito. Se a microemulsão for do tipo água-em-óleo (a/o) ou uma óleo-em-água (o/a) é dependente das 15 propriedades do óleo e tensoativo usados e da estrutura e embalagem geométrica das cabeças polares e caudas dos hidrocarbonetos das moléculas de tensoativo (Schott, em Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1985, pág., 271).

O método fenomenológico utilizando diagramas de fase foi extensivamente estudado e rendeu um conhecimento inclusivo, para alguém versado na técnica, de como formular microemulsões (Rosoff, em Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger e Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nova Iorque, N. I., volume 1, pág., 245; Block, em Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger e Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nova Iorque, N. I., volume 1, pág., 335). Comparadas às emulsões convencionais, as microemulsões oferecem a vantagem de solubilizar fármacos insolúveis em água em uma formulação de gotículas termodinamicamente estáveis que são formadas espontaneamente.

Tensoativos usados na preparação de microemulsões incluem, 30 mas não são limitados a, tensoativos iônicos, tensoativos não-iônicos, Brij 96, éteres de oleíla de polioxietileno, ésteres de ácido graxo de poliglicerol, monolaurato de tetraglicerol (ML310), monooleato de tetraglicerol (MO310),

monooleato de hexaglicerol (PO310), pentaoleato de hexaglicerol (PO500), monocaprato de decaglicerol (MCA750), monooleato de decaglicerol (MO750), sequioleato de decaglicerol (SO750), decaoleato de decaglicerol (DAO750), sozinho ou em combinação com cotonsoativos. O cotonsoativo, 5 usualmente um álcool de cadeia curta tal como etanol, 1-propanol, e 1-butanol, serve para aumentar a fluidez interfacial penetrando no filme de tensoativo e por conseguinte criando um filme desordenado por causa do espaço vago gerado entre as moléculas de tensoativo. Porém, as microemulsões podem ser preparadas sem o uso de cotonsoativos e sistemas de 10 microemulsão auto-emulsificante livre de álcool são conhecidos na técnica. A fase aquosa pode tipicamente ser, mas não é limitada a, água, uma solução aquosa do fármaco, glicerol, PEG300, PEG400, poligliceróis, propileno glicóis, e derivados de étileno glicol. A fase de óleo pode incluir, mas não é limitada a, materiais tais como Captex 300, Captex 355, Capmul MCM, ésteres 15 de ácido graxo, mono, di, e triglicerídeos de cadeia média ( $C_8-C_{12}$ ), ésteres de ácido graxo de glicerila polioxietilada, alcoóis graxos, glicerídeos poliglicolizados,  $C_8-C_{10}$  glicerídeos saturados poliglicolizados, óleos vegetais e óleo de silicone.

Microemulsões são particularmente de interesse do ponto de 20 vista de solubilização dos fármacos e a absorção intensificada dos fármacos. Microemulsões com base em lipídio (o/a e a/o) foram propostas intensificar a biodisponibilidade oral dos fármacos, incluindo peptídeos (Constantinides et al., Pharmaceutical Research, 1994, 11, 1385-1390; Ritschel, Meth. Find. Exp. Clin. Pharmacol., 1993, 13, 205). Microemulsões fornecem vantagens 25 melhoradas de solubilização de fármaco, proteção de fármaco da hidrólise enzimática, possível intensificação da absorção de fármaco devido às alterações induzidas por tensoativo na fluidez e permeabilidade da membrana, facilidade de preparação, facilidade de administração oral em formas de dosagem sólidas, potência clínica melhorada, e toxicidade diminuída 30 (Constantinides et al., Pharmaceuticals Reserach, 1994, 11, 1385; Ho et al., J. Pharm. Sci., 1996, 85, 138-143). Frequentemente as microemulsões podem se formar espontaneamente quando seus componentes são reunidos

em temperatura ambiente. Isto pode ser particularmente vantajoso ao formular fármacos, peptídeos ou dsRNAs termoestáveis. Microemulsões têm também sido eficazes na liberação transdérmica de componentes ativos em aplicações cosméticas e farmacêuticas. Espera-se que as composições de 5 microemulsão e formulações da presente invenção facilite a absorção sistêmica aumentada de dsRNAs e ácidos nucléicos do trato gastrointestinal, como também melhore a absorção celular local de dsRNAs e ácidos nucléicos dentro do trato gastrointestinal, vagina, cavidade bucal e outras áreas de administração.

10 Microemulsões da presente invenção podem também conter componentes adicionais e aditivos tais como monoestearato de sorbitan (Grill 3), Labrasol, e intensificadores de penetração para melhorar as propriedades da formulação e intensificar a absorção dos dsRNAs e ácidos nucléicos da presente invenção. Intensificadores de penetração usados nas 15 microemulsões da presente invenção podem ser classificados como pertencendo a um dentre os tensoativos de cinco categorias vastas, ácidos graxos, sais biliares, agentes quelantes, e não-tensoativos não-quelantes (Lee et al., Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1991, pág., 92). Cada um destas classes foi debatida acima.

20 LIPOSSOMAS

Há muitas estruturas organizadas de tensoativos além das microemulsões que foram estudadas e usadas para a formulação de fármacos. Estas incluem monocamadas, micelas, bicamadas e vesículas. Vesículas, tais como lipossomas, atraíram grande interesse por causa de sua especificidade e a duração de ação que elas oferecem do ponto de vista de liberação de fármaco. Como usado na presente invenção, o termo "lipossoma" significa uma vesícula composta de lipídios anfifílicos dispostos em uma bicamada ou bicamadas esféricas.

30 Lipossomas são vesículas unilamelares ou multilamelares tendo uma membrana formada de um material lipofílico e um interior aquoso. A porção aquosa contém a composição a ser liberada. Lipossomas catiônicos possuem a vantagem de serem capazes de fundirem-se com a parede da

célula. Lipossomas não-catiônicos, embora não capazes de eficientemente fundirem-se com a parede da célula, são absorvidos pelos macrófagos *in vivo*.

Para cruzar a pele mamífera intacta, as vesículas de lipídio têm 5 que atravessar uma série de poros finos, cada com um diâmetro menor que 50 nm, sob a influência de um gradiente transdérmico adequado. Portanto, é desejável usar um lipossoma que seja altamente deformável e capaz de atravessar tais poros finos.

Mais vantagens dos lipossomas incluem; lipossomas obtidos de 10 fosfolipídeos naturais são biocompatíveis e biodegradáveis; lipossomas podem incorporar uma gama extensiva de água e fármacos solúveis em lipídio; lipossomas podem proteger os fármacos encapsulados em seus compartimentos internos do metabolismo e degradação (Rosoff, em *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger e Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, 15 Inc., Nova Iorque, N. Y., volume 1, pág., 245). Considerações importantes na preparação de formulações de lipossoma são a carga da superfície de lipídio, tamanho da vesícula e o volume aquoso dos lipossomas.

Lipossomas são úteis para a transferência e liberação de componentes ativos para o sítio de ação. Porque a membrana lipossomal é es-20 truturalmente similar às membranas biológicas, quando os lipossomas são aplicados a um tecido, os lipossomas começam a fundir com as membranas celulares e à medida que a fusão dos lipossomas e das células progride, os conteúdos lipossomais são esvaziados na célula onde o agente ativo pode agir.

25 Formulações lipossomais foram o foco de investigação extensiva como o modo de liberação para muitos fármacos. Há evidência crescente que para administração tópica, os lipossomas apresentam várias vantagens sobre outras formulações. Tais vantagens incluem efeitos colaterais reduzidos relacionados à absorção sistêmica alta do fármaco administrado, acumulação aumentada do fármaco administrado ao alvo desejado, e a habilidade para administrar uma ampla variedade de fármacos, hidrofilo e hidrofóbico, na pele.

Vários relatórios detalharam a habilidade dos lipossomas para liberar agentes, incluindo DNA de peso molecular alto, na pele. Compostos incluindo analgésicos, anticorpos, hormônios e DNAs de peso molecular alto foram administrados à pele. A maior parte das aplicações resultou no alvejamento da epiderme superior

Lipossomas enquadraram-se em duas classes vastas. Lipossomas catiônicos são lipossomas positivamente carregados que interagem com as moléculas de DNA negativamente carregadas para formar um complexo estável. O complexo de DNA/lipossoma positivamente carregado liga à superfície da célula negativamente carregada e é interiorizado em um endossoma. Devido ao pH acídico dentro do endossoma, os lipossomas são rompidos, liberando seus conteúdos no citoplasma da célula (Wang et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 1987, 147, 980-985).

Lipossomas que são sensíveis ao pH ou negativamente carregados, atraem o DNA ao invés do complexo com este. Uma vez que o DNA e o lipídio estão similarmente carregados, repulsão ao invés de formação de complexo ocorre. Não obstante, algum DNA é atraído para dentro do interior aquoso destes lipossomas. Lipossomas sensíveis ao pH foram usados para liberar DNA que codifica o gene de timidina cinase para monocamadas das células em cultura. Expressão do gene exógeno foi detectada nas células alvo (Zhou et al., Journal of Controlled Release, 1992, 19, 269-274).

Um tipo principal da composição lipossomal inclui fosfolipídeos diferentes de fosfatidilcolina naturalmente derivada. Composições lipossomais neutras podem ser formadas, por exemplo, de fosfatidilcolina de dimiristoíla (DMPC) ou fosfatidilcolina de dipalmitoíla (DPPC). Composições lipossomais aniônicas em geral são formadas de fosfatidilglicerol de dimiristoíla, enquanto lipossomas fusogênicas aniônicas são formadas primariamente de fosfatidiletanolamina de dioleoíla (DOPE). Outro tipo de composição lipossomal é formado de fosfatidilcolina (PC) tal como, por exemplo, PC de feijão-soja, e PC de ovo. Outro tipo é formado de misturas de fosfolipídeo e/ou fosfatidilcolina e/ou colesterol.

Vários estudos avaliaram a liberação tópica das formulações de

fármacos lipossomais à pele. Aplicação de lipossomas contendo interferona à pele de cobaia resultou em uma redução das feridas de herpes da pele enquanto liberação de interferona por meio de outros meios (por exemplo como uma solução ou como uma emulsão) foi ineficaz (Weiner et al., Journal of Drug Targeting, 1992, 2, 405-410). Também, um estudo adicional testou a eficácia de interferona administrada como parte de uma formulação lipossomal para a administração de interferona usando um sistema aquoso, e concluiu que a formulação lipossomal foi superior à administração aquosa (du Plessis et al., Antiviral Research, 1992, 18, 259-265).

Sistemas lipossomais não-iônicos foram também examinados para determinar sua utilidade na liberação de fármacos à pele, em particular sistemas compreendendo tensoativo não-iônico e colesterol. Formulações lipossomais não-iônicas compreendendo Novosome.TM. I (dilauroato de glicerila/colesterol/éter de polioxietileno-10-estearila) e Novosome.TM. II (distearylato de glicerila/colesterol/éter de polioxietileno-10-estearil) foram usados para liberar ciclosporina-A na derme da pele do camundongo. Resultados indicaram que tais sistemas lipossomais não-iônicos foram eficazes em facilitar a deposição de ciclosporina-A em diferentes camadas da pele (Hu et al. S. T. P. Pharma. Sci., 1994, 4, 6, 466).

Lipossomas também incluem lipossomas "estericamente estabilizadas", um termo que, como aqui usado, refere-se aos lipossomas compreendendo um ou mais lipídios especializados que, quando incorporados nos lipossomas, resultam em vidas de circulação otimizadas com relação aos lipossomas que carecem de tais lipídios especializados. Exemplos de lipossomas estericamente estabilizados são aqueles em que parte da porção de lipídio de formação de vesícula do lipossoma (A) compreende um ou mais glicolipídeos, tais como monosialogangliosídeo G<sub>m</sub>1, ou (B) é derivatizado com um ou mais polímeros hidrófilos, tais como uma porção de polietilenoglicol (PEG). Embora não querendo estar preso a qualquer teoria particular, a técnica acredita que, pelo menos para lipossomas estericamente estabilizados contendo gangliosídeos, esfingomielina, ou lipídios derivatizados de PEG, as meia-vidas de circulação otimizadas destes lipossomas es-

tericamente estabilizados derivam de uma absorção reduzida nas células do sistema reticuloendotelial (RES) (Allen et al., FEBS Letters, 1987, 223, 42; Wu et al., Cancer Research, 1993, 53, 3765).

Vários lipossomas compreendendo um ou mais glicolipídeos  
5 são conhecidos na técnica. Papahadjopoulos et al. (A Ann. N. I. Acad. Sci., 1987, 507, 64) relatou a habilidade de monosialogangliosídeo G<sub>m</sub>1, sulfato de galactocerebrosídeo e fosfatidilinositol melhorar as meia-vidas no sangue dos lipossomas. Estes achados foram expostos por Gabizon et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A, 1988, 85, 6949). Pat. U. S. No. 4.837.028 e WO  
10 88/04924, ambos para Allen et al., descrevem lipossomas compreendendo (1) esfingomielina e (2) o gangliosídeo G<sub>m</sub>1 ou um éster de sulfato de galactocerebrosídeo. Pat. U. S. No. 5.543.152 (Webb et al.) descreve lipossomas compreendendo esfingomielina. Lipossomas compreendendo 1,2-sn-dimiristoilfosfatidilcolina são descrevedos em WO 97/13499 (Lim et al.).

Muitos lipossomas compreendendo lipídios derivatizados com  
15 um ou mais polímeros hidrófilos, e métodos de preparação dos mesmos, são conhecidos na técnica. Sunamoto et al. (Bull. Chem. Soc. Jpn., 1980, 53, 2778) descreveu lipossomas compreendendo um detergente não-iônico, 2C<sub>12</sub>15G, que contém uma porção de PEG. Illum et al. (FEBS Lett., 1984, 20 167, 79) observou que revestimento hidrófilo das partículas de poliestireno com glicóis poliméricos resulta em meia-vidas no sangue significativamente otimizadas. Fosfolipídeos sintéticos modificados para a ligação de grupos carboxílicos de polialquíleno glicóis (por exemplo, PEG) são descritos por Sears (Pats. U. S. Nos. 4.426.330 e 4.534.899). Klibanov et al. (FEBS Lett., 25 1990, 268, 235) descreveu experimentos demonstrando que lipossomas compreendendo fosfatidiletanolamina (PE) derivatizada com PEG ou esteárate de PEG tem aumentos significativos nas meia-vidas de circulação de sangue. Blume et al. (Biochimica et Biophysica Acta, 1990, 1029, 91) estendeu tais observações a outros fosfolipídeos derivatizados com PEG, por exemplo, DSPE-PEG, formados da combinação de diestearoilfosfatidiletanolamina (DSPE) e PEG. Lipossomas tendo porções de PEG covalentemente ligadas em sua superfície externa são descritos na Patente européia No. EP  
30

0 445 131 B1 e WO 90/04384 para Fisher. Composições lipossomais contendo 1-20 por cento em mol de PE derivatizado com PEG, e métodos de uso das mesmas, são descritas por Woodle et al. (Pats. U. S. Nos. 5.013.556 e 5.356.633) e Martin et al. (Pat. U. S. No. 5.213.804 e Patente 5 europeia No. EP 0 496 813 B1). Lipossomas compreendendo vários outros conjugados de lipídio-polímero são descrevidos em WO 91/05545 e Pat. U. S. No. 5.225.212 (ambos para Martin et al.) e em WO 94/20073 (Zalipsky et al.). Lipossomas compreendendo lipídios de ceramida PEG-modificados são descritos em WO 96/10391 (Choi et al). Pat. U. S. No. 5.540.935 (Miyazaki 10 et al.) e Pat. U. S. No. 5.556.948 (Tagawa et al.) descrevem lipossomas contendo PEG que podem ser também derivatizados com porções funcionais 15 em suas superfícies.

Um número limitado de lipossomas compreendendo ácidos nucléicos é conhecido na técnica. WO 96/40062 para Thierry et al. descreve 15 métodos para encapsular ácidos nucléicos de peso molecular alto em lipossomas. Pat. U. S. No. 5.264.221 para Tagawa et al. descreve lipossomas ligados a proteína e afirma que os conteúdos de tais lipossomas podem incluir dsRNA. Pat. U. S. No. 5.665.710 para Rahman et al. descreve certos 20 métodos de encapsular oligodeoxinucleotídeos em lipossomas. WO 97/04787 para Amar et al. descreve lipossomas compreendendo dsRNAs alvejados para o gene de raf.

Transfersomas são ainda outro tipo de lipossomas, e são altamente agregados de lipídios deformáveis que são candidatos atrativos para veículos de liberação de fármaco. Transfersomas podem ser descritos como gotículas de lipídio que são tão altamente deformáveis que eles são facilmente capazes de penetrar através de poros que são menores que a gotícula. Transfersomas são adaptáveis ao ambiente no qual eles são usados, por exemplo eles estão auto-otimizantes (adaptáveis à forma dos poros na pele), auto-reparadores, frequentemente alcançam seus alvos sem fragmentarem-se, e frequentemente autocarregadores. Para fazer transfersomas é possível adicionar ativadores de borda de superfície, usualmente tensoativos, a uma composição lipossomal padrão. Transfersomas foram usados 25 30

para liberar albumina de soro à pele. A liberação mediada por transfersoma de albumina de soro foi mostrada ser tão eficaz quanto injeção subcutânea de uma solução contendo albumina de soro.

Tensoativos encontram ampla aplicação em formulações tais como emulsões (incluindo microemulsões) e lipossomas. O modo mais comum de classificar e avaliar as propriedades dos muitos tipos diferentes de tensoativos, naturais e sintéticos, é pelo uso do equilíbrio de hidrófilo/lipófilo (HLB). A natureza do grupo hidrófilo (também conhecido como a "cabeça") provê os meios mais úteis para categorizar os tensoativos diferentes usados nas formulações (Rieger, em *Pharmaceutical Dosage Forms*, Marcel Dekker, Inc., Nova Iorque, N. I., 1988, pág., 285).

Se a molécula de tensoativo não for ionizada, é classificada como um tensoativo não-iônico. Tensoativos não-iônicos encontram ampla aplicação em produtos farmacêuticos e cosméticos e são utilizáveis em uma gama extensiva de valores de pH. Em geral seus valores de HLB variam de 2 a cerca de 18 dependendo de sua estrutura. Tensoativos não-iônicos incluem ésteres não-iônicos tais como ésteres de etileno glicol, ésteres de propilenoglicol, ésteres de glicerila, ésteres de poliglycerila, ésteres de sorbitan, ésteres de sucrose, e ésteres etoxilados. Alcanolamidas e éteres não-iônicas tais como etoxilatos de álcool graxo, alcoóis propoxilados, e polímeros de bloco etoxilados/propoxilados são também inclusos nesta classe. Os tensoativos de polioxietileno são os membros mais populares da classe de tensoativos não-iônicos.

Se a molécula de tensoativo carregar uma carga negativa quando for dissolvida ou dispersa em água, o tensoativo é classificado como aniónico. Tensoativos aniónicos incluem carboxilatos tais como sabões, lactilatos de acila, amidas de acila de aminoácidos, ésteres de ácido sulfúrico tais como sulfatos de alquila e sulfatos de alquila etoxilados, sulfonatos tais como sulfonatos de alquil benzeno, isetionatos de acila, tauratos de acila e sulfossuccinatos, e fosfatos. Os membros mais importantes da classe de tensoativos aniónicos são os sulfatos de alquila e os sabões.

Se a molécula de tensoativo carregar uma carga positiva quan-

do for dissolvida ou dispersada em água, o tensoativo é classificado como catiônico. Tensoativos catiônicos incluem sais de amônio quaternário e aminas etoxiladas. Os sais de amônio quaternário são os membros mais usados desta classe.

5 Se a molécula de tensoativo tiver a habilidade ou carregar uma carga positiva ou negativa, o tensoativo é classificado como anfotérico. Tensoativos anfotéricos incluem derivados de ácido acrílico, alquilamidas substituídas, N-alquilbetaínas e fosfatídeos.

10 O uso de tensoativos em produtos de fármaco, formulações e em emulsões foi revisado (Rieger, em *Pharmaceutical Dosage Forms*, Marcel Dekker, Inc., Nova Iorque, N. I., 1988, pág., 285).

#### INTENSIFICADORES DE PENETRAÇÃO

Em uma modalidade, a presente invenção emprega vários intensificadores de penetração para realizar a liberação eficiente de ácidos nucléicos, particularmente dsRNAs, à pele dos animais. A maioria dos fármacos está presente em solução tanto nas formas ionizadas como não-ionizadas. Porém, usualmente apenas fármacos solúveis em lipídio ou lipofílicos facilmente atravessam as membranas da célula. Foi descoberto que até mesmo fármacos não-lipofílicos podem cruzar as membranas da célula se a membrana a ser cruzada for tratada com um intensificador de penetração. Além de auxiliar a difusão dos fármacos não-lipofílicos ao longo das membranas da célula, os intensificadores de penetração também intensificam a permeabilidade dos fármacos lipofílicos.

25 Intensificadores de penetração podem ser classificados como pertencendo a um dentre cinco categorias vastas, isto é, tensoativos, ácidos graxos, sais biliares, agentes quelantes, e não-tensoativos não-quelantes (Lee et al., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, pág. 92). Cada uma das classes de intensificadores de penetração supracitadas são descritas abaixo em maior detalhe.

30 Tensoativos: com relação à presente invenção, os tensoativos (ou "agentes ativos de superfície") são entidades químicas que, quando dissolvidas em uma solução aquosa, reduzem a tensão superficial da solução

ou a tensão interfacial entre a solução aquosa e outro líquido, com o resultado que a absorção dos dsRNAs através da mucosa é intensificada. Além dos sais biliares e ácidos graxos, estes intensificadores de penetração incluem, por exemplo, lauril sulfato de sódio, éter de polioxietileno-9-laurila e éter de polioxietileno-20-cetila) (Lee et al., Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1991, pág. 92); e emulsões perfluoroquímicas, tais como FC-43 (Takahashi et al., J. Pharm. Pharmacol., 1988, 40, 252).

Ácidos graxos: Vários ácidos graxos e seus derivados que atuam como intensificadores de penetração incluem, por exemplo, ácido oléico, ácido láurico, ácido cáprico (ácido n-decanóico), ácido mirístico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido linoléico, ácido linolênico, dicaprato, tricaprato, monooleína (1-monooleoil-rac-glicerol), dilaurina, ácido caprílico, ácido araquidônico, 1-monocaprato de glicerol, 1-dodecilazaciclo-heptan-2-oná, acilcarnitinas, acilcolinas, C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> alquil ésteres dos mesmos (por exemplo, metila, isopropila e t-butila), e mono- e di-glicerídeos dos mesmos (isto é, oleato, laurato, caprato, miristato, palmitato, estearato, linoleato, etc.) (Lee et al., Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1991, pág. 92; Muranishi, Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1990, 7, 1-33; El Hariri et al., J. Pharm. Pharmacol., 1992, 44, 651-654).

Sais biliares: O papel fisiológico da bílis inclui a facilitação da dispersão e absorção dos lipídios e vitaminas solúveis em gordura (Brunton, Capítulo 38 em: Goodman & Gilman The Pharmacological Basis of Therapeutics, 9<sup>a</sup> Ed., Hardman et al. Eds., McGraw-Hill, Nova Iorque, 1996, págs. 934-935). Vários sais biliares naturais, e seus derivados sintéticos, atuam como intensificadores de penetração. Desse modo o termo "saís biliares" inclui quaisquer dos componentes de ocorrência natural da bílis como também qualquer de seus derivados sintéticos. Os saís biliares da invenção incluem, por exemplo, ácido cólico (ou seu sal de sódio farmaceuticamente aceitável, colato de sódio), ácido desidrocólico (deidrocolato de sódio), ácido deoxicólico (deoxicolato de sódio), ácido glucólico (glucolato de sódio), ácido glicólico (glicocolato de sódio), ácido glicodeoxicólico (glicodeoxicolato de sódio), ácido taurocólico (taurocolato de sódio), ácido taurodeoxicólico (tau-

rodeoxicolato de sódio), ácido quenodeoxicólico (quenodeoxicolato de sódio), ácido ursodeoxicólico (UDCA), tauro-24,25-diidro-fusidato de sódio (STDHF), glicodiidrofusidato de sódio e éter de polioxietileno-9-laurila (POE) (Lee et al., Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1991, página 92; Swinyard, Capítulo 39 Em: Remington's Pharmaceuticals Sciences, 18<sup>a</sup> Ed., Gennaro, ed., Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1990, páginas 782-783; Muranishi, Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1990, 7, 1-33; Yamamoto et al., J. Pharm. Exp. Ther., 1992, 263, 25; Yamashita et al., J. Pharm. Sci., 1990, 79, 579-583).

Agentes Quelantes: Agentes quelantes, como usados com relação à presente invenção, podem ser definidos como compostos que removem íons metálicos da solução formando complexos com estes, com o resultado que a absorção dos dsRNAs através da mucosa é intensificada. Com relação ao seu uso como intensificadores de penetração na presente invenção, os agentes quelantes têm a vantagem adicionada de também servir como inibidores de DNase, como a maioria das nucleases de DNA caracterizadas requerem um íon de metal divalente para catálise e são desse modo inibidas pelos agentes quelantes (Jarrett, J. Chromatogr., 1993, 618, 315-339). Agentes quelantes da invenção incluem mas não são limitados a etilenodiaminotetraacetato de dissódio (EDTA), ácido cítrico, salicilatos (por exemplo, salicilato de sódio, 5-metoxisalicilato e homovanilato), derivados de N-acila de colágeno, laurete-9 e derivados de N-amino acila de betadicetonas (enaminas) (Lee et al., Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1991, página 92; Muranishi, Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1990, 7, 1-33; Buur et al., J. Control Rel., 1990, 14, 43-51).

Não-tensoativos não-quelantes: Como aqui usado, compostos de intensificação de penetração de não-tensoativo não-quelante podem ser definidos como compostos que demonstram atividade insignificante como agentes quelantes ou como tensoativos mas que no entanto intensificam a absorção dos dsRNAs através da mucosa alimentar (Muranishi, Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1990, 7, 1-33). Esta classe de

intensificadores de penetração inclui, por exemplo, ureias cíclicas insaturadas, derivados de 1-alquil- e 1-alquenilazaciclo-alcanona (Lee et al., Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1991, página 92); e agentes anti-inflamatórios não-esteróides tais como diclofenaco sódico, indometacina 5 e fenilbutazona (Yamashita et al., J. Pharm. Pharmacol., 1987, 39, 621-626).

Agentes que intensificam a absorção dos dsRNAs no nível celular podem também ser adicionados às composições farmacêuticas e outras da presente invenção. Por exemplo, lipídios catiônicos, tais como lipofectina (Junichi et al, Pat. U. S. No. 5.705.188), derivados de glicerol catiônico, e 10 moléculas policatiônicas, tais como polilisina (Lollo et al., Pedido de Patente do PCT WO 97/30731), é também conhecido intensificar a absorção celular dos dsRNAs.

Outros agentes podem ser utilizados para intensificar a penetração dos ácidos nucléicos administrados, incluindo glicóis tais como etileno 15 glicol e propileno glicol, pirróis tais como 2-pirrol, azonas, e terpenos tais como limoneno e mentona.

#### VEÍCULOS

Certas composições da presente invenção também incorporam compostos de veículo na formulação. Como aqui usado, "composto de veículo" ou "veículo" podem referir-se a um ácido nucléico, ou análogo do mesmo que seja inerte (isto é, não possua atividade biológica per se) mas seja reconhecido como um ácido nucléico por processos in vivo que reduzem a biodisponibilidade de um ácido nucléico tendo atividade biológica, por exemplo, degradando o ácido nucléico biologicamente ativo ou promovendo 20 sua remoção de circulação. A coadministração de um ácido nucléico e um composto de veículo, tipicamente com um excesso da última substância, pode resultar em uma redução substancial da quantidade de ácido nucléico restabelecido no fígado, rim ou outros reservatórios extracirculatórios, presumivelmente devido à competição entre o composto de veículo e o ácido 25 nucléico para um receptor comum. Por exemplo, o restabelecimento de um dsRNA de fosforotioato parcialmente em tecido hepático pode ser reduzido quando for coadministrado com ácido poliinosínico, sulfato de dextrana, áci- 30

do policitídico ou ácido 4-acetamido-4'isotiociano-estilbeno-2,2'-dissulfônico (Miyao et al., Antisense Res. Dev., 1995, 5, 115-121; Takakura et al., Antisense & Nucl. Acid Drug Dev., 1996, 6, 177-183.

#### EXCIPIENTES

5 Em contraste com um composto de veículo, um "veículo farmacêutico" ou "excipiente" é um solvente farmaceuticamente aceitável, agente de suspensão ou qualquer outro veículo farmacologicamente inerte para liberar um ou mais ácidos nucléicos a um animal. O excipiente pode ser líquido ou sólido e é selecionado, com a maneira planejada de administração  
10 em mente, para prover o volume desejado, consistência, etc., quando combinado com um ácido nucléico e os outros componentes de uma composição farmacêutica dada. Veículos farmacêuticos típicos incluem, mas não  
15 são limitados a, agentes de ligação (por exemplo, amido de milho pré-gelatinizado, polivinilpirrolidona ou hidroxipropil metilcelulose, etc.); agentes de enchimento (por exemplo, lactose e outros açúcares, celulose microcrystalina, pectina, gelatina, sulfato de cálcio, etil celulose, poliacrilatos ou fosfato de hidrogênio de cálcio, etc.); lubrificantes (por exemplo, estearato de magnésio, talco, sílica, dióxido de silício coloidal, ácido esteárico, estearatos metálicos, óleos vegetais hidrogenados, amido de milho, polietileno glicóis,  
20 benzoato de sódio, acetato de sódio, etc.); desintegrantes (por exemplo, amido, glicolato de amido de sódio, etc.); e agentes umectantes (por exemplo, lauril sulfato de sódio, etc.).

Excipiente orgânico ou inorgânico farmaceuticamente aceitável adequado para administração não-parenteral que não deleteriamente reage  
25 com os ácidos nucléicos pode também ser usado para formular as composições da presente invenção. Veículos farmaceuticamente aceitáveis adequados incluem, mas não são limitados a, água, soluções de sal, alcoóis, polietileno glicóis, gelatina, lactose, amilose, estearato de magnésio, talco, ácido silícico, parafina viscosa, hidroximetilcelulose, polivinilpirrolidona e outros.

30 Formulações para administração tópica dos ácidos nucléicos podem incluir soluções aquosas estéreis e não-estéreis, soluções não-aquosas em solventes comuns tais como alcoóis, ou soluções dos ácidos

nucléicos em bases de óleo líquidas ou sólidas. As soluções podem também conter tampões, diluentes e outros aditivos adequados. Excipientes orgânicos ou inorgânicos farmaceuticamente aceitáveis adequados para administração não-parenteral que não deleteriamente reage com os ácidos nucléicos podem ser usados.

5 Excipientes farmaceuticamente aceitáveis adequados incluem, mas não são limitados a, água, soluções de sal, álcool, polietileno glicóis, gelatina, lactose, amilose, estearato de magnésio, talco, ácido silícico, parafina viscosa, hidroximetilcelulose, polivinilpirrolidona e outros.

## 10 COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS PARA A LIBERAÇÃO PARA O TRATO RESPIRATÓRIO

Outro aspecto da invenção provê a liberação de agentes de iRNA ao trato respiratório, particularmente para o tratamento de fibrose cística. O trato respiratório inclui as vias aéreas superiores, incluindo a orofaringe e 15 laringe, seguidas pelas vias aéreas inferiores que incluem a traquéia seguidas por bifurcações nos brônquios e bronquíolos. As vias aéreas superiores e inferiores são chamadas as vias aéreas condutivas. Os bronquíolos terminais depois dividem em bronquíolos respiratórios que depois conduzem à última zona respiratória, os alvéolos, ou pulmão profundo. O pulmão profundo, ou alvéolos, é o alvo primário de aerossóis terapêuticos inalados para 20 liberação sistêmica dos agentes de iRNA.

Composições de liberação pulmonar podem ser liberadas através de inalação pelo paciente de uma dispersão de forma que a composição, preferivelmente o agente de iRNA, dentro da dispersão possa alcançar 25 o pulmão onde pode, por exemplo, ser absorvida facilmente através da região alveolar diretamente para a circulação do sangue. Liberação pulmonar pode ser eficaz tanto para liberação sistêmica como para liberação localizada para tratar doenças dos pulmões.

Liberação pulmonar pode ser alcançada através de métodos diferentes, incluindo o uso de formulações nebulizadas, aerossolizadas, micelulares e baseadas em pó seco; administração através de inalação pode ser 30 oral e/ou nasal. Liberação pode ser alcançada com nebulizadores líquidos,

inaladores com base em aerossol, e dispositivos de dispersão de pó seco. Dispositivos de dose medida são preferidos. Um dos benefícios de se usar um atomizador ou inalador é que o potencial para contaminação é minimizado porque os dispositivos ficam autocontidos. Dispositivos de dispersão de pós secos, por exemplo, liberam os fármacos que podem ser formulados facilmente como pós secos. Uma composição de iRNA pode ser estavelmente armazenada como pós liofilizados ou secados por pulverização por si só ou em combinação com veículos de pó adequados. A liberação de uma composição para inalação pode ser mediada por um elemento de regulação de doseamento que pode incluir um cronômetro, contador de dose, dispositivo medidor de tempo, ou um indicador de tempo que quando incorporado no dispositivo permite rastreamento da dose, monitoramento de complacência, e/ou desencadeamento de dose para um paciente durante a administração do fármaco de aerossol.

Exemplos de dispositivos farmacêuticos para liberação de aerossol incluem inaladores de dose medida (MDIs), inaladores de pós secos (DPIs), e nebulizadores de jato de ar. Sistemas de liberação exemplares para inalação que podem ser facilmente adaptados para liberação dos agentes de iRNA em questão são descritos, por exemplo, nas Pats. U. S. Nos. 5.756.353; 5.858.784; e pedidos de patente do PCT WO98/31346; WO98/10796; WO00/27359; WO01/54664; WO02/060412. Outras formulações de aerossol que podem ser usadas para liberar os agentes de iRNA são nas Pats. U. S. Nos. 6.294.153; 6.344.194; 6.071.497, e pedidos de patente do PCT WO02/066078; WO02/053190; WO01/60420; WO00/66206. Também, métodos para liberar agentes de iRNA podem ser adaptados daqueles usados na liberação de outros oligonucleotídeos (por exemplo, um oligonucleotídeo antisentido) através de inalação, tais como descritos em Templin et al., Antisense Nucleic Acid Drugs Dev, 2000, 10:359-68; Sandrasagra et al., Expert Opin Biol Ther, 2001, 1:979-83; Sandrasagra et al., Antisense Nucleic Acid Drug Dev, 2002, 12:177-81.

A liberação dos agentes inventivos pode também envolver a administração dos assim chamados "pró-fármacos", isto é formulações ou

modificações químicas de uma substância terapêutica que requer alguma forma de processamento ou transporte através de sistemas inatos para o organismo sujeito para liberar a substância terapêutica, preferivelmente no sítio onde sua ação é desejada; esta modalidade posterior pode ser usada

5 junto com liberação do trato respiratório, mas também junto com outras modalidades da presente invenção. Por exemplo, os pulmões humanos podem remover ou rapidamente degradar os aerossóis depositados hidroliticamente cliváveis em períodos que variam de minutos a horas. Nas vias aéreas superiores, os epitélios ciliados contribuem para o "escalator mucociliar" por que

10 as partículas são varridas das vias aéreas para a boca. Pavia, D., "Lung Mucociliary Clearance", em Aerossols and the Lung: Clinical and Experimental Aspects, Clarke, S. W. e Pavia, D., Eds., Butterworths, Londres, 1984. Nos pulmões profundos, os macrófagos alveolares são capazes de realizar fagocitose de partículas logo após sua deposição. Warheit et al. Microscopy Res.

15 Tech., 26: 412-422 (1993); e Brain, J. D., "Physiology and Pathophysiology of Pulmonary Macrophages", em The Reticuloendothelial System, S. M. Richardson e J. Filkins, Eds., Plenum, Nova Iorque, págs. 315-327, 1985.

Em modalidades preferidas, particularmente onde doseamento sistêmico com o agente de iRNA for desejado, os agentes de iRNA em aerossol são formulados como micropartículas. Micropartículas tendo um diâmetro de entre 0,5 e dez mícrons podem penetrar os pulmões, atravessando a maioria das barreiras naturais. Um diâmetro de menos de dez mícrons é requerido para desviar-se da garganta; um diâmetro de 0,5 mícrons ou maior é requerido para evitar de ser exalado.

## 25 OUTROS COMPONENTES

As composições da presente invenção podem adicionalmente conter outros componentes adjuntos convencionalmente encontrados nas composições farmacêuticas, em seus níveis de uso estabelecidos na técnica. Desse modo, por exemplo, as composições podem conter materiais adicionais, compatíveis, farmaceuticamente ativos tais como, por exemplo, antipruríticos, adstringentes, anestésicos locais ou agentes anti-inflamatórios, ou pode conter materiais adicionais úteis em fisicamente formular as várias

formas de dosagem das composições da presente invenção, tais como corantes, agentes flavorizantes, conservantes, antioxidantes, opacificadores, agentes espessantes e estabilizantes. Porém, tais materiais, quando adicionados, não deveriam interferir indevidamente com as atividades biológicas  
5 dos componentes das composições da presente invenção. As formulações podem ser esterilizadas e, se desejado, misturadas com agentes auxiliares, por exemplo, lubrificantes, conservantes, estabilizantes, agentes umectantes, emulsificantes, sais para influenciar a pressão osmótica, tampões, colorações, condimentos e/ou substâncias aromáticas e outros que não deleteriamente interagem com o(s) ácido(s) nucléico(s) da formulação.  
10

Suspensões aquosas podem conter substâncias que aumentam a viscosidade da suspensão incluindo, por exemplo, carboximetilcelulose de sódio, sorbitol e/ou dextrana. A suspensão pode também conter estabilizantes.

15 Certas modalidades da invenção fornecem composições farmacêuticas que contêm (a) um ou mais agentes de dsRNA e (b) um ou mais outros agentes quimioterapêuticos que funcionam por um mecanismo de interferência de não-RNA. Exemplos de tais agentes quimioterapêuticos incluem mas não são limitados a daunorrubicina, daunomicina, dactinomicina, doxorrubicina, epirubicina, idarrubicina, esorrubicina, bleomicina, mafosfamida, ifosfamida, arabinosida de citosina, bis-cloroetilnitrosureia, bussulfano, mitomicina C, actinomicina D, mitramicina, prednisona, hidroxiprogesterona, testosterona, tamoxifeno, dacarbazina, procarbazina, hexametilmelamina, pentametilmelamina, mitoxantrona, ansacrina, clorambucil, metilciclohexilnitrosureia, mostardas de nitrogênio, melfalano, ciclofosfamida, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-azacitidina, hidroxiureia, deoxicocomicina, 4-hidroxiperoxiciclofosforamida, 5-fluorouracila (5-FU), 5-fluorodeoxiuridina (5-FUDR), metotrexato (MTX), colquicina, taxol, vincristina, vinblastina, etoposida (VP-16), trimetrexato, irinotecan, topotecan, gencitabina, teniposida, cisplatina e dietilestilbestrol (DES). Vide, em geral, The Merck Manual of Diagnosis and Therapy, 15<sup>a</sup> Ed. 1987, págs. 1206-1228, Berkow et al., eds., Rahway, N. J. Quando usados com os compostos da

invenção, tais agentes quimioterapêuticos podem ser usados individualmente (por exemplo, 5-FU e oligonucleotídeo), sequencialmente (por exemplo, 5-FU e oligonucleotídeo durante um período de tempo seguido por MTX e oligonucleotídeo), ou em combinação com um ou mais outros tais agentes  
5 quimioterapêuticos (por exemplo, 5-FU, MTX e oligonucleotídeo, ou 5-FU, radioterapia e oligonucleotídeo). Fármacos anti-inflamatórios, incluindo mas não-limitados a fármacos anti-inflamatórios não-esteroidais e corticosteróides, e fármacos antivirais, incluindo mas não-limitados a ribivirina, vidarabina, aciclovir e ganciclovir, podem também ser combinados nas composições  
10 da invenção. Vide, em geral, The Merck Manual of Diagnosis and Therapy, 15<sup>a</sup> Ed., Berkow et al., eds., 1987, Rahway, N. J., páginas 2499-2506 e 46-49, respectivamente). Outros agentes quimioterapêuticos de não-dsRNA estão também dentro do escopo desta invenção. Dois ou mais compostos combinados podem ser usados junto ou sequencialmente.

15 Toxicidade e eficácia terapêutica de tais compostos podem ser determinadas através de procedimentos farmacêuticos padrão em culturas de célula ou animais experimentais, por exemplo, para determinar a LD<sub>50</sub> (a dose letal para 50% da população) e a ED<sub>50</sub> (a dose terapeuticamente eficaz em 50% da população). A razão de dose entre os efeitos tóxicos e terapêuticos é o índice terapêutico e pode ser expressada como a razão LD<sub>50</sub>/ED<sub>50</sub>.  
20 Compostos que exibem índice terapêutico alto são preferidos.

Os dados obtidos de ensaios de cultura de célula e estudos de animais podem ser usados na formulação uma faixa de dosagem para uso em seres humanos. A dosagem das composições da invenção fica em geral dentro de uma faixa de concentrações circulantes que incluem a ED<sub>50</sub> com pouca ou nenhuma toxicidade. A dosagem pode variar dentro desta faixa dependendo da forma de dosagem empregada e da via de administração utilizada. Para qualquer composto usado no método da invenção, a dose terapeuticamente eficaz pode ser estimada inicialmente de ensaios de cultura de células. Uma dose pode ser formulada em modelos animais para alcançar uma faixa de concentração de plasma circulante do composto ou, quando apropriado, do produto de polipeptídeo de uma sequência alvo (por

exemplo, alcançando uma concentração diminuída do polipeptídeo) que inclui a IC<sub>50</sub> (isto é, a concentração do composto de teste que alcança uma inibição máxima da porção dos sintomas) conforme determinado na cultura de células. Tal informação pode ser usada para determinar doses úteis mais 5 com precisão em seres humanos. Os níveis em plasma podem ser medidos, por exemplo, através de cromatografia líquida de alto desempenho.

Além de sua administração individualmente ou como uma pluralidade, como debatido acima, os dsRNAs da invenção podem ser administrados em combinação com outros agentes conhecidos eficazes no tratamento 10 de processos patológicos mediados por expressão de Aha. Em todo caso, o médico administrador pode ajustar a quantidade e regulação da administração de dsRNA em base dos resultados observados usando medidas de eficácia padrões conhecidas na técnica ou descritas aqui.

#### MÉTODOS PARA TRATAR DOENÇAS CAUSADAS POR EX- 15 PRESSÃO DE UM GENE DE Aha

A invenção refere-se em particular ao uso de um dsRNA ou uma composição farmacêutica preparada deste para o tratamento de Fibrose Cística. Devido ao efeito inibidor na expressão de Aha1, um dsRNA de acordo 20 com a invenção ou uma composição farmacêutica preparada deste pode intensificar a qualidade de vida de pacientes com Fibrose Cística.

Além disso, a invenção refere-se ao uso de um dsRNA ou uma composição farmacêutica da invenção visada para o tratamento de câncer, por exemplo, para inibir crescimento do tumor e metástase do tumor. Por exemplo, o dsRNA ou uma composição farmacêutica preparada deste pode ser usado para o tratamento de tumores sólidos, como câncer de mama, câncer pulmonar, câncer de cabeça e pescoço, câncer de cérebro, câncer abdominal, câncer de cólon, câncer colorretal, câncer de esôfago, câncer gastrointestinal, glioma, câncer de fígado, câncer de língua, neuroblastoma, osteossarcoma, câncer ovariano, câncer pancreático, câncer de próstata, 25 retinoblastoma, tumor de Wilm, mieloma múltiplo e para o tratamento de câncer de pele, como melanoma, para o tratamento de linfomas e câncer de sangue. A invenção também refere-se ao uso de um dsRNA de acordo com

a invenção ou uma composição farmacêutica preparada deste para inibir expressão de Aha1 e/ou para inibir acumulação de fluido de ascites e efusão pleural em tipos diferentes de câncer, por exemplo, câncer de mama, câncer pulmonar, câncer de cabeça, câncer de pescoço, câncer de cérebro, 5 câncer abdominal, câncer de cólon, câncer colorretal, câncer de esôfago, câncer gastrointestinal, glioma, câncer de fígado, câncer de língua, neuroblastoma, osteossarcoma, câncer ovariano, câncer pancreático, câncer de próstata, retinoblastoma, tumor de Wilm, mieloma múltiplo, câncer de pele, melanoma, linfomas e câncer de sangue. Devido ao efeito inibidor em expressão de Aha1, um dsRNA de acordo com a invenção ou uma composição farmacêutica preparada deste pode intensificar a qualidade de vida de 10 pacientes de câncer.

A invenção refere-se, além disso, ao uso de um dsRNA ou uma composição farmacêutica do mesmo, por exemplo, para tratar Fibrose Cística ou câncer ou para impedir metástase do tumor, em combinação com outros farmacêuticos e/ou outros métodos terapêuticos, por exemplo, com farmacêuticos conhecidos e/ou métodos terapêuticos conhecidos, tais como, por exemplo, aqueles que são empregados correntemente para tratar Fibrose Cística ou câncer e/ou para impedir metástase do tumor. Onde a composição farmacêutica visa para o tratamento de fibrose cística, preferência é dada a uma combinação com fisioterapia de tórax diária, enzimas pancreáticas oralmente aplicadas, antibióticos orais ou inalados diariamente para oponer-se à infecção pulmonar, terapia antiasma inalada, comprimidos de corticosteróides, suplementos dietéticos de vitamina, especialmente A e D, inalação de Pulmozyme™, medicinas para aliviar a constipação ou melhorar a atividade dos suplementos de enzima, insulina para diabetes relacionada a CF, medicação para doença hepática associada a CF, e oxigênio para ajudar com a respiração.

Onde a composição farmacêutica visa para o tratamento de 30 câncer e/ou para impedir metástase do tumor, preferência é dada a uma combinação com terapia de radiação e agentes quimioterapêuticos, tais como cisplatina, ciclofosfamida, 5-fluorouracila, adriamicina, daunorrubicina ou

tamoxifeno.

A invenção pode também ser praticada incluindo com um agente de RNAi específico outro agente quimioterapêutico anticâncer, tal como qualquer agente quimioterapêutico convencional. A combinação de um agente de ligação específico com tais outros agentes pode potencializar o protocolo quimioterapêutico. Numerosos protocolos quimioterapêuticos se apresentarão na mente do médico versado como sendo capaz de incorporação no método da invenção. Qualquer agente quimioterapêutico pode ser usado, incluindo agentes de alquilação, antimetabólitos, hormônios e antagonistas, radioisótopos, como também produtos naturais. Por exemplo, o composto da invenção pode ser administrado com antibióticos tais como doxorrubicina e outros análogos de antraciclina, mostardas de nitrogênio tais como ciclofosfamida, análogos de pirimidina tais como 5-fluorouracila, cisplatina, hidroxiureia, taxol e seus derivados naturais e sintéticos, e outros.

No caso de tumores misturados, tais como adenocarcinoma da mama onde os tumores incluem células dependentes de gonadotropina e independentes de gonadotropina, o composto pode ser administrado junto com leuprorelin ou goserrelina como outro exemplo, (análogos de peptídeo sintéticos de LH-RH). Outros protocolos antineoplásicos incluem o uso de um composto de tetraciclina com outra modalidade de tratamento, por exemplo, cirurgia, radiação, etc., também referido aqui como "modalidades antineoplásicas adjuntas". Desse modo, o método da invenção pode ser empregado com tais regimes convencionais com o benefício de reduzir os efeitos colaterais e intensificar a eficácia.

MÉTODOS PARA INIBIR EXPRESSÃO DE UM GENE DE Aha

Em ainda outro aspecto, a invenção provê um método para inibir a expressão de um gene de Aha em um mamífero. O método compreende administrar uma composição da invenção ao mamífero de modo que a expressão do gene de Aha alvo, por exemplo Aha1, é silenciado. Por causa de sua especificidade alta, os dsRNAs da invenção especificamente alvejam os RNAs (primários ou processados) do gene de Aha alvo. Composições e métodos para inibir a expressão destes genes de Aha usando dsRNAs podem

ser executados como descritos em outro lugar aqui.

Em uma modalidade, o método compreende administrar uma composição compreendendo um dsRNA, em que o dsRNA compreende uma sequência de nucleotídeo que é complementar a pelo menos uma parte 5 de uma transcrição de RNA de um gene de Aha, por exemplo Aha1, do mamífero a ser tratado. Quando o organismo a ser tratado for um mamífero tal como um ser humano, a composição pode ser administrada por quaisquer meios conhecidos na técnica incluindo, mas não-limitada a vias orais ou parenterais, incluindo administração intravenosa, intramuscular, subcutânea, 10 transdérmica, via aérea (aerossol), nasal, retal, vaginal e tópica (incluindo bucal e sublingual). Em modalidades preferidas, as composições são administradas por infusão ou injeção intravenosa.

A menos que do contrário definido, todos termos técnicos e científicos aqui usados têm o mesmo significado que comumente entendido 15 por alguém versado na técnica ao qual esta invenção compete. Embora métodos e materiais similares ou equivalentes àqueles descritos aqui possam ser usados na prática ou testagem da invenção, métodos e materiais adequados são descritos abaixo. Todas as publicações, pedidos de patente, patentes, e outras referências mencionadas aqui são incorporados por referência 20 em sua totalidade. No caso de conflito, o relatório descriptivo presente, incluindo definições, prevalecerá. Além disso, os materiais, métodos, e exemplos são ilustrativos apenas e não intencionados ser limitativos.

#### EXEMPLOS

##### CAMINHADA DE GENE DE UM GENE DE Aha

Modelo de siRNA foi realizado para identificar siRNAs que alvejam Aha1. As sequências de mRNA de Aha 1 de *Homo sapiens* (NM\_012111.1), *Mus musculus* (NM\_146036.1) e *Pan troglodytes* (XM\_510094.1) foram examinadas por análise de computador para identificar sequências homólogas de 19 ou 21 nucleotídeos que rendem agentes 25 de RNAi reativos cruzados entre estas três espécies. Daquelas identificadas, 30 48 tais sequências foram selecionadas para interações não-alvas mínimas em ratos (pelo menos 3 disparidades para qualquer outro gene no genoma

de rato, ou pelo menos duas disparidades para qualquer outro gene no genoma de rato, em que uma das ditas pelo menos duas disparidades fica localizada em uma posição complementar à posição 9 ou 10 do filamento antisentido do agente de RNAi correspondente, contando 5' para 3') e os dsRNAs correspondentes sintetizados para triar (AL-DP-7301 - AL-DP-7346, vide Tabela 1). AL-DP-7561, AL-DP-7562, AL-DP-7563 e AL-DP-7564 que são adicionalmente reativos cruzados para Aha 2 de *Mus musculus* (NM\_172391.3) e *Rattus norvegicus* (XM\_223680.3), foram também sintetizados e triados. Além disso, umas 40 sequências também foram selecionadas para interações não-alvo mínimas prognosticadas em seres humanos (pelo menos 3 disparidades para qualquer outro gene no genoma humano, ou pelo menos duas disparidades para qualquer outro gene no genoma humano, em que uma das ditas pelo menos duas disparidades fica localizada em uma posição complementar à posição 9 ou 10 do filamento antisentido do agente de RNAi correspondente, contando 5' para 3') e os dsRNAs correspondentes sintetizados para triar (AL-DP-9250 - AL-DP-9289, vide Tabela 2). 17 sequências foram identificadas como pertencendo a ambos conjuntos (AL-DP-7301, AL-DP-7304, AL-DP-7305, AL-DP-7307, AL-DP-7310, AL-DP-7312, AL-DP-7315, AL-DP-7316, AL-DP-7317, AL-DP-7323, AL-DP-7324, AL-DP-7332, AL-DP-7336, AL-DP-7337, AL-DP-7338, AL-DP-7342, e AL-DP-7344.

#### SÍNTESE DE dsRNA

#### FONTE DE REAGENTES

Onde a fonte de um reagente especificamente não for dada aí, tal reagente pode ser obtido de qualquer provedor de reagentes para biologia molecular em uma qualidade/pureza padrões para aplicação em biologia molecular.

#### SÍNTESE DE SIRNA

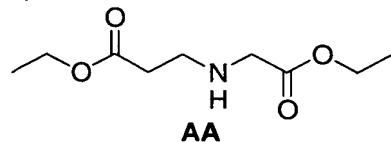
30 RNAs unifilamentares foram produzidos através de síntese de fase sólida em uma escala de 1 µmol usando um sintetizador 8909 Expedite (Applied Biosystems, Applera Deutschland GmbH, Darmstadt, Alemanha) e vidro de poro controlado (CPG, 500Å, Proligo Biochemie GmbH, Hamburgo,

Alemanha) como suporte sólido. RNA e RNA contendo nucleotídeos de 2'-O-metila foram gerados por síntese de fase sólida empregando as fosforamiditas correspondentes e fosforamiditas de 2'-O-metila, respectivamente (Proligo Biochemie GmbH, Hamburgo, Alemanha). Estes blocos de construção 5 foram incorporados em sítios selecionados dentro da sequência da cadeia de oligorribonucleotídeo usando química de fosforamidita de nucleosídeo padrão tal como descrita em Current protocols in nucleic acid chemistry, Beaucage, S. L. et al. (Edrs.), John Wiley & Sons, Inc., Nova Iorque, NY, EUA. Ligações de fosforotioato foram introduzidas por substituição da solução 10 de oxidante de iodo com uma solução do reagente de Beaucage (Chruachem Ltd, Glasgow, UK) em acetonitrila (1%). Outros reagentes subordinados foram obtidos de Mallinckrodt Baker (Griesheim, Alemanha).

Desproteção e purificação dos oligorribonucleotídeos brutos através de HPLC de permuta de ânion foram realizadas de acordo com os procedimentos estabelecidos. Rendimentos e concentrações foram determinados por absorção de UV de uma solução do respectivo RNA a um comprimento de onda de 260 nm usando um fotômetro espectral (DU 640B, Beckman Coulter GmbH, Unterschleißheim, Alemanha). RNA bifilamentar foi gerado misturando uma solução equimolar de filamentos complementares 15 em tampão de anelamento (20 mM de fosfato de sódio, pH 6,8; 100 mM de cloreto de sódio), aquecido em um banho de água a 85 - 90°C durante 3 minutos e esfriado para temperatura ambiente em um período de 3 - 4 horas. A solução de RNA anelada foi armazenada a -20°C até o uso.

Para a síntese de siRNAs conjugados com 3'-colesterol (aqui referidos como -Col-3'), um suporte sólido apropriadamente modificado foi usado para síntese de RNA. O suporte sólido modificado foi preparado como segue:

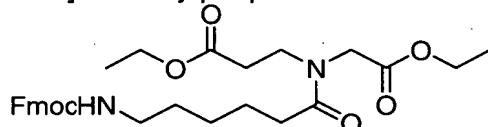
Dietil-2-azabutano-1,4-dicarboxilato AA



Uma solução aquosa a 4,7 M de hidróxido de sódio (50 ml) foi

5 adicionada em uma solução esfriada a gelo agitada de cloridrato de glicinato de etila (32,19 g, 0,23 mol) em água (50 ml). Depois, acrilato de etila (23,1 g, 0,23 mol) foi adicionado e a mistura foi agitada em temperatura ambiente até conclusão da reação ser apurada por TLC. Após 19 h, a solução foi dividida com diclorometano (3 x 100 ml). A camada orgânica foi secada com sulfato de sódio anidro, filtrada e evaporada. O resíduo foi destilado para fornecer AA (28,8 g, 61%).

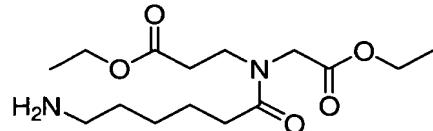
Éster de etila de ácido 3-{Etoxicarbonilmetil-[6-(9H-fluoren-9-ilmetoxicarbonil-amino)-hexanoil]-amino}-propiônico AB



AB

10 Ácido Fmoc-6-amino-hexanóico (9,12 g, 25,83 mmols) foi dissolvido em diclorometano (50 ml) e esfriado com gelo. Diisopropilcarbodímera (3,25 g, 3,99 ml, 25,83 mmols) foi adicionada à solução a 0°C. Foi depois seguido pela adição de Dietil-azabutano-1,4-dicarboxilato (5 g, 24,6 mmols) 15 e dimetilamino piridina (0,305 g, 2,5 mmols). A solução foi trazida para temperatura ambiente e agitada por mais 6 h. Conclusão da reação foi apurada por TLC. A mistura de reação foi concentrada sob vácuo e acetato de etila foi adicionado para precipitar a diisopropil ureia. A suspensão foi filtrada. O filtrado foi lavado com 5% de ácido clorídrico aquoso, 5% de bicarbonato de 20 sódio e água. A camada orgânica combinada foi secada em sulfato de sódio e concentrada para dar o produto bruto que foi purificado através de cromatografia de coluna (50% EtOAC/Hexanos) para render 11,87 g (88%) de AB.

Éster de etila de ácido 3-{(6-amino-hexanoil)-etoxicarbonilmetil-amino}-propiônico AC

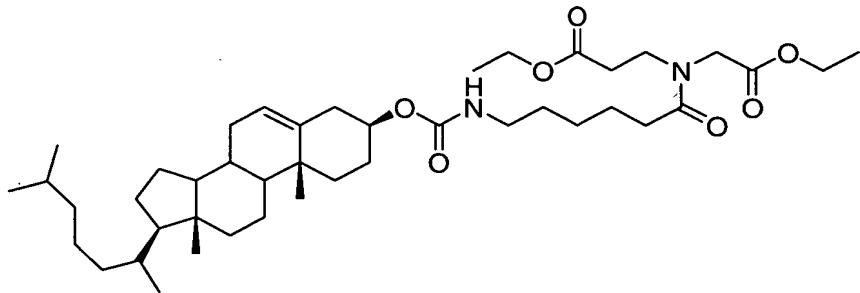


25 AC

Éster de etila de ácido 3-{etoxicarbonilmetil-[6-(9H-fluoren-9-ilmetoxicarbonilamino)-hexanoil]-amino}-propiônico AB (11,5 g, 21,3 mmols)

foi dissolvido em 20% de piperidina em dimetilformamida a 0°C. A solução foi continuada agitando por 1 h. A mistura de reação foi concentrada sob vácuo, água foi adicionada ao resíduo, e o produto foi extraído com acetato de etila. O produto bruto foi purificado através de conversão em seu sal de cloridrato.

Éster de etila de ácido 3-({6-[17-(1,5-dimetil-hexil)-10,13-dimetil-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecaidro-1H-ciclopenta[a]fenanren-3-iloxicarbonilamino]-hexanoil}etoxicarbonilmethyl-amino)-propiônico AD

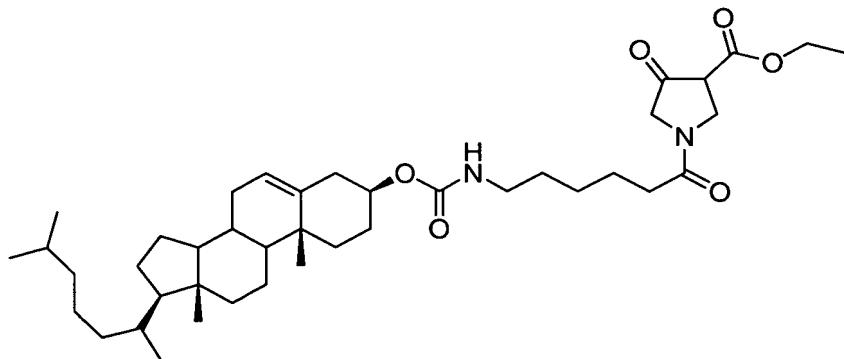


10

AD

O sal de cloridrato de éster de etila de ácido 3-[(6-amino-hexanoil)-etoxicarbonilmethyl-amino]-propiônico AC (4,7 g, 14,8 mmols) foi absorvido em diclorometano. A suspensão foi esfriada para 0°C em gelo. À suspensão, diisopropiletilamina (3,87 g, 5,2 ml, 30 mmols) foi adicionada. À 15 solução resultante, cloroformato de colesterol (6,675 g, 14,8 mmols) foi adicionado. A mistura de reação foi agitada durante a noite. A mistura de reação foi diluída com diclorometano e lavada com 10% de ácido clorídrico. O produto foi purificado através de cromatografia instantânea (10,3 g, 92%).

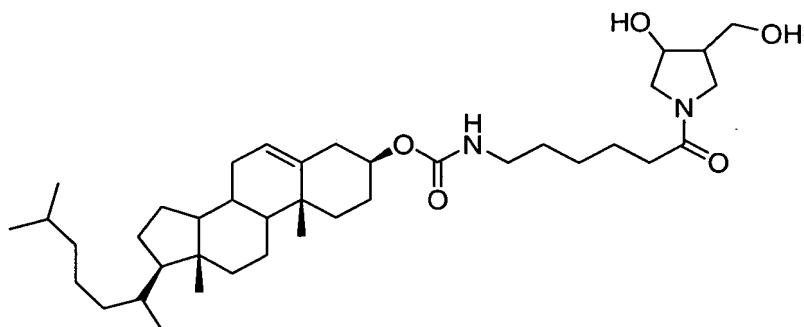
Éster de etila de ácido 1-{6-[17-(1,5-dimetil-hexil)-10,13-dimetil-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecaidro-1H-ciclopenta[a]fenanren-3-iloxicarbonilamino]-hexanoil}-4-oxo-pirrolidina-3-carboxílico AE



AE

T-butóxido de potássio (1,1 g, 9,8 mmols) foi empastado em 30 ml de tolueno seco. A mistura foi esfriada para 0°C em gelo e 5 g (6,6 mmols) de diéster AD foram adicionados lentamente com agitação dentro de 5 20 min. A temperatura foi mantida abaixo de 5°C durante a adição. A agitação foi continuada por 30 min a 0°C e 1 ml de ácido acético glacial foi adicionado, imediatamente seguido por 4 g de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  em 40 ml de água. A mistura resultante foi extraída duas vezes com 100 ml de diclorometano cada e os extratos orgânicos combinados foram lavados duas vezes 10 com 10 ml de tampão de fosfato cada, secados, e evaporados à secura. O resíduo foi dissolvido em 60 ml de tolueno, esfriado para 0°C e extraído com três porções de 50 ml de tampão de carbonato frio a pH 9,5. Os extratos aquosos foram ajustados para pH 3 com ácido fosfórico, e extraídos com cinco porções de 40 ml de clorofórmio que foram combinadas, secadas e 15 evaporadas à secura. O resíduo foi purificado através de cromatografia de coluna usando 25% de etilacetato/hexano para fornecer 1,9 g de b-cetoéster (39%).

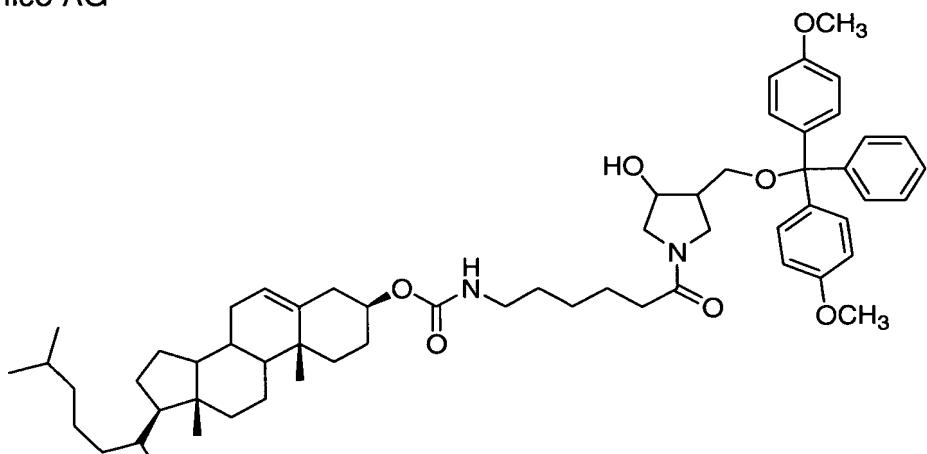
Éster de 17-(1,5-dimetil-hexil)-10,13-dimetil-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradeca-1H-cyclopenta[a]fenantren-3-ila de ácido [6-20] (3-hidróxi-4-hidroximetil-pirrolidin-1-il)-6-oxo-hexil]-carbâmico AF



AF

Metanol (2 ml) foi adicionado a gotas em um período de 1 h a uma mistura sob refluxo de  $\beta$ -cetoéster AE (1,5 g, 2,2 mmols) e boroidreto de sódio (0,226 g, 6 mmols) em tetraidrofurano (10 ml). Agitação foi continua-  
5 ada em temperatura de refluxo por 1 h. Após esfriar para temperatura ambi-ente, 1 N de HCl (12,5 ml) foi adicionado, a mistura foi extraída com etilace-tato (3 x 40 ml). A camada de etilacetato combinada foi secada em sulfato de sódio anidro e concentrada sob vácuo para render o produto que foi puri-ficado através de cromatografia de coluna (10% de MeOH/CHCl<sub>3</sub>) (89%).

10 Éster de 17-(1,5-dimetil-hexil)-10,13-dimetil-2,3,4,7,8,9,10,11,12, 13,14,15,16,17-tetradecaidro-1H-ciclopenta[a]fenantren-3-ila de ácido (6-{3-[Bis-(4-metóxi-fenil)-fenil-metoximetil]-4-hidróxi-pirrolidin-1-il}-6-oxo-hexil)-carbâmico AG

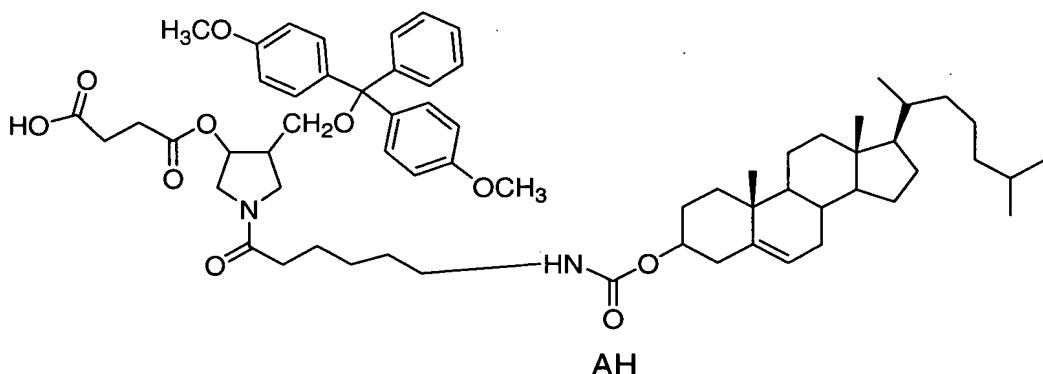


AG

15 Diol AF (1,25 gm 1,994 mmols) foi seco evaporando com piri-dina (2 x 5 mL) a vácuo. Piridina anidra (10 ml) e 4,4'-dimetoxitritilcloreto (0,724 g, 2,13 mmols) foi adicionado com agitação. A reação foi realizada

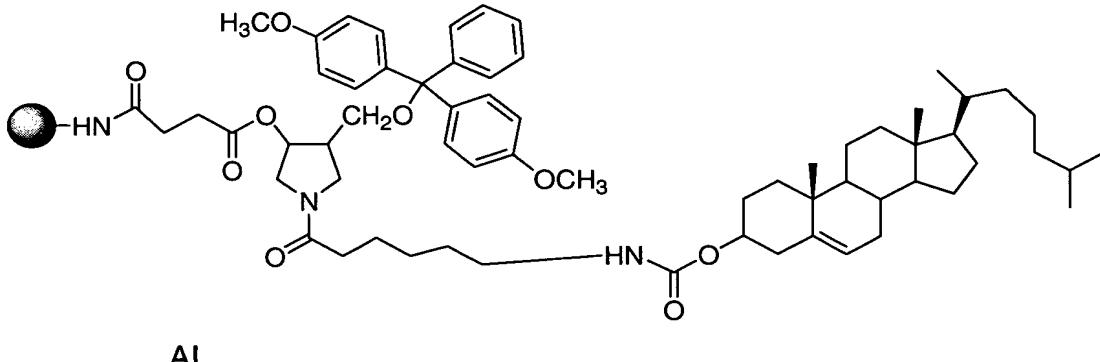
em temperatura ambiente durante a noite. A reação foi extinguida pela adição de metanol. A mistura de reação foi concentrada sob vácuo e ao resíduo diclorometano (50 ml) foi adicionado. A camada orgânica foi lavada com 1M de bicarbonato de sódio aquoso. A camada orgânica foi secada em sulfato de sódio anidro, filtrada e concentrada. A piridina residual foi removida evaporando com tolueno. O produto bruto foi purificado através de cromatografia de coluna (2% de MeOH/clorofórmio,  $R_f = 0,5$  em 5% de MeOH/CHCl<sub>3</sub>) (1,75 g, 95%).

Éster de mono-(4-[bis-(4-metóxi-fenil)-fenil-metoximetil]-1-{6-[17-(1,5-dimetil-hexil)-10,13-dimetil-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecadro-1H ciclopenta[a]fenantren-3-iloxicarbonilamino]-hexañoil}-pirrolidin-3-il) de ácido succínico AH



O composto AG (1,0 g, 1,05 mmol) foi misturado com anidrido succínico (0,150 g, 1,5 mmol) e DMAP (0,073 g, 0,6 mmol) e secado em um  
 5 vácuo a 40°C durante a noite. A mistura foi dissolvida em dicloroetano anidro (3 ml), trietilamina (0,318 g, 0,440 mL, 3,15 mmols) foi adicionada e a soluço foi agitada em temperatura ambiente sob atmosfera de argônio por 16 h.  
 Foi depois diluída com diclorometano (40 ml) e lavada com gelo   ido cítrico aquoso frio (5 %p, 30 ml) e   qua (2 X 20 ml). A fase orgânica foi secada em  
 10 sulfato de sódio anidro e concentrada à secura. O resíduo foi usado como tal para a próxima etapa.

CPG derivatizado com colesterol AI



Succinato AH (0,254 g, 0,242 mmol) foi dissolvido em uma mistura de diclorometano/acetonitrila (3:2, 3 ml). Aquele soluço DMAP (0,0296 g, 0,242 mmol) em acetonitrila (1,25 ml), 2,2'-Ditio-bis(5-nitropiridina) (0,075 g, 0,242 mmol) em acetonitrila/dicloroetano (3:1, 1,25 ml) foram adicionados sucessivamente. A soluço resultante trifenilfosfina (0,064 g, 0,242 mmol) em acetonitrila (0,6 ml) foi adicionada. A mistura de rea  o tornou-se de cor  
 15 laranja clara. A soluço foi brevemente agitada usando um agitador de a  o  
 20

de pulsos (5 min). Alquilamina de cadeia longa-CPG (LCAA-CPG) (1,5 g, 61 mM) foi adicionada. A suspensão foi agitada por 2 h. A CPG foi filtrada através de um funil sinterizado e lavada sucessivamente com acetonitrila, diclorometano e éter. Grupos amino não-reagidos foram mascarados usando 5 anidrido acético/piridina. O carregamento alcançado da CPG foi medido tirando a medição de UV (37 mM/g).

A síntese de siRNAs carregando um grupo bisdecilamida de ácido 5'-12-dodecanóico (aqui referido como "5'-C32-") ou um grupo derivado de 5'-colesterila (aqui referido como "5'-Col-") foi executada como descrita 10 em WO 2004/065601, exceto que, para o derivado de colesterila, foi executada a etapa de oxidação usando o reagente de Beaucage para introduzir uma ligação de fosforotioato à terminação 5' do oligômero de ácido nucléico.

Sequências de ácido nucléico são representadas abaixo usando nomenclatura padrão, e especificamente as abreviações da Tabela 2.

15 **TABELA 3: ABREVIAÇÕES DOS MONÔMEROS DE NUCLEOTÍDEO USADOS NA REPRESENTAÇÃO DA SEQUÊNCIA DE ÁCIDO NUCLÉICO.** Será entendido que estes monômeros, quando presentes em um oligonucleotídeo, estão ligados mutuamente através de ligações de 5'-3'-fosfodiéster.

Abreviação	Nucleotídeo(s)
A, a	2'-deóxi-adenosina-5'-fosfato, adenosina-5'-fosfato
C, c	2'-deóxi-citidina-5'-fosfato, citidina-5'-fosfato
G, g	2'-deóxi-guanosina-5'-fosfato, guanosina-5'-fosfato
T, t	2'-deóxi-timidina-5'-fosfato, timidina-5'-fosfato
U, u	2'-deóxi-uridina-5'-fosfato, uridina-5'-fosfato
N, n	qualquer 2'-deóxi-nucleotídeo/nucleotídeo (G, A, C, ou T, g, a, c ou u)
Am	2'-O-metiladenosina-5'-fosfato
Cm	2'-O-metilcitidina-5'-fosfato
Gm	2'-O-metilguanosina-5'-fosfato

Abreviação	Nucleotídeo(s)
Tm	2'-O-metil-timidina-5'-fosfato
Um	2'-O-metiluridina-5'-fosfato
Af	2'-flúor-2'-deóxi-adenosina-5'-fosfato
Cf	2'-flúor-2'-deóxi-citidina-5'-fosfato
Gf	2'-flúor-2'-deóxi-guanosina-5'-fosfato
Tf	2'-flúor-2'-deóxi-timidina-5'-fosfato
Uf	2'-flúor-2'-deóxi-uridina-5'-fosfato
<u>A</u> , <u>C</u> , <u>G</u> , <u>T</u> , <u>U</u> , <u>a</u> , <u>c</u> , <u>g</u> , <u>t</u> , <u>u</u>	sublinhado: nucleosídeo-5'-fosforotioato
<u>am</u> , <u>cm</u> , <u>gm</u> , <u>tm</u> , <u>um</u>	sublinhado: 2-O-metil-nucleosídeo-5'-fosforotioato

<sup>a</sup> Letras maiúsculas representam 2'-deoxirribonucleotídeos (DNA), letras minúsculas representam ribonucleotídeos (RNA)

#### VETORES DE EXPRESSÃO DE DSRNA

Em outro aspecto da invenção, moléculas de dsRNA específicas para Aha1 que modulam a atividade de expressão do gene Aha1 são expressadas das unidades de transcrição inseridas nos vetores de DNA ou RNA (vide, por exemplo, Couture, A, et al., *TIG.* (1996), 12:5-10; Skillern, A., et al., Publicação Internacional do PCT No. WO 00/22113, Conrad, Publicação Internacional do PCT No. WO 00/22114, e Conrad, Pat. U. S. No. 6.054.299). Estes transgenes podem ser introduzidos como uma construção linear, um plasmídeo circular, ou um vetor viral, que podem ser incorporados e herdados como um transgene integrado no genoma hospedeiro. O transgene pode também ser construído para permití-lo ser herdado como um plasmídeo extracromossômico (Gassmann, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1995) 92:1292).

Os filamentos individuais de um dsRNA podem ser transcritos por promotores em dois vetores de expressão separados e podem ser co-transfeccionados em uma célula alvo. Alternativamente cada filamento individual do dsRNA pode ser transcrito por promotores ambos destes estão

localizados no mesmo plasmídeo de expressão. Em uma modalidade preferida, um dsRNA é expressado como uma repetição invertida unida por uma sequência de polinucleotídeo de ligador de modo que o dsRNA tem uma estrutura tronco e de alça.

- 5 Os vetores de expressão de dsRNA recombinante são em geral plasmídeos de DNA ou vetores virais. dsRNA que expressam vetores virais podem ser construídos com base em, mas não-limitado a, adenovírus associado (para uma revisão, vide Muzyczka, et al., *Curr. Topics Micro. Immunol.* (1992) 158:97-129)); adenovírus (vide, por exemplo, Berkner, et al., BioTechniques (1998) 6:616), Rosenfeld et al. (1991, *Science* 252:431-434), e Rosenfeld et al. (1992, *Cell* 68:143-155)); ou alfavírus como também outros conhecidos na técnica. Retrovírus foram usados para introduzir uma variedade de genes em muitos tipos de células diferentes, incluindo células epiteliais, *in vitro* e/ou *in vivo* (vide, por exemplo, Eglitis, et al., *Science* (1985) 15 230:1395-1398; Danos e Mulligan, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1998) 85:6460-6464; Wilson et al., 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:3014-3018; Armentano et al., 1990, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:61416145; Huber et al., 1991, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:8039-8043; Ferry et al., 1991, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:8377-8381; Chowdhury et al., 1991, *Science* 20 254:1802-1805; van Beusechem. et al., 1992, *Proc. Nad. Acad. Sci. USA* 89:7640-19 ; Kay et al., 1992, *Human Gene Therapy* 3:641-647; Dai et al., 1992, *Proc. Natl.Acad. Sci. USA* 89:10892-10895; Hwu et al., 1993, *J. Immunol.* 150:4104-4115; patente U. S. No. 4.868.116; patente U. S. No. 4.980.286; Pedido de Patente do PCT WO 89/07136; Pedido de Patente do 25 PCT WO 89/02468; Pedido de Patente do PCT WO 89/05345; e Pedido de Patente do PCT WO 92/07573). Vetores retrovirais recombinantes capazes de transduzir e expressar genes inseridos no genoma de uma célula podem ser produzidos transfeccionando o genoma retroviral recombinante em linhagens celulares de embalagem adequadas tais como PA317 e Psi-CRIP 30 (Comette et al., 1991, *Human Gene Therapy* 2:5-10; Cone et al., 1984, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6349). Vetores adenovirais recombinantes podem ser usados para infetar uma ampla variedade de células e tecidos em hos-

pedeiros suscetíveis (por exemplo, rato, hamster, cachorro, e chimpanzé) (Hsu et al., 1992, *J., Infectious Disease*, 166:769), e também têm a vantagem de não requerer células mitoticamente ativas para infecção.

O promotor dirigindo a expressão de dsRNA ou em um plasmídeo de DNA ou vetor viral da invenção pode ser uma RNA polimerase euca-riótica I (por exemplo promotor de RNA ribossômico), RNA II polimerase (por exemplo promotor prematuro do CMV ou promotor da actina ou promotor de snRNA de U1) ou em geral promotor de RNA polimerase III (por exemplo promotor de RNA de SnRNA de U6 ou de 7SK) ou um promotor procariótico, por exemplo, o promotor T7, contanto que o plasmídeo de expressão também codifique T7 RNA polimerase requerida para transcrição de um promotor T7. O promotor pode também dirigir a expressão do transgene para o pâncreas (vide, por exemplo sequência reguladora de insulina para o pâncreas (Bucchini et al., 1986, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:2511-2515)).

Além disso, a expressão do transgene pode ser precisamente regulada, por exemplo, usando uma sequência reguladora induzível e sistemas de expressão tais como uma sequência reguladora que seja sensível a certos reguladores fisiológicos, por exemplo, níveis de glicose circulante, ou hormônios (Docherty et al., 1994, *FASEB J.*, 8:20-24). Tais sistemas de expressão induzível, adequados para o controle de expressão do transgene em células ou em mamíferos incluem regulação por ecdisona, através de estrogênio, progesterona, tetraciclina, indutores químicos de dimerização, e isopropil-beta-D1-tiogalactopiranósideo (EPTG). Uma pessoa versada na técnica poderia selecionar a sequência reguladora/promotora apropriada com base no uso intencionado do transgene de dsRNA.

Em geral, vetores recombinantes capazes de expressar moléculas de dsRNA são liberados como descrito abaixo, e persistem em células alvos. Alternativamente, vetores virais podem ser usados que fornecem expressão transitória das moléculas de dsRNA. Tais vetores podem ser administrados repetidamente quando necessário. Uma vez expressos, os dsRNAs ligam ao RNA alvo e modulam sua função ou expressão. Liberação dos vetores de expressão de dsRNA pode ser sistêmica, tal como por adminis-

tração intravenosa ou intramuscular, por administração às células alvos explantadas do paciente seguidas por reintrodução no paciente ou por quaisquer outros meios que permitam introdução em uma célula alvo desejada.

plasmídeos de DNA de expressão de dsRNA são tipicamente transfeccionados em células alvas como um complexo com veículos de lipídios catiônicos (por exemplo Oligofectamina) ou veículos baseados de lipídios não-catiônicos (por exemplo Transit-TKO™). Transfecções de lipídios múltiplas para choques mediados por dsRNA que alvejam regiões diferentes de um gene de Aha1 simples ou genes de Aha1 múltiplos em um período de uma semana ou mais são também contempladas pela invenção. Introdução com sucesso dos vetores da invenção em células hospedeiras pode ser monitorada usando vários métodos conhecidos. Por exemplo, transfecção transiente pode ser sinalizada com repórter, tal como um marcador fluorescente, tal como Proteína Fluorescente Verde (GFP). Transfecção estável de células ex vivo pode ser assegurada usando marcadores que provêem a célula transfeccionada com resistência aos fatores ambientais específicos (por exemplo, antibióticos e fármacos), tais como resistência à higromicina B.

As moléculas de dsRNA específicas para Aha1 podem também ser inseridas nos vetores e usadas como vetores de terapia de gene para pacientes humanos. Vetores de terapia de gene podem ser liberados a um sujeito, por exemplo, por injeção intravenosa, administração local (vide patente U. S. 5.328.470) ou através de injeção estereotática (vide por exemplo, Chen et al. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:3054-3057). A preparação farmacêutica do vetor de terapia de gene pode incluir o vetor de terapia de gene em um diluente aceitável, ou pode compreender uma matriz de liberação lenta no qual o veículo de liberação de gene está embutido. Alternativamente, onde o vetor de liberação de gene completo pode ser produzido intacto das células recombinantes, por exemplo, vetores retrovirais, a preparação farmacêutica pode incluir uma ou mais células que produzem o sistema de liberação de gene.

## VARREDURA DE DOSE ÚNICA EM CÉLULAS Hela E MLE 12

Células HeLa foram obtidas da American Type Culture Collection (Rockville, MD, cat. No. HB-8065) e cultivadas em F12 de Ham's (Biochrom AG, Berlim, Alemanha, cat. No. FG0815) suplementado para conter

- 5 10% de soro de bezerro fetal (FCS) (Biochrom AG, Berlim, Alemanha, cat. No. S0115), Penicilina 100 U/ml, Estreptomicina 100 µg/ml (Biochrom AG, Berlim, Alemanha, cat. No. A2213) a 37°C em uma atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub> em uma incubadora umedecida (Heraeus HERAcell, Kendro Laboratory Products, Langenselbold, Alemanha).

10 Células de MLE 12 foram obtidas da American Type Culture Collection (Rockville, MD, cat. No. CRL-2110) e cultivadas em Meio de HITES (mistura 1:1 de MEM de Dulbecco (Biochrom AG, Berlim, Alemanha, cat. No: F0435) + F12 de Ham (Biochrom AG, Berlim, Alemanha, cat. No: FG0815)) suplementado para conter 2% de soro de bezerro fetal (FCS) (Bi-

- 15 ochrom AG, Berlim, Alemanha, cat. No. S0115), Penicilina 100 U/ml, Estreptomicina 100 µg/ml (Biochrom AG, Berlim, Alemanha, cat. No. A2213), 4 mM de L-Glutamina (Biochrom AG, Berlim, Alemanha, cat. No: K0282), 1 x Insulina/Transferrina/Na-Selenita (Gibco: 51500-056), 10 nM de Hidrocortisona (Sigma Munique, Alemanha, cat. No: H6909), 10 nM de β-Estradiol (Sigma

20 Munique, Alemanha, cat. No: E2257), e 10 mM de HEPES (USB Europe GmbH, Staufen, Alemanha, cat. No.: 16926) a 37°C em uma atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub> em uma incubadora umedecida (Heraeus HERAcell, Kendro Laboratory Products, Langenselbold, Alemanha).

## TRANSFECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE mRNA

25 Células HeLa e MLE12 foram semeadas a uma densidade de 2,0 × 10<sup>4</sup> células/célula em placas de 96 cavidades para transfecção com siRNA, e transfeccionadas diretamente. Transfecção de siRNA (30 nM) foi realizada com lipofectamina 2000 (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Alemanha, cat. No. 11668-019) como descrita pelo fabricante. 24 horas após transfec-

- 30 ção, as células foram lisadas e os níveis de mRNA de Aha1 foram quantificados com o kit Quantigene Explore (Genospectra, Dumbarton Circle Fremont, USA, cat. No. QG-000-02) de acordo com o protocolo do fabricante.

Níveis de mRNA de Aha1 foram normalizados para mRNA de GAPDH. As leituras foram obtidas em quadruplicações para cada siRNA. Dúplices de siRNA não relacionados para o gene de Aha1 foram usados como controle. A atividade de um duplex de siRNA específico para Aha1 dado foi expressada como por cento da concentração de mRNA de Aha1 em células tratadas com relação à concentração de mRNA de Aha1 em células tratadas com o duplex de siRNA de controle.

TABELA 4: SEQUÊNCIAS DE SONDA USADAS COM O KIT DE QUANTIGENE EXPLORE (GENOSPECTRA) NA QUANTIFICAÇÃO DE

AHA1 DE Homo Sapiens (HS)

Nome de FPL	Função	Sequência
hsAha1 001	CE	GATGTAATTCCCATTGCTTCTCTTTTC TCTGGAAAGAAAGT
hsAha1 002	CE	TGAACCTCTGTTT- GAGGGTGCTTTCTCTGGAAAGAA- AGT
hsAha1 003	CE	GGGTCTACTGACTCTCCATTCAATTGTTTT CTCTGGAAAGAAAGT
hsAha1 004	CE	CCTTGCCTCCT- CAGTTTCTTTCTCTGGAAAGAAAGT
hsAha1 005	CE	GGTTTTGAAGGAGCAGGCTTAGTTTC TCTGGAAAGAAAGT
hsAha1 006	LE	ACGCTTTTCACTCAGACAAATTTCAG GCATAGGACCCGTGTCT
hsAha1 007	LE	GCTCACACTAATCTCCACTTCATCCTTTT AGGCATAGGACCCGTGTCT
hsAha1 008	LE	TCATTAAGGCCACGAGATTGTTTTAGG CATAGGACCCGTGTCT
hsAha1 009	LE	TAGGTAAGATCATGCCCTGGGTTTTAGG CATAGGACCCGTGTCT
hsAha1 010	LE	ACTCCAACAGGTCTGGCCTGTTTTAGGC ATAGGACCCGTGTCT
hsAha1 011	BL	GTCAGGCTCATTTGGCAAG
hsAha1 012	BL	TAGAAGTTCACCCCTTCTTCCT
hsAha1 013	BL	AGTGCTGGCTCCCCACT

TABELA 5: SEQUÊNCIAS DE SONDA USADAS COM KIT DE

QUANTIGENE EXPLORE (GENOSPECTRA) NA QUANTIFICAÇÃO DE  
AHA1 DE Mus Musculus (mm)

Nome de FPL	Função	Sequência
mmAhsa 1001	CE	CTCGAACGGCCAGGAA- CATTTCCTCTGGAAAGAAAGT
mmAhsa 1002	CE	GCACTTGCCCTCTCATTTCATTTC TCTGGAAAGAAAGT
mmAhsa 1003	CE	TTGATGGATGCCTCCC- CATTTCCTCTGGAAAGAAAGT
mmAhsa 1004	CE	AACTCTGTCTTGAGGGTGCTGATTTT CTCTGGAAAGAAAGT
	CE	TTTGGCCTGGCTTTGA- ATTTTCCTCTGGAAAGAAAGT
	LE	CAAGCTTGTTCACTCGGTCACCTCTTT TAGGCATAGGACCCGTGTCT
	LE	CCTGACTTAGAGGTACCTGTCCAGTTT TTTAGGCATAGGACCCGTGTCT
	LE	GATTCACATGTCCTTGTACTGCACTT TTTAGGCATAGGACCCGTGTCT
	LE	ATTTCATCAGACAAATTGGGTTTTAGG CATAGGACCCGTGTCT
	LE	TAATCTCCACTTCATCCACGCTTTTAG GCATAGGACCCGTGTCT
	LE	TTTCACCCCGTCTCCTTCATTTCAGGC ATAGGACCCGTGTCT
	LE	ACTGTGGGCAAGATCATGCCCTGAGTAT TTTAGGCATAGGACCCGTGTCT
	BL	AAGATAAGTTGCCTTCCTGTTG
	BL	CAGTTGATGGTCCACTCATAGAAG
	BL	CATCTTGGCAAGGCTCACAC
	BL	TTAAGGCCACGAGATTGTGTCAGGCT
	BL	GTAAATTCCCCTGCTCTCAGAAG
	BL	CACTGGATCTACTGACTCTCCATTTC

Nome de FPL	Função	Sequência
	BL	CTCAGTCTTAGTGCTGGCTGGCC
	BL	GGAGCAGACTTAGCCTTGCAAGT

#### CURVA DE DOSE-RESPOSTA EM CÉLULAS HeLa

Transfecção e quantificação de mRNA: Para transfecção com siRNA, as células HeLa foram semeadas a uma densidade de  $2,0 \times 10^4$  células/cavidade em placas de 96 cavidades e transfeccionadas diretamente.

- 5 Transfecção de siRNA foi realizada com lipofectamina 2000 (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Alemanha, cat. No. 11668-019) como descrito pelo fabricante. siRNAs foram concentrados de 30 nM em diluições de 3 vezes para 14 pM. 24 horas após transfecção, as células HeLa foram lisadas e os níveis de mRNA de Aha1 foram quantificados com o kit Quantigene Explore (Genospectra, Dumbarton Circle Fremont, USA, cat. No. QG-000-02) de acordo com o protocolo. Níveis de mRNA de Aha1 foram normalizados para mRNA de GAP-DH. Para cada siRNA, quatro pontos de dados individuais foram colhidos. Dúplices de siRNA não relacionados ao gene de Aha1 foram usados como controle. A atividade de um duplex de siRNA específico para Aha1 dado foi expressada como por cento de concentração de mRNA de Aha1 em células tratadas com relação à concentração de mRNA de Aha1 em células tratadas com o duplex de siRNA de controle. Ajuste XL foi usado para calcular os valores de IC<sub>50</sub>.
- 10
- 15
- 20

Tabela 6 fornece valores para inibição da expressão de Aha1 usando várias moléculas de dsRNA da invenção.

TABELA 6: mRNA De Aha1 RESIDUAL EM % DE CONTROLE EM CÉLULAS HeLa E MLE12 TRATADAS COM SOLUÇÕES DE 30 nM DE VÁRIOS AGENTES DE RNAi ESPECÍFICOS PARA Aha1, E IC<sub>50</sub> PARA AGENTES DE RNAi SELECIONADOS DETERMINADOS EM CÉLULAS

25 HeLa

Identificador de dúplex	Células HeLa, mRNA residual [%]	IC <sub>50</sub> em células HeLa [nM]	Células MLE12, mRNA residual [%]
AL-DP-7299	19 ± 3		105 ± 17
AL-DP-7300	7 ± 2		94 ± 13
AL-DP-7301	3 ± 1	0,035	14 ± 3
AL-DP-7302	17 ± 5		61 ± 16
AL-DP-7303	5 ± 2		23 ± 5
AL-DP-7304	7 ± 3		30 ± 7
AL-DP-7305	6 ± 2		26 ± 6
AL-DP-7306	27 ± 8		45 ± 11
AL-DP-7307	16 ± 6	1,1	27 ± 8
AL-DP-7308	13 ± 5	0,21	20 ± 7
AL-DP-7309	10 ± 3	0,36	22 ± 8
AL-DP-7310	51 ± 13		59 ± 13
AL-DP-7311	4 ± 3	0,07	16 ± 4
AL-DP-7312	14 ± 3		40 ± 8
AL-DP-7313	63 ± 14		80 ± 10
AL-DP-7314	97 ± 21		88 ± 10
AL-DP-7315	76 ± 24		77 ± 10
AL-DP-7316	7 ± 2	0,34	23 ± 6
AL-DP-7317	11 ± 3		44 ± 12
AL-DP-7318	4 ± 2	0,29	16 ± 3
AL-DP-7319	38 ± 7		73 ± 21
AL-DP-7320	16 ± 4	0,07	15 ± 5
AL-DP-7321	130 ± 36		81 ± 16
AL-DP-7322	4 ± 2	0,045	10 ± 3
AL-DP-7323	24 ± 6		55 ± 11
AL-DP-7324	3 ± 2	0,089	12 ± 4
AL-DP-7325	5 ± 2	0,3	12 ± 4
AL-DP-7326	3 ± 1	0,27	19 ± 7
AL-DP-7327	3 ± 1	0,08	13 ± 7
AL-DP-7328	49 ± 14		67 ± 10
AL-DP-7329	6 ± 2	0,2	18 ± 5

Identificador de dúplex	Células HeLa, mRNA residual [%]	IC <sub>50</sub> em células HeLa [nM]	Células MLE12, mRNA residual [%]
AL-DP-7330	64 ± 19		78 ± 10
AL-DP-7331	5 ± 2	0,55	13 ± 5
AL-DP-7332	95 ± 20		82 ± 15
AL-DP-7333	2 ± 1	0,27	9 ± 3
AL-DP-7334	94 ± 17		83 ± 19
AL-DP-7335	11 ± 5		57 ± 11
AL-DP-7336	22 ± 4		63 ± 12
AL-DP-7337	6 ± 2	0,29	20 ± 5
AL-DP-7338	39 ± 6		56 ± 10
AL-DP-7339	10 ± 1		35 ± 6
AL-DP-7340	8 ± 2	0,61	19 ± 6
AL-DP-7341	17 ± 4		55 ± 16
AL-DP-7342	6 ± 4	0,5	15 ± 3
AL-DP-7343	26 ± 4		103 ± 19
AL-DP-7344	5 ± 2		38 ± 11
AL-DP-7345	53 ± 22		63 ± 15
AL-DP-7346	22 ± 4		44 ± 11
AL-DP-9250	4 ± 1		
AL-DP-9251	51 ± 9		
AL-DP-9252	19 ± 2		
AL-DP-9253	11 ± 1		
AL-DP-9254	7 ± 1		
AL-DP-9255	5 ± 0		
AL-DP-9256	5 ± 0		
AL-DP-9257	7 ± 0		
AL-DP-9258	9 ± 1		
AL-DP-9259	7 ± 1		
AL-DP-9260	15 ± 3		
AL-DP-9261	21 ± 2		
AL-DP-9262	24 ± 4		
AL-DP-9263	25 ± 6		
AL-DP-9264	7 ± 2		

Identificador de dúplex	Células HeLa, mRNA residual [%]	IC <sub>50</sub> em células HeLa [nM]	Células MLE12, mRNA residual [%]
AL-DP-9265	8 ± 1		
AL-DP-9266	11 ± 2		
AL-DP-9267	45 ± 4		
AL-DP-9268	9 ± 1		
AL-DP-9269	5 ± 1		
AL-DP-9270	6 ± 1		
AL-DP-9271	6 ± 2		
AL-DP-9272	26 ± 8		
AL-DP-9273	11 ± 1		
AL-DP-9274	7 ± 1		
AL-DP-9275	8 ± 1		
AL-DP-9276	4 ± 1		
AL-DP-9277	10 ± 1		
AL-DP-9278	2 ± 0		
AL-DP-9279	3 ± 0		
AL-DP-9280	12 ± 1		
AL-DP-9281	8 ± 2		
AL-DP-9282	3 ± 0		
AL-DP-9283	6 ± 1		
AL-DP-9284	39 ± 2		
AL-DP-9285	4 ± 1		
AL-DP-9286	61 ± 11		
AL-DP-9287	3 ± 1		
AL-DP-9288	27 ± 5		
AL-DP-9289	6 ± 1		

Em resumo, AL-DP-7301, AL-DP-7308, AL-DP-7318, AL-DP-7320, AL-DP-7322, AL-DP-7324, AL-DP-7325, AL-DP-7326, AL-DP-7327, AL-DP-7329, AL-DP-7331, AL-DP-7333, AL-DP-7340, e AL-DP-7342 inibiram expressão de Aha1 em pelo menos 80% em células HeLa e MLE12, 5 AL-DP-7303, AL-DP-7305, AL-DP-7307, AL-DP-7309, AL-DP-7316, e AL-DP-7337 inibiram expressão de Aha1 em pelo menos 80% em células HeLa

e em pelo menos 70% em células MLE12, AL-DP-7304, AL-DP-7312, AL-DP-7339, e AL-DP-7344 inibiram expressão de Aha1 em pelo menos 80% em células HeLa e em pelo menos 60% em células MLE12, AL-DP-7306, AL-DP-7317, e AL-DP-7346 inibiram expressão de Aha1 em pelo menos 5 70% em células HeLa e em pelo menos 50% em células MLE12, AL-DP-7310, AL-DP-7323, AL-DP-7335, AL-DP-7338, e AL-DP-7341 inibiram expressão de Aha1 em pelo menos 40% em células HeLa e MLE12, e AL-DP-7302, AL-DP-7315, AL-DP-7328, AL-DP-7330, AL-DP-7336, e AL-DP-7345 inibiram expressão de Aha1 em pelo menos 20% em células HeLa e MLE12.

10 Além disso, AL-DP-9250, AL-DP-9252, AL-DP-9253, AL-DP-9254, AL-DP-9255, AL-DP-9256, AL-DP-9257, AL-DP-9258, AL-DP-9259, AL-DP-9260, AL-DP-9264, AL-DP-9265, AL-DP-9266, AL-DP-9268, AL-DP-9269, AL-DP-9270, AL-DP-9271, AL-DP-9273, AL-DP-9274, AL-DP-9275, AL-DP-9276, AL-DP-9277, AL-DP-9279, AL-DP-9280, AL-DP-9281, AL-DP-15 9282, AL-DP-9283, AL-DP-9285, AL-DP-9287, e AL-DP-9289 inibiram expressão de Aha1 em pelo menos 80% em células HeLa, AL-DP-9261, AL-DP-9262, AL-DP-9263, AL-DP-9272, e AL-DP-9288 inibiram expressão de Aha1 em pelo menos 70% em células HeLa, AL-DP-9263 inibiu expressão de Aha1 em pelo menos 60% em células HeLa, AL-DP-9267 inibiu expressão de Aha1 em pelo menos 50% em células HeLa, AL-DP-9251 inibiu expressão de Aha1 em pelo menos 40% em células HeLa, e AL-DP-9286 inibiu expressão de Aha1 em pelo menos 30% em células HeLa.

## Listagem de sequência

<110> Alnylam Pharmaceuticals, Inc.

<120> MODULAÇÃO DE RNAi DE AHA E USOS TERAPÊUTICOS DO MESMO

<130> 14174-132W01

<140> PCT/US07/69229

<141> 2007-05-18

<150> US 60/801.840

<151> 2006-05-19

<160> 217

<210> 1

<211> 21

<212> DNA

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Agentes de RNAi para infrarregulação de Aha 1

<220>

<223> ácido nucléico 5'-terminal é um nucleosídeo, isto é, base + açúcar mas carecendo de 5'-fosfato

<220>

<221> base\_modificada

<222> 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19

<223> /base-mod = "base correspondente de 2'-O-metila"

<400> 1  
auugguccac ggauaagcut t 21

<210> 2

<211> 21

<212> DNA

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Agentes de RNAi para infrarregulação de Aha 1

<220>

<223> ácido nucléico 5'-terminal é um nucleosídeo, isto é, base + açúcar mas carecendo de 5'-fosfato

<220>

<221> base\_modificada

<222> 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19

<223> /base-mod = "base correspondente de 2'-O-metila"

<400> 2  
agcuuauccg uggaccaaut t 21

<210> 3

<211> 21 ..

<212> DNA

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Agentes de RNAi para infrarregulação de Aha 1

```

<220>
<223> ácido nucléico 5'-terminal é um nucleosídeo, isto é, base + açúcar mas
carecendo de 5'-fosfato

<220>
<221> base_modificada
<222> 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19
<223> /base-mod = "base correspondente de 2'-O-metila"

<400> 3
gugaguaagc uugauggagt t      21

<210> 4
<211> 21
<212> DNA
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Agentes de RNAi para infrarregulação de Aha 1

<220>
<223> ácido nucléico 5'-terminal é um nucleosídeo, isto é, base + açúcar mas
carecendo de 5'-fosfato

<220>
<221> base_modificada
<222> 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19
<223> /base-mod = "base correspondente de 2'-O-metila"

<400> 4
cuccaucaag cuuacucact t      21

<210> 5
<211> 21
<212> DNA
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Agentes de RNAi para infrarregulação de Aha 1

<220>
<223> ácido nucléico 5'-terminal é um nucleosídeo, isto é, base + açúcar mas
carecendo de 5'-fosfato

<220>
<221> base_modificada
<222> 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19
<223> /base-mod = "base correspondente de 2'-O-metila"

<400> 5
agucaaaauc cccacuugut t      21

<210> 6
<211> 21
<212> DNA
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Agentes de RNAi para infrarregulação de Aha 1

<220>
<223> ácido nucléico 5'-terminal é um nucleosídeo, isto é, base + açúcar mas
carecendo de 5'-fosfato

```

```

<220>
<221>  base_modificada
<222>  1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19
<223>  /base-mod = "base correspondente de 2'-O-metila"

<400>  6
acaagugggg auuuugacut t      21

<210>  7
<211>  21
<212>  DNA
<213>  Sequência artificial

<220>
<223>  ácido nucléico 5'-terminal é um nucleosídeo, isto é, base + açúcar mas
carecendo de 5'-fosfato

<220>
<221>  base_modificada
<222>  1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19
<223>  /base-mod = "base correspondente de 2'-O-metila"

<400>  7
aaaucucgug gccuuuaugt t      21

<210>  8
<211>  21
<212>  DNA
<213>  Sequência artificial

<220>
<223>  Agentes de RNAi para infrarregulação de Aha 1

<220>
<223>  ácido nucléico 5'-terminal é um nucleosídeo, isto é, base + açúcar mas
carecendo de 5'-fosfato

<220>
<221>  base_modificada
<222>  1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19
<223>  /base-mod = "base correspondente de 2'-O-metila"

<400>  8
cauuuaggcc acgagauuut t      21

<210>  9
<211>  21
<212>  DNA
<213>  Sequência artificial

<220>
<223>  Agentes de RNAi para infrarregulação de Aha 1

<220>
<223>  ácido nucléico 5'-terminal é um nucleosídeo, isto é, base + açúcar mas
carecendo de 5'-fosfato

<220>
<221>  base_modificada
<222>  1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19
<223>  /base-mod = "base correspondente de 2'-O-metila"

```

```

<400> 9
gagauuagug ugagccuugt t      21

<210> 10
<211> 21
<212> DNA
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Agentes de RNAi para infrarregulação de Aha 1

<220>
<223> ácido nucléico 5'-terminal é um nucleosídeo, isto é, base + açúcar mas
carecendo de 5'-fosfato

<220>
<221> base_modificada
<222> 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19
<223> /base-mod = "base correspondente de 2'-O-metila"

<400> 10
caaggcucac acuaaucuct t      21

<210> 11
<211> 21
<212> DNA
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Agentes de RNAi para infrarregulação de Aha 1

<220>
<223> ácido nucléico 5'-terminal é um nucleosídeo, isto é, base + açúcar mas
carecendo de 5'-fosfato

<220>
<221> base_modificada
<222> 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19
<223> /base-mod = "base correspondente de 2'-O-metila"

<400> 11
aaucucgugg ccuuaaugat t      21

<210> 12
<211> 21
<212> DNA
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Agentes de RNAi para infrarregulação de Aha 1

<220>
<223> ácido nucléico 5'-terminal é um nucleosídeo, isto é, base + açúcar mas
carecendo de 5'-fosfato

<220>
<221> base_modificada
<222> 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19
<223> /base-mod = "base correspondente de 2'-O-metila"

<400> 12
ucauuaaggc cacgagauut t      21

```

```

<210> 13
<211> 21
<212> DNA
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Agentes de RNAi para infrarregulação de Aha 1

<220>
<223> ácido nucléico 5'-terminal é um nucleosídeo, isto é, base + açúcar mas
carecendo de 5'-fosfato

<220>
<221> base_modificada
<222> 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19
<223> /base-mod = "base correspondente de 2'-O-metila"

<400> 13
agauuagugu gagccuugct t      21

<210> 14
<211> 21
<212> DNA
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Agentes de RNAi para infrarregulação de Aha 1

<220>
<223> ácido nucléico 5'-terminal é um nucleosídeo, isto é, base + açúcar mas
carecendo de 5'-fosfato

<220>
<221> base_modificada
<222> 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19
<223> /base-mod = "base correspondente de 2'-O-metila"

<400> 14
gcaaggcuca cacuaaucut t      21

<210> 15
<211> 21
<212> DNA
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Agentes de RNAi para infrarregulação de Aha 1

<220>
<223> ácido nucléico 5'-terminal é um nucleosídeo, isto é, base + açúcar mas
carecendo de 5'-fosfato

<220>
<221> base_modificada
<222> 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19
<223> /base-mod = "base correspondente de 2'-O-metila"

<400> 15
cgggcggacg ccacccaacgt t      21

<210> 16
<211> 21

```

```

<212>  DNA
<213>  Sequência artificial

<220>
<223>  Agentes de RNAi para infrarregulação de Aha 1

<220>
<223>  ácido nucléico 5'-terminal é um nucleosídeo, isto é, base + açúcar mas
carecendo de 5'-fosfato

<220>
<221>  base_modificada
<222>  1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19
<223>  /base-mod = "base correspondente de 2'-O-metila"

<400>  16
cguugguggc guccggccgt t      21

<210>  17
<211>  21
<212>  DNA
<213>  Sequência artificial

<220>
<223>  Agentes de RNAi para infrarregulação de Aha 1

<220>
<223>  ácido nucléico 5'-terminal é um nucleosídeo, isto é, base + açúcar mas
carecendo de 5'-fosfato

<220>
<221>  base_modificada
<222>  1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19
<223>  /base-mod = "base correspondente de 2'-O-metila"

<400>  17
ggcggacgcc accaacguct t      21

<210>  18
<211>  21
<212>  DNA
<213>  Sequência artificial

<220>
<223>  Agentes de RNAi para infrarregulação de Aha 1

<220>
<223>  ácido nucléico 5'-terminal é um nucleosídeo, isto é, base + açúcar mas
carecendo de 5'-fosfato

<220>
<221>  base_modificada
<222>  1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19
<223>  /base-mod = "base correspondente de 2'-O-metila"

<400>  18
gacguuggug gcguccgcct t      21

<210>  19
<211>  21
<212>  DNA
<213>  Sequência artificial

<220>

```

```

<223> Agentes de RNAi para infrarregulação de Aha 1

<220>
<223> ácido nucléico 5'-terminal é um nucleosídeo, isto é, base + açúcar mas
carecendo de 5'-fosfato

<220>
<221> base_modificada
<222> 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19
<223> /base-mod = "base correspondente de 2'-O-metila"

<400> 19
gggcggacgc caccaacgut t      21

<210> 20
<211> 21
<212> DNA
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Agentes de RNAi para infrarregulação de Aha 1

<220>
<223> ácido nucléico 5'-terminal é um nucleosídeo, isto é, base + açúcar mas
carecendo de 5'-fosfato

<220>
<221> base_modificada
<222> 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19
<223> /base-mod = "base correspondente de 2'-O-metila"

<400> 20
acguuggugg cguccggccct t      21

<210> 21
<211> 21
<212> DNA
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Agentes de RNAi para infrarregulação de Aha 1

<220>
<223> ácido nucléico 5'-terminal é um nucleosídeo, isto é, base + açúcar mas
carecendo de 5'-fosfato

<220>
<221> base_modificada
<222> 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19
<223> /base-mod = "base correspondente de 2'-O-metila"

<400> 21
caacguaca aacuggcact t      21

<210> 22
<211> 21
<212> DNA
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Agentes de RNAi para infrarregulação de Aha 1

<220>

```

```

<223> ácido nucléico 5'-terminal é um nucleosídeo, isto é, base + açúcar mas
carecendo de 5'-fosfato

<220>
<221> base_modificada
<222> 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19
<223> /base-mod = "base correspondente de 2'-O-metila"

<400> 22
gugccaguug uugacguugt t      21

<210> 23
<211> 21
<212> DNA
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Agentes de RNAi para infrarregulação de Aha 1

<220>
<223> ácido nucléico 5'-terminal é um nucleosídeo, isto é, base + açúcar mas
carecendo de 5'-fosfato

<220>
<221> base_modificada
<222> 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19
<223> /base-mod = "base correspondente de 2'-O-metila"

<400> 23
gcgggcggac gccaccaact t      21

<210> 24
<211> 21
<212> DNA
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Agentes de RNAi para infrarregulação de Aha 1

<220>
<223> ácido nucléico 5'-terminal é um nucleosídeo, isto é, base + açúcar mas
carecendo de 5'-fosfato

<220>
<221> base_modificada
<222> 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19
<223> /base-mod = "base correspondente de 2'-O-metila"

<400> 24
guugguggcg uccgccccgct t      21

<210> 25
<211> 21
<212> DNA
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Agentes de RNAi para infrarregulação de Aha 1

<220>
<223> ácido nucléico 5'-terminal é um nucleosídeo, isto é, base + açúcar mas
carecendo de 5'-fosfato

<220>

```

```

<221> base_modificada
<222> 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19
<223> /base-mod = "base correspondente de 2'-O-metila"

<400> 25
aucucguggc cuuaaugaat t      21

<210> 26
<211> 21
<212> DNA
<213> Sequência artificial

<220>
<223> ácido nucléico 5'-terminal é um nucleosídeo, isto é, base + açúcar mas
carecendo de 5'-fosfato

<220>
<221> base_modificada
<222> 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19
<223> /base-mod = "base correspondente de 2'-O-metila"

<400> 26
uucauuuaagg ccacgagaut t      21

<210> 27
<211> 21
<212> DNA
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Agentes de RNAi para infrarregulação de Aha 1

<220>
<223> ácido nucléico 5'-terminal é um nucleosídeo, isto é, base + açúcar mas
carecendo de 5'-fosfato

<220>
<221> base_modificada
<222> 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19
<223> /base-mod = "base correspondente de 2'-O-metila"

<400> 27
acguacaaca cuggcacugt t      21

<210> 28
<211> 21
<212> DNA
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Agentes de RNAi para infrarregulação de Aha 1

<220>
<223> ácido nucléico 5'-terminal é um nucleosídeo, isto é, base + açúcar mas
carecendo de 5'-fosfato

<220>
<221> base_modificada
<222> 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19
<223> /base-mod = "base correspondente de 2'-O-metila"

```

```

<400> 28
cagugccagu uguugacgut t      21

<210> 29
<211> 21
<212> DNA
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Agentes de RNAi para infrarregulação de Aha 1

<220>
<223> ácido nucléico 5'-terminal é um nucleosídeo, isto é, base + açúcar mas
carecendo de 5'-fosfato

<220>
<221> base_modificada
<222> 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19
<223> /base-mod = "base correspondente de 2'-O-metila"

<400> 29
accaacguca acaacuggct t      21

<210> 30
<211> 21
<212> DNA
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Agentes de RNAi para infrarregulação de Aha 1

<220>
<223> ácido nucléico 5'-terminal é um nucleosídeo, isto é, base + açúcar mas
carecendo de 5'-fosfato

<220>
<221> base_modificada
<222> 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19
<223> /base-mod = "base correspondente de 2'-O-metila"

<400> 30
gccaguuguu gacguugggt t      21

<210> 31
<211> 21
<212> DNA
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Agentes de RNAi para infrarregulação de Aha 1

<220>
<223> ácido nucléico 5'-terminal é um nucleosídeo, isto é, base + açúcar mas
carecendo de 5'-fosfato

<220>
<221> base_modificada
<222> 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19
<223> /base-mod = "base correspondente de 2'-O-metila"

<400> 31
acgcuggauc guggaggagt t      21

```

```

<210> 32
<211> 21
<212> DNA
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Agentes de RNAi para infrarregulação de Aha 1

<220>
<223> ácido nucléico 5'-terminal é um nucleosídeo, isto é, base + açúcar mas
carecendo de 5'-fosfato

<220>
<221> base_modificada
<222> 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19
<223> /base-mod = "base correspondente de 2'-O-metila"

<400> 32
cuccuccacg auccagcgut t      21

<210> 33
<211> 21
<212> DNA
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Agentes de RNAi para infrarregulação de Aha 1

<220>
<223> ácido nucléico 5'-terminal é um nucleosídeo, isto é, base + açúcar mas
carecendo de 5'-fosfato

<220>
<221> base_modificada
<222> 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19
<223> /base-mod = "base correspondente de 2'-O-metila"

<400> 33
agacccacgc uggaucgugt t      21

<210> 34
<211> 21
<212> DNA
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Agentes de RNAi para infrarregulação de Aha 1

<220>
<223> ácido nucléico 5'-terminal é um nucleosídeo, isto é, base + açúcar mas
carecendo de 5'-fosfato

<220>
<221> base_modificada
<222> 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19
<223> /base-mod = "base correspondente de 2'-O-metila"

<400> 34
cacgauccag cgugggucut t      21

<210> 35
<211> 21
<212> DNA

```

```

<213> Sequência artificial

<220>
<223> Agentes de RNAi para infrarregulação de Aha 1

<220>
<223> ácido nucléico 5'-terminal é um nucleosídeo, isto é, base + açúcar mas
carecendo de 5'-fosfato

<220>
<221> base_modificada
<222> 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19
<223> /base-mod = "base correspondente de 2'-O-metila"

<400> 35
gacccacgcu ggaucguggt t           21

<210> 36
<211> 21
<212> DNA
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Agentes de RNAi para infrarregulação de Aha 1

<220>
<223> ácido nucléico 5'-terminal é um nucleosídeo, isto é, base + açúcar mas
carecendo de 5'-fosfato

<220>
<221> base_modificada
<222> 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19
<223> /base-mod = "base correspondente de 2'-O-metila"

<400> 36
ccacgaucca gcguggguct t           21

<210> 37
<211> 21
<212> DNA
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Agentes de RNAi para infrarregulação de Aha 1

<220>
<223> ácido nucléico 5'-terminal é um nucleosídeo, isto é, base + açúcar mas
carecendo de 5'-fosfato

<220>
<221> base_modificada
<222> 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19
<223> /base-mod = "base correspondente de 2'-O-metila"

<400> 37
gaauuuacau cagcacccut t           21

<210> 38
<211> 21
<212> DNA
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Agentes de RNAi para infrarregulação de Aha 1

```

```

<220>
<223> ácido nucléico 5'-terminal é um nucleosídeo, isto é, base + açúcar mas
carecendo de 5'-fosfato

<220>
<221> base_modificada
<222> 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19
<223> /base-mod = "base correspondente de 2'-O-metila"

<400> 38
aggugcuga uguauauuct t      21

<210> 39
<211> 21
<212> DNA
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Agentes de RNAi para infrarregulação de Aha 1

<220>
<223> ácido nucléico 5'-terminal é um nucleosídeo, isto é, base + açúcar mas
carecendo de 5'-fosfato

<220>
<221> base_modificada
<222> 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19
<223> /base-mod = "base correspondente de 2'-O-metila"

<400> 39
gggaauuuac aucagcacct t      21

<210> 40
<211> 21
<212> DNA
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Agentes de RNAi para infrarregulação de Aha 1

<220>
<223> ácido nucléico 5'-terminal é um nucleosídeo, isto é, base + açúcar mas
carecendo de 5'-fosfato

<220>
<221> base_modificada
<222> 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19
<223> /base-mod = "base correspondente de 2'-O-metila"

<400> 40
ggugcugaug uaaaauccct t      21

<210> 41
<211> 21
<212> DNA
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Agentes de RNAi para infrarregulação de Aha 1

<220>

```

<223> ácido nucléico 5'-terminal é um nucleosídeo, isto é, base + açúcar mas carecendo de 5'-fosfato

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19  
 <223> /base-mod = "base correspondente de 2'-O-metila"  
 <400> 41  
 ugggaauuuua caucagcact t 21

<210> 42  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Sequência artificial  
 <220>  
 <223> Agentes de RNAi para infrarregulação de Aha 1

<220>  
 <223> ácido nucléico 5'-terminal é um nucleosídeo, isto é, base + açúcar mas carecendo de 5'-fosfato

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19  
 <223> /base-mod = "base correspondente de 2'-O-metila"  
 <400> 42  
 gugcugaugu aaauucccat t 21

<210> 43  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Sequência artificial  
 <220>  
 <223> Agentes de RNAi para infrarregulação de Aha 1

<220>  
 <223> ácido nucléico 5'-terminal é um nucleosídeo, isto é, base + açúcar mas carecendo de 5'-fosfato

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19  
 <223> /base-mod = "base correspondente de 2'-O-metila"  
 <400> 43  
 ccaacgucaa caacuggcat t 21

<210> 44  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Sequência artificial  
 <220>  
 <223> Agentes de RNAi para infrarregulação de Aha 1

<220>  
 <223> ácido nucléico 5'-terminal é um nucleosídeo, isto é, base + açúcar mas carecendo de 5'-fosfato

<220>

```

<221> base_modificada
<222> 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19
<223> /base-mod = "base correspondente de 2'-O-metila"

<400> 44
ugccagugu ugacguuggt t      21

<210> 45
<211> 21
<212> DNA
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Agentes de RNAi para infrarregulação de Aha 1

<220>
<223> ácido nucléico 5'-terminal é um nucleosídeo, isto é, base + açúcar mas
carecendo de 5'-fosfato

<220>
<221> base_modificada
<222> 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19
<223> /base-mod = "base correspondente de 2'-O-metila"

<400> 45
aaguggggug agggagacct t      21

<210> 46
<211> 21
<212> DNA
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Agentes de RNAi para infrarregulação de Aha 1

<220>
<223> ácido nucléico 5'-terminal é um nucleosídeo, isto é, base + açúcar mas
carecendo de 5'-fosfato

<220>
<221> base_modificada
<222> 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19
<223> /base-mod = "base correspondente de 2'-O-metila"

<400> 46
ggucucccuc accccacuut t      21

<210> 47
<211> 21
<212> DNA
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Agentes de RNAi para infrarregulação de Aha 1

<220>
<223> ácido nucléico 5'-terminal é um nucleosídeo, isto é, base + açúcar mas
carecendo de 5'-fosfato

<220>
<221> base_modificada
<222> 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19
<223> /base-mod = "base correspondente de 2'-O-metila"

```

```

<400> 47
acacaaaucu cguggccuut t      21

<210> 48
<211> 21
<212> DNA
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Agentes de RNAi para infrarregulação de Aha 1

<220>
<223> ácido nucléico 5'-terminal é um nucleosídeo, isto é, base + açúcar mas
carecendo de 5'-fosfato

<220>
<221> base_modificada
<222> 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19
<223> /base-mod = "base correspondente de 2'-O-metila"

<400> 48
aaggccacga gauuugugut t      21

<210> 49
<211> 21
<212> DNA
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Agentes de RNAi para infrarregulação de Aha 1

<220>
<223> ácido nucléico 5'-terminal é um nucleosídeo, isto é, base + açúcar mas
carecendo de 5'-fosfato

<220>
<221> base_modificada
<222> 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19
<223> /base-mod = "base correspondente de 2'-O-metila"

<400> 49
acccacgcug gaucguggat t      21

<210> 50
<211> 21
<212> DNA
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Agentes de RNAi para infrarregulação de Aha 1

<220>
<223> ácido nucléico 5'-terminal é um nucleosídeo, isto é, base + açúcar mas
carecendo de 5'-fosfato

<220>
<221> base_modificada
<222> 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19
<223> /base-mod = "base correspondente de 2'-O-metila"

<400> 50
uccacgaucc agcgugggut t      21

```

```

<210> 51
<211> 21
<212> DNA
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Agentes de RNAi para infrarregulação de Aha 1

<220>
<223> ácido nucléico 5'-terminal é um nucleosídeo, isto é, base + açúcar mas
carecendo de 5'-fosfato

<220>
<221> base_modificada
<222> 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19
<223> /base-mod = "base correspondente de 2'-O-metila"

<400> 51
gagucaaaau ccccacuugt t      21

<210> 52
<211> 21
<212> DNA
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Agentes de RNAi para infrarregulação de Aha 1

<220>
<223> ácido nucléico 5'-terminal é um nucleosídeo, isto é, base + açúcar mas
carecendo de 5'-fosfato

<220>
<221> base_modificada
<222> 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19
<223> /base-mod = "base correspondente de 2'-O-metila"

<400> 52
caagugggga uuuugacuct t      21

<210> 53
<211> 21
<212> DNA
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Agentes de RNAi para infrarregulação de Aha 1

<220>
<223> ácido nucléico 5'-terminal é um nucleosídeo, isto é, base + açúcar mas
carecendo de 5'-fosfato

<220>
<221> base_modificada
<222> 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19
<223> /base-mod = "base correspondente de 2'-O-metila"

<400> 53
gagcucuaua gaguguuuat t      21

<210> 54
<211> 21
<212> DNA

```

```

<213> Sequência artificial

<220>
<223> Agentes de RNAi para infrarregulação de Aha 1

<220>
<223> ácido nucléico 5'-terminal é um nucleosídeo, isto é, base + açúcar mas
carecendo de 5'-fosfato

<220>
<221> base_modificada
<222> 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19
<223> /base-mod = "base correspondente de 2'-O-metila"

<400> 54
uaaacacucu auagagcuct t      21

<210> 55
<211> 21
<212> DNA
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Agentes de RNAi para infrarregulação de Aha 1

<220>
<223> ácido nucléico 5'-terminal é um nucleosídeo, isto é, base + açúcar mas
carecendo de 5'-fosfato

<220>
<221> base_modificada
<222> 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19
<223> /base-mod = "base correspondente de 2'-O-metila"

<400> 55
ggcagcggua cuacuuugat t      21

<210> 56
<211> 21
<212> DNA
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Agentes de RNAi para infrarregulação de Aha 1

<220>
<223> ácido nucléico 5'-terminal é um nucleosídeo, isto é, base + açúcar mas
carecendo de 5'-fosfato

<220>
<221> base_modificada
<222> 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19
<223> /base-mod = "base correspondente de 2'-O-metila"

<400> 56
ucaaaguagu accgcugcct t      21

<210> 57
<211> 21
<212> DNA
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Agentes de RNAi para infrarregulação de Aha 1

```

```

<220>
<223> ácido nucléico 5'-terminal é um nucleosídeo, isto é, base + açúcar mas
carecendo de 5'-fosfato

<220>
<221> base_modificada
<222> 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19
<223> /base-mod = "base correspondente de 2'-O-metila"

<400> 57
gacacaaauc ucguggccut t      21

<210> 58
<211> 21
<212> DNA
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Agentes de RNAi para infrarregulação de Aha 1

<220>
<223> ácido nucléico 5'-terminal é um nucleosídeo, isto é, base + açúcar mas
carecendo de 5'-fosfato

<220>
<221> base_modificada
<222> 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19
<223> /base-mod = "base correspondente de 2'-O-metila"

<400> 58
aggccacgag auuuguguct t      21

<210> 59
<211> 21
<212> DNA
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Agentes de RNAi para infrarregulação de Aha 1

<220>
<223> ácido nucléico 5'-terminal é um nucleosídeo, isto é, base + açúcar mas
carecendo de 5'-fosfato

<220>
<221> base_modificada
<222> 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19
<223> /base-mod = "base correspondente de 2'-O-metila"

<400> 59
agcgggcgga cgccaccaat t      21

<210> 60
<211> 21
<212> DNA
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Agentes de RNAi para infrarregulação de Aha 1

<220>

```

<223> ácido nucléico 5'-terminal é um nucleosídeo, isto é, base + açúcar mas carecendo de 5'-fosfato

<220>

<221> base\_modificada

<222> 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19

<223> /base-mod = "base correspondente de 2'-O-metila"

<400> 60  
uugguggcgu ccgccccgt t 21

<210> 61

<211> 21

<212> DNA

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Agentes de RNAi para infrarregulação de Aha 1

<220>

<223> ácido nucléico 5'-terminal é um nucleosídeo, isto é, base + açúcar mas carecendo de 5'-fosfato

<220>

<221> base\_modificada

<222> 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19

<223> /base-mod = "base correspondente de 2'-O-metila"

<400> 61  
caaaaucccc acuuguaagt t 21

<210> 62

<211> 21

<212> DNA

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Agentes de RNAi para infrarregulação de Aha 1

<220>

<223> ácido nucléico 5'-terminal é um nucleosídeo, isto é, base + açúcar mas carecendo de 5'-fosfato

<220>

<221> base\_modificada

<222> 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19

<223> /base-mod = "base correspondente de 2'-O-metila"

<400> 62  
cuuacaagug gggauuuugt t 21

<210> 63

<211> 21

<212> DNA

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Agentes de RNAi para infrarregulação de Aha 1

<220>

<223> ácido nucléico 5'-terminal é um nucleosídeo, isto é, base + açúcar mas carecendo de 5'-fosfato

<220>

```

<221> base_modificada
<222> 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19
<223> /base-mod = "base correspondente de 2'-O-metila"

<400> 63
gagaccacg cuggaucgt t      21

<210> 64
<211> 21
<212> DNA
<213> Sequência artificial

<220>
<223> ácido nucléico 5'-terminal é um nucleosídeo, isto é, base + açúcar mas
carecendo de 5'-fosfato

<220>
<221> base_modificada
<222> 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19
<223> /base-mod = "base correspondente de 2'-O-metila"

<400> 64
acgauccagc gugggucuct t      21

<210> 65
<211> 21
<212> DNA
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Agentes de RNAi para infrarregulação de Aha 1

<220>
<223> ácido nucléico 5'-terminal é um nucleosídeo, isto é, base + açúcar mas
carecendo de 5'-fosfato

<220>
<221> base_modificada
<222> 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19
<223> /base-mod = "base correspondente de 2'-O-metila"

<400> 65
gagccuugcc aaagaaugagt t      21

<210> 66
<211> 21
<212> DNA
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Agentes de RNAi para infrarregulação de Aha 1

<220>
<223> ácido nucléico 5'-terminal é um nucleosídeo, isto é, base + açúcar mas
carecendo de 5'-fosfato

<220>
<221> base_modificada
<222> 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19
<223> /base-mod = "base correspondente de 2'-O-metila"

```

```

<400> 66
cucaucuuug gcaaggcuct t      21

<210> 67
<211> 21
<212> DNA
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Agentes de RNAi para infrarregulação de Aha 1

<220>
<223> ácido nucléico 5'-terminal é um nucleosídeo, isto é, base + açúcar mas
carecendo de 5'-fosfato

<220>
<221> base_modificada
<222> 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19
<223> /base-mod = "base correspondente de 2'-O-metila"

<400> 67
ugacacaaaau cucguggcct t      21

<210> 68
<211> 21
<212> DNA
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Agentes de RNAi para infrarregulação de Aha 1

<220>
<223> ácido nucléico 5'-terminal é um nucleosídeo, isto é, base + açúcar mas
carecendo de 5'-fosfato

<220>
<221> base_modificada
<222> 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19
<223> /base-mod = "base correspondente de 2'-O-metila"

<400> 68
ggccacgaga uuugugucat t      21

<210> 69
<211> 21
<212> DNA
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Agentes de RNAi para infrarregulação de Aha 1

<220>
<223> ácido nucléico 5'-terminal é um nucleosídeo, isto é, base + açúcar mas
carecendo de 5'-fosfato

<220>
<221> base_modificada
<222> 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19
<223> /base-mod = "base correspondente de 2'-O-metila"

<400> 69
ggagcucuau agaguguut t      21

```

```

<210> 70
<211> 21
<212> DNA
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Agentes de RNAi para infrarregulação de Aha 1

<220>
<223> ácido nucléico 5'-terminal é um nucleosídeo, isto é, base + açúcar mas
carecendo de 5'-fosfato

<220>
<221> base_modificada
<222> 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19
<223> /base-mod = "base correspondente de 2'-O-metila"

<400> 70
aaacacucua uagagcucct t      21

<210> 71
<211> 21
<212> DNA
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Agentes de RNAi para infrarregulação de Aha 1

<220>
<223> ácido nucléico 5'-terminal é um nucleosídeo, isto é, base + açúcar mas
carecendo de 5'-fosfato

<220>
<221> base_modificada
<222> 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19
<223> /base-mod = "base correspondente de 2'-O-metila"

<400> 71
cccacgcugg aucguggagt t      21

<210> 72
<211> 21
<212> DNA
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Agentes de RNAi para infrarregulação de Aha 1

<220>
<223> ácido nucléico 5'-terminal é um nucleosídeo, isto é, base + açúcar mas
carecendo de 5'-fosfato

<220>
<221> base_modificada
<222> 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19
<223> /base-mod = "base correspondente de 2'-O-metila"

<400> 72
cuccacgauc cagcguggggt t      21

<210> 73
<211> 21
<212> DNA

```

```

<213> Sequência artificial

<220>
<223> Agentes de RNAi para infrarregulação de Aha 1

<220>
<223> ácido nucléico 5'-terminal é um nucleosídeo, isto é, base + açúcar mas
carecendo de 5'-fosfato

<220>
<221> base_modificada
<222> 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19
<223> /base-mod = "base correspondente de 2'-O-metila"

<400> 73
gaucccccaau uugucugaut t      21

.

<210> 74
<211> 21
<212> DNA
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Agentes de RNAi para infrarregulação de Aha 1

<220>
<223> ácido nucléico 5'-terminal é um nucleosídeo, isto é, base + açúcar mas
carecendo de 5'-fosfato

<220>
<221> base_modificada
<222> 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19
<223> /base-mod = "base correspondente de 2'-O-metila"

<400> 74
aucagacaaa uuggggauct t      21

.

<210> 75
<211> 21
<212> DNA
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Agentes de RNAi para infrarregulação de Aha 1

<220>
<223> ácido nucléico 5'-terminal é um nucleosídeo, isto é, base + açúcar mas
carecendo de 5'-fosfato

<220>
<221> base_modificada
<222> 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19
<223> /base-mod = "base correspondente de 2'-O-metila"

<400> 75
gagaauccca auuugucugt t      21

.

<210> 76
<211> 21
<212> DNA
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Agentes de RNAi para infrarregulação de Aha 1

```

```

<220>
<223> ácido nucléico 5'-terminal é um nucleosídeo, isto é, base + açúcar mas
carecendo de 5'-fosfato

<220>
<221> base_modificada
<222> 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19
<223> /base-mod = "base correspondente de 2'-O-metila"

<400> 76
cagacaaauu ggggaucuct t      21

<210> 77
<211> 21
<212> DNA
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Agentes de RNAi para infrarregulação de Aha 1

<220>
<223> ácido nucléico 5'-terminal é um nucleosídeo, isto é, base + açúcar mas
carecendo de 5'-fosfato

<220>
<221> base_modificada
<222> 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19
<223> /base-mod = "base correspondente de 2'-O-metila"

<400> 77
agccugacac aaaucucgut t      21

<210> 78
<211> 21
<212> DNA
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Agentes de RNAi para infrarregulação de Aha 1

<220>
<223> ácido nucléico 5'-terminal é um nucleosídeo, isto é, base + açúcar mas
carecendo de 5'-fosfato

<220>
<221> base_modificada
<222> 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19
<223> /base-mod = "base correspondente de 2'-O-metila"

<400> 78
acgagauuug ugucaggcut t      21

<210> 79
<211> 21
<212> DNA
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Agentes de RNAi para infrarregulação de Aha 1

<220>

```

<223> ácido nucléico 5'-terminal é um nucleosídeo, isto é, base + açúcar mas carecendo de 5'-fosfato

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19  
 <223> /base-mod = "base correspondente de 2'-O-metila"

<400> 79  
 agaucccaa uuugucugat t 21

<210> 80  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Sequência artificial

<220>  
 <223> Agentes de RNAi para infrarregulação de Aha 1

<220>  
 <223> ácido nucléico 5'-terminal é um nucleosídeo, isto é, base + açúcar mas carecendo de 5'-fosfato

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19  
 <223> /base-mod = "base correspondente de 2'-O-metila"

<400> 80  
 ucagacaaa uggggaucut t 21

<210> 81  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Sequência artificial

<220>  
 <223> Agentes de RNAi para infrarregulação de Aha 1

<220>  
 <223> ácido nucléico 5'-terminal é um nucleosídeo, isto é, base + açúcar mas carecendo de 5'-fosfato

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19  
 <223> /base-mod = "base correspondente de 2'-O-metila"

<400> 81  
 agggagaccc acgcuggaut t 21

<210> 82  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Sequência artificial

<220>  
 <223> Agentes de RNAi para infrarregulação de Aha 1

<220>  
 <223> ácido nucléico 5'-terminal é um nucleosídeo, isto é, base + açúcar mas carecendo de 5'-fosfato

<220>

```

<221> base_modificada
<222> 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19
<223> /base-mod = "base correspondente de 2'-O-metila"

<400> 82
auccagcgug ggucuccut t      21

<210> 83
<211> 21
<212> DNA
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Agentes de RNAi para infrarregulação de Aha 1

<220>
<223> ácido nucléico 5'-terminal é um nucleosídeo, isto é, base + açúcar mas
carecendo de 5'-fosfato

<220>
<221> base_modificada
<222> 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19
<223> /base-mod = "base correspondente de 2'-O-metila"

<400> 83
gagggagacc cacgcuggat t .    21

<210> 84
<211> 21
<212> DNA
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Agentes de RNAi para infrarregulação de Aha 1

<220>
<223> ácido nucléico 5'-terminal é um nucleosídeo, isto é, base + açúcar mas
carecendo de 5'-fosfato

<220>
<221> base_modificada
<222> 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19
<223> /base-mod = "base correspondente de 2'-O-metila"

<400> 84
uccagcgugg gucuccuct t      21

<210> 85
<211> 21
<212> DNA
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Agentes de RNAi para infrarregulação de Aha 1

<220>
<223> ácido nucléico 5'-terminal é um nucleosídeo, isto é, base + açúcar mas
carecendo de 5'-fosfato

<220>
<221> base_modificada
<222> 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19
<223> /base-mod = "base correspondente de 2'-O-metila"

```

```

<400> 85
gccaauggg gugagggagt t      21

<210> 86
<211> 21
<212> DNA
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Agentes de RNAi para infrarregulação de Aha 1

<220>
<223> ácido nucléico 5'-terminal é um nucleosídeo, isto é, base + açúcar mas
carecendo de 5'-fosfato

<220>
<221> base_modificada
<222> 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19
<223> /base-mod = "base correspondente de 2'-O-metila"

<400> 86
cuccucaccc cacuuggct t      21

<210> 87
<211> 21
<212> DNA
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Agentes de RNAi para infrarregulação de Aha 1

<220>
<223> ácido nucléico 5'-terminal é um nucleosídeo, isto é, base + açúcar mas
carecendo de 5'-fosfato

<220>
<221> base_modificada
<222> 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19
<223> /base-mod = "base correspondente de 2'-O-metila"

<400> 87
uggcagcggu acuacuuugt t      21

<210> 88
<211> 21
<212> DNA
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Agentes de RNAi para infrarregulação de Aha 1

<220>
<223> ácido nucléico 5'-terminal é um nucleosídeo, isto é, base + açúcar mas
carecendo de 5'-fosfato

<220>
<221> base_modificada
<222> 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19
<223> /base-mod = "base correspondente de 2'-O-metila"

<400> 88
caaaguagua ccgcugccat t      21

```

```

<210> 89
<211> 21
<212> DNA
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Agentes de RNAi para infrarregulação de Aha 1

<220>
<223> ácido nucléico 5'-terminal é um nucleosídeo, isto é, base + açúcar mas
carecendo de 5'-fosfato

<220>
<221> base_modificada
<222> 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19
<223> /base-mod = "base correspondente de 2'-O-metila"

<400> 89
ugagggagac ccacgcuggt t      21

<210> 90
<211> 21
<212> DNA
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Agentes de RNAi para infrarregulação de Aha 1

<220>
<223> ácido nucléico 5'-terminal é um nucleosídeo, isto é, base + açúcar mas
carecendo de 5'-fosfato

<220>
<221> base_modificada
<222> 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19
<223> /base-mod = "base correspondente de 2'-O-metila"

<400> 90
ccagcguggg ucuccccucat t      21

<210> 91
<211> 21
<212> DNA
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Agentes de RNAi para infrarregulação de Aha 1

<220>
<223> ácido nucléico 5'-terminal é um nucleosídeo, isto é, base + açúcar mas
carecendo de 5'-fosfato

<220>
<221> base_modificada
<222> 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19
<223> /base-mod = "base correspondente de 2'-O-metila"

<400> 91
aguggagauu agugugagct t      21

<210> 92
<211> 21
<212> DNA

```

```

<213> Sequência artificial

<220>
<223> Agentes de RNAi para infrarregulação de Aha 1

<220>
<223> ácido nucléico 5'-terminal é um nucleosídeo, isto é, base + açúcar mas
carecendo de 5'-fosfato

<220>
<221> base_modificada
<222> 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19
<223> /base-mod = "base correspondente de 2'-O-metila"

<400> 92
gcucacacacua aucuccacut t      21

<210> 93
<211> 21
<212> DNA
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Agentes de RNAi para infrarregulação de Aha 1

<220>
<223> ácido nucléico 5'-terminal é um nucleosídeo, isto é, base + açúcar mas
carecendo de 5'-fosfato

<220>
<221> base_modificada
<222> 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19
<223> /base-mod = "base correspondente de 2'-O-metila"

<400> 93
aggagcucua uagaguguut t      21

<210> 94
<211> 21
<212> DNA
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Agentes de RNAi para infrarregulação de Aha 1

<220>
<223> ácido nucléico 5'-terminal é um nucleosídeo, isto é, base + açúcar mas
carecendo de 5'-fosfato

<220>
<221> base_modificada
<222> 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19
<223> /base-mod = "base correspondente de 2'-O-metila"

<400> 94
aacacucuau agagcuccut t      21

<210> 95
<211> 21
<212> DNA
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Agentes de RNAi para infrarregulação de Aha 1

```

```

<220>
<223> ácido nucléico 5'-terminal é um nucleosídeo, isto é, base + açúcar mas
carecendo de 5'-fosfato

<220>
<221> base_modificada
<222> 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19
<223> /base-mod = "base correspondente de 2'-O-metila"

<400> 95
agcgguaacua cuuugagggt t      21

<210> 96
<211> 21
<212> DNA
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Agentes de RNAi para infrarregulação de Aha 1

<220>
<223> ácido nucléico 5'-terminal é um nucleosídeo, isto é, base + açúcar mas
carecendo de 5'-fosfato

<220>
<221> base_modificada
<222> 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19
<223> /base-mod = "base correspondente de 2'-O-metila"

<400> 96
cccucaaagu aguaccgcgt t      21

<210> 97
<211> 21
<212> DNA
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Agentes de RNAi para infrarregulação de Aha 1

<220>
<223> ácido nucléico 5'-terminal é um nucleosídeo, isto é, base + açúcar mas
carecendo de 5'-fosfato

<220>
<221> base_modificada
<222> 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19
<223> /base-mod = "base correspondente de 2'-O-metila"

<400> 97
cgcuggauca ugaggaggct t      21

<210> 98
<211> 21
<212> DNA
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Agentes de RNAi para infrarregulação de Aha 1

<220>

```

<223> ácido nucléico 5'-terminal é um nucleosídeo, isto é, base + açúcar mas carecendo de 5'-fosfato

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19  
 <223> /base-mod = "base correspondente de 2'-O-metila"  
 <400> 98  
 gcuccuccac gauccagcgt t 21

<210> 99  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Sequência artificial  
 <220>  
 <223> Agentes de RNAi para infrarregulação de Aha 1

<220>  
 <223> ácido nucléico 5'-terminal é um nucleosídeo, isto é, base + açúcar mas carecendo de 5'-fosfato

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19  
 <223> /base-mod = "base correspondente de 2'-O-metila"  
 <400> 99  
 gcuggaucgu ggaggagcgt t 21

<210> 100  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Sequência artificial  
 <220>  
 <223> Agentes de RNAi para infrarregulação de Aha 1

<220>  
 <223> ácido nucléico 5'-terminal é um nucleosídeo, isto é, base + açúcar mas carecendo de 5'-fosfato

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19  
 <223> /base-mod = "base correspondente de 2'-O-metila"  
 <400> 100  
 cgcuccucca cgauccagct t 21

<210> 101  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Sequência artificial  
 <220>  
 <223> Agentes de RNAi para infrarregulação de Aha 1

<220>  
 <223> ácido nucléico 5'-terminal é um nucleosídeo, isto é, base + açúcar mas carecendo de 5'-fosfato

<220>

```

<221> base_modificada
<222> 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19
<223> /base-mod = "base correspondente de 2'-O-metila"

<400> 101
cuggaucgug gaggagcggt t      21

<210> 102
<211> 21
<212> DNA
<213> Sequência artificial

<220>
<223> ácido nucléico 5'-terminal é um nucleosídeo, isto é, base + açúcar mas
carecendo de 5'-fosfato

<220>
<221> base_modificada
<222> 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19
<223> /base-mod = "base correspondente de 2'-O-metila"

<400> 102
ccgcuccucc acgauccagt t      21

<210> 103
<211> 21
<212> DNA
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Agentes de RNAi para infrarregulação de Aha 1

<220>
<223> ácido nucléico 5'-terminal é um nucleosídeo, isto é, base + açúcar mas
carecendo de 5'-fosfato

<220>
<221> base_modificada
<222> 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19
<223> /base-mod = "base correspondente de 2'-O-metila"

<400> 103
uggaucgugg aggagcggt t      21

<210> 104
<211> 21
<212> DNA
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Agentes de RNAi para infrarregulação de Aha 1

<220>
<223> ácido nucléico 5'-terminal é um nucleosídeo, isto é, base + açúcar mas
carecendo de 5'-fosfato

<220>
<221> base_modificada
<222> 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19
<223> /base-mod = "base correspondente de 2'-O-metila"

```

```

<400> 104
ccgcucuc cacgaucat t      21

<210> 105
<211> 21
<212> DNA
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Agentes de RNAi para infrarregulação de Aha 1

<220>
<223> ácido nucléico 5'-terminal é um nucleosídeo, isto é, base + açúcar mas
carecendo de 5'-fosfato

<220>
<221> base_modificada
<222> 1..19
<223> /base-mod = "base correspondente de 2'-hidróxi"

<400> 105
gccugacaca aaucucgugt t      21

<210> 106
<211> 21
<212> DNA
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Agentes de RNAi para infrarregulação de Aha 1

<220>
<223> ácido nucléico 5'-terminal é um nucleosídeo, isto é, base + açúcar mas
carecendo de 5'-fosfato

<220>
<221> base_modificada
<222> 1..19
<223> /base-mod = "base correspondente de 2'-hidróxi"

<400> 106
cacgagauuu gugucaggct t      21

<210> 107
<211> 21
<212> DNA
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Agentes de RNAi para infrarregulação de Aha 1

<220>
<223> ácido nucléico 5'-terminal é um nucleosídeo, isto é, base + açúcar mas
carecendo de 5'-fosfato

<220>
<221> base_modificada
<222> 1..19
<223> /base-mod = "base correspondente de 2'-hidróxi"

<400> 107
ccugacacaa aucucguggt t      21

```

```

<210> 108
<211> 21
<212> DNA
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Agentes de RNAi para infrarregulação de Aha 1

<220>
<223> ácido nucléico 5'-terminal é um nucleosídeo, isto é, base + açúcar mas
carecendo de 5'-fosfato

<220>
<221> base_modificada
<222> 1..19
<223> /base-mod = "base correspondente de 2'-hidróxi"

<400> 108
ccacgagauu ugugucaggt t      21

<210> 109
<211> 21
<212> DNA
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Agentes de RNAi para infrarregulação de Aha 1

<220>
<223> ácido nucléico 5'-terminal é um nucleosídeo, isto é, base + açúcar mas
carecendo de 5'-fosfato

<220>
<221> base_modificada
<222> 1..19
<223> /base-mod = "base correspondente de 2'-hidróxi"

<400> 109
acgccaccaa cguacaacaat t      21

<210> 110
<211> 21
<212> DNA
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Agentes de RNAi para infrarregulação de Aha 1

<220>
<223> ácido nucléico 5'-terminal é um nucleosídeo, isto é, base + açúcar mas
carecendo de 5'-fosfato

<220>
<221> base_modificada
<222> 1..19
<223> /base-mod = "base correspondente de 2'-hidróxi"

<400> 110
uuguugacgu ugguggcgut t      21

<210> 111
<211> 21
<212> DNA

```

```

<213> Sequência artificial

<220>
<223> Agentes de RNAi para infrarregulação de Aha 1

<220>
<223> ácido nucléico 5'-terminal é um nucleosídeo, isto é, base + açúcar mas
carecendo de 5'-fosfato

<220>
<221> base_modificada
<222> 1..19
<223> /base-mod = "base correspondente de 2'-hidróxi"

<400> 111
agcucuauag aguguuuact t      21

<210> 112
<211> 21
<212> DNA
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Agentes de RNAi para infrarregulação de Aha 1

<220>
<223> ácido nucléico 5'-terminal é um nucleosídeo, isto é, base + açúcar mas
carecendo de 5'-fosfato

<220>
<221> base_modificada
<222> 1..19
<223> /base-mod = "base correspondente de 2'-hidróxi"

<400> 112
guaaacacac uauagagcgt t      21

<210> 113
<211> 21
<212> DNA
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Agentes de RNAi para infrarregulação de Aha 1

<220>
<223> ácido nucléico 5'-terminal é um nucleosídeo, isto é, base + açúcar mas
carecendo de 5'-fosfato

<220>
<221> base_modificada
<222> 1..19
<223> /base-mod = "base correspondente de 2'-hidróxi"

<400> 113
gggcuggcag cgguaucact t      21

<210> 114
<211> 21
<212> DNA
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Agentes de RNAi para infrarregulação de Aha 1

```

```

<220>
<223> ácido nucléico 5'-terminal é um nucleosídeo, isto é, base + açúcar mas
carecendo de 5'-fosfato

<220>
<221> base_modificada
<222> 1..19
<223> /base-mod = "base correspondente de 2'-hidróxi"

<400> 114
guaguaccgc ugccagccct t      21

<210> 115
<211> 21
<212> DNA
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Agentes de RNAi para infrarregulação de Aha 1

<220>
<223> ácido nucléico 5'-terminal é um nucleosídeo, isto é, base + açúcar mas
carecendo de 5'-fosfato

<220>
<221> base_modificada
<222> 1..19
<223> /base-mod = "base correspondente de 2'-hidróxi"

<400> 115
cuggcagcgg uacuacuuut t      21

<210> 116
<211> 21
<212> DNA
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Agentes de RNAi para infrarregulação de Aha 1

<220>
<223> ácido nucléico 5'-terminal é um nucleosídeo, isto é, base + açúcar mas
carecendo de 5'-fosfato

<220>
<221> base_modificada
<222> 1..19
<223> /base-mod = "base correspondente de 2'-hidróxi"

<400> 116
aaaguaguac cgcugccagt t      21

<210> 117
<211> 21
<212> DNA
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Agentes de RNAi para infrarregulação de Aha 1

<220>

```

<223> ácido nucléico 5'-terminal é um nucleosídeo, isto é, base + açúcar mas carecendo de 5'-fosfato

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1..19  
 <223> /base-mod = "base correspondente de 2'-hidróxi"  
 <400> 117  
 ggaugaagug gagauuagut t 21

<210> 118  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Sequência artificial  
 <220>  
 <223> Agentes de RNAi para infrarregulação de Aha 1

<220>  
 <223> ácido nucléico 5'-terminal é um nucleosídeo, isto é, base + açúcar mas carecendo de 5'-fosfato

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1..19  
 <223> /base-mod = "base correspondente de 2'-hidróxi"  
 <400> 118  
 acuaaucucc acuucaucct t 21

<210> 119  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Sequência artificial  
 <220>  
 <223> Agentes de RNAi para infrarregulação de Aha 1

<220>  
 <223> ácido nucléico 5'-terminal é um nucleosídeo, isto é, base + açúcar mas carecendo de 5'-fosfato

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1..19  
 <223> /base-mod = "base correspondente de 2'-hidróxi"  
 <400> 119  
 accagaggag cucuauagat t 21

<210> 120  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Sequência artificial  
 <220>  
 <223> Agentes de RNAi para infrarregulação de Aha 1

<220>  
 <223> ácido nucléico 5'-terminal é um nucleosídeo, isto é, base + açúcar mas carecendo de 5'-fosfato

<220>

```

<221> base_modificada
<222> 1..19
<223> /base-mod = "base correspondente de 2'-hidróxi"

<400> 120
ucuauagagc uccucuggut t      21

<210> 121
<211> 21
<212> DNA
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Agentes de RNAi para infrarregulação de Aha 1

<220>
<223> ácido nucléico 5'-terminal é um nucleosídeo, isto é, base + açúcar mas
carecendo de 5'-fosfato

<220>
<221> base_modificada
<222> 1..19
<223> /base-mod = "base correspondente de 2'-hidróxi"

<400> 121
aaggaggagau uagugugagt t      21

<210> 122
<211> 21
<212> DNA
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Agentes de RNAi para infrarregulação de Aha 1

<220>
<223> ácido nucléico 5'-terminal é um nucleosídeo, isto é, base + açúcar mas
carecendo de 5'-fosfato

<220>
<221> base_modificada
<222> 1..19
<223> /base-mod = "base correspondente de 2'-hidróxi"

<400> 122
cucacacuua ucuccacuut t      21

<210> 123
<211> 21
<212> DNA
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Agentes de RNAi para infrarregulação de Aha 1

<220>
<223> ácido nucléico 5'-terminal é um nucleosídeo, isto é, base + açúcar mas
carecendo de 5'-fosfato

<220>
<221> base_modificada
<222> 1..19
<223> /base-mod = "base correspondente de 2'-hidróxi"

```

<400> 123  
gaggagcucu auagagugut t 21

<210> 124  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Sequência artificial

<220>  
<223> Agentes de RNAi para infrarregulação de Aha 1

<220>  
<223> ácido nucléico 5'-terminal é um nucleosídeo, isto é, base + açúcar mas carecendo de 5'-fosfato

<220>  
<221> base\_modificada  
<222> 1..19  
<223> /base-mod = "base correspondente de 2'-hidróxi"

<400> 124  
acacucuaua gagcuccuct t 21

<210> 125  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Sequência artificial

<220>  
<223> Agentes de RNAi para infrarregulação de Aha 1

<220>  
<223> ácido nucléico 5'-terminal é um nucleosídeo, isto é, base + açúcar mas carecendo de 5'-fosfato

<220>  
<221> base\_modificada  
<222> 1..19  
<223> /base-mod = "base correspondente de 2'-hidróxi"

<400> 125  
gggagaccca cgcuggauct t 21

<210> 126  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Sequência artificial

<220>  
<223> Agentes de RNAi para infrarregulação de Aha 1

<220>  
<223> ácido nucléico 5'-terminal é um nucleosídeo, isto é, base + açúcar mas carecendo de 5'-fosfato

<220>  
<221> base\_modificada  
<222> 1..19  
<223> /base-mod = "base correspondente de 2'-hidróxi"

<400> 126  
gauccagcgu gggucuccct t 21

```

<210> 127
<211> 21
<212> DNA
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Agentes de RNAi para infrarregulação de Aha 1

<220>
<223> ácido nucléico 5'-terminal é um nucleosídeo, isto é, base + açúcar mas
carecendo de 5'-fosfato

<220>
<221> base_modificada
<222> 1..19
<223> /base-mod = "base correspondente de 2'-hidróxi"

<400> 127
ugagccugac acaaaucuct t      21

<210> 128
<211> 21
<212> DNA
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Agentes de RNAi para infrarregulação de Aha 1

<220>
<223> ácido nucléico 5'-terminal é um nucleosídeo, isto é, base + açúcar mas
carecendo de 5'-fosfato

<220>
<221> base_modificada
<222> 1..19
<223> /base-mod = "base correspondente de 2'-hidróxi"

<400> 128
gagauuugug ucaggcucat t      21

<210> 129
<211> 21
<212> DNA
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Agentes de RNAi para infrarregulação de Aha 1

<220>
<223> ácido nucléico 5'-terminal é um nucleosídeo, isto é, base + açúcar mas
carecendo de 5'-fosfato

<220>
<221> base_modificada
<222> 1..19
<223> /base-mod = "base correspondente de 2'-hidróxi"

<400> 129
gcggacgcca ccaacgucat t      21

<210> 130
<211> 21
<212> DNA

```

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Agentes de RNAi para infrarregulação de Aha 1

<220>

<223> ácido nucléico 5'-terminal é um nucleosídeo, isto é, base + açúcar mas carecendo de 5'-fosfato

<220>

<221> base\_modificada

<222> 1..19

<223> /base-mod = "base correspondente de 2'-hidróxi"

<400> 130  
ugacguugg ugcguccgct t 21

<210> 131

<211> 21

<212> DNA

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Agentes de RNAi para infrarregulação de Aha 1

<220>

<223> ácido nucléico 5'-terminal é um nucleosídeo, isto é, base + açúcar mas carecendo de 5'-fosfato

<220>

<221> base\_modificada

<222> 1..19

<223> /base-mod = "base correspondente de 2'-hidróxi"

<400> 131  
cgcacgcccac caacgucaat t 21

<210> 132

<211> 21

<212> DNA

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Agentes de RNAi para infrarregulação de Aha 1

<220>

<223> ácido nucléico 5'-terminal é um nucleosídeo, isto é, base + açúcar mas carecendo de 5'-fosfato

<220>

<221> base\_modificada

<222> 1..19

<223> /base-mod = "base correspondente de 2'-hidróxi"

<400> 132  
uugacguugg uggcguccgt t 21

<210> 133

<211> 21

<212> DNA

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Agentes de RNAi para infrarregulação de Aha 1

```

<220>
<223> ácido nucléico 5'-terminal é um nucleosídeo, isto é, base + açúcar mas
carecendo de 5'-fosfato

<220>
<221> base_modificada
<222> 1..19
<223> /base-mod = "base correspondente de 2'-hidróxi"

<400> 133
gaaguggaga uuagugugat t      21

<210> 134
<211> 21
<212> DNA
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Agentes de RNAi para infrarregulação de Aha 1

<220>
<223> ácido nucléico 5'-terminal é um nucleosídeo, isto é, base + açúcar mas
carecendo de 5'-fosfato

<220>
<221> base_modificada
<222> 1..19
<223> /base-mod = "base correspondente de 2'-hidróxi"

<400> 134
ucacacuaau cuccacuuct t      21

<210> 135
<211> 21
<212> DNA
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Agentes de RNAi para infrarregulação de Aha 1

<220>
<223> ácido nucléico 5'-terminal é um nucleosídeo, isto é, base + açúcar mas
carecendo de 5'-fosfato

<220>
<221> base_modificada
<222> 1..19
<223> /base-mod = "base correspondente de 2'-hidróxi"

<400> 135
cucguggccu uaaugaagg t      21

<210> 136
<211> 21
<212> DNA
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Agentes de RNAi para infrarregulação de Aha 1

<220>

```

<223> ácido nucléico 5'-terminal é um nucleosídeo, isto é, base + açúcar mas carecendo de 5'-fosfato

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1..19  
 <223> /base-mod = "base correspondente de 2'-hidróxi"  
 <400> 136  
 ccuucaauua ggccacgagt t 21

<210> 137  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Sequência artificial  
 <220>  
 <223> Agentes de RNAi para infrarregulação de Aha 1

<220>  
 <223> ácido nucléico 5'-terminal é um nucleosídeo, isto é, base + açúcar mas carecendo de 5'-fosfato  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1..19  
 <223> /base-mod = "base correspondente de 2'-hidróxi"

<400> 137  
 ucguggccuu aaugaaggat t 21

<210> 138  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Sequência artificial  
 <220>  
 <223> Agentes de RNAi para infrarregulação de Aha 1

<220>  
 <223> ácido nucléico 5'-terminal é um nucleosídeo, isto é, base + açúcar mas carecendo de 5'-fosfato

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1..19  
 <223> /base-mod = "base correspondente de 2'-hidróxi"

<400> 138  
 uccuucaauua aggccacgat t 21

<210> 139  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Sequência artificial

<220>  
 <223> Agentes de RNAi para infrarregulação de Aha 1

<220>  
 <223> ácido nucléico 5'-terminal é um nucleosídeo, isto é, base + açúcar mas carecendo de 5'-fosfato

<220>

```

<221> base_modificada
<222> 1..19
<223> /base-mod = "base correspondente de 2'-hidróxi"

<400> 139
aaugggaaauu uacaucagct t      21

<210> 140
<211> 21
<212> DNA
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Agentes de RNAi para infrarregulação de Aha 1

<220>
<223> ácido nucléico 5'-terminal é um nucleosídeo, isto é, base + açúcar mas
carecendo de 5'-fosfato

<220>
<221> base_modificada
<222> 1..19
<223> /base-mod = "base correspondente de 2'-hidróxi"

<400> 140
gcugauguaa auucccauut t      21

<210> 141
<211> 21
<212> DNA
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Agentes de RNAi para infrarregulação de Aha 1

<220>
<223> ácido nucléico 5'-terminal é um nucleosídeo, isto é, base + açúcar mas
carecendo de 5'-fosfato

<220>
<221> base_modificada
<222> 1..19
<223> /base-mod = "base correspondente de 2'-hidróxi"

<400> 141
ggaaauuuaca ucagcacccct t      21

<210> 142
<211> 21
<212> DNA
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Agentes de RNAi para infrarregulação de Aha 1

<220>
<223> ácido nucléico 5'-terminal é um nucleosídeo, isto é, base + açúcar mas
carecendo de 5'-fosfato

<220>
<221> base_modificada
<222> 1..19
<223> /base-mod = "base correspondente de 2'-hidróxi"

```

```

<400> 142
gggugcugau guaaauucct t      21

<210> 143
<211> 21
<212> DNA
<213> Sequência artificial

<220>
<223> ácido nucléico 5'-terminal é um nucleosídeo, isto é, base + açúcar mas
carecendo de 5'-fosfato

<220>
<221> base_modificada
<222> 1..19
<223> /base-mod = "base correspondente de 2'-hidróxi"

<400> 143
ggagauuagu gugagccuut t      21

<210> 144
<211> 21
<212> DNA
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Agentes de RNAi para infrarregulação de Aha 1

<220>
<223> ácido nucléico 5'-terminal é um nucleosídeo, isto é, base + açúcar mas
carecendo de 5'-fosfato

<220>
<221> base_modificada
<222> 1..19
<223> /base-mod = "base correspondente de 2'-hidróxi"

<400> 144
aaggcucaca cuauaucucc t      21

<210> 145
<211> 21
<212> DNA
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Agentes de RNAi para infrarregulação de Aha 1

<220>
<223> ácido nucléico 5'-terminal é um nucleosídeo, isto é, base + açúcar mas
carecendo de 5'-fosfato

<220>
<221> base_modificada
<222> 1..19
<223> /base-mod = "base correspondente de 2'-hidróxi"

<400> 145
cacaaaucuc guggccuuat t      21

```

```

<210> 146
<211> 21
<212> DNA
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Agentes de RNAi para infrarregulação de Aha 1

<220>
<223> ácido nucléico 5'-terminal é um nucleosídeo, isto é, base + açúcar mas
carecendo de 5'-fosfato

<220>
<221> base_modificada
<222> 1..19
<223> /base-mod = "base correspondente de 2'-hidróxi"

<400> 146
uaaggccacg agauuugugt t      21

<210> 147
<211> 21
<212> DNA
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Agentes de RNAi para infrarregulação de Aha 1

<220>
<223> ácido nucléico 5'-terminal é um nucleosídeo, isto é, base + açúcar mas
carecendo de 5'-fosfato

<220>
<221> base_modificada
<222> 1..19
<223> /base-mod = "base correspondente de 2'-hidróxi"

<400> 147
acaaaucucg uggccuuaat t      21

<210> 148
<211> 21
<212> DNA
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Agentes de RNAi para infrarregulação de Aha 1

<220>
<223> ácido nucléico 5'-terminal é um nucleosídeo, isto é, base + açúcar mas
carecendo de 5'-fosfato

<220>
<221> base_modificada
<222> 1..19
<223> /base-mod = "base correspondente de 2'-hidróxi"

<400> 148
uuaaggccac gagauuugut t      21

<210> 149
<211> 21
<212> DNA

```

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Agentes de RNAi para infrarregulação de Aha 1

<220>

<223> ácido nucléico 5'-terminal é um nucleosídeo, isto é, base + açúcar mas carecendo de 5'-fosfato

<220>

<221> base\_modificada

<222> 1..19

<223> /base-mod = "base correspondente de 2'-hidróxi"

<400> 149  
ggagacccac gcuggaucgt t 21

<210> 150

<211> 21

<212> DNA

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Agentes de RNAi para infrarregulação de Aha 1

<220>

<223> ácido nucléico 5'-terminal é um nucleosídeo, isto é, base + açúcar mas carecendo de 5'-fosfato

<220>

<221> base\_modificada

<222> 1..19

<223> /base-mod = "base correspondente de 2'-hidróxi"

<400> 150  
cgauccagcg ug ggucucct t 21

<210> 151

<211> 21

<212> DNA

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Agentes de RNAi para infrarregulação de Aha 1

<220>

<223> ácido nucléico 5'-terminal é um nucleosídeo, isto é, base + açúcar mas carecendo de 5'-fosfato

<220>

<221> base\_modificada

<222> 1..19

<223> /base-mod = "base correspondente de 2'-hidróxi"

<400> 151  
ggacgccacc aacgucaact t 21

<210> 152

<211> 21

<212> DNA

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Agentes de RNAi para infrarregulação de Aha 1

```

<220>
<223> ácido nucléico 5'-terminal é um nucleosídeo, isto é, base + açúcar mas
carecendo de 5'-fosfato

<220>
<221> base_modificada
<222> 1..19
<223> /base-mod = "base correspondente de 2'-hidróxi"

<400> 152
guugacguug guggcgucct t      21

<210> 153
<211> 21
<212> DNA
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Agentes de RNAi para infrarregulação de Aha 1

<220>
<223> ácido nucléico 5'-terminal é um nucleosídeo, isto é, base + açúcar mas
carecendo de 5'-fosfato

<220>
<221> base_modificada
<222> 1..19
<223> /base-mod = "base correspondente de 2'-hidróxi"

<400> 153
gaugaagugg agauuagugt t      21

<210> 154
<211> 21
<212> DNA
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Agentes de RNAi para infrarregulação de Aha 1

<220>
<223> ácido nucléico 5'-terminal é um nucleosídeo, isto é, base + açúcar mas
carecendo de 5'-fosfato

<220>
<221> base_modificada
<222> 1..19
<223> /base-mod = "base correspondente de 2'-hidróxi"

<400> 154
cacuaaucuc cacuucauct t      21

<210> 155
<211> 21
<212> DNA
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Agentes de RNAi para infrarregulação de Aha 1

<220>

```

<223> ácido nucléico 5'-terminal é um nucleosídeo, isto é, base + açúcar mas carecendo de 5'-fosfato

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1..19  
 <223> /base-mod = "base correspondente de 2'-hidróxi"  
 <400> 155  
 gugagccuug ccaaagaugt t 21

<210> 156  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Sequência artificial  
 <220>  
 <223> Agentes de RNAi para infrarregulação de Aha 1

<220>  
 <223> ácido nucléico 5'-terminal é um nucleosídeo, isto é, base + açúcar mas carecendo de 5'-fosfato  
 <220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1..19  
 <223> /base-mod = "base correspondente de 2'-hidróxi"

<400> 156  
 caucuuuggc aaggcucact t 21

<210> 157  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Sequência artificial  
 <220>  
 <223> Agentes de RNAi para infrarregulação de Aha 1

<220>  
 <223> ácido nucléico 5'-terminal é um nucleosídeo, isto é, base + açúcar mas carecendo de 5'-fosfato

<220>  
 <221> base\_modificada  
 <222> 1..19  
 <223> /base-mod = "base correspondente de 2'-hidróxi"

<400> 157  
 caaugaaugg agagucagut t 21

<210> 158  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Sequência artificial  
 <220>  
 <223> Agentes de RNAi para infrarregulação de Aha 1

<220>  
 <223> ácido nucléico 5'-terminal é um nucleosídeo, isto é, base + açúcar mas carecendo de 5'-fosfato

<220>

```
<221> base_modificada
<222> 1..19
<223> /base-mod = "base correspondente de 2'-hidróxi"

<400> 158
acugacucuc cauucauugt t      21

<210> 159
<211> 21
<212> DNA
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Agentes de RNAi para infrarregulação de Aha 1

<220>
<223> ácido nucléico 5'-terminal é um nucleosídeo, isto é, base + açúcar mas
carecendo de 5'-fosfato

<220>
<221> base_modificada
<222> 1..19
<223> /base-mod = "base correspondente de 2'-hidróxi"

<400> 159
auuaguguga gccuugccat t      21

<210> 160
<211> 21
<212> DNA
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Agentes de RNAi para infrarregulação de Aha 1

<220>
<223> ácido nucléico 5'-terminal é um nucleosídeo, isto é, base + açúcar mas
carecendo de 5'-fosfato

<220>
<221> base_modificada
<222> 1..19
<223> /base-mod = "base correspondente de 2'-hidróxi"

<400> 160
uggcaaggcu cacacuaaut t      21

<210> 161
<211> 21
<212> DNA
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Agentes de RNAi para infrarregulação de Aha 1

<220>
<223> ácido nucléico 5'-terminal é um nucleosídeo, isto é, base + açúcar mas
carecendo de 5'-fosfato

<220>
<221> base_modificada
<222> 1..19
<223> /base-mod = "base correspondente de 2'-hidróxi"
```

```

<400> 161
agaugagccu gacacaaaaut t      21

<210> 162
<211> 21
<212> DNA
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Agentes de RNAi para infrarregulação de Aha 1

<220>
<223> ácido nucléico 5'-terminal é um nucleosídeo, isto é, base + açúcar mas
carecendo de 5'-fosfato

<220>
<221> base_modificada
<222> 1..19
<223> /base-mod = "base correspondente de 2'-hidróxi"

<400> 162
auuuguguguca ggcucaucut t      21

<210> 163
<211> 21
<212> DNA
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Agentes de RNAi para infrarregulação de Aha 1

<220>
<223> ácido nucléico 5'-terminal é um nucleosídeo, isto é, base + açúcar mas
carecendo de 5'-fosfato

<220>
<221> base_modificada
<222> 1..19
<223> /base-mod = "base correspondente de 2'-hidróxi"

<400> 163
uagugugagc cuugccaaat t      21

<210> 164
<211> 21
<212> DNA
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Agentes de RNAi para infrarregulação de Aha 1

<220>
<223> ácido nucléico 5'-terminal é um nucleosídeo, isto é, base + açúcar mas
carecendo de 5'-fosfato

<220>
<221> base_modificada
<222> 1..19
<223> /base-mod = "base correspondente de 2'-hidróxi"

<400> 164
uuuggcaagg cucacacauat t      21

```

```

<210> 165
<211> 21
<212> DNA
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Agentes de RNAi para infrarregulação de Aha 1

<220>
<223> ácido nucléico 5'-terminal é um nucleosídeo, isto é, base + açúcar mas
carecendo de 5'-fosfato

<220>
<221> base_modificada
<222> 1..19
<223> /base-mod = "base correspondente de 2'-hidróxi"

<400> 165
uuugccacca ucaccuugat t      21

<210> 166
<211> 21
<212> DNA
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Agentes de RNAi para infrarregulação de Aha 1

<220>
<223> ácido nucléico 5'-terminal é um nucleosídeo, isto é, base + açúcar mas
carecendo de 5'-fosfato

<220>
<221> base_modificada
<222> 1..19
<223> /base-mod = "base correspondente de 2'-hidróxi"

<400> 166
ucaaggugau gguggcaaat t      21

<210> 167
<211> 21
<212> DNA
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Agentes de RNAi para infrarregulação de Aha 1

<220>
<223> ácido nucléico 5'-terminal é um nucleosídeo, isto é, base + açúcar mas
carecendo de 5'-fosfato

<220>
<221> base_modificada
<222> 1..19
<223> /base-mod = "base correspondente de 2'-hidróxi"

<400> 167
acggagagag augcuucaat t      21

<210> 168
<211> 21
<212> DNA

```

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Agentes de RNAi para infrarregulação de Aha 1

<220>

<223> ácido nucléico 5'-terminal é um nucleosídeo, isto é, base + açúcar mas carecendo de 5'-fosfato

<220>

<221> base\_modificada

<222> 1..19

<223> /base-mod = "base correspondente de 2'-hidróxi"

<400> 168  
uugaaggcauc ucucuccgut t 21

<210> 169

<211> 21

<212> DNA

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Agentes de RNAi para infrarregulação de Aha 1

<220>

<223> ácido nucléico 5'-terminal é um nucleosídeo, isto é, base + açúcar mas carecendo de 5'-fosfato

<220>

<221> base\_modificada

<222> 1..19

<223> /base-mod = "base correspondente de 2'-hidróxi"

<400> 169  
cgagagaga ugcuucaaat t 21

<210> 170

<211> 21

<212> DNA

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Agentes de RNAi para infrarregulação de Aha 1

<220>

<223> ácido nucléico 5'-terminal é um nucleosídeo, isto é, base + açúcar mas carecendo de 5'-fosfato

<220>

<221> base\_modificada

<222> 1..19

<223> /base-mod = "base correspondente de 2'-hidróxi"

<400> 170  
uuugaaggcau cucucuccgt t 21

<210> 171

<211> 21

<212> DNA

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Agentes de RNAi para infrarregulação de Aha 1

```

<220>
<223> ácido nucléico 5'-terminal é um nucleosídeo, isto é, base + açúcar mas
carecendo de 5'-fosfato

<220>
<221> base_modificada
<222> 1..19
<223> /base-mod = "base correspondente de 2'-hidróxi"

<400> 171
aaaaaucccca cuuguaagat t      21

<210> 172
<211> 21
<212> DNA
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Agentes de RNAi para infrarregulação de Aha 1

<220>
<223> ácido nucléico 5'-terminal é um nucleosídeo, isto é, base + açúcar mas
carecendo de 5'-fosfato

<220>
<221> base_modificada
<222> 1..19
<223> /base-mod = "base correspondente de 2'-hidróxi"

<400> 172
ucuuacaagu ggggauuuut t      21

<210> 173
<211> 21
<212> DNA
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Agentes de RNAi para infrarregulação de Aha 1

<220>
<223> ácido nucléico 5'-terminal é um nucleosídeo, isto é, base + açúcar mas
carecendo de 5'-fosfato

<220>
<221> base_modificada
<222> 1..19
<223> /base-mod = "base correspondente de 2'-hidróxi"

<400> 173
auccccaauu ugucugaugt t      21

<210> 174
<211> 21
<212> DNA
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Agentes de RNAi para infrarregulação de Aha 1

<220>

```

<223> ácido nucléico 5'-terminal é um nucleosídeo, isto é, base + açúcar mas carecendo de 5'-fosfato

```
<220>
<221> base_modificada
<222> 1..19
<223> /base-mod = "base correspondente de 2'-hidróxi"

<400> 174
caucagacaa auuggggaut t      21
```

```
<210> 175
<211> 21
<212> DNA
<213> Sequência artificial
```

```
<220>
<223> Agentes de RNAi para infrarregulação de Aha 1
```

<220>

<223> ácido nucléico 5'-terminal é um nucleosídeo, isto é, base + açúcar mas carecendo de 5'-fosfato

```
<220>
<221> base_modificada
<222> 1..19
<223> /base-mod = "base correspondente de 2'-hidróxi"

<400> 175
ucaaaaaucc cacuuguaat t      21
```

```
<210> 176
<211> 21
<212> DNA
<213> Sequência artificial
```

```
<220>
<223> Agentes de RNAi para infrarregulação de Aha 1
```

<220>

<223> ácido nucléico 5'-terminal é um nucleosídeo, isto é, base + açúcar mas carecendo de 5'-fosfato

```
<220>
<221> base_modificada
<222> 1..19
<223> /base-mod = "base correspondente de 2'-hidróxi"

<400> 176
uuacaagg ug ggauuuugat t      21
```

```
<210> 177
<211> 21
<212> DNA
<213> Sequência artificial
```

```
<220>
<223> Agentes de RNAi para infrarregulação de Aha 1
```

<220>

<223> ácido nucléico 5'-terminal é um nucleosídeo, isto é, base + açúcar mas carecendo de 5'-fosfato

<220>

```
<221> base_modificada
<222> 1..19
<223> /base-mod = "base correspondente de 2'-hidróxi"

<400> 177
aaauccccac uuguaagaut t      21

<210> 178
<211> 21
<212> DNA
<213> Sequência artificial

<220>
<223> ácido nucléico 5'-terminal é um nucleosídeo, isto é, base + açúcar mas
carecendo de 5'-fosfato

<220>
<221> base_modificada
<222> 1..19
<223> /base-mod = "base correspondente de 2'-hidróxi"

<400> 178
aucuuacaaag ugggauuut t      21

<210> 179
<211> 21
<212> DNA
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Agentes de RNAi para infrarregulação de Aha 1

<220>
<223> ácido nucléico 5'-terminal é um nucleosídeo, isto é, base + açúcar mas
carecendo de 5'-fosfato

<220>
<221> base_modificada
<222> 1..19
<223> /base-mod = "base correspondente de 2'-hidróxi"

<400> 179
uccccaauuu gucugaugat t      21

<210> 180
<211> 21
<212> DNA
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Agentes de RNAi para infrarregulação de Aha 1

<220>
<223> ácido nucléico 5'-terminal é um nucleosídeo, isto é, base + açúcar mas
carecendo de 5'-fosfato

<220>
<221> base_modificada
<222> 1..19
<223> /base-mod = "base correspondente de 2'-hidróxi"
```

```

<400> 180
ucaucagaca aauuggggat t      21

<210> 181
<211> 21
<212> DNA
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Agentes de RNAi para infrarregulação de Aha 1

<220>
<223> ácido nucléico 5'-terminal é um nucleosídeo, isto é, base + açúcar mas
carecendo de 5'-fosfato

<220>
<221> base_modificada
<222> 1..19
<223> /base-mod = "base correspondente de 2'-hidróxi"

<400> 181
auggccaagu ggggugaggt t      21

<210> 182
<211> 21
<212> DNA
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Agentes de RNAi para infrarregulação de Aha 1

<220>
<223> ácido nucléico 5'-terminal é um nucleosídeo, isto é, base + açúcar mas
carecendo de 5'-fosfato

<220>
<221> base_modificada
<222> 1..19
<223> /base-mod = "base correspondente de 2'-hidróxi"

<400> 182
ccucacccca cuuggccaut t      21

<210> 183
<211> 21
<212> DNA
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Agentes de RNAi para infrarregulação de Aha 1

<220>
<223> ácido nucléico 5'-terminal é um nucleosídeo, isto é, base + açúcar mas
carecendo de 5'-fosfato

<220>
<221> base_modificada
<222> 1..19
<223> /base-mod = "base correspondente de 2'-hidróxi"

<400> 183
ggagucaaaa uccccacuut t      21

```

```

<210> 184
<211> 21
<212> DNA
<213> Sequência artificial

<220>
<223> Agentes de RNAi para infrarregulação de Aha 1

<220>
<223> ácido nucléico 5'-terminal é um nucleosídeo, isto é, base + açúcar mas
carecendo de 5'-fosfato

<220>
<221> base_modificada
<222> 1..19
<223> /base-mod = "base correspondente de 2'-hidróxi"

<400> 184
aaguggggau uuugacucct t          21

<210> 185
<211> 45
<212> DNA
<213> Sequência artificial

<220>
<223> sequência de sonda de bDNA usada para quantificação de Ahal de Homo sapiens

<400> 185
gatgtaaatt cccatttgctt ctctttttc tcttgaaag aaagt    45

<210> 186
<211> 43
<212> DNA
<213> Sequência artificial

<220>
<223> sequência de sonda de bDNA usada para quantificação de Ahal de Homo sapiens

<400> 186
tgaactctgt tttgagggtg ctttttctc ttggaaagaa agt      43

<210> 187
<211> 46
<212> DNA
<213> Sequência artificial

<220>
<223> sequência de sonda de bDNA usada para quantificação de Ahal de Homo sapiens

<400> 187
gggtctactg actctccatt cattgtttt ctcttgaaa gaaagt  46

<210> 188
<211> 41
<212> DNA
<213> Sequência artificial

<220>
<223> sequência de sonda de bDNA usada para quantificação de Ahal de Homo sapiens

<400> 188
ccttgcgctc ctcagtttc ttttctctt ggaaagaaag t          41

```

<210> 189  
<211> 44  
<212> DNA  
<213> Sequência artificial

<220>  
<223> sequência de sonda de bDNA usada para quantificação de Ahal de Homo sapiens

<400> 189  
ggttttgaa ggaggcaggct tagttttct cttggaaaga aagt 44

<210> 190  
<211> 47  
<212> DNA  
<213> Sequência artificial

<220>  
<223> sequência de sonda de bDNA usada para quantificação de Ahal de Homo sapiens

<400> 190  
acgctgtttt catcagacaa attttttag gcataaggacc cgtgtct 47

<210> 191  
<211> 49  
<212> DNA  
<213> Sequência artificial

<220>  
<223> sequência de sonda de bDNA usada para quantificação de Ahal de Homo sapiens

<400> 191  
gctcacacta atctccactt catcctttt aggcatagga cccgtgtct 49

<210> 192  
<211> 46  
<212> DNA  
<213> Sequência artificial

<220>  
<223> sequência de sonda de bDNA usada para quantificação de Ahal de Homo sapiens

<400> 192  
tcattaaggc cacgagattt gtttttagg cataggaccc gtgtct 46

<210> 193  
<211> 45  
<212> DNA  
<213> Sequência artificial

<220>  
<223> sequência de sonda de bDNA usada para quantificação de Ahal de Homo sapiens

<400> 193  
taggtaagat catgccctgg gtttttaggc ataggacccg tgtct 45

<210> 194  
<211> 44  
<212> DNA  
<213> Sequência artificial

<220>  
<223> sequência de sonda de bDNA usada para quantificação de Ahal de Homo sapiens  
<400> 194  
actccaaacag gtctggcctg tttttaggca taggaccgt gtct 44

<210> 195  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Sequência artificial

<220>  
<223> sequência de sonda de bDNA usada para quantificação de Ahal de Homo sapiens  
<400> 195  
gtcaggctca tcttggcaa g 21

<210> 196  
<211> 23  
<212> DNA  
<213> Sequência artificial

<220>  
<223> sequência de sonda de bDNA usada para quantificação de Ahal de Homo sapiens  
<400> 196  
tagaagtttc accccttctt cct 23

<210> 197  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Sequência artificial

<220>  
<223> sequência de sonda de bDNA usada para quantificação de Ahal de Homo sapiens  
<400> 197  
agtgcgtggct gccccact 18

<210> 198  
<211> 39  
<212> DNA  
<213> Sequência artificial

<220>  
<223> sequência de sonda de bDNA usada para quantificação de Ahal de Mus musculus  
<400> 198  
ctcgaacggc caggaacattt tttctttgg aaagaaaagt 39

<210> 199  
<211> 44  
<212> DNA  
<213> Sequência artificial

<220>  
<223> sequência de sonda de bDNA usada para quantificação de Ahal de Mus musculus  
<400> 199  
gcacttgccc tcttcatttt ctattttct cttggaaaga aagt 44

<210> 200  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Sequência artificial

<220>  
<223> sequência de sonda de bDNA usada para quantificação de Ahal de *Mus musculus*

<400> 200  
ttgatggatg cctcccccatt ttttctcttg gaaagaaaagt 40

<210> 201  
<211> 44  
<212> DNA  
<213> Sequência artificial

<220>  
<223> sequência de sonda de bDNA usada para quantificação de Ahal de *Mus musculus*

<400> 201  
aactctgtct tgagggtgct gatTTTTCT cttggaaaga aagt 44

<210> 202  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Sequência artificial

<220>  
<223> sequência de sonda de bDNA usada para quantificação de Ahal de *Mus musculus*

<400> 202  
tttggcctgg ctTTTGAAT ttttctcttg gaaagaaaagt 40

<210> 203  
<211> 49  
<212> DNA  
<213> Sequência artificial

<220>  
<223> sequência de sonda de bDNA usada para quantificação de Ahal de *Mus musculus*

<400> 203  
caagcttgtt cacttcggtc acctttttt aggcatagga cccgtgtct 49

<210> 204  
<211> 50  
<212> DNA  
<213> Sequência artificial

<220>  
<223> sequência de sonda de bDNA usada para quantificação de Ahal de *Mus musculus*

<400> 204  
cctgacttag aggtacctgt ccagTTTTT taggcataagg acccggtgtct 50

<210> 205  
<211> 52  
<212> DNA  
<213> Sequência artificial

<220>  
<223> sequência de sonda de bDNA usada para quantificação de Ahal de *Mus musculus*

<400> 205  
gatttccaca tgtccttgt actgcacttt tttaggcata ggaccgtgt ct 52

<210> 206  
<211> 45  
<212> DNA  
<213> Sequência artificial

<220>  
<223> sequência de sonda de bDNA usada para quantificação de Ahal de *Mus musculus*

<400> 206  
attttcatca gacaaattgg gtttttaggc ataggacccg tgtct 45

<210> 207  
<211> 46  
<212> DNA  
<213> Sequência artificial

<220>  
<223> sequência de sonda de bDNA usada para quantificação de Ahal de *Mus musculus*

<400> 207  
taatctccac ttcatccacg ctttttagg cataggaccc gtgtct 46

<210> 208  
<211> 44  
<212> DNA  
<213> Sequência artificial

<220>  
<223> sequência de sonda de bDNA usada para quantificação de Ahal de *Mus musculus*

<400> 208  
tttcaccccg tcttccttca tttttaggca taggacccgt gtct 44

<210> 209  
<211> 51  
<212> DNA  
<213> Sequência artificial

<220>  
<223> sequência de sonda de bDNA usada para quantificação de Ahal de *Mus musculus*

<400> 209  
actgtggcca agatcatgcc ctgagttttt ttaggcata gaccgtgtc t 51

<210> 210  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Sequência artificial

<220>  
<223> sequência de sonda de bDNA usada para quantificação de Ahal de *Mus musculus*

<400> 210  
aagataagt tgcccttcct gtgt 24

<210> 211  
<211> 25

<212> DNA  
<213> Sequência artificial

<220>  
<223> sequência de sonda de bDNA usada para quantificação de Ahal de *Mus musculus*

<400> 211  
cagtttgatg gtccactcat agaag 25

<210> 212  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Sequência artificial

<220>  
<223> sequência de sonda de bDNA usada para quantificação de Ahal de *Mus musculus*

<400> 212  
catcttggc aaggctcaca c 21

<210> 213  
<211> 27  
<212> DNA  
<213> Sequência artificial

<220>  
<223> sequência de sonda de bDNA usada para quantificação de Ahal de *Mus musculus*

<400> 213  
ttaaggccac gagatttgtg tcaggct 27

<210> 214  
<211> 27  
<212> DNA  
<213> Sequência artificial

<220>  
<223> sequência de sonda de bDNA usada para quantificação de Ahal de *Mus musculus*

<400> 214  
gtaaattccc actgcttctc tcagaag 27

<210> 215  
<211> 25  
<212> DNA  
<213> Sequência artificial

<220>  
<223> sequência de sonda de bDNA usada para quantificação de Ahal de *Mus musculus*

<400> 215  
caactggatct actgactctc cattc 25

<210> 216  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Sequência artificial

<220>  
<223> sequência de sonda de bDNA usada para quantificação de Ahal de *Mus musculus*

<400> 216  
ctcagtgctt agtgctggct ggcc 24

<210> 217  
<211> 23  
<212> DNA  
<213> Sequência artificial  
  
<220>  
<223> sequência de sonda de bDNA usada para quantificação de Ahal de *Mus musculus*  
  
<400> 217  
ggagcagact tagccttgca agt 23

## REIVINDICAÇÕES

1. Ácido ribonucléico bifilamentar (dsRNA) para inibir a expressão de um gene Aha humano em uma célula, em que o dito dsRNA compreende pelo menos duas sequências que são complementares uma à outra  
5 e em que um filamento de sentido compreende uma primeira sequência e um filamento de antisentido compreende uma segunda sequência compreendendo uma região de complementaridade que é substancialmente complementar a pelo menos uma parte de um mRNA que codifica um gene Aha e em que a dita região de complementaridade é menos de 30 nucleotídeos  
10 em comprimento e em que o dsRNA realiza clivagem de um mRNA que codifica um gene Aha dentro da sequência alvo de um segundo dsRNA tendo um filamento de sentido selecionado do grupo de SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 73,  
15 SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 89, SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 93, SEQ ID NO: 95, SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 99, SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 105, SEQ ID NO: 107, SEQ ID NO:  
20 109, SEQ ID NO: 111, SEQ ID NO: 113, SEQ ID NO: 115, SEQ ID NO: 117, SEQ ID NO: 119, SEQ ID NO: 121, SEQ ID NO: 123, SEQ ID NO: 125, SEQ ID NO: 127, SEQ ID NO: 129, SEQ ID NO: 131, SEQ ID NO: 133, SEQ ID NO: 135, SEQ ID NO: 137, SEQ ID NO: 139, SEQ ID NO: 141, SEQ ID NO:  
25 143, SEQ ID NO: 145, SEQ ID NO: 147, SEQ ID NO: 149, SEQ ID NO: 151, SEQ ID NO: 153, SEQ ID NO: 155, SEQ ID NO: 157, SEQ ID NO: 159, SEQ ID NO: 163, SEQ ID NO: 165, SEQ ID NO: 167, SEQ ID NO: 169, SEQ ID NO: 171, SEQ ID NO: 173, SEQ ID NO: 175, SEQ ID NO: 177, SEQ ID NO:  
30 179, SEQ ID NO: 181, e SEQ ID NO: 183, e um filamento de antisentido

complementar ao último filamento de sentido e selecionado do grupo de SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 78, SEQ ID NO: 80, SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 90, SEQ ID NO: 92, SEQ ID NO: 94, SEQ ID NO: 96, SEQ ID NO: 98, SEQ ID NO: 100, SEQ ID NO: 102, SEQ ID NO: 104, SEQ ID NO: 106, SEQ ID NO: 108, SEQ ID NO: 110, SEQ ID NO: 112, SEQ ID NO: 114, SEQ ID NO: 116, SEQ ID NO: 118, SEQ ID NO: 120, SEQ ID NO: 122, SEQ ID NO: 124, SEQ ID NO: 126, SEQ ID NO: 128, SEQ ID NO: 130, SEQ ID NO: 132, SEQ ID NO: 134, SEQ ID NO: 136, SEQ ID NO: 138, SEQ ID NO: 140, SEQ ID NO: 142, SEQ ID NO: 144, SEQ ID NO: 146, SEQ ID NO: 148, SEQ ID NO: 150, SEQ ID NO: 152, SEQ ID NO: 154, SEQ ID NO: 156, SEQ ID NO: 158, SEQ ID NO: 160, SEQ ID NO: 164, SEQ ID NO: 166, SEQ ID NO: 168, SEQ ID NO: 170, SEQ ID NO: 172, SEQ ID NO: 174, SEQ ID NO: 176, SEQ ID NO: 178, SEQ ID NO: 180, SEQ ID NO: 182, e SEQ ID NO: 184.

2. dsRNA de acordo com a reivindicação 1, em que o dito gene Aha é um gene Aha1, e preferivelmente um gene Aha1 de *Homo sapiens*.

3. dsRNA de acordo com a reivindicação 1 ou 2, em que, sob contato com uma célula que expressa o dito gene Aha, o dsRNA inibe expressão do dito gene Aha na dita célula por pelo menos 20%.

4. dsRNA de acordo com a reivindicação 3, em que a dita inibição de pelo menos 20% da expressão de um gene Aha é realizada em células de HeLa e/ou MLE12.

30 5. dsRNA de qualquer uma das reivindicações precedentes, em que o dsRNA é selecionado do grupo de AL-DP-7301, AL-DP-7308, AL-DP-7318, AL-DP-7320, AL-DP-7322, AL-DP-7324, AL-DP-7325, AL-DP-7326,

AL-DP-7327, AL-DP-7329, AL-DP-7331, AL-DP-7333, AL-DP-7340, AL-DP-7342, AL-DP-7303, AL-DP-7305, AL-DP-7307, AL-DP-7309, AL-DP-7316, e AL-DP-7337, AL-DP-7304, AL-DP-7312, AL-DP-7339, AL-DP-7344, AL-DP-7306, AL-DP-7317, AL-DP-7346, AL-DP-7310, AL-DP-7323, AL-DP-7335,

5 AL-DP-7338, AL-DP-7341, AL-DP-7302, AL-DP-7315, AL-DP-7328, AL-DP-7330, AL-DP-7336, AL-DP-7345, AL-DP-9250, AL-DP-9251, AL-DP-9252, AL-DP-9253, AL-DP-9254, AL-DP-9255, AL-DP-9256, AL-DP-9257, AL-DP-9258, AL-DP-9259, AL-DP-9260, AL-DP-9261, AL-DP-9262, AL-DP-9263, AL-DP-9264, AL-DP-9265, AL-DP-9266, AL-DP-9267, AL-DP-9268, AL-DP-

10 9269, AL-DP-9270, AL-DP-9271, AL-DP-9272, AL-DP-9273, AL-DP-9274, AL-DP-9275, AL-DP-9276, AL-DP-9277, AL-DP-9279, AL-DP-9280, AL-DP-9281, AL-DP-9282, AL-DP-9283, AL-DP-9284, AL-DP-9285, AL-DP-9286, AL-DP-9287, AL-DP-9288, e AL-DP-9289.

6. dsRNA de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, em que o dito dsRNA compreende pelo menos um nucleotídeo modificado.

7. dsRNA de acordo com a reivindicação 6, em que o dito nucleotídeo modificado é selecionado do grupo de: um nucleotídeo de 2'-O-metila modificada, um nucleotídeo compreendendo um grupo 5'-fosforotioato, e um nucleotídeo terminal ligado a um derivado de colesterol ou grupo bisdecilamida de ácido dodecanóico.

8. dsRNA de acordo com a reivindicação 6, em que o dito nucleotídeo modificado é selecionado do grupo de: um nucleotídeo 2'-deóxi-2'-flúor modificado, um nucleotídeo 2'-deóxi-modificado, um nucleotídeo travado, um nucleotídeo abásico, nucleotídeo 2'-amino-modificado, nucleotídeo 2'-alquil-modificado, nucleotídeo de morfolino, um fosforamidato, e um nucleotídeo compreendendo base não-natural.

9. Célula compreendendo o dsRNA de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes.

30 10. Composição farmacêutica para inibir a expressão de um gene Aha em um organismo, compreendendo um dsRNA e um veículo farmacologicamente aceitável, em que o dsRNA compreende pelo menos duas se-

quências que são complementares uma à outra e em que um filamento de sentido compreende uma primeira sequência e um filamento de antisentido compreende uma segunda sequência compreendendo uma região de complementaridade que é substancialmente complementar a pelo menos uma parte de um mRNA que codifica um gene Aha, e em que a dita região de complementaridade é menos de 30 nucleotídeos em comprimento, e em que o dsRNA realiza clivagem de um mRNA que codifica um gene Aha dentro da sequência alvo de um segundo dsRNA tendo um filamento de sentido selecionado do grupo de SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 89, SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 93, SEQ ID NO: 95, SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 99, SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 105, SEQ ID NO: 107, SEQ ID NO: 109, SEQ ID NO: 111, SEQ ID NO: 113, SEQ ID NO: 115, SEQ ID NO: 117, SEQ ID NO: 119, SEQ ID NO: 121, SEQ ID NO: 123, SEQ ID NO: 125, SEQ ID NO: 127, SEQ ID NO: 129, SEQ ID NO: 131, SEQ ID NO: 133, SEQ ID NO: 135, SEQ ID NO: 137, SEQ ID NO: 139, SEQ ID NO: 141, SEQ ID NO: 143, SEQ ID NO: 145, SEQ ID NO: 147, SEQ ID NO: 149, SEQ ID NO: 151, SEQ ID NO: 153, SEQ ID NO: 155, SEQ ID NO: 157, SEQ ID NO: 159, SEQ ID NO: 163, SEQ ID NO: 165, SEQ ID NO: 167, SEQ ID NO: 169, SEQ ID NO: 171, SEQ ID NO: 173, SEQ ID NO: 175, SEQ ID NO: 177, SEQ ID NO: 179, SEQ ID NO: 181, e SEQ ID NO: 183, e um filamento de antisentido complementar ao último filamento de sentido e selecionado do grupo de SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 28, SEQ ID

NO: 30, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 78, SEQ ID NO: 80, SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 90, SEQ ID NO: 92, SEQ ID NO: 94, SEQ ID NO: 96, SEQ ID NO: 98, SEQ ID NO: 100, SEQ ID NO: 102, SEQ ID NO: 104, SEQ ID NO: 106, SEQ ID NO: 108, SEQ ID NO: 110, SEQ ID NO: 112, SEQ ID NO: 114, SEQ ID NO: 116, SEQ ID NO: 118, SEQ ID NO: 120, SEQ ID NO: 122, SEQ ID NO: 124, SEQ ID NO: 126, SEQ ID NO: 128, SEQ ID NO: 130, SEQ ID NO: 132, SEQ ID NO: 134, SEQ ID NO: 136, SEQ ID NO: 138, SEQ ID NO: 140, SEQ ID NO: 142, SEQ ID NO: 144, SEQ ID NO: 146, SEQ ID NO: 148, SEQ ID NO: 150, SEQ ID NO: 152, SEQ ID NO: 154, SEQ ID NO: 156, SEQ ID NO: 158, SEQ ID NO: 160, SEQ ID NO: 164, SEQ ID NO: 166, SEQ ID NO: 168, SEQ ID NO: 170, SEQ ID NO: 172, SEQ ID NO: 174, SEQ ID NO: 176, SEQ ID NO: 178, SEQ ID NO: 180, SEQ ID NO: 182, e SEQ ID NO: 184.

11. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 10, em que o dito gene Aha é um gene Aha1, e preferivelmente um gene Aha1 de Homo sapiens.

12. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 10 ou 11, em que, sob contato com uma célula que expressa o dito gene Aha, o dsRNA inibe expressão do dito gene Aha na dita célula por pelo menos 20%.

13. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 12, em que a dita inibição de pelo menos 20% da expressão de um gene Aha é realizada em células de HeLa e/ou MLE12.

14. Composição farmacêutica de qualquer uma das reivindicações 10 a 13, em que o dsRNA é selecionado do grupo de AL-DP-7301, AL-DP-7308, AL-DP-7318, AL-DP-7320, AL-DP-7322, AL-DP-7324, AL-DP-7325, AL-DP-7326, AL-DP-7327, AL-DP-7329, AL-DP-7331, AL-DP-7333,

AL-DP-7340, AL-DP-7342, AL-DP-7303, AL-DP-7305, AL-DP-7307, AL-DP-7309, AL-DP-7316, AL-DP-7337, AL-DP-7304, AL-DP-7312, AL-DP-7339, AL-DP-7344, AL-DP-7306, AL-DP-7317, AL-DP-7346, AL-DP-7310, AL-DP-7323, AL-DP-7335, AL-DP-7338, AL-DP-7341, AL-DP-7302, AL-DP-7315,  
5 AL-DP-7328, AL-DP-7330, AL-DP-7336, AL-DP-7345, AL-DP-9250, AL-DP-9251, AL-DP-9252, AL-DP-9253, AL-DP-9254, AL-DP-9255, AL-DP-9256, AL-DP-9257, AL-DP-9258, AL-DP-9259, AL-DP-9260, AL-DP-9261, AL-DP-9262, AL-DP-9263, AL-DP-9264, AL-DP-9265, AL-DP-9266, AL-DP-9267, AL-DP-9268, AL-DP-9269, AL-DP-9270, AL-DP-9271, AL-DP-9272, AL-DP-  
10 9273, AL-DP-9274, AL-DP-9275, AL-DP-9276, AL-DP-9277, AL-DP-9279, AL-DP-9280, AL-DP-9281, AL-DP-9282, AL-DP-9283, AL-DP-9284, AL-DP-9285, AL-DP-9286, AL-DP-9287, AL-DP-9288, e AL-DP-9289.

15. Composição farmacêutica de qualquer uma das reivindicações 10 a 14, em que o dito dsRNA compreende pelo menos um nucleotídeo modificado.

16. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 15, em que o dito nucleotídeo modificado é selecionado do grupo de: um nucleotídeo de 2'-O-metil modificado, um nucleotídeo compreendendo um grupo 5'-fosforotioato, e um nucleotídeo terminal ligado a um derivado de colesterila ou grupo bisdecilamida de ácido dodecanóico.

17. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 15, em que o dito nucleotídeo modificado é selecionado do grupo de: um nucleotídeo 2'-deóxi-2'-flúor modificado, um nucleotídeo 2'-deóxi-modificado, um nucleotídeo travado, um nucleotídeo abásico, nucleotídeo 2'-amino-modificado, nucleotídeo 2'-alquil-modificado, nucleotídeo de morfolino, um fosforamidato, e um nucleotídeo compreendendo base não-natural.

25 18. Método para inibir a expressão de um gene Aha em uma célula, o método compreendendo:

(a) introduzir na célula um ácido ribonucléico bifilamentar (dsRNA), em que o dsRNA compreende pelo menos duas sequências que são complementares uma à outra e em que um filamento de sentido compreende uma primeira sequência e um filamento de antisentido compreende

uma segunda sequência compreendendo uma região de complementaridade que é substancialmente complementar a pelo menos uma parte de um mRNA que codifica Aha1, e em que a dita região de complementaridade é menos de 30 nucleotídeos em comprimento e em que o dsRNA realiza clivagem de um mRNA que codifica um gene Aha dentro da sequência alvo de um segundo dsRNA tendo um filamento de sentido selecionado do grupo de SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 89, SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 93, SEQ ID NO: 95, SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 99, SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 105, SEQ ID NO: 107, SEQ ID NO: 109, SEQ ID NO: 111, SEQ ID NO: 113, SEQ ID NO: 115, SEQ ID NO: 117, SEQ ID NO: 119, SEQ ID NO: 121, SEQ ID NO: 123, SEQ ID NO: 125, SEQ ID NO: 127, SEQ ID NO: 129, SEQ ID NO: 131, SEQ ID NO: 133, SEQ ID NO: 135, SEQ ID NO: 137, SEQ ID NO: 139, SEQ ID NO: 141, SEQ ID NO: 143, SEQ ID NO: 145, SEQ ID NO: 147, SEQ ID NO: 149, SEQ ID NO: 151, SEQ ID NO: 153, SEQ ID NO: 155, SEQ ID NO: 157, SEQ ID NO: 159, SEQ ID NO: 163, SEQ ID NO: 165, SEQ ID NO: 167, SEQ ID NO: 169, SEQ ID NO: 171, SEQ ID NO: 173, SEQ ID NO: 175, SEQ ID NO: 177, SEQ ID NO: 179, SEQ ID NO: 181, e SEQ ID NO: 183, e um filamento de antisentido complementar ao último filamento de sentido e selecionado do grupo de SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 50, SEQ ID

NO: 52, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 78, SEQ ID NO: 80, SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO: 86, SEQ ID  
5 NO: 88, SEQ ID NO: 90, SEQ ID NO: 92, SEQ ID NO: 94, SEQ ID NO: 96, SEQ ID NO: 98, SEQ ID NO: 100, SEQ ID NO: 102, SEQ ID NO: 104, SEQ ID NO: 106, SEQ ID NO: 108, SEQ ID NO: 110, SEQ ID NO: 112, SEQ ID NO: 114, SEQ ID NO: 116, SEQ ID NO: 118, SEQ ID NO: 120, SEQ ID NO: 122, SEQ ID NO: 124, SEQ ID NO: 126, SEQ ID NO: 128, SEQ ID NO: 130,  
10 SEQ ID NO: 132, SEQ ID NO: 134, SEQ ID NO: 136, SEQ ID NO: 138, SEQ ID NO: 140, SEQ ID NO: 142, SEQ ID NO: 144, SEQ ID NO: 146, SEQ ID NO: 148, SEQ ID NO: 150, SEQ ID NO: 152, SEQ ID NO: 154, SEQ ID NO: 156, SEQ ID NO: 158, SEQ ID NO: 160, SEQ ID NO: 164, SEQ ID NO: 166, SEQ ID NO: 168, SEQ ID NO: 170, SEQ ID NO: 172, SEQ ID NO: 174, SEQ  
15 ID NO: 176, SEQ ID NO: 178, SEQ ID NO: 180, SEQ ID NO: 182, e SEQ ID NO: 184; e

(b) manter a célula produzida na etapa (a) durante um tempo suficiente para obter degradação da transcrição de mRNA de um gene Aha; assim inibindo a expressão de um gene Aha na célula.

20 19. Método de acordo com a reivindicação 18, em que o gene é um gene Aha1, e preferivelmente um gene Aha1 de Homo sapiens.

20 20. Método de acordo com a reivindicação 18 ou 19, em que o dsRNA é selecionado do grupo de AL-DP-7301, AL-DP-7308, AL-DP-7318, AL-DP-7320, AL-DP-7322, AL-DP-7324, AL-DP-7325, AL-DP-7326, AL-DP-  
25 7327, AL-DP-7329, AL-DP-7331, AL-DP-7333, AL-DP-7340, AL-DP-7342, AL-DP-7303, AL-DP-7305, AL-DP-7307, AL-DP-7309, AL-DP-7316, e AL-DP-7337, AL-DP-7304, AL-DP-7312, AL-DP-7339, AL-DP-7344, AL-DP-7306, AL-DP-7317, AL-DP-7346, AL-DP-7310, AL-DP-7323, AL-DP-7335, AL-DP-7338, AL-DP-7341, AL-DP-7302, AL-DP-7315, AL-DP-7328, AL-DP-  
30 7330, AL-DP-7336, AL-DP-7345, AL-DP-9250, AL-DP-9251, AL-DP-9252, AL-DP-9253, AL-DP-9254, AL-DP-9255, AL-DP-9256, AL-DP-9257, AL-DP-9258, AL-DP-9259, AL-DP-9260, AL-DP-9261, AL-DP-9262, AL-DP-9263,

AL-DP-9264, AL-DP-9265, AL-DP-9266, AL-DP-9267, AL-DP-9268, AL-DP-9269, AL-DP-9270, AL-DP-9271, AL-DP-9272, AL-DP-9273, AL-DP-9274, AL-DP-9275, AL-DP-9276, AL-DP-9277, AL-DP-9279, AL-DP-9280, AL-DP-9281, AL-DP-9282, AL-DP-9283, AL-DP-9284, AL-DP-9285, AL-DP-9286,

5 AL-DP-9287, AL-DP-9288, e AL-DP-9289.

21. Método de qualquer uma das reivindicações 18 a 20, em que o método é executado *in vitro*.

22. Método de tratar, prevenir ou controlar processos patológicos mediados por expressão de Aha compreendendo administrar a um pa-

10 paciente em necessidade de tal tratamento, prevenção ou gerenciamento uma quantidade terapêutica ou profilaticamente eficaz de um dsRNA, em que o dsRNA compreende pelo menos duas sequências que são complementares uma à outra e em que um filamento de sentido compreende uma primeira se-

15 quência compreendendo uma região de complementaridade que é substancialmente complementar a pelo menos uma parte de um mRNA que codifica Aha1, e em que a dita região de complementaridade é menos de 30 nucleotídeos em comprimento e em que o dsRNA realiza clivagem de um mRNA que codifica um gene Aha dentro da sequência alvo de um segundo dsRNA

20 tendo um filamento de sentido selecionado do grupo de SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 55,

25 SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 89, SEQ ID NO: 91,

30 SEQ ID NO: 93, SEQ ID NO: 95, SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 99, SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 105, SEQ ID NO: 107, SEQ ID NO: 109, SEQ ID NO: 111, SEQ ID NO: 113, SEQ ID NO: 115, SEQ ID NO: 117,

SEQ ID NO: 119, SEQ ID NO: 121, SEQ ID NO: 123, SEQ ID NO: 125, SEQ ID NO: 127, SEQ ID NO: 129, SEQ ID NO: 131, SEQ ID NO: 133, SEQ ID NO: 135, SEQ ID NO: 137, SEQ ID NO: 139, SEQ ID NO: 141, SEQ ID NO: 143, SEQ ID NO: 145, SEQ ID NO: 147, SEQ ID NO: 149, SEQ ID NO: 151,

5 SEQ ID NO: 153, SEQ ID NO: 155, SEQ ID NO: 157, SEQ ID NO: 159, SEQ ID NO: 163, SEQ ID NO: 165, SEQ ID NO: 167, SEQ ID NO: 169, SEQ ID NO: 171, SEQ ID NO: 173, SEQ ID NO: 175, SEQ ID NO: 177, SEQ ID NO: 179, SEQ ID NO: 181, e SEQ ID NO: 183, e um filamento de antisentido complementar ao último filamento de sentido e selecionado do grupo de  
10 SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO:  
15 54, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 78, SEQ ID NO: 80, SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 90, SEQ ID NO: 92, SEQ ID NO: 94, SEQ ID NO: 96, SEQ ID NO: 98, SEQ  
20 ID NO: 100, SEQ ID NO: 102, SEQ ID NO: 104, SEQ ID NO: 106, SEQ ID NO: 108, SEQ ID NO: 110, SEQ ID NO: 112, SEQ ID NO: 114, SEQ ID NO: 116, SEQ ID NO: 118, SEQ ID NO: 120, SEQ ID NO: 122, SEQ ID NO: 124, SEQ ID NO: 126, SEQ ID NO: 128, SEQ ID NO: 130, SEQ ID NO: 132, SEQ ID NO: 134, SEQ ID NO: 136, SEQ ID NO: 138, SEQ ID NO: 140, SEQ ID NO:  
25 142, SEQ ID NO: 144, SEQ ID NO: 146, SEQ ID NO: 148, SEQ ID NO: 150, SEQ ID NO: 152, SEQ ID NO: 154, SEQ ID NO: 156, SEQ ID NO: 158, SEQ ID NO: 160, SEQ ID NO: 164, SEQ ID NO: 166, SEQ ID NO: 168, SEQ ID NO: 170, SEQ ID NO: 172, SEQ ID NO: 174, SEQ ID NO: 176, SEQ ID NO: 178, SEQ ID NO: 180, SEQ ID NO: 182, e SEQ ID NO: 184.

30 23. Método de acordo com a reivindicação 22, em que o dsRNA é selecionado do grupo de AL-DP-7301, AL-DP-7308, AL-DP-7318, AL-DP-7320, AL-DP-7322, AL-DP-7324, AL-DP-7325, AL-DP-7326, AL-DP-7327,

AL-DP-7329, AL-DP-7331, AL-DP-7333, AL-DP-7340, AL-DP-7342, AL-DP-7303, AL-DP-7305, AL-DP-7307, AL-DP-7309, AL-DP-7316, e AL-DP-7337, AL-DP-7304, AL-DP-7312, AL-DP-7339, AL-DP-7344, AL-DP-7306, AL-DP-7317, AL-DP-7346, AL-DP-7310, AL-DP-7323, AL-DP-7335, AL-DP-7338,

5 AL-DP-7341, AL-DP-7302, AL-DP-7315, AL-DP-7328, AL-DP-7330, AL-DP-7336, AL-DP-7345, AL-DP-9250, AL-DP-9251, AL-DP-9252, AL-DP-9253, AL-DP-9254, AL-DP-9255, AL-DP-9256, AL-DP-9257, AL-DP-9258, AL-DP-9259, AL-DP-9260, AL-DP-9261, AL-DP-9262, AL-DP-9263, AL-DP-9264, AL-DP-9265, AL-DP-9266, AL-DP-9267, AL-DP-9268, AL-DP-9269, AL-DP-

10 9270, AL-DP-9271, AL-DP-9272, AL-DP-9273, AL-DP-9274, AL-DP-9275, AL-DP-9276, AL-DP-9277, AL-DP-9279, AL-DP-9280, AL-DP-9281, AL-DP-9282, AL-DP-9283, AL-DP-9284, AL-DP-9285, AL-DP-9286, AL-DP-9287, AL-DP-9288, e AL-DP-9289.

24. Vetor para inibir a expressão de um gene Aha em uma célula, o dito vetor compreendendo uma sequência reguladora operavelmente ligada a uma sequência de nucleotídeo que codifica pelo menos um filamento de um dsRNA, em que um dos filamentos do dito dsRNA é substancialmente complementar a pelo menos uma parte de um mRNA que codifica Aha1 e em que o dito dsRNA é menos de 30 pares de base em comprimento e em que o dsRNA realiza clivagem de um mRNA que codifica um gene Aha dentro da sequência alvo de um segundo dsRNA tendo um filamento de sentido selecionado do grupo de SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 89, SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 93, SEQ ID NO: 95, SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 99, SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 103,

SEQ ID NO: 105, SEQ ID NO: 107, SEQ ID NO: 109, SEQ ID NO: 111, SEQ ID NO: 113, SEQ ID NO: 115, SEQ ID NO: 117, SEQ ID NO: 119, SEQ ID NO: 121, SEQ ID NO: 123, SEQ ID NO: 125, SEQ ID NO: 127, SEQ ID NO: 129, SEQ ID NO: 131, SEQ ID NO: 133, SEQ ID NO: 135, SEQ ID NO: 137,  
5 SEQ ID NO: 139, SEQ ID NO: 141, SEQ ID NO: 143, SEQ ID NO: 145, SEQ ID NO: 147, SEQ ID NO: 149, SEQ ID NO: 151, SEQ ID NO: 153, SEQ ID NO: 155, SEQ ID NO: 157, SEQ ID NO: 159, SEQ ID NO: 163, SEQ ID NO: 165, SEQ ID NO: 167, SEQ ID NO: 169, SEQ ID NO: 171, SEQ ID NO: 173, SEQ ID NO: 175, SEQ ID NO: 177, SEQ ID NO: 179, SEQ ID NO: 181, e  
10 SEQ ID NO: 183, e um filamento de antisentido complementar ao último filamento de sentido e selecionado do grupo de SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 78, SEQ ID NO: 80, SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 84,  
15 SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 90, SEQ ID NO: 92, SEQ ID NO: 94, SEQ ID NO: 96, SEQ ID NO: 98, SEQ ID NO: 100, SEQ ID NO: 102, SEQ ID NO: 104, SEQ ID NO: 106, SEQ ID NO: 108, SEQ ID NO: 110, SEQ ID NO: 112, SEQ ID NO: 114, SEQ ID NO: 116, SEQ ID NO: 118, SEQ ID NO: 120, SEQ ID NO: 122, SEQ ID NO: 124, SEQ ID NO: 126, SEQ ID NO: 128, SEQ ID NO: 130, SEQ ID NO: 132, SEQ ID NO: 134, SEQ ID NO: 136, SEQ ID NO: 138, SEQ ID NO: 140, SEQ ID NO: 142, SEQ ID NO: 144, SEQ ID NO: 146, SEQ ID NO: 148, SEQ ID NO: 150, SEQ ID NO: 152, SEQ ID NO: 154, SEQ ID NO: 156, SEQ ID NO: 158, SEQ ID NO: 160, SEQ ID NO: 164, SEQ ID NO: 166, SEQ ID NO: 168, SEQ ID NO: 170, SEQ ID NO: 172,  
20 SEQ ID NO: 174, SEQ ID NO: 176, SEQ ID NO: 178, SEQ ID NO: 180, SEQ ID NO: 182, e SEQ ID NO: 184.

PI0712038-6

## RESUMO

### Patente de Invenção: "MODULAÇÃO DE RNAi DE Aha E USOS TERAPEUTICOS DO MESMO".

A presente presente invenção refere-se a um ácido ribonucléico bifilamentar (dsRNA) para inibir a expressão de um gene Aha (gene Aha1), compreendendo um filamento de antisentido tendo uma sequência de nucleotídeo que é menor que 30 nucleotídeos em comprimento, em geral 19-25 nucleotídeos em comprimento, e que é substancialmente complementar a pelo menos uma parte de um gene Aha. A invenção também refere-se a uma composição farmacêutica compreendendo o dsRNA junto com um veículo farmaceuticamente aceitável; métodos para tratar doenças causadas por expressão de Aha1 e a expressão de um gene Aha usando a composição farmacêutica; e métodos para inibir a expressão de um gene Aha em uma célula.