COMPOSICIONES DE ARNi CONTRA EL ANGIOTENSINÓGENO (AGT) Y MÉTODOS PARA SU USO

Solicitudes Relacionadas

Esta solicitud se relaciona con la Solicitud Provisional de los EE.UU. No. 62/671.094, presentada el 14 de mayo de 2018, la Solicitud Provisional de los EE.UU. No. 62/727.141, presentada el 5 de septiembre de 2018, y la Solicitud Provisional de los EE.UU. No. 62/816.996, presentada el 12 de marzo de 2019. Los contenidos completos de cada una de las solicitudes anteriores se incorporan a la presente a modo de referencia.

Listado de Secuencias

La presente solicitud contiene un Listado de Secuencias que se ha enviado en forma electrónica en formato ASCII y que se incorpora a la presente a modo de referencia en su totalidad. Dicha copia en ASCII, creada el 3 de mayo de 2019, se denomina 121301_08620_SL.txt y posee 272.488 bytes de tamaño.

Antecedentes de la Invención

El sistema de renina-angiotensina-aldosterona (RAAS) tiene un rol crucial en la regulación de la presión sanguínea. La cascada de RAAS comienza con la liberación del angiotensinógeno a partir del hígado, y de la renina mediante las células yuxtaglomerulares del riñón hacia la circulación. La secreción de renina es estimulada por varios factores, incluyendo la carga de Na+ del túbulo distal, la estimulación β-simpática o la perfusión renal reducida. La renina activa en el plasma escinde el angiotensinógeno (producido por el

hígado) a angiotensina I, que luego es convertida por la enzima convertidora de angiotensina (ACE), circulante o expresada localmente, a angiotensina II. La mayor parte de los efectos de la angiotensina II sobre el RAAS son ejercidos por su unión a los receptores de angiotensina II de tipo 1 (AT_1R), conduciendo a vasoconstricción arterial, efectos tubulares y glomerulares, tales como una mayor reabsorción de Na+ o la modulación de la tasa de filtración glomerular. Además, junto con otros estímulos tales como la adrenocorticotropina, la hormona antidiurética, las catecolaminas, la endotelina, la serotonina, y los niveles de Mg2+ y K+, la estimulación de los AT_1R conduce a la liberación de la aldosterona que, a su vez, promueve la excreción de Na+ y K+ en el túbulo renal contorneado distal.

La desregulación del RAAS que conduce, por ejemplo, a un exceso de producción de angiotensina II o de estimulación del AT_1R, resulta en hipertensión que puede conducir a, por ejemplo, mayor estrés oxidativo, promoción de inflamación, hipertrofia y fibrosis en el corazón, riñones, y arterias, y resulta, por ejemplo, en fibrosis ventricular izquierda, remodelación arterial, y glomeruloesclerosis.

La hipertensión es la enfermedad controlable más prevalente en los países desarrollados, afectando entre 20 y 50% de la población adulta. La hipertensión es un factor de riesgo mayor para diversas enfermedades, trastornos y condiciones tales como menor esperanza de vida, enfermedad renal crónica, accidente cerebrovascular, infarto de miocardio, insuficiencia cardiaca, aneurismas (por ejemplo aneurisma aórtico), enfermedad arterial periférica, daño cardiaco (por ejemplo, agrandamiento o hipertrofia cardiaca) y otras enfermedades, trastornos, o condiciones cardiovasculares relacionadas.

Además, se ha demostrado que la hipertensión es un importante factor de riesgo de morbilidad y mortalidad cardiovascular dando cuenta, o contribuyendo al 62% de todos los accidentes cerebrovasculares y al 49% de todos los casos de enfermedad cardiaca. En 2017, se desarrollaron cambios en las guías de diagnóstico, prevención y tratamiento de hipertensión proporcionando objetivos para bajar aún más la presión sanguínea para disminuir aún más el riesgo de desarrollo de enfermedades y trastornos asociados con la hipertensión (véase, por ejemplo, Reboussin y col. Systematic Review for the 2017 ACC/AHA/AAPA/ABC/ACPM/AGS/APhA/ASH/ASPC/NMA/PCNA Guideline for the Prevention, Detection, Evaluation, and Management of High Blood Pressure in Adults: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines. *J Am Coll Cardiol*. 2017 Nov 7. pii: S0735-1097(17)41517-8. doi: 10.1016/j.jacc.2017.11.004; y Whelton y col. (2017 ACC/AHA/AAPA/ABC/ACPM/AGS/APhA/ASH/ASPC/NMA/PCNA Guideline for the Prevention, Detection, Evaluation, and Management of High Blood Pressure in Adults: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines. *J Am Coll Cardiol.* 2017 Nov 7. pii: S0735-1097(17)41519-1. doi: 10.1016/j.jacc.2017.11.006).

A pesar del número de fármacos antihipertensivos disponibles para tratar la hipertensión, más de dos tercios de los sujetos no se pueden controlar con un agente anti-hipertensivo solo y requieren dos o más agentes anti-hipertensivos seleccionados entre las diferentes clases de fármacos. Esto reduce adicionalmente el número de sujetos con presión sanguínea controlada

debido a que se reduce la adherencia y se incrementan los efectos secundarios con el número creciente de medicaciones.

Síntesis de la invención

La presente invención provee composiciones de ARNi que afectan a la escisión de transcriptos de ARN mediante el complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC) de un gen que codifica para angiotensinógeno (AGT). El AGT puede estar dentro de una célula, por ejemplo, una célula dentro de un sujeto, tal como un sujeto humano.

En un aspecto, la invención provee un agente de ácido ribonucleico de hebra doble (ARNdh) para inhibir la expresión de angiotensinógeno (AGT), en donde el agente de ARNhd comprende una hebra sentido y una hebra antisentido que forman una región de hebra doble, en donde la hebra sentido comprende al menos 19 nucleótidos contiguos de la secuencia nucleotídica de cualquiera de los nucleótidos 635-658, 636-658, 642-667, 642-664, 645-667, 1248-1273, 1248-1272, 1248-1270, 1250-1272, 1251-1273, 1580-1602, 1584-1606, 1587-1609, 1601-1623, 1881-1903, 2074-2097, 2074-2096, 2075-2097, 2080-2102, 2272-2294, 2276-2298, 2281-2304, 2281-2303, o 2282-2304 de la SEQ ID NO:1 y la secuencia antisentido comprende al menos 19 nucleótidos contiguos de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO:2.

En determinadas formas de realización, la hebra sentido comprende al menos 21 nucleótidos contiguos de cualquiera de los nucleótidos 635-658, 636-658, 642-667, 642-664, 645-667, 1248-1273, 1248-1272, 1248-1270, 1250-1272, 1251-1273, 1580-1602, 1584-1606, 1587-1609, 1601-1623, 1881-1903, 2074-2097, 2074-2096, 2075-2097, 2080-2102, 2272-2294, 2276-2298, 2281-

2304, 2281-2303, o 2282-2304 de la SEQ ID NO:1. En determinadas formas de realización, la hebra antisentido comprende al menos 21 nucleótidos contiguos de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO:2.

En determinadas formas de realización, la hebra antisentido comprende al menos 19 nucleótidos contiguos de una cualquiera de las secuencias nucleotídicas de hebra antisentido de un dúplex que se selecciona del grupo que consiste en AD-85481, AD-84701, AD-84703, AD-84704, AD-84705, AD-84707, AD-84715, AD-84716, AD-84739, AD-84741, AD-84746, AD-85432, AD-85434, AD-85435, AD-85436, AD-85437, AD-85438, AD-85441, AD-85442, AD-85443, AD-85444, AD-85446, AD-85447, AD-85482, AD-85485, AD-85493, AD-85496, AD-85504, AD-85517, AD-85519, AD-85524, AD-85622, AD-85623, AD-85625, AD-85626, AD-85634, AD-85635, AD-85637, AD-85655, AD-126306, AD-126307, AD-126308, AD-126310, AD133360, AD-133361, AD-133362, AD-133374 y AD-133385. En determinadas formas de realización, la hebra sentido comprende al menos 19 nucleótidos contiguos de una cualquiera de las secuencias nucleotídicas de hebra sentido de un dúplex que se selecciona del grupo que consiste en AD-85481, AD-84701, AD-84703, AD-84704, AD-84705, AD-84707, AD-84715, AD-84716, AD-84739, AD-84741, AD-84746, AD-85432, AD-85434, AD-85435, AD-85436, AD-85437, AD-85438, AD-85441, AD-85442, AD-85443, AD-85444, AD-85446, AD-85447, AD-85482, AD-85485, AD-85493, AD-85496, AD-85504, AD-85517, AD-85519, AD-85524, AD-85622, AD-85623, AD-85625, AD-85626, AD-85634, AD-85635, AD-85637, AD-85655, AD-126306, AD-126307, AD-126308, AD-126310, AD133360, AD-133361, AD-133362, AD-133374 y AD-133385. En determinadas formas de realización, las hebra sentido y antisentido comprenden secuencias nucleotídicas de un dúplex que se

selecciona del grupo que consiste en AD-85481, AD-84701, AD-84703, AD-84704, AD-84705, AD-84707, AD-84715, AD-84716, AD-84739, AD-84741, AD-84746, AD-85432, AD-85434, AD-85435, AD-85436, AD-85437, AD-85438, AD-85441, AD-85442, AD-85443, AD-85444, AD-85446, AD-85447, AD-85482, AD-85485, AD-85493, AD-85496, AD-85504, AD-85517, AD-85519, AD-85524, AD-85622, AD-85623, AD-85625, AD-85626, AD-85634, AD-85635, AD-85637, AD-85655, AD-126306, AD-126307, AD-126308, AD-126310, AD133360, AD-133361, AD-133362, AD-133374 y AD-133385.

En determinadas formas de realización, la hebra antisentido comprende al menos 19 nucleótidos contiguos de la secuencia nucleotídica de la hebra antisentido de AD-85481 (5'-UGUACUCUCAUUGUGGAUGACGA-3' (SEQ ID NO: 9)). En determinadas formas de realización, la hebra sentido comprende al menos 19 nucleótidos contiguos de las secuencias nucleotídicas de la hebra sentido de AD-85481 (5'-GUCAUCCACAAUGAGAGUACA-3' (SEQ ID NO: 10)). En determinadas formas de realización, las hebra sentido y antisentido comprenden las secuencias nucleotídicas de las hebra sentido y antisentido de AD-85481 (5'-UGUACUCUCAUUGUGGAUGACGA-3' (SEQ ID NO: 9) y 5'-GUCAUCCACAAUGAGAGUACA-3' (SEQ ID NO: 10)).

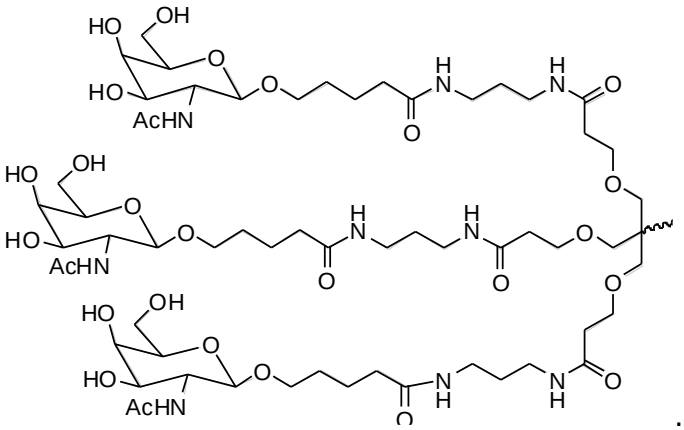
En determinadas formas de realización, el agente de ARNhd comprende al menos un nucleótido modificado. En determinadas formas de realización, sustancialmente todos los nucleótidos de la hebra sentido y sustancialmente todos los nucleótidos de la hebra antisentido comprenden una modificación. En determinadas formas de realización, todos los nucleótidos de la hebra sentido y todos los nucleótidos de la hebra antisentido comprenden una modificación. En determinadas formas de realización, al menos uno de los nucleótidos

modificados se selecciona a partir del grupo de un desoxinucleótido, un nucleótido de desoxitimina (dT) de extremo 3' terminal, un nucleótido con modificación 2'-O-metilo, un nucleótido con modificación 2'-flúor, un nucleótido con modificación 2'-desoxi, un nucleótido bloqueado, un nucleótido sin bloquear, un nucleótido con restricción conformacional, un etil nucleótido constreñido, un nucleótido abásico, un nucleótido con modificación 2'-amino, un nucleótido con modificación 2'-O-alilo, nucleótido con modificación 2'-C-alquilo, nucleótido con modificación 2'-hidroxilo, un nucleótido con modificación 2'-metoxietilo, un nucleótido con modificación 2'-O-alquilo, un nucleótido con morfolino, un fosforamidato, un nucleótido que comprende una base no natural, un nucleótido con modificación tetrahidropirano, un nucleótido con modificación 1,5-anhidrohexitol, un nucleótido con modificación ciclohexenilo, un nucleótido que comprende un grupo fosforotioato, un nucleótido que comprende un grupo metilfosfonato, un nucleótido que comprende un 5'-fosfato, un nucleótido que comprende un mimético de 5'-fosfato, un nucleótido de desestabilización térmica, un nucleótido con modificación glicólica (GNA), y un nucleótido con modificación 2-O-(N-metilacetamida); y combinaciones de los mismos. En determinadas formas de realización, las modificaciones en los nucleótidos se seleccionan del grupo que consiste en LNA, HNA, CeNA, 2′-metoxietilo, 2′-O-alquilo, 2′-O-alilo, 2′-C-alilo, 2′-flúor, 2′-desoxi, 2'-hidroxilo, GNA, y combinaciones de las mismas. En determinadas formas de realización, las modificaciones en los nucleótidos son 2′-O-metilo o 2′-flúor. En determinadas formas de realización, al menos uno de los nucleótidos modificados se selecciona del grupo que consiste en un desoxinucleótido, un nucleótido con modificación 2'-O-metilo, un nucleótido con modificación 2'-flúor, un nucleótido

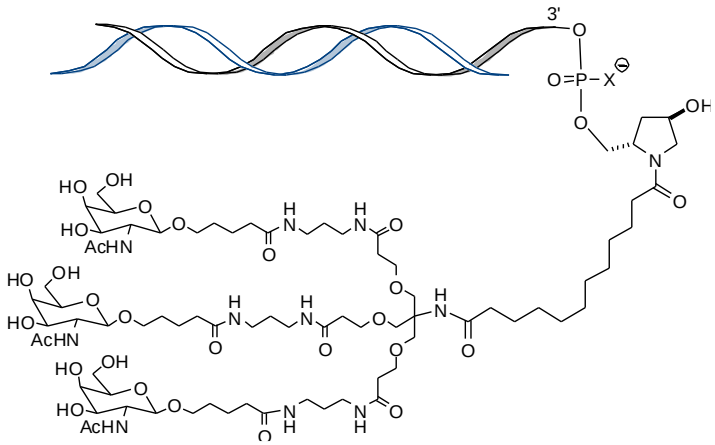
con modificación 2'-desoxi, un nucleótido con modificación glicólica (GNA), y un nucleótido con modificación 2-O-(N-metilacetamida); y combinaciones de los mismos. En determinadas formas de realización, por lo menos una de las modificaciones de nucleótido es una modificación de nucleótido de desestabilización térmica. En determinadas formas de realización, la modificación de nucleótido de desestabilización térmica se selecciona del grupo que consiste en una modificación abásica; una no coincidencia con el nucleótido opuesto en el dúplex; y modificación de azúcar desestabilizante, un modificación 2'-desoxi, un nucleótido acíclico, un ácido nucleico no bloqueado (UNA), y un ácido nucleico glicólico (GNA)

En determinadas formas de realización, la región de hebra doble tiene entre 19 y 21 nucleótidos de longitud. En determinadas formas de realización, la región de hebra doble tiene 21 nucleótidos de longitud. En determinadas formas de realización, cada hebra del agente de ARNhd tiene de manera independiente no más de 30 nucleótidos de longitud. En determinadas formas de realización, por lo menos una hebra del agente de ARNhd comprende una sobreextensión en el extremo 3' de al menos 1 nucleótido o por lo menos 2 nucleótidos.

En determinadas formas de realización, el agente de ARNhd además comprende un ligando. En determinadas formas de realización, el ligando está conjugado al extremo 3' de la hebra sentido del agente de ARNhd. En determinadas formas de realización, el ligando es un derivado de N-acetilgalactosamina (GalNAc), por ejemplo, en donde el ligando es



En determinadas formas de realización, el agente de ARNhd está conjugado al ligando como se muestra en el siguiente esquema



y, en donde X es O o S, por ejemplo, en donde X es O.

En determinadas formas de realización, la invención provee un agente de ARNhd, en donde la hebra antisentido comprende una región de complementariedad con un ARNm que codifica para AGT de humano, en donde la región de complementariedad comprende al menos 19 nucleótidos de una de las secuencias de hebra antisentido de un dúplex que se selecciona del grupo que consiste en AD-85481, AD-84701, AD-84703, AD-84704, AD-84705, AD-84707, AD-84715, AD-84716, AD-84739, AD-84741, AD-84746, AD-85432, AD-85434, AD-85435, AD-85436, AD-85437, AD-85438, AD-85441, AD-85442, AD-85443, AD-85444, AD-85446, AD-85447, AD-85482, AD-85485, AD-85493, AD-

85496, AD-85504, AD-85517, AD-85519, AD-85524, AD-85622, AD-85623, AD-85625, AD-85626, AD-85634, AD-85635, AD-85637, AD-85655, AD-126306, AD-126307, AD-126308, AD-126310, AD133360, AD-133361, AD-133362, AD-133374 y AD-133385. En determinadas formas de realización, la hebra antisentido comprende una región de complementariedad con un ARNm que codifica para AGT de humano, en donde la región de complementariedad comprende una cualquiera de las secuencias de hebra antisentido de un dúplex que se selecciona del grupo que consiste en AD-85481, AD-84701, AD-84703, AD-84704, AD-84705, AD-84707, AD-84715, AD-84716, AD-84739, AD-84741, AD-84746, AD-85432, AD-85434, AD-85435, AD-85436, AD-85437, AD-85438, AD-85441, AD-85442, AD-85443, AD-85444, AD-85446, AD-85447, AD-85482, AD-85485, AD-85493, AD-85496, AD-85504, AD-85517, AD-85519, AD-85524, AD-85622, AD-85623, AD-85625, AD-85626, AD-85634, AD-85635, AD-85637, AD-85655, AD-126306, AD-126307, AD-126308, AD-126310, AD133360, AD-133361, AD-133362, AD-133374 y AD-133385. En determinadas formas de realización, la región de complementariedad consiste en una cualquiera de las secuencias de hebra antisentido de un dúplex que se selecciona del grupo que consiste en AD-85481, AD-84701, AD-84703, AD-84704, AD-84705, AD-84707, AD-84715, AD-84716, AD-84739, AD-84741, AD-84746, AD-85432, AD-85434, AD-85435, AD-85436, AD-85437, AD-85438, AD-85441, AD-85442, AD-85443, AD-85444, AD-85446, AD-85447, AD-85482, AD-85485, AD-85493, AD-85496, AD-85504, AD-85517, AD-85519, AD-85524, AD-85622, AD-85623, AD-85625, AD-85626, AD-85634, AD-85635, AD-85637, AD-85655, AD-126306, AD-126307, AD-126308, AD-126310, AD133360, AD-133361, AD-133362, AD-133374 y AD-133385.

En determinadas formas de realización, la invención provee un agente de ARNhd, en donde la hebra antisentido comprende la secuencia de nucleótidos modificados químicamente de un dúplex que se selecciona del grupo que consiste en AD-85481, AD-84701, AD-84703, AD-84704, AD-84705, AD-84707, AD-84715, AD-84716, AD-84739, AD-84741, AD-84746, AD-85432, AD-85434, AD-85435, AD-85436, AD-85437, AD-85438, AD-85441, AD-85442, AD-85443, AD-85444, AD-85446, AD-85447, AD-85482, AD-85485, AD-85493, AD-85496, AD-85504, AD-85517, AD-85519, AD-85524, AD-85622, AD-85623, AD-85625, AD-85626, AD-85634, AD-85635, AD-85637, AD-85655, AD-126306, AD-126307, AD-126308, AD-126310, AD133360, AD-133361, AD-133362, AD-133374 y AD-133385.

En determinadas formas de realización, la invención provee un agente de ARNhd, en donde la hebra antisentido comprende la secuencia de nucleótidos modificados químicamente del dúplex AD-85481 (5'-usGfsuac(Tgn)cucauugUfgGfaugacsgsa-3' (SEQ ID NO: 11)) en donde a, c, g, y u son 2'-O-metiladenosina-3'-fosfato, 2'-O-metilcitidina-3'-fosfato, 2'-O-metilguanosina-3'-fosfato, y 2'-O-metiluridina-3'-fosfato, respectivamente; Af, Cf, Gf, y Uf son 2'-O-fluoroadenosina-3'-fosfato, 2'-O-fluorocitidina-3'-fosfato, 2'-O-fluoroguanosina-3'-fosfato, y 2'-O-fluorouridina-3'-fosfato, respectivamente; dT es una desoxitimina; s es una unión fosforotioato; y (Tgn) es el isómero S del ácido nucleico glicólico de timidina (GNA).

En determinadas formas de realización, la invención provee un agente de ARNhd, en donde la hebra antisentido y la hebra sentido comprenden las secuencias de nucleótidos con modificación química de un dúplex que se selecciona del grupo que consiste en AD-85481, AD-84701, AD-84703, AD-

84704, AD-84705, AD-84707, AD-84715, AD-84716, AD-84739, AD-84741, AD-84746, AD-85432, AD-85434, AD-85435, AD-85436, AD-85437, AD-85438, AD-85441, AD-85442, AD-85443, AD-85444, AD-85446, AD-85447, AD-85482, AD-85485, AD-85493, AD-85496, AD-85504, AD-85517, AD-85519, AD-85524, AD-85622, AD-85623, AD-85625, AD-85626, AD-85634, AD-85635, AD-85637, AD-85655, AD-126306, AD-126307, AD-126308, AD-126310, AD133360, AD-133361, AD-133362, AD-133374 y AD-133385.

En determinadas formas de realización, la invención provee un agente de ARNhd, en donde la hebra antisentido y la hebra sentido comprenden las secuencias de nucleótidos con modificación química del dúplex AD-85481 (5'-usGfsuac(Tgn)cucauugUfgGfaugacsgsa-3' (SEQ ID NO: 11) y 5'-gsuscaucCfaCfAfAfugagaguaca-3' (SEQ ID NO: 12)) en donde a, c, g, y u son 2'-O-metiladenosina-3'-fosfato, 2'-O-metilcitidina-3'-fosfato, 2'-O-metilguanosina-3'-fosfato, y 2'-O-metiluridina-3'-fosfato, respectivamente; Af, Cf, Gf, y Uf son 2'-O-fluoroadenosina-3'-fosfato, 2'-O-fluorocitidina-3'-fosfato, 2'-O-fluoroguanosina-3'-fosfato, y 2'-O-fluorouridina-3'-fosfato, respectivamente; dT es una desoxitimina; s es una unión fosforotioato; y (Tgn) es el isómero S del ácido nucleico glicólico de timidina (GNA); y en donde el extremo 3' de la hebra sentido se conjuga opcionalmente a un ligando de N-[tris(GalNAc-alquil)-amidodecanoil)]-4-hidroxiprolinol (L96).

En determinadas formas de realización, la invención provee un agente de ARNhd, en donde la hebra antisentido y la hebra sentido consisten en las secuencias nucleotídicas químicamente modificadas del dúplex AD-85481 (5'-usGfsuac(Tgn)cucauugUfgGfaugacsgsa-3' (SEQ ID NO: 11) y 5'-gsuscaucCfaCfAfAfugagaguaca-3' (SEQ ID NO: 12)), en donde el extremo 3' de

la hebra sentido está conjugada a un ligando de N-[tris(GalNAc-alquil)-amidodecanoil)]-4-hidroxiprolinol (L96), en donde a, c, g, y u son 2'-O-metiladenosina-3'-fosfato, 2'-O-metilcitidina-3'-fosfato, 2'-O-metilguanosina-3'-fosfato, y 2'-O-metiluridina-3'-fosfato, respectivamente; Af, Cf, Gf, y Uf son 2'-O-fluoroadenosina-3'-fosfato, 2'-O-fluorocitidina-3'-fosfato, 2'-O-fluoroguanosina-3'-fosfato, y 2'-O-fluorouridina-3'-fosfato, respectivamente; dT es una desoxitimina; s es una unión de fosforotioato; y (Tgn) es el isómero S de un ácido nucleico glicólico de timidina (GNA).

En determinadas formas de realización, la región de doble hebra del agente de ARNhd es de aproximadamente entre 19 y 30 pares de nucleótidos de longitud, aproximadamente entre 19 y 25 pares de nucleótidos de longitud, aproximadamente entre 23 y 27 pares de nucleótidos de longitud, aproximadamente entre 19 y 23 pares de nucleótidos de longitud, aproximadamente entre 21 y 23 pares de nucleótidos de longitud.

En determinadas formas de realización, cada hebra del agente de ARNhd tiene independientemente entre 19 y 30 nucleótidos de longitud.

En determinadas formas de realización, el ligando es uno o más de los derivados de GalNAc unido a través de un conector monovalente, divalente, o trivalente ramificado.

En determinadas formas de realización, el agente de ARNhd además comprende al menos una unión internucleotídica de fosforotioato o metilfosfonato. En determinadas formas de realización, la unión internucleotídica de fosforotioato o metilfosfonato se encuentra en el extremo 3’ terminal de una hebra. En determinadas formas de realización, la hebra es la hebra antisentido. En determinadas formas de realización, la hebra es la hebra sentido. En

determinadas formas de realización, la unión internucleotídica de fosforotioato o metilfosfonato se encuentra en el extremo 5' terminal de una hebra. En determinadas formas de realización, la hebra es la hebra antisentido. En determinadas formas de realización, la hebra es la hebra sentido. En determinadas formas de realización, la unión internucleotídica de fosforotioato o metilfosfonato se encuentra en los extremos 5' y 3' terminales de una hebra. En determinadas formas de realización, la hebra es la hebra antisentido.

En determinadas formas de realización, el agente de ARNhd en la posición 1 del extremo 5´ de la hebra antisentido del dúplex comprende un par de bases que es un par de bases AU.

En determinadas formas de realización, el agente de ARNhd comprende una hebra sentido tiene un total de 21 nucleótidos y una hebra antisentido tiene un total de 23 nucleótidos.

En un aspecto, la invención provee una célula que contiene el agente de ARNhd de la invención.

En un aspecto, la invención provee a composición farmacéutica para inhibir la expresión de un gen que codifica para AGT que comprende el agente de ARNhd de la invención. En determinadas formas de realización, la composición farmacéutica comprende el agente de ARNhd y una formulación de lípidos.

En un aspecto, la invención provee un método para inhibir la expresión de un gen de AGT en una célula, en donde el método comprende:

(a) poner en contacto la célula con el agente de ARNhd o una composición farmacéutica de la invención; y

(b) mantener la célula que se produjo en el paso (a) durante un tiempo suficiente para obtener la degradación del transcripto de ARNm del gen de AGT, inhibiendo de esta manera la expresión del gen AGT en la célula.

En determinadas formas de realización, la célula está en un sujeto. En determinadas formas de realización, el sujeto es un humano. En determinadas formas de realización, el sujeto ha sido diagnosticado con un trastorno asociado con AGT.

En determinadas formas de realización, el trastorno asociado con AGT se selecciona entre presión arterial elevada, hipertensión, prehipertensión, hipertensión primaria, hipertensión secundaria hipertensión sistólica o diastólica aislada, hipertensión asociada con embarazo, hipertensión en diabéticos, hipertensión resistente, hipertensión refractaria, hipertensión paroxística, hipertensión renovascular, hipertensión de Goldblatt, hipertensión ocular, glaucoma, hipertensión pulmonar, hipertensión portal, hipertensión venosa sistémica, hipertensión sistólica, hipertensión lábil; enfermedad cardiaca hipertensiva, nefropatía hipertensiva, aterosclerosis, arteriosclerosis, vasculopatía, nefropatía diabética, retinopatía diabética, insuficiencia cardiaca crónica, cardiomiopatía, miopatía cardiaca diabética, glomeruloesclerosis, coartación de la aorta, aneurisma aórtico, fibrosis ventricular, insuficiencia cardiaca, infarto de miocardio, angina, accidente cerebrovascular, enfermedad renal, insuficiencia renal, esclerosis sistémica, restricción de desarrollo intrauterino (IUGR) , restricción de desarrollo fetal, obesidad, esteatosis hepática/ hígado graso, esteatohepatitis no alcohólica (NASH), enfermedad de hígado graso no alcohólica (NAFLD); intolerancia a la glucosa, diabetes tipo 2 (diabetes no dependiente de insulina), y síndrome metabólico.

En determinadas formas de realización, el sujeto tiene una presión arterial sistólica de por lo menos 130 mmHg o una presión arterial diastólica de por lo menos 80 mmHg. En determinadas formas de realización, el sujeto tiene una presión arterial sistólica de por lo menos 140 mmHg y una presión arterial diastólica de por lo menos 80 mmHg. En determinadas formas de realización, el sujeto es parte de un grupo susceptible a sensibilidad a la sal, tiene sobrepeso, es obeso, o tiene un embarazo.

En determinadas formas de realización, poner en contacto la célula con el agente de ARNhd inhibe la expresión de AGT en por lo menos 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% (por ejemplo, en comparación con el nivel de expresión de AGT antes de poner en contacto primero la célula con el agente de ARNhd; por ejemplo, antes de la administración de una primera dosis del agente de ARNhd al sujeto). En determinadas formas de realización, la inhibición de la expresión de AGT disminuye un nivel proteico de AGT en una o más muestras de suero de un sujeto en por lo menos 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, o 95%, por ejemplo, en comparación con el nivel de expresión de AGT antes de poner en contacto primero la célula con el agente de ARNhd.

En un aspecto, la invención provee un método para tratar un trastorno asociado con AGT en un sujeto, que comprende administrar al sujeto el agente de ARNhd o la composición farmacéutica de la invención, tratando de esta manera el trastorno asociado con AGT en el sujeto. En determinadas formas de realización, el sujeto tiene una presión arterial sistólica de por lo menos 130 mmHg o una presión arterial diastólica de por lo menos 80 mmHg. En determinadas formas de realización, el sujeto tiene una presión arterial sistólica de por lo menos 140 mmHg y una presión sanguínea diastólica de al menos 80

mmHg. En determinadas formas de realización, el sujeto es humano. En determinadas formas de realización, sujeto es parte de un grupo susceptible a sensibilidad a la sal, tiene sobrepeso, es obeso, o tiene un embarazo.

En determinadas formas de realización de la invención, el agente de ARNhd se administra en una dosis de entre aproximadamente 0,01 mg/kg y aproximadamente 50 mg/kg. En determinadas formas de realización, el agente de ARNhd se administra al sujeto por vía subcutánea. En determinadas formas de realización, se mide el nivel de AGT en el sujeto. En determinadas formas de realización, el nivel de AGT en el sujeto es un nivel de proteína AGT en una o más muestras de sangre, una o más muestras de suero, o una o más muestras de orina del sujeto.

En determinadas formas de realización, se administra al sujeto un agente terapéutico adicional para el tratamiento de hipertensión. En determinadas formas de realización, el agente terapéutico adicional se selecciona del grupo que consiste en un diurético, un inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina (ACE), un antagonista del receptor de angiotensina II, un bloqueante beta, un vasodilatador, un bloqueante del canal de calcio, un antagonista de aldosterona, un agonista alfa2, un inhibidor de renina, un bloqueante alfa, un agente adrenérgico de acción periférica, un agonista parcial del receptor D1 selectivo, un antagonista adrenérgico alfa no selectivo, un agente antimineralocorticoide esteroideo, sintético; o una combinación de cualquiera de los anteriores; y un agente terapéutico contra la hipertensión formulado como una combinación de agentes. En determinadas formas de realización, el agente terapéutico adicional comprende un antagonista del receptor de angiotensina II, por ejemplo, losartán, valsartán, olmesartán, eprosartán, y azilsartán. En

determinadas formas de realización, el agente terapéutico adicional es un inhibidor de receptor de angiotensina -neprilisina (ARNi), por ejemplo, Entresto®, sacubitril/valsartán; o un antagonista de receptor de endotelina (ERA), por ejemplo, sitaxentán, ambrisentán, atrasentán, BQ-123, zibotentán, bosentán, macitentán, y tezosentán.

La invención también provee usos de los agentes de ARNhd y las composiciones farmacéuticas provistas en la presente para el tratamiento de un trastorno asociado con AGT. En determinadas formas de realización, los usos incluyen cualquiera de los métodos provistos por la invención.

La invención provee kits que comprenden un agente de ARNhd de la invención. En determinadas formas de realización, la invención provee kits para la práctica de un método de la invención.

Descripción Breve de las Figuras

La Figura 1A es un gráfico que muestra los niveles séricos de la proteína AGT en monos cinomolgos (n = 3 por grupo) tratados con una dosis individual de 3 mg/kg de los ARNpi indicados. Los niveles de AGT se muestran como un porcentaje del nivel de AGT antes del tratamiento.

La Figura 1B es un gráfico que muestra niveles séricos de la proteína AGT en monos cinomolgos (n = 3 por grupo) tratados con una dosis individual de 0,3 mg/kg, 1 mg/kg, o 3 mg/kg de AD-85481 o AD-67327 en el día 1. Los niveles de AGT se muestran como un porcentaje del nivel de AGT antes del tratamiento.

La Figura 1C es un gráfico que muestra los niveles séricos de la proteína AGT en monos cinomolgos (n = 3 por grupo) administrados con una dosis de 1 mg/kg de AD-85481 o AD-67327, una vez cada cuatro semanas para tres dosis.

Los niveles de AGT se muestran como un porcentaje de nivel de AGT antes del tratamiento.

En las Figuras 2A-2G se muestran los resultados de varios parámetros en un estudio en ratas espontáneamente hipertensas (n=9 por grupo) tratadas con un vehículo, valsartán (31 mg/kg/día), un ARNpi contra AGT específico de rata (10 mg/kg q2w), captopril (100 mg/kg/día), valsartán y captopril, o valsartán y ARNpi contra AGT.

En la Figura 2A se muestran los niveles plasmáticos de AGT al comienzo (barras sólidas) y al final (barras punteadas) del estudio (a las 4 semanas).

En la Figura 2B se muestran las lecturas diarias de presión sanguínea en comparación con el nivel basal.

La Figura 2C es un gráfico que muestra la proporción peso cardiaco: longitud de la tibia.

La Figura 2D es un gráfico que muestra el nivel de actividad de renina en plasma al comienzo (barras sólidas) y al final (barras punteadas) del estudio (a las 4 semanas).

La Figura 2E es un gráfico de la proporción de peso cardiaco: longitud de la tibia contra la presión arterial media (MAP) en mmHg.

La Figura 2F es un gráfico del tamaño de los cardiomiocitos.

La Figura 2G es un gráfico de los niveles de péptido natriurético de tipo pro b N-terminal (NT-proBNP).

La Figura 3 es un gráfico que muestra los niveles de AGT en orina en el estudio con ratas espontáneamente hipertensas.

La Figura 4A es un gráfico que muestra el nivel de Ang I en sangre en el estudio con ratas espontáneamente hipertensas.

La Figura 4B es un gráfico que muestra el nivel de Ang II en sangre en el estudio con ratas espontáneamente hipertensas.

La Figura 4C es un gráfico que muestra la proporción de Ang II en sangre a Ang I en sangre en el estudio con ratas espontáneamente hipertensas.

La Figura 5A es un gráfico que muestra el nivel de renal Ang I en el estudio con ratas espontáneamente hipertensas.

La Figura 5B es un gráfico que muestra el nivel de renal Ang II en el estudio con ratas espontáneamente hipertensas.

La Figura 5C es un gráfico que muestra la proporción de Ang II renal a Ang I renal en el estudio con ratas espontáneamente hipertensas.

La Figura 6A es un gráfico que muestra el nivel de receptor de angiotensina 1a en la corteza y médula renal en el estudio con ratas espontáneamente hipertensas.

La Figura 6B es un gráfico que muestra el nivel de receptor de angiotensina 1b en la corteza y médula renal en el estudio con ratas espontáneamente hipertensas.

La Figura 6C es un gráfico que muestra el nivel de ACE en la corteza y en la médula renal en el estudio con ratas espontáneamente hipertensas.

La Figura 7 es un gráfico que muestra el volumen urinario en estado basal y a 4 semanas después del comienzo del tratamiento en el estudio con ratas espontáneamente hipertensas.

La Figura 8A es un gráfico que muestra los pesos corporales promedio de ratones con obesidad inducida por dieta con alto contenido de grasas (DIO) o ratones alimentados con dieta normal (n = 5 por grupo) tratados con un agente de ARNhd contra AGT o bien con PBS.

La Figura 8B es un gráfico que muestra los pesos terminales de hígado, tejido adiposo y músculo (n = 5 por grupo) de ratones con obesidad inducida por dieta con alto contenido de grasas (DIO) o ratones alimentados con dieta normal tratados con un agente de ARNhd contra AGT o bien con PBS.

La Figura 9A es un gráfico que muestra los cambios de los niveles de glucosa en plasma (mg/dL) en los ratones con obesidad inducida por dieta con alto contenido de grasas (DIO) o ratones alimentados con dieta normal (n = 5 por grupo) tratados con un agente de ARNhd contra AGT o bien con PBS a la semana 0 antes de la primera dosis de tratamiento.

La Figura 9B es un gráfico que muestra los niveles de glucosa en plasma (mg/dL) en ratones con obesidad inducida por dieta con alto contenido de grasas (DIO) o ratones alimentados con dieta normal (n = 5 por grupo) tratados con un agente de ARNhd contra AGT o bien con PBS a la semana 6 del experimento.

La Figura 9C es un gráfico que muestra los niveles de glucosa en plasma (mg/dL) en los ratones con obesidad inducida por dieta con alto contenido de grasas (DIO) o ratones alimentados con dieta normal (n = 5 por grupo) tratados con un agente de ARNhd contra AGT o bien con PBS a la semana 12 del experimento.

La Figura 10A es un gráfico que muestra pesos corporales promedio de ratones alimentados con alto contenido de grasas y alto contenido de fructosa (HF HFr) tratados con un agente de ARNhd contra AGT o bien con PBS, o ratones alimentados con dieta normal (LFD).

La Figura 10B es un gráfico que muestra la ganancia de peso acumulada promedio de los ratones alimentados con alto contenido de grasas y alto

contenido de fructosa (HF HFr) tratados con un agente de ARNhd contra AGT o bien con PBS, o ratones alimentados con dieta normal (LFD).

Las Figuras 11A-11C son gráficos que muestran las enzimas hepáticas en suero en ratones alimentados con alto contenido de grasas y alto contenido de fructosa (HF HFr) tratados con un agente de ARNhd contra AGT o bien con PBS, o ratones alimentados con dieta normal (LFD) a la semana 20 del experimento.

La Figura 11A es un gráfico que muestra los niveles de alanina transaminasa (ALT) en los ratones alimentados con alto contenido de grasas y alto contenido de fructosa (HF HFr) tratados con un agente de ARNhd contra AGT o bien con PBS, o ratones alimentados con dieta normal (LFD).

La Figura 11B es un gráfico que muestra los niveles de aspartato transaminasa (AST) en los ratones alimentados con alto contenido de grasas y alto contenido de fructosa (HF HFr) tratados con un agente de ARNhd contra AGT o bien con PBS, o ratones alimentados con dieta normal (LFD).

La Figura 11C es un gráfico que muestra los niveles de glutamato deshidrogenasa (GLDH) en los ratones alimentados con alto contenido de grasas y alto contenido de fructosa (HF HFr) tratados con un agente de ARNhd contra AGT o bien con PBS, o ratones alimentados con dieta normal (LFD).

Descripción Detallada de la Invención

La presente invención provee composiciones de ARNi que efectúan la escisión mediada por el complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC) de transcriptos de ARN de un gen AGT. El gen puede estar dentro de una célula, por ejemplo, una célula dentro de un sujeto, tal como un humano. El uso de estos

ARNi permite la degradación dirigida de los ARNm del gen correspondiente (gen AGT) en mamíferos.

Los ARNi de la invención se han diseñado para direccionarse contra el gen AGT humano, incluyendo partes del gen que están conservadas en los ortólogos de AGT de otras especies de mamíferos. Sin pretender estar limitados por la teoría, se cree que una combinación o sub-combinación de las propiedades anteriores y de los sitios blanco específicos o las modificaciones específicas en estos ARNi le confiere a los ARNi de la invención un aumento de eficacia, estabilidad, potencia, durabilidad y seguridad.

En consecuencia, la presente invención provee métodos para tratar y prevenir un trastorno asociado con AGT, por ejemplo, hipertensión, usando composiciones de ARNi que efectúan la escisión mediada por el complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC) de transcriptos de ARN de un gen AGT.

Los ARNi de la invención incluyen una hebra de ARN (la hebra antisentido) que tiene una región que es de hasta aproximadamente 30 nucleótidos o menos de longitud, por ejemplo, entre 19 y 30, entre 19 y 29, entre 19 y 28, entre 19 y 27, entre 19 y 26, entre 19 y 25, entre 19 y 24, entre 19 y 23, entre 19 y 22, entre 19 y 21, entre 19 y 20, entre 20 y 30, entre 20 y 29, entre 20 y 28, entre 20 y 27, entre 20 y 26, entre 20 y 25, entre 20 y 24,20 y 23, entre 20 y 22, entre 20 y 21, entre 21 y 30, entre 21 y 29, entre 21 y 28, entre 21 y 27, entre 21 y 26, entre 21 y 25, entre 21 y 24, entre 21 y 23, o entre 21 y 22 nucleótidos de longitud, en donde la región es sustancialmente complementaria a por lo menos parte de un transcripto de ARNm de un gen AGT.

En determinadas formas de realización, una o ambas de las hebras de los agentes de ARNi de hebra doble de la invención tiene hasta 66 nucleótidos de

longitud, por ejemplo, entre 36 y 66, entre 26 y 36, entre 25 y 36, entre 31 y 60, entre 22 y 43, entre 27 y 53 nucleótidos de longitud, con una región de al menos 19 nucleótidos contiguos que es sustancialmente complementaria a por lo menos una parte de un transcripto de ARNm de un gen AGT. En algunas formas de realización, dichos agentes de ARNi que tienen hebras antisentido de mayor longitud preferiblemente pueden incluir una segunda hebra de ARN (la hebra sentido) de entre 20 y 60 nucleótidos de longitud en donde las hebra sentido y antisentido forman un dúplex de entre 18 y 30 nucleótidos contiguos.

El uso de los ARNi de la invención permite la degradación dirigida de los ARNm del gen correspondiente (gen AGT) en mamíferos. Usando ensayos *in vitro* e *in vivo*, los presentes inventores han demostrado que los ARNi direccionados contra un gen AGT pueden mediar la iARN, resultando en una inhibición significativa de la expresión de AGT. La inhibición de la expresión de AGT en dicho sujeto prevendrá o tratará el desarrollo de un trastorno asociado con AGT, por ejemplo, la hipertensión. Por lo tanto, los métodos y las composiciones que incluyen estos ARNi son útiles para prevenir y tratar a un sujeto susceptible o diagnosticado con un trastorno asociado con AGT, por ejemplo, la hipertensión. Los métodos y las composiciones de la presente son útiles para reducir el nivel de AGT en un sujeto.

La siguiente descripción detallada divulga la manera de elaborar y de usar las composiciones que contienen ARNi para inhibir la expresión de un gen AGT así como también las composiciones, usos, y métodos para tratar sujetos que se beneficiarían a partir de la reducción de la expresión de un gen AGT, por ejemplo, sujetos susceptibles o diagnosticados con un trastorno asociado con AGT, por ejemplo, hipertensión.

I. Definiciones

Con el objetivo de que la presente invención se comprenda en forma más completa, primero se definen ciertos términos. Además, ha de notarse que siempre que se indique un valor o rango de valores de un parámetro, también se pretende que los valores y rangos intermedios a los valores indicados sean parte de esta invención.

Los artículos “uno/una” y “un” se usan en la presente para referirse a uno o más de uno (es decir, a por lo menos uno) de los objetos gramaticales del artículo. A modo de ejemplo, “un elemento” designa a un elemento o más de un elemento, por ejemplo, una pluralidad de elementos.

El término "que incluye" se usa en la presente para designar la expresión "incluyendo a título enunciativo no taxativo" y se usa como sinónimo de la misma.

El término "o" se usa en la presente para designar al término "y/o," y se usa como sinónimo del mismo, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por ejemplo, “hebra sentido o hebra antisentido” se interpreta como “hebra sentido o hebra antisentido o hebra sentido y hebra antisentido.”

El término “aproximadamente” se usa en la presente para indicar que se está dentro de los rangos de tolerancia típicos en el arte. Por ejemplo, “aproximadamente” se puede interpretar como aproximadamente 2 desviaciones estándar de la media. En determinadas formas de realización, aproximadamente significa $\pm$10%. En determinadas formas de realización, aproximadamente significa $\pm$5%. Cuando aproximadamente se presenta antes de una serie de números o de un rango, se ha de comprender que “aproximadamente” puede modificar a cada uno de los números en la serie o rango.

El término “por lo menos” antes de un número o serie de números indica la inclusión del número adyacente al término “por lo menos”, y a todos los subsiguientes números o números enteros que lógicamente podrían estar incluidos, como es claro a partir del contexto. Por ejemplo, el número de nucleótidos en una molécula de ácido nucleico debe ser un número entero. Por ejemplo, “por lo menos 19 nucleótidos de una molécula de ácido nucleico de 21 nucleótidos” significa que 19, 20, o 21 nucleótidos tienen la propiedad indicada. Cuando por lo menos está presente antes de una serie de números o de un rango, se ha de comprender que “por lo menos” puede modificar a cada uno de los números de la serie o rango.

Como se usa en la presente, “no más de” o “menos de” se interpreta como el valor adyacente a la expresión y los valores o números enteros lógicamente inferiores, como es lógico a partir del contexto, hasta cero. Por ejemplo, un dúplex con una sobreextensión de “no más de 2 nucleótidos” tiene una sobreextensión de 2, 1, o 0 nucleótidos. Cuando “no más de” está presente antes de una serie de números o rango, se ha de comprender que “no más de” puede modificar a cada uno de los números de la serie o rango. Como se usa en la presente, los rangos incluyen tanto al límite superior como inferior.

En el caso de un conflicto entre una secuencia y su sitio indicado en un transcripto u otra secuencia, la secuencia nucleotídica mencionada en la memoria descriptiva es la que toma precedencia.

Como se usa en la presente, “angiotensinógeno”, se usa como sinónimo del término “AGT” y se refiere al gen y al polipéptido bien conocido, también denominado en el arte como Inhibidor de Serpina Peptidasa, Clado A, Miembro 8; Alfa-1 Antiproteinasa; Antitrripsina; SERPINA8; Angiotensina I; Serpina A8;

Angiotensina II; Alfa-1 Antiproteinasa angiotensinógeno; antitripsina; pre-angiotensinógeno2; ANHU; Inhibidor de Serina Proteinasa; e Inhibidor de Cisteína Proteinasa.

El término “AGT” incluye a AGT humano, cuyas secuencias de aminoácidos y codificante completa se pueden hallar por ejemplo, en No. de Acceso a GenBank GI:188595658 (NM_000029.3; SEQ ID NO:1); AGT de *Macaca fascicularis*, cuyas secuencias de aminoácidos y codificante completa se pueden hallar en por ejemplo, No. de Acceso a GenBank GI: 90075391 (AB170313.1: SEQ ID NO:3); AGT de ratón (*Mus musculus*), cuyas secuencias de aminoácidos y codificante completa se pueden hallar en por ejemplo, No. de Acceso a GenBank GI: 113461997 (NM_007428.3; SEQ ID NO:5); y AGT de rata (*Rattus norvegicus*) AGT cuyas secuencias de aminoácidos y codificante completa se pueden hallar en por ejemplo, por ejemplo No. de Acceso a GenBank GI:51036672 (NM_134432; SEQ ID NO:7).

Se pueden conseguir fácilmente ejemplos adicionales de secuencias de ARNm de AGT usando bases de datos públicamente disponibles, por ejemplo, GenBank, UniProt, OMIM, y el sitio web del proyecto genoma de *Macaca*.

El término “AGT”, como se usa en la presente, también se refiere a las variaciones de la secuencia de ADN de origen natural del gen AGT, tales como un polimorfismo de nucleótido simple (SNP) en el gen AGT. Los ejemplos de SNP se pueden hallar en la base de datos dbSNP disponible en www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?geneId=183. Los ejemplos no limitantes de variaciones de secuencia dentro del gen AGT incluyen, por ejemplo, a aquellas que se describen en la Patente de los EE.UU. No. 5.589.584, cuyos contenidos completos se incorporan a la presente a modo de referencia. Por

ejemplo, las variaciones de secuencia dentro del gen AGT pueden incluir a C→T en la posición -532 (en relación al sitio de inicio de la transcripción); a G→A en la posición -386; a G→A en la posición -218; a C→T en la posición -18; a G→A y a A→C en la posición -6 y -10; a C→T en la posición +10 (sin traducir); a C→T en la posición +521 (T174M); a T→C en la posición +597 (P199P); a T→C en la posición +704 (M235T; véase también, por ejemplo, Reference SNP (refSNP) Cluster Report: rs699, disponible en www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP); a A→G en la posición +743 (Y248C); a C→T en la posición +813 (N271N); a G→A en la posición +1017 (L339L); a C→A en la posición +1075 (L359M); y/o a G→A en la posición +1162 (V388M).

Como se usa en la presente, "secuencia blanco" se refiere a una parte continua de la secuencia nucleotídica de una molécula de ARNm que se forma durante la transcripción de un gen AGT, incluyendo al ARNm que es un producto del procesamiento de ARN de un producto de transcripción primario. La parte blanco de la secuencia tendrá por lo menos una longitud suficiente para servir como sustrato para la escisión dirigida por ARNi en esa parte, o cerca de esa parte de la secuencia nucleotídica de una molécula de ARNm formada durante la transcripción de un gen AGT. En una forma de realización, la secuencia blanco está dentro de la región codificante de proteína de AGT.

La secuencia blanco puede ser de aproximadamente entre 19 y 36 nucleótidos de longitud, por ejemplo, preferiblemente aproximadamente entre 19 y 30 nucleótidos de longitud. Por ejemplo, la secuencia blanco puede ser de aproximadamente entre 19 y 30 nucleótidos, entre 19 y 30, entre 19 y 29, entre 19 y 28, entre 19 y 27, entre 19 y 26, entre 19 y 25, entre 19 y 24, entre 19 y 23, entre 19 y 22, entre 19 y 21, entre 19 y 20, entre 20 y 30, entre 20 y 29, entre 20

y 28, entre 20 y 27, entre 20 y 26, entre 20 y 25, entre 20 y 24, entre 20 y 23, entre 20 y 22, entre 20 y 21, entre 21 y 30, entre 21 y 29, entre 21 y 28, entre 21 y 27, entre 21 y 26, entre 21 y 25, entre 21 y 24, entre 21 y 23, o entre 21 y 22 nucleótidos de longitud. Los rangos y longitudes intermedias a los rangos y longitudes mencionadas previamente también están contempladas como parte de la invención.

Como se usa en la presente, el término "hebra que comprende una secuencia" se refiere a un oligonucleótido que comprende una cadena de nucleótidos que está descripta por la secuencia de referencia usando la nomenclatura estándar de nucleótidos.

"G", "C", "A", "T", y "U" en general designan cada una a un nucleótido que contiene guanina, citosina, adenina, timidina, y uracilo como una base, respectivamente. Sin embargo, se ha de comprender que el término "ribonucleótido" o "nucleótido" también se puede referir a un nucleótido modificado, como se detalla mejor más adelante, o una unidad sustituta de reemplazo (véase, por ejemplo, la Tabla 2). Las personas con experiencia en el arte son bien conscientes de que la guanina, la citosina, la adenina, y el uracilo pueden reemplazarse por otras unidades sin alterar sustancialmente las propiedades de apareamiento de bases de un oligonucleótido que comprende un nucleótido que porta dicha unidad de reemplazo. Por ejemplo, a título enunciativo no taxativo, un nucleótido que comprende inosina como su base puede formar apareamiento de bases con nucleótidos que contienen adenina, citosina, o uracilo. Por lo tanto, los nucleótidos que contienen uracilo, guanina, o adenina pueden reemplazarse en las secuencias nucleotídicas de ARNhd presentadas en la invención por un nucleótido que contiene, por ejemplo, inosina.

En otro ejemplo, la adenina y la citosina en cualquier posición del oligonucleótido se pueden reemplazar por guanina y uracilo, respectivamente para formar un apareamiento de bases tambaleante G-U con el ARNm blanco. Las secuencias que contienen dichas unidades de reemplazo son adecuadas para las composiciones y los métodos que se presentan en la invención.

Los términos "ARNi", "agente de ARNi", "agente de iARNi", "agente de ARN de interferencia" usados como sinónimos en la presente, se refieren a un agente que contiene ARN tal como lo define el término de la presente, y que media la escisión dirigida de un transcripto de ARN a través de una vía de complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC). El ARNi dirige la degradación específica de secuencia del ARNm a través de un proceso conocido como interferencia de ARN (iARN). La iARN modula, por ejemplo, inhibe, la expresión de un gen AGT en una célula, por ejemplo, una célula dentro de un sujeto, tal como un sujeto mamífero.

En una forma de realización, un agente de ARNi de la invención incluye un ARN de hebra doble que interacciona con una secuencia de ARN blanco, por ejemplo, una secuencia de ARN blanco de AGT, para dirigir la escisión del ARN blanco. Sin pretender estar limitados por la teoría se cree que el ARN largo de hebra doble introducido en las células es degradado a ARNpi mediante una endonucleasa de tipo III conocida como Dicer (Sharp y col. (2001) *Genes Dev*. 15:485). La Dicer, una enzima similar a una ribonucleasa III, procesa el ARNhd a ARN cortos de interferencia de entre 19 y 23 pares de bases con sobreextensiones características de dos bases en el extremo 3' (Bernstein, y col., (2001) *Nature* 409:363). Los ARNpi se incorporan luego a un complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC) en donde una o más helicasas

desenroscan el dúplex de ARNpi, permitiendo que la hebra antisentido complementaria guíe el reconocimiento del blanco (Nykanen, y col., (2001) célula 107:309). Ante la unión al ARNm blanco apropiado, una o más endonucleasas dentro del RISC escinden al blanco para inducir el silenciamiento (Elbashir, y col., (2001) *Genes Dev*. 15:188). Por lo tanto, en un aspecto la invención se relaciona con un ARN de hebra doble (ARNpi) generado dentro de una célula y que promueve la formación de un complejo RISC para efectuar el silenciamiento del gen blanco, es decir, un gen AGT. En consecuencia, el término "ARNpi" también se usa en la presente para referirse a un ARNi como se describió anteriormente.

En determinadas formas de realización, el agente de ARNi puede ser un ARNpi de hebra simple (ARNihs) que se introduce a una célula u organismo para inhibir a un ARNm blanco. Los agentes de ARNi de hebra simple se unen a la endonucleasa del RISC, Argonauta 2, que luego escinde al ARNm blanco. Los ARNpi de simple hebra en general tienen entre 15 y 30 nucleótidos y están químicamente modificados. El diseño y la prueba de los ARNpi de simple hebra se describen en la Patente de los EE.UU. No. 8.101.348 y en Lima y col., (2012) Cell 150:883-894, cuyos contenidos completos se incorporan a la presente a modo de referencia. Cualquiera de las secuencias nucleotídicas antisentido descritas en la presente se puede usar como un ARNpi de hebra simple como se describe la presente o en forma químicamente modificada mediante los métodos que se describen en Lima y col., (2012) Cell 150:883-894.

En ciertas formas de realización, un "ARNi" para usar en las composiciones, los usos, y los métodos de la invención es un ARN de hebra doble y se denomina en la presente como un "agente de ARN de hebra doble",

“molécula de ARN de hebra doble (ARNhd)”, “agente de ARNhd”, o “ARNhd”. El término “ARNhd”, se refiere a un complejo de moléculas de ácido ribonucleico, que tienen una estructura en dúplex que comprende dos hebras de ácido nucleico antiparalelas y sustancialmente complementarias, que se dice que tienen orientaciones “sentido” y “antisentido” con respecto a un ARN blanco, es decir, un gen AGT. En algunas formas de realización de la invención, un ARN de hebra doble (ARNhd) induce la degradación de un ARN blanco, por ejemplo, un ARNm, a través de un mecanismo de silenciamiento génico postranscripcional denominado en la presente como interferencia de ARN o iARN.

En general, la mayoría de los nucleótidos de cada hebra de una molécula de ARNhd son ribonucleótidos, pero como se describe en detalle en la presente, cada una o ambas hebras también pueden incluir uno o más no ribonucleótidos, por ejemplo, un desoxirribonucleótido o un nucleótido modificado. Además, como se usa en esta memoria descriptiva, un “ARNi” puede incluir ribonucleótidos con modificaciones químicas; un ARNi puede incluir modificaciones sustanciales en múltiples nucleótidos. Como se usa en la presente, el término “nucleótido modificado” se refiere a un nucleótido que tiene, independientemente, una unidad de azúcar modificada, una unión internucleotídica modificada, o una nucleobase modificada, o cualquier combinación de los anteriores. Por lo tanto, el término nucleótido modificado abarca sustituciones, adiciones o eliminaciones, por ejemplo, de un grupo funcional o átomo, a uniones internucleosídicas, unidades de azúcar, o nucleobases. Las modificaciones adecuadas para usar en los agentes de la invención incluyen a todos los tipos de modificaciones divulgadas en la presente o conocidas en el arte. Cualquiera de dichas modificaciones, como se usa en una molécula de tipo ARNpi, está abarcada por

los términos “ARNi” o “agente de ARNi” para los propósitos de esta memoria descriptiva y reivindicaciones.

La región dúplex puede ser de cualquier longitud que permita la degradación específica de un ARN blanco deseado a través de una vía de RISC, y puede estar en el rango entre aproximadamente 19 y 36 pares de bases de longitud, por ejemplo, aproximadamente entre 19 y 30 pares de bases de longitud, por ejemplo, aproximadamente 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, o 36 pares de bases de longitud, tal como aproximadamente entre 19 y 30, entre 19 y 29, entre 19 y 28, entre 19 y 27, entre 19 y 26, entre 19 y 25, entre 19 y 24, entre 19 y 23, entre 19 y 22, entre 19 y 21, entre 19 y 20, entre 20 y 30, entre 20 y 29, entre 20 y 28, entre 20 y 27, entre 20 y 26, entre 20 y 25, entre 20 y 24,20 y 23, entre 20 y 22, entre 20 y 21, entre 21 y 30, entre 21 y 29, entre 21 y 28, entre 21 y 27, entre 21 y 26, entre 21 y 25, entre 21 y 24, entre 21 y 23, o entre 21 y 22 pares de bases de longitud. Los rangos y longitudes intermedias a los rangos y longitudes mencionadas previamente también se contemplan como parte de la invención.

Las dos hebras que forman la estructura de dúplex pueden ser porciones diferentes de una molécula de ARN más grande, o las mismas pueden ser moléculas de ARN separadas. Cuando las dos hebras son parte de una molécula mayor y por lo tanto están conectadas mediante una cadena ininterrumpida de nucleótidos entre el extremo 3’ de una hebra y el extremo 5’ de la respectiva otra hebra formando la estructura de dúplex, la cadena de ARN conectora se denomina como “bucle de horquilla.” Un bucle de horquilla puede comprender por lo menos un nucleótido desapareado. En algunas formas de realización, el bucle de horquilla puede comprender por lo menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20,

23 o más nucleótidos desapareados. En algunas formas de realización, el bucle de horquilla puede ser de 10 o menos nucleótidos. En algunas formas de realización, el bucle de horquilla puede ser de 8 o menos nucleótidos desapareados. En algunas formas de realización, el bucle de horquilla puede ser de entre 4 y 10 nucleótidos desapareados. En algunas formas de realización, el bucle de horquilla puede ser de entre 4 y 8 nucleótidos.

Cuando las dos hebras sustancialmente complementarias de un ARNhd están comprendidas en moléculas de ARN separadas, esas moléculas no necesitan estar, pero pueden estar covalentemente conectadas. Cuando las dos hebras están conectadas en forma covalente en forma distinta a una cadena ininterrumpida de nucleótidos entre el extremo 3' de una hebra y el extremo 5' de la respectiva otra hebra formando la estructura de dúplex, la estructura de conexión se denomina como "conector." Las hebras de ARN pueden tener el mismo número de nucleótidos o uno diferente. El número máximo de pares de bases es el número de nucleótidos en la hebra más corta del ARNhd menos cualquier sobreextensión que esté presente en el dúplex. Además de la estructura de dúplex, un ARNi puede comprender una o más sobreextensiones de nucleótidos.

En determinadas formas de realización, un agente de ARNi de la invención es un ARNhd, en donde cada hebra comprende entre 19 y 23 nucleótidos, que interacciona con una secuencia de ARN blanco, por ejemplo, un gen AGT, para dirigir la escisión del ARN blanco.

En algunas formas de realización, un ARNi de la invención es un ARNhd de entre 24 y 30 nucleótidos que interacciona con una secuencia de ARN blanco,

por ejemplo, una secuencia de ARN blanco de AGT, para dirigir la escisión del ARN blanco.

Como se usa en la presente, el término “sobreextensión de nucleótidos” se refiere a por lo menos un nucleótido desapareado que protruye desde la estructura de dúplex de un ARNi de hebra doble. Por ejemplo, cuando un extremo 3’ de una hebra de un ARNhd se extiende más allá del extremo 5' de la otra hebra, o *viceversa*, existe una sobreextensión de nucleótidos. Un ARNhd puede comprender una sobreextensión de por lo menos un nucleótido; como alternativa la sobreextensión puede comprender por lo menos dos nucleótidos, por lo menos tres nucleótidos, por lo menos cuatro nucleótidos, por lo menos cinco nucleótidos o más. Una sobreextensión de nucleótidos puede comprender o consistir en un análogo de nucleótido/nucleósido, incluyendo un desoxinucleótido/nucleósido. La o las sobreextensiones pueden estar en la hebra sentido, la hebra antisentido, o en cualquier combinación de los anteriores. Más aún, el o los nucleótidos de una sobreextensión pueden estar presentes en el extremo 5', el extremo 3', o en ambos extremos de la hebra antisentido o la hebra sentido de un ARNhd.

En determinadas formas de realización, la hebra antisentido de un ARNhd tiene una sobreextensión de entre 1 y 10 nucleótidos, por ejemplo, una sobreextensión de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10 nucleótidos en el extremo 3’ o el extremo 5’. En determinadas formas de realización, la sobreextensión en la hebra sentido o la hebra antisentido, o ambas, puede incluir longitudes extendidas mayores a 10 nucleótidos, por ejemplo, de entre 1 y 30 nucleótidos, entre 2 y 30 nucleótidos, entre 10 y 30 nucleótidos, entre 10 y 25 nucleótidos, entre 10 y 20 nucleótidos, entre o 10 y 15 nucleótidos de longitud. En

determinadas formas de realización, hay una sobreextensión extendida en la hebra sentido del dúplex. En determinadas formas de realización, hay presente una sobreextensión extendida en el extremo 3' de la hebra sentido del dúplex. En determinadas formas de realización, hay presente una sobreextensión extendida en el extremo 5' de la hebra sentido del dúplex. En determinadas formas de realización, hay una sobreextensión extendida en la hebra antisentido del dúplex. En determinadas formas de realización, hay presente una sobreextensión extendida en el extremo 3' de la hebra antisentido del dúplex. En determinadas formas de realización, hay presente una sobreextensión extendida en el extremo 5' de la hebra antisentido del dúplex. En determinadas formas de realización, uno o más de los nucleótidos de la sobreextensión extendida se reemplaza por un tiofosfato de nucleósido. En determinadas formas de realización, la sobreextensión incluye una parte autocomplementaria de forma que la sobreextensión es capaz de formar una estructura de horquilla que es estable bajo condiciones fisiológicas.

El término "romo" o "extremo romo" significa que no hay nucleótidos desapareados en el extremo del agente de ARN de hebra doble, es decir, no hay sobreextensión de nucleótidos. Un agente de ARN de hebra doble con "extremo romo" posee hebra doble a lo largo de toda su longitud, es decir, no hay sobreextensión de nucleótidos en ningún extremo de la molécula. Los agentes de ARNi de la invención incluyen agentes de ARNi son sobreextensión de nucleótidos en un extremo (es decir, agentes con una sobreextensión y un extremo romo) o sin sobreextensiones de nucleótidos en ninguno de los extremos. Con mayor frecuencia dicha molécula será de hebra doble a lo largo de toda su longitud.

El término “hebra antisentido” o "hebra guía" se refiere a la hebra de un ARNi, por ejemplo, un ARNhd, que incluye una región que es sustancialmente complementaria a una secuencia blanco, por ejemplo, un ARNm de AGT. Como se usa en la presente, el término “región de complementaridad” se refiere a la región de la hebra antisentido que es sustancialmente complementaria a una secuencia, por ejemplo una secuencia blanco, por ejemplo, una secuencia nucleotídica de AGT, como se define en la presente. Cuando la región de complementariedad no es completamente complementaria a la secuencia blanco, las faltas de complementaridad pueden darse en las regiones internas o terminales de la molécula. En general, las faltas de complementaridad más toleradas son en las regiones terminales, por ejemplo, dentro de los 5, 4, o 3 nucleótidos desde el extremo 5’ o 3’ del ARNi. En algunas formas de realización, un agente de ARN de hebra doble de la invención incluye una falta de complementaridad nucleotídica en la hebra antisentido. En algunas formas de realización, un agente de ARN de hebra doble de la invención incluye una falta de complementaridad nucleotídica en la hebra sentido. En algunas formas de realización, la falta de complementaridad nucleotídica está, por ejemplo, dentro de los 5, 4, 3 nucleótidos desde el extremo 3’ del ARNi. En otra forma de realización, la falta de complementaridad nucleotídica está, por ejemplo, en el nucleótido 3’ terminal del ARNi.

El término “hebra sentido” o "hebra pasajera" como se usa en la presente, se refiere a la hebra de un ARNi que incluye una región que es sustancialmente complementaria a una región de la hebra antisentido tal como se define el término en la presente.

Como se usa en la presente, “sustancialmente todos los nucleótidos están modificados” significa que están modificados en gran medida pero no en su totalidad y puede incluir no más de 5, 4, 3, 2, o 1 nucleótidos no modificados.

Como se usa en la presente, el término “región de escisión” se refiere a una región que se localiza inmediatamente adyacente al sitio de escisión. El sitio de escisión es el sitio del blanco en donde ocurre la escisión. En algunas formas de realización, la región de escisión comprende tres bases en cualquiera de los extremos, e inmediatamente adyacentes al sitio de escisión. En algunas formas de realización, la región de escisión comprende dos bases en cualquiera de los extremos e inmediatamente adyacentes al sitio de escisión. En algunas formas de realización, el sitio de escisión específicamente se da en el sitio unido por los nucleótidos 10 y 11 de la hebra antisentido, y la región de escisión comprende los nucleótidos 11, 12 y 13.

Como se usa en la presente, y a menos que se indique otra cosa, el término “complementario”, cuando se usa para describir una primera secuencia nucleotídica en relación a una segunda secuencia nucleotídica, se refiere a la capacidad de un oligonucleótido o polinucleótido que comprende la primera secuencia nucleotídica para hibridizar y formar una estructura de dúplex bajo ciertas condiciones con un oligonucleótido o polinucleótido que comprende la segunda secuencia nucleotídica, como lo comprenderán las personas con experiencia en el arte. Dichas condiciones, por ejemplo, pueden ser condiciones rigurosas, en donde las condiciones rigurosas pueden incluir: NaCl 400 mM, PIPES 40 mM pH 6,4, EDTA 1 mM, 50°C o 70°C entre 12 y 16 horas seguido por lavado (véase, por ejemplo, “Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrook, y col. (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press). Se pueden

aplicar otras condiciones, tales como condiciones fisiológicamente relevantes tales como las que se hallan dentro de un organismo. Las personas con experiencia en el arte serán capaces de determinar el conjunto de condiciones más apropiadas para una prueba de complementaridad de dos secuencias de acuerdo con la aplicación definitiva de los nucleótidos hibridizados.

Las secuencias complementarias dentro de un ARNi, por ejemplo, dentro de un ARNhd como se describe en la presente, incluyen un apareamiento de bases del oligonucleótido o polinucleótido que comprende una primera secuencia nucleotídica con un oligonucleótido o polinucleótido que comprende una segunda secuencia nucleotídica a lo largo de toda la longitud de una o de ambas secuencias nucleotídicas. Dichas secuencias se pueden denominar como "completamente complementarias" una con respecto a la otra en la presente. Sin embargo, cuando una primera secuencia se denomina como "sustancialmente complementaria" con respecto a una segunda secuencia en la presente, las dos secuencias pueden ser completamente complementarias, o las mismas pueden formar un o más, pero en general no más de 5, 4, 3, o 2 pares de bases no apareados ante su hibridización, para un dúplex de hasta 30 pares de bases, a la vez que se retiene la capacidad para hibridizar bajo las condiciones más relevantes para su aplicación final, por ejemplo, la inhibición de la expresión génica a través de una vía RISC. Sin embargo, cuando dos oligonucleótidos se diseñan para formar, ante su hibridización, una o más sobreextensiones de hebra individual, dichas sobreextensiones no deben interpretarse como faltas de complementaridad con respecto a la determinación de la complementaridad. Por ejemplo, un ARNhd que comprende un oligonucleótido de 21 nucleótidos de longitud y otro oligonucleótido de 23 nucleótidos de longitud, en donde el

oligonucleótido más largo comprende una secuencia de 21 nucleótidos que es completamente complementaria al oligonucleótido más corto, aún puede denominarse como “completamente complementario” para los propósitos que se describen en la presente.

Las secuencias “complementarias”, como se usa en la presente, también pueden incluir, o estar formadas completamente a partir de pares de bases distintos a Watson-Crick o pares de bases formados a partir de nucleótidos no naturales y nucleótidos modificados, en la medida en que se cumplan los requerimientos anteriores con respecto a su capacidad para hibridizar. Dichos pares de bases distintos a Watson-Crick incluyen, a título enunciativo no taxativo, el apareamiento de bases tambaleante G:U o de Hoogstein.

Los términos “complementaria”, “completamente complementaria” y “sustancialmente complementaria” en la presente pueden usarse con respecto al apareamiento de bases entre la hebra sentido y la secuencia antisentido de un ARNhd, o entre la hebra antisentido de un agente de ARN de hebra doble y una secuencia blanco, como se comprenderá a partir del contexto de su uso.

Como se usa en la presente, un polinucleótido que es “sustancialmente complementario a por lo menos parte de” un ARN mensajero (ARNm) se refiere a un polinucleótido que es sustancialmente complementario a una parte continua del ARNm de interés (por ejemplo, un ARNm que codifica para un gen AGT). Por ejemplo, un polinucleótido es complementario a por lo menos una parte de un ARNm de AGT si la secuencia es sustancialmente complementaria a una parte ininterrumpida de un ARNm que codifica para un gen AGT.

En consecuencia, en algunas formas de realización, los polinucleótidos de hebra sentido y los polinucleótidos de hebra antisentido divulgados en la

presente son completamente complementarios a la secuencia blanco de AGT. En otras formas de realización, los polinucleótidos de hebra sentido o los polinucleótidos de hebra antisentido divulgados en la presente son sustancialmente complementarios a la secuencia blanco de AGT y comprenden una secuencia nucleotídica continua que es al menos 80% complementaria a lo largo de toda su longitud a la región equivalente de la secuencia nucleotídica de una cualquiera de las SEQ ID NOs:1 y 2, o un fragmento de una cualquiera de las SEQ ID NOs:1 y 2, tal como por lo menos 90%, o 95% complementaria; o 100% complementaria.

En consecuencia, en algunas formas de realización, los polinucleótidos de hebra antisentido divulgados en la presente son completamente complementarios a la secuencia blanco de AGT. En otras formas de realización, los polinucleótidos de hebra antisentido divulgados en la presente son sustancialmente complementarios a la secuencia blanco de AGT y comprenden una secuencia nucleotídica continua que es al menos aproximadamente 90% complementaria a lo largo de toda su longitud a la región equivalente de la secuencia nucleotídica de la SEQ ID NO:1, o un fragmento de la SEQ ID NO:1, tal como aproximadamente 90%, o aproximadamente 95%, complementaria. En determinadas formas de realización, el fragmento de la SEQ ID NO: 1 se selecciona a partir del grupo de nucleótidos 632-658, 635-658, 636-658, 1248-1273, 1248-1270, 1250-1272, 1251-1273, 1580-1602, 1584-1606, 1587-1609, 1601-1623, 1881-1903, 2074-2097, 2074-2096, 2075-2097, 2080-2102, 2272-2294, 2276-2298, 2281-2304, 2281-2303, o 2282-2304 de la SEQ ID NO: 1. En formas de realización preferidas, el dúplex no consiste en la hebra sentido que consiste en uscsucccAfcCfUfUfuucuucuaauL96 (SEQ ID NO: 13) y la secuencia

antisentido que consiste en asUfsuagAfagaaaagGfuGfggagascsu (SEQ ID NO: 14).

En algunas formas de realización, un ARNi de la invención incluye una hebra antisentido que es sustancialmente complementaria a la secuencia blanco de AGT y comprende una secuencia nucleotídica continua que es al menos aproximadamente 90% complementaria a lo largo de toda su longitud a la región equivalente de la secuencia nucleotídica de una cualquiera de las hebras sentido de la Tabla 3, Tabla 5, o Tabla 6 o un fragmento de una cualquiera de las hebras sentido de la Tabla 3, Tabla 5, o Tabla 6, tal como aproximadamente 90%, 95%, o 100% complementaria.

En algunas formas de realización, un ARNi de la invención incluye una hebra sentido que es sustancialmente complementaria a un polinucleótido de hebra antisentido que, a su vez, es complementario a una secuencia blanco de AGT, y en donde el polinucleótido de la hebra sentido comprende una secuencia nucleotídica continua que es al menos aproximadamente 90% complementaria a lo largo de toda su longitud a la región equivalente de la secuencia nucleotídica de una cualquiera de las hebras antisentido de la Tabla 3, 5, o 6, o un fragmento de una cualquiera de las hebras antisentido de la Tabla 3 o 5, tal como aproximadamente 90%, 95%, o 100%.

En determinadas formas de realización, las hebra sentido y antisentido de la Tabla 3 o de la Tabla 5 se seleccionan a partir de los dúplex AD-85481, AD-84701, AD-84703, AD-84704, AD-84705, AD-84707, AD-84715, AD-84716, AD-84739, AD-84741, AD-84746, AD-85432, AD-85434, AD-85435, AD-85436, AD-85437, AD-85438, AD-85441, AD-85442, AD-85443, AD-85444, AD-85446, AD-85447, AD-85482, AD-85485, AD-85493, AD-85496, AD-85504, AD-85517, AD-

85519, AD-85524, AD-85622, AD-85623, AD-85625, AD-85626, AD-85634, AD-85635, AD-85637 y AD-85655.

En general, un "ARNi" incluye ribonucleótidos con modificaciones químicas. Dichas modificaciones pueden incluir todos los tipos de modificaciones divulgadas en la presente o conocidas en el arte. Cualquiera de dichas modificaciones, como se usan en una molécula de ARNhd, están abarcadas por el término "ARNi" para los propósitos de esta memoria descriptiva y las reivindicaciones.

En un aspecto de la invención, un agente para usar en los métodos y las composiciones de la invención es una molécula de oligonucleótido antisentido de hebra individual que inhibe a un ARNm blanco a través de un mecanismo de inhibición por antisentido. La molécula de oligonucleótido antisentido de hebra individual es complementaria a una secuencia dentro del ARNm blanco. Los oligonucleótidos antisentido de hebra individual pueden inhibir la traducción de una forma estequiométrica mediante apareamiento de bases con el ARNm y obstruyendo físicamente la maquinaria de traducción, véase Dias, N. y col., (2002) *Mol Cancer Ther* 1:347-355. La molécula de oligonucleótido antisentido de hebra individual puede ser de entre aproximadamente 14 y aproximadamente 30 nucleótidos de longitud y tener una secuencia que es complementaria a una secuencia blanco. Por ejemplo, la molécula de oligonucleótido antisentido de hebra individual puede comprender una secuencia que tiene por lo menos aproximadamente 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, o más nucleótidos contiguos de una cualquiera de las secuencias antisentido que se describen en la presente.

La expresión "poner en contacto una célula con un ARNi", tal como un ARNhd, como se usa en la presente, incluye poner en contacto una célula

mediante cualquier medio posible. Poner en contacto una célula con un ARNi incluye poner en contacto una célula *in vitro* con el ARNi o poner en contacto una célula *in vivo* con el ARNi. El paso de poner en contacto se puede hacer en forma directa o indirecta. Por lo tanto, por ejemplo, el ARNi se puede poner en contacto físico con la célula a través del individuo que lleva a cabo el método, o como alternativa, el ARNi se puede poner en una situación que permitirá o causará que subsiguientemente se ponga en contacto con la célula.

El paso de poner en contacto con una célula *in vitro* se puede realizar, por ejemplo, incubando la célula con el ARNi. El paso de poner en contacto una célula *in vivo* se puede realizar, por ejemplo, mediante inyección del ARNi en el tejido, o cerca del mismo, en donde se localiza la célula, o mediante la inyección del ARNi dentro de otra área, por ejemplo, el torrente sanguíneo o el espacio subcutáneo, de manera que el agente alcance subsiguientemente el tejido en donde se localiza la célula a contactar. Por ejemplo, el ARNi puede contener o estar acoplado a un ligando, por ejemplo, GalNAc, que direcciona al ARNi a un sitio de interés, por ejemplo, el hígado. También son posibles combinaciones de métodos *in vitro* e *in vivo* para poner en contacto. Por ejemplo, también se puede contactar una célula *in vitro* con un ARNi y subsiguientemente trasplantarse a un sujeto.

En determinadas formas de realización, poner en contacto una célula con un ARNi incluye “introducir” o “administrar el ARNi dentro de la célula” facilitando o efectuando la captación o la absorción dentro de la célula. La absorción o la captación de un ARNi pueden ocurrir a través de difusión simple o mediante procesos celulares activos, o mediante agentes o dispositivos auxiliares. La introducción de un ARNi dentro de una célula puede ser *in vitro* o *in vivo*. Por

ejemplo, para la introducción *in vivo*, se puede inyectar el ARNi dentro de un sitio tisular o administrarse por vía sistémica. La introducción *in vitro* dentro de una célula incluye métodos conocidos en el arte tales como la electroporación y la lipofección. Más adelante en la presente se describen estrategias adicionales o las mismas son conocidas en el arte.

El término "nanopartícula de lípido" o "LNP" designa a una vesícula que comprende una capa lipídica que encapsula a una molécula farmacéuticamente activa, tal como una molécula de ácido nucleico, por ejemplo, un ARNi o un plásmido a partir del que se transcribe un ARNi. Las LNP se describen en, por ejemplo, las Patentes de los EE.UU. Nos. 6.858.225; 6.815.432; 8.158.601; y 8.058.069; cuyos contenidos completos se incorporan a la presente a modo de referencia.

Como se usa en la presente, un "sujeto" es un animal, tal como un mamífero, incluyendo a un primate (tal como un humano, un primate no humano, por ejemplo, un mono, y un chimpancé), un no primate (tal como una vaca, un cerdo, un caballo, una cabra, un conejo, una oveja, un hámster, un conejillo de las indias, un gato, un perro, una rata o un ratón), o un ave que expresa el gen blanco, ya sea en forma endógena o heteróloga. En una forma de realización, el sujeto es un humano, tal como un humano que está siendo tratado o evaluado para una enfermedad o trastorno que se beneficiaría a partir de la reducción de la expresión de AGT; un humano en riesgo de una enfermedad o trastorno que se beneficiaría a partir de la reducción de la expresión de AGT; un humano que tiene una enfermedad o trastorno que se beneficiaría a partir de la reducción de la expresión de AGT; o un humano que está siendo tratado para una enfermedad o trastorno que se beneficiaría a partir de la reducción de la expresión de AGT

como se describe en la presente. Los criterios diagnósticos para un trastorno asociado con AGT, por ejemplo, hipertensión, se proveen más adelante. En algunas formas de realización, el sujeto es un humano femenino. En otras formas de realización, el sujeto es un humano masculino. En determinadas formas de realización, el sujeto es parte de un grupo susceptible a sensibilidad a la sal, por ejemplo, adulto negro o mayor ($\geq$ 65 años de edad). En determinadas formas de realización, el sujeto tiene sobrepeso o es obeso, por ejemplo, un sujeto que sufre de obesidad central. En determinadas formas de realización, el sujeto es sedentario. En determinadas formas de realización, el sujeto tiene un embarazo.

Como se usa en la presente, los términos "tratar" o "tratamiento" se refieren a un resultado beneficioso o deseado, tal como la reducción de por lo menos un signo o síntoma de un trastorno asociado con AGT, por ejemplo, hipertensión en un sujeto. El tratamiento también incluye una reducción de uno o más signos o síntomas asociados con una expresión indeseada de AGT, por ejemplo, activación de receptor de angiotensina II de tipo 1 (AT_1R) (por ejemplo, hipertensión, enfermedad renal crónica, accidente cerebrovascular, infarto de miocardio, insuficiencia cardiaca, aneurismas, enfermedad de arterias periféricas, enfermedad cardiaca, aumento de estrés oxidativo, por ejemplo, incremento de formación de superóxidos, inflamación, vasoconstricción, retención de sodio y agua, pérdida de potasio y magnesio, supresión de renina, hipertrofia de miocitos y de músculo liso, incremento de síntesis de colágeno, estimulación de fibrosis vascular, miocárdica y renal, incremento de la frecuencia y fuerza de las contracciones cardiacas, frecuencia cardiaca alterada, por ejemplo, arritmia incrementada, estimulación de inhibidor de activador de plasminógeno 1 (PAI1), activación del sistema nervioso simpático, e incremento

de la secreción de endotelina), síntomas de hipertensión asociada con embarazo (por ejemplo, preeclampsia, y eclampsia), incluyendo, a título enunciativo no taxativo restricción de desarrollo intrauterino (IUGR) o restricción de desarrollo fetal, síntomas asociados con hipertensión maligna, síntomas asociados con hiperaldosteronismo; disminución de la extensión de activación indeseada de AT_1R; estabilización (es decir, no empeoramiento) del estado de la activación crónica de AT_1R; mejora o paliación de activación indeseada de AT_1R (por ejemplo, hipertensión, enfermedad renal crónica, accidente cerebrovascular, infarto de miocardio, insuficiencia cardiaca, aneurismas, enfermedad de arterias periféricas, enfermedad cardiaca, aumento de estrés oxidativo, por ejemplo, incremento de formación de superóxidos, inflamación, vasoconstricción, retención de sodio y agua, pérdida de potasio y magnesio, supresión de renina, hipertrofia de miocitos y de músculo liso, incremento de la síntesis de colágeno, estimulación de fibrosis vascular, miocárdica y renal, incremento de la frecuencia y fuerza de las contracciones cardiacas, frecuencia cardiaca alterada, por ejemplo, arritmia incrementada, estimulación de inhibidor de activador de plasminógeno 1 (PAI1), activación del sistema nervioso simpático, e incremento de la secreción de endotelina) ya sea en forma detectable o no detectable. Los trastornos asociados con AGT también pueden incluir obesidad, esteatosis hepática/ hígado graso, por ejemplo, esteatohepatitis no alcohólica (NASH) y enfermedad de hígado graso no alcohólica (NAFLD), intolerancia a la glucosa, diabetes tipo 2 (diabetes no dependiente de insulina), y síndrome metabólico. En determinadas formas de realización, la hipertensión incluye hipertensión asociada con baja actividad de renina en plasma o baja concentración de renina

en plasma. El “tratamiento” también puede significar prolongar la sobrevida en comparación con la sobrevida esperada en ausencia de tratamiento.

El término “inferior” en el contexto del nivel de expresión del gen AGT o de producción de proteína agt en un sujeto, o un marcador o síntoma de enfermedad se refiere a una disminución estadísticamente significativa de dicho nivel. La disminución puede ser, por ejemplo, a por lo menos 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, o 95%, o menos del nivel de detección para el método de detección en una célula o tejido relevante, por ejemplo, una célula hepática, u otra muestra del sujeto, por ejemplo, sangre o suero derivado del mismo, u orina.

Como se usa en la presente, “prevención” o “prevenir”, cuando se usan hacen referencia a una enfermedad o trastorno que se beneficiaría a partir de una reducción de la expresión de un gen AGT o de la producción de la proteína agt, por ejemplo, en un sujeto susceptible a un trastorno asociado con AGT debido a, por ejemplo, envejecimiento, factores genéticos, cambios hormonales, dieta, y un estilo de vida sedentario. En determinadas formas de realización, la enfermedad o trastorno es por ejemplo, un síntoma de activación indeseada de AT_1R, tal como una hipertensión, enfermedad renal crónica, accidente cerebrovascular, infarto de miocardio, insuficiencia cardiaca, aneurismas, enfermedad de arterias periféricas, enfermedad cardiaca, aumento de estrés oxidativo, por ejemplo, incremento de formación de superóxidos, inflamación, vasoconstricción, retención de sodio y agua, pérdida de potasio y magnesio, supresión de renina, hipertrofia de miocitos y de músculo liso, aumento de la síntesis de colágeno, estimulación de fibrosis vascular, miocárdica y renal, incremento de la frecuencia y fuerza de las contracciones cardiacas, frecuencia

cardiaca alterada, por ejemplo, arritmia incrementada, estimulación de inhibidor de activador de plasminógeno 1 (PAI1), activación del sistema nervioso simpático, e incremento de la secreción de endotelina. Los trastornos asociados con AGT también pueden incluir obesidad, esteatosis hepática/ hígado graso, por ejemplo, esteatohepatitis no alcohólica (NASH) y enfermedad de hígado graso no alcohólica (NAFLD), intolerancia a la glucosa, diabetes tipo 2 (diabetes no dependiente de insulina), y síndrome metabólico. En determinadas formas de realización, hipertensión incluye hipertensión asociada con baja actividad de renina en plasma o baja concentración de renina en plasma. La probabilidad de desarrollar, por ejemplo, hipertensión, se reduce, por ejemplo, cuando un individual que tiene un o más factores de riesgo para una hipertensión evita desarrollar la hipertensión o desarrolla una hipertensión con menos severidad en relación a una población que tiene los mismos factores de riesgo y que no recibe tratamiento como se describe en la presente. El fracaso en el desarrollo de un trastorno asociado con AGT, por ejemplo, hipertensión o un retraso en el tiempo para el desarrollo de la hipertensión de meses o de años se consideran como una prevención eficaz. La prevención puede requerir la administración de más de una dosis del agente de ARNi.

Como se usa en la presente, el término "enfermedad asociada a angiotensinógeno" o "enfermedad asociada a AGT", es una enfermedad o trastorno que está causada, o asociada con la activación del sistema renina-angiotensina-aldosterona (RAAS), o una enfermedad o trastorno cuyos síntomas o cuya progresión responde a la inactivación del RAAS. El término "enfermedad asociada a angiotensinógeno" incluye a una enfermedad, trastorno o condición que se beneficiaría a partir de la reducción de la expresión del AGT. Dichas

enfermedades típicamente se asocian con presión arterial elevada. Los ejemplos no limitantes de enfermedades asociadas a angiotensinógeno incluyen a hipertensión, por ejemplo, prehipertensión (también conocida como prehipertensión), hipertensión primaria (también conocida como hipertensión esencial o hipertensión idiopática), hipertensión secundaria (también conocida como hipertensión no esencial), hipertensión sistólica o diastólica aislada, hipertensión asociada con embarazo (por ejemplo, preeclampsia, eclampsia, y preeclampsia postparto), hipertensión en diabéticos, hipertensión resistente, hipertensión refractaria, hipertensión paroxística, hipertensión renovascular (también conocida como hipertensión renal), hipertensión de Goldblatt, hipertensión ocular, glaucoma, hipertensión pulmonar, hipertensión portal, hipertensión venosa sistémica, hipertensión sistólica, hipertensión lábil; enfermedad cardiaca hipertensiva, nefropatía hipertensiva, aterosclerosis, arteriosclerosis, vasculopatía (incluyendo enfermedad vascular periférica), nefropatía diabética, retinopatía diabética, insuficiencia cardiaca crónica, cardiomiopatía, miopatía cardiaca diabética, glomeruloesclerosis, coartación de la aorta, aneurisma aórtico, fibrosis ventricular, apnea del sueño, insuficiencia cardiaca (por ejemplo, disfunción sistólica de ventrículo izquierdo), infarto de miocardio, angina, accidente cerebrovascular, enfermedad renal por ejemplo, enfermedad renal crónica o nefropatía diabética opcionalmente en el contexto de embarazo, insuficiencia renal, por ejemplo, insuficiencia renal crónica, y esclerosis sistémica (por ejemplo, crisis renal por escleroderma). En determinadas formas de realización, la enfermedad asociada a AGT incluye la restricción de desarrollo intrauterino (IUGR) o la restricción de desarrollo fetal. En determinadas formas de realización, los trastornos asociados a AGT también

incluyen obesidad, esteatosis hepática/ hígado graso, por ejemplo, esteatohepatitis no alcohólica (NASH) y enfermedad de hígado graso no alcohólica (NAFLD), intolerancia a la glucosa, diabetes tipo 2 (diabetes no dependiente de insulina), y síndrome metabólico. En determinadas formas de realización, la hipertensión incluye hipertensión asociada con baja actividad de renina en plasma o baja concentración de renina en plasma.

Los umbrales de presión arterial elevada y las etapas de la hipertensión se discuten en detalle más adelante.

En una forma de realización, una enfermedad asociada a angiotensinógeno es la hipertensión primaria. La “hipertensión primaria” es un resultado de causas ambientales o genéticas (por ejemplo, un resultado de una causa médica subyacente no obvia).

En una forma de realización, una enfermedad asociada a angiotensinógeno es la hipertensión secundaria. La “hipertensión secundaria” tiene un trastorno subyacente identificable que puede ser de múltiples etiologías, incluyendo causas renales, vasculares, y endocrinas, por ejemplo, enfermedad de parénquima renal (por ejemplo, riñones poliquísticos, enfermedad glomerular o intersticial), enfermedad vascular renal (por ejemplo, estenosis arterial renal, displasia fibromuscular), trastornos endocrinos (por ejemplo, exceso de adrenocorticosteroides o mineralocorticoides, feocromocitoma, hipertiroidismo o hipotiroidismo, exceso de hormona de crecimiento, hiperparatiroidismo), coartación de la aorta, o uso de contraceptivos orales.

En una forma de realización, una enfermedad asociada a angiotensinógeno es la hipertensión asociada con embarazo, por ejemplo, hipertensión crónica del embarazo, hipertensión gestacional, preeclampsia,

eclampsia, preeclampsia superpuesta a hipertensión crónica, síndrome HELLP, e hipertensión gestacional (también conocida como hipertensión transitoria del embarazo, hipertensión crónica identificada en la segunda mitad del embarazo, e hipertensión inducida por embarazo (PIH)). Los criterios diagnósticos para la hipertensión asociada con el embarazo se proveen más adelante.

En una forma de realización, una enfermedad asociada a angiotensinógeno es la hipertensión resistente. La “hipertensión resistente” es la presión sanguínea por arriba de un valor objetivo (por ejemplo, por arriba de 130 mmHg sistólica o por arriba de 90 diastólica) a pesar del uso concurrente de tres agentes antihipertensivos de diferentes clases, uno de los cuales es un diurético de tiazida. Los sujetos cuya presión sanguínea se controla con cuatro o más medicaciones también se consideran con hipertensión resistente.

Una "cantidad terapéuticamente eficaz" o “cantidad profilácticamente eficaz” también incluye a una cantidad de un agente de ARNi que produce algún efecto deseado con una proporción razonable de beneficio/riesgo aplicable a cualquier tratamiento. El ARNi que se emplea en los métodos de la presente invención se puede administrar en una cantidad suficiente para producir una proporción razonable de beneficio / riesgo aplicable a dicho tratamiento.

La expresión "farmacéuticamente aceptable" se emplea en la presente para referirse a aquellos compuestos, materiales, composiciones, o formas de dosificación que son, dentro del alcance del juicio médico, adecuados para usar en contacto con los tejidos de sujetos humanos y sujetos animales sin u exceso de toxicidad, irritación, respuesta alérgica u otro problema o complicación, acorde con una proporción razonable de beneficio / riesgo.

La expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable" como se usa en la presente designa a un material, composición, o vehículo farmacéuticamente aceptable, tal como un relleno líquido o sólido, diluyente, excipiente, asistente de fabricación (por ejemplo, lubricante, talco, estearato de magnesio, calcio o zinc, o ácido esteárico), o material encapsulante de solvente, involucrado en la vehiculización o transporte del compuesto objeto dese un órgano, o parte del cuerpo, a otro órgano o parte del cuerpo. Cada vehículo debe ser "aceptable" en el sentido de ser compatible con los otros ingredientes de la formulación y no deletéreo para el sujeto que se está tratando. Dichos vehículos son conocidos en el arte. Los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen a vehículos para administración por inyección.

El término “muestra”, como se usa en la presente, incluye una colección de fluidos, células o tejidos similares aislados de un sujeto, así como fluidos, células, o tejidos presentes dentro de un sujeto. Los ejemplos de fluidos biológicos incluyen a la sangre, suero y fluidos serosos, plasma, fluido cerebroespinal, fluidos oculares, linfa, orina, saliva, y similares. Las muestras de tejido pueden incluir muestras de tejidos, órganos, o regiones localizadas. Por ejemplo, las muestras pueden derivar de órganos particulares, partes de órganos, o fluidos o células dentro de esos órganos. En determinadas formas de realización, las muestras pueden derivar del hígado (por ejemplo, hígado entero o ciertos segmentos de hígado o ciertos tipos de células del hígado, tales como, por ejemplo, los hepatocitos). En algunas formas de realización, una “muestra derivada de un sujeto” se refiere a orina obtenida del sujeto. Una “muestra derivada de un sujeto” puede referirse a sangre o suero sanguíneo o plasma del sujeto.

I. ARNi de la invención

La presente invención provee ARNi que inhiben la expresión de un gen AGT. En formas de realización preferidas, el ARNi incluye moléculas de ácido ribonucleico de hebra doble (ARNhd) para inhibir la expresión de un gen AGT en una célula, tal como una célula dentro de un sujeto, por ejemplo, un mamífero, tal como un humano susceptible al desarrollo de un trastorno asociado con AGT, por ejemplo, hipertensión. El agente de ARNihd incluye una hebra antisentido que tiene una región de complementaridad que es complementaria a por lo menos una parte de un ARNm formado durante la expresión de un gen AGT. La región de complementariedad es de aproximadamente entre 19 y 30 nucleótidos de longitud (por ejemplo, aproximadamente 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, o 19 nucleótidos de longitud). Ante el contacto con una célula que expresa el gen AGT, el ARNi inhibe la expresión del gen AGT (por ejemplo, un gen AGT de humano, primate, no primate, o de rata) en por lo menos aproximadamente 50% según el ensayo, por ejemplo, por un método de PCR o de ADN ramificado (ARNram), o mediante un método basado en proteína, tal como por análisis por inmunofluorescencia, usando, por ejemplo, técnicas de transferencia western o citometría de flujo. En formas de realización preferidas, la inhibición de la expresión se determina por el método de qPCR que se provee en los ejemplos, especialmente en el Ejemplo 2 con el ARNpi a una concentración de 10 nM en una línea celular apropiada del organismo que allí se provee. En formas de realización preferidas, la inhibición de la expresión *in vivo* se determina por noqueo del gen humano en un roedor que expresa el gen humano, por ejemplo, un ratón o un ratón infectado por AAV que expresa el gen blanco humano, por

ejemplo, cuando se administra una dosis individual a 3 mg/kg en el nadir de la expresión de ARN. La expresión de ARN en el hígado se determina usando los métodos de PCR que se proveen en el Ejemplo 2.

Un ARNhd incluye dos hebras de ARN que son complementarias y que se hibridizan para formar una estructura de dúplex bajo condiciones en las que se usará el ARNhd. Una hebra de un ARNhd (la hebra antisentido) incluye una región de complementaridad que es sustancialmente complementaria, y en general completamente complementaria, a una secuencia blanco. La secuencia blanco puede derivar de la secuencia de un ARNm formado durante la expresión de un gen AGT. La otra hebra (la hebra sentido) incluye una región que es complementaria a la hebra antisentido, de manera que las dos hebras hibridizan forman una estructura de dúplex cuando se combinan bajo condiciones adecuadas. Como se describe en algún otro lugar de la presente y como se conoce en el arte, las secuencias complementarias de un ARNhd también pueden estar contenidas como regiones autocomplementarias de una molécula individual de ácido nucleico, en oposición al caso de los oligonucleótidos separados.

En general, la estructura de dúplex tiene entre 19 y 30 pares de bases de longitud. De manera similar, la región de complementariedad con la secuencia blanco tiene entre 19 y 30 nucleótidos de longitud.

En algunas formas de realización, el ARNhd es de entre aproximadamente 19 y aproximadamente 23 nucleótidos de longitud, o entre aproximadamente 25 y aproximadamente 30 nucleótidos de longitud. En general, el ARNhd tiene una longitud suficiente como para servir de sustrato para la enzima Dicer. Por ejemplo, es bien sabido en el arte que los ARNhd más largos

que aproximadamente entre 21 y 23 nucleótidos de longitud pueden servir como sustratos para Dicer. Tal como es reconocido por las personas con experiencia en el arte, la región de un ARN blanco de la escisión con mayor frecuencia será parte de una molécula de ARN más grande, con frecuencia una molécula de ARNm. En los casos relevantes, una “parte” de un ARNm blanco es un secuencia continua de un ARNm blanco con una longitud suficiente para permitirle ser un sustrato para la escisión dirigida por ARNi (es decir, la escisión a través de una vía de RISC).

Las personas con experiencia en el arte también reconocerán que la región dúplex es una parte funcional primaria de un ARNhd, por ejemplo, una región dúplex de entre aproximadamente 19 y aproximadamente 30 pares de bases, por ejemplo, aproximadamente entre 19 y 30, entre 19 y 29, entre 19 y 28, entre 19 y 27, entre 19 y 26, entre 19 y 25, entre 19 y 24, entre 19 y 23, entre 19 y 22, entre 19 y 21, entre 19 y 20, entre 20 y 30, entre 20 y 29, entre 20 y 28, entre 20 y 27, entre 20 y 26, entre 20 y 25, entre 20 y 24,20 y 23, entre 20 y 22, entre 20 y 21, entre 21 y 30, entre 21 y 29, entre 21 y 28, entre 21 y 27, entre 21 y 26, entre 21 y 25, entre 21 y 24, entre 21 y 23, o entre 21 y 22 pares de bases. Por lo tanto, en una forma de realización, en la extensión en que se procese a un dúplex funcional, de por ejemplo, entre 15 y 30 pares de bases, que se direcciona contra un ARN para su escisión, una molécula de ARN o complejo de moléculas de ARN con una región dúplex mayor que 30 pares de bases, es un ARNhd. Por lo tanto, las personas con experiencia en el arte reconocerán que en una forma de realización, un microARN es un ARNhd. En otra forma de realización, un ARNhd no es un microARN de origen natural. En otra forma de

realización, un agente de ARNi útil contra la expresión del gen AGT no se genera en la célula blanco por escisión de un ARNhd más grande.

Un ARNhd como se describe en la presente además puede incluir una o más sobreextensiones de nucleótidos de hebra individual por ejemplo, de entre 1 y 4, entre 2 y 4, entre 1 y 3, entre 2 y 3, 1, 2, 3, o 4 nucleótidos. Los ARNhd que tienen por lo menos una sobreextensión de un nucleótido pueden tener propiedades inhibidoras superiores en relación a sus contrapartes de extremos romos. Una sobreextensión de nucleótidos puede comprender o consistir en un análogo de nucleótido/nucleósido, incluyendo un desoxinucleótido/nucleósido. La o las sobreextensiones pueden estar en la hebra sentido, en la hebra antisentido, o en cualquier combinación de los anteriores. Más aún, el o los nucleótidos de una sobreextensión pueden estar presentes en el extremo 5', en el extremo 3', o en ambos extremos de una hebra antisentido o sentido de un ARNhd.

Un ARNhd se puede sintetizar mediante métodos estándares conocidos en el arte. Los compuestos de ARNi de hebra doble de la invención se pueden preparar usando un procedimiento de dos pasos. Primero, las hebras individuales de la molécula de ARN de hebra doble se preparan por separado. Luego, las hebras componentes se alinean. Las hebras individuales del compuesto de ARNpi se pueden preparar usando síntesis orgánica en fase solución o en fase sólida, o ambas. La síntesis orgánica ofrece la ventaja de que las hebras de oligonucleótido que comprenden nucleótidos no naturales o modificados se pueden preparar fácilmente. De manera similar, los oligonucleótidos de hebra individual de la invención se pueden preparar usando síntesis orgánica en fase solución o en fase sólida, o ambas.

En un aspecto, un ARNhd de la invención incluye por lo menos dos secuencias nucleotídicas, una secuencia sentido y una secuencia antisentido. La hebra sentido se selecciona a partir del grupo de secuencias que se proveen en las Tablas 3, 5, y 6, y la correspondiente hebra antisentido de la hebra sentido se selecciona a partir del grupo de secuencias de las Tabla 3, 5, y 6. En este aspecto, una de las dos secuencias es complementaria a la otra de las dos secuencias, en donde una de las secuencias es sustancialmente complementaria a una secuencia de un ARNm generado durante la expresión de un gen AGT. Como tal, en este aspecto, un ARNhd incluirá dos oligonucleótidos, en donde un oligonucleótido se describe como la hebra sentido en las Tabla 5, o 6, y el segundo oligonucleótido se describe como la correspondiente hebra antisentido de la hebra sentido en la Tabla 3, 5, o 6. En determinadas formas de realización, las secuencias sustancialmente complementarias del ARNhd están contenidas en oligonucleótidos separados. En otras formas de realización, las secuencias sustancialmente complementarias del ARNhd están contenidas en un oligonucleótido individual. En determinadas formas de realización, la hebra sentido o antisentido de la Tabla 3 o 5 se selecciona entre AD-85481, AD-84701, AD-84703, AD-84704, AD-84705, AD-84707, AD-84715, AD-84716, AD-84739, AD-84741, AD-84746, AD-85432, AD-85434, AD-85435, AD-85436, AD-85437, AD-85438, AD-85441, AD-85442, AD-85443, AD-85444, AD-85446, AD-85447, AD-85482, AD-85485, AD-85493, AD-85496, AD-85504, AD-85517, AD-85519, AD-85524, AD-85622, AD-85623, AD-85625, AD-85626, AD-85634, AD-85635, AD-85637 y AD-85655.

Ha de comprenderse que, a pesar de que las secuencias de la Tabla 3 no se describen como secuencias modificadas o conjugadas, el ARN del ARNi de

la invención por ejemplo, un ARNhd de la invención, puede comprender una cualquiera de las secuencias que se establecen en la Tabla 3, o las secuencias de la Tabla 5 o 6 que están modificadas, o las secuencias de la Tabla 5 o 6 que están conjugadas. En otras palabras, la invención abarca los ARNhd de la Tabla 3, 5, y 6 que están sin modificar, sin conjugar, modificados o conjugados, como se describe en la presente.

Las personas con experiencia en el arte son conscientes de que los ARNhd que tienen una estructura de dúplex de aproximadamente entre 20 y 23 pares de bases, por ejemplo, 21 pares de bases han sido designados como en particular eficaces para inducir interferencia por ARN (Elbashir y col., *EMBO* 2001, 20:6877-6888). Sin embargo, otros autores han hallado que ARN con estructuras de dúplex más cortos o más largos también pueden ser eficaces (Chu y Rana (2007) RNA 14:1714-1719; Kim y col. (2005) *Nat Biotech* 23:222-226). En las formas de realización que se describieron previamente, en virtud de la naturaleza de las secuencias oligonucleotídicas que se proveen en cualquiera de las Tablas 3, 5, y 6, los ARNhd que se describen en la presente pueden incluir por lo menos una hebra de una longitud mínima de 21 nucleótidos. Razonablemente se puede esperar que dúplex más cortos que tienen una de las secuencias de las Tablas 3, 5, y 6 menos solamente unos pocos nucleótidos en uno o ambos extremos, sean similarmente eficaces en comparación con los ARNhd que se describieron previamente. Por lo tanto, los ARNhd que tienen una secuencia de al menos 19, 20, o más nucleótidos contiguos derivados de una de las secuencias de las Tablas 3, 5, y 6, y que difieren en su capacidad para inhibir la expresión de un gen AGT en no más de aproximadamente 5, 10, 15, 20, 25, o

30 % de inhibición en comparación con un ARNhd que comprende la secuencia completa, están contemplados dentro del alcance de la presente invención.

Además, los ARN que se proveen en las Tablas 3, 5, y 6 identifican uno o más sitios en un transcripto de AGT que es susceptible a la escisión mediada por RISC. Como tal, la presente invención además presenta ARNi que se direccionan hacia dentro de uno de estos sitios. Como se usa en la presente, se dice que un ARNi se direcciona a un sitio particular de un transcripto de ARN cuando el ARNi promueve la escisión del transcripto en cualquier lugar dentro del sitio particular. Dicho ARNi en general incluirá por lo menos aproximadamente 19 nucleótidos contiguos de una de las secuencias que se proveen en las Tablas 3, 5, y 6 acoplados a secuencias nucleotídicas adicionales tomadas de la región contigua a la secuencia seleccionada en un gen AGT.

II. ARNi modificados de la Invención

En determinadas formas de realización, el ARN del ARNi de la invención por ejemplo, un ARNhd, está no modificado, y no comprende, por ejemplo, modificaciones químicas o conjugaciones conocidas en el arte y descritas en la presente. En otras formas de realización, el ARN de un ARNi de la invención, por ejemplo, un ARNhd, está modificado químicamente para aumentar la estabilidad u otras características beneficiosas. En determinadas formas de realización de la invención, sustancialmente todos los nucleótidos de un ARNi de la invención están modificados. En otras formas de realización de la invención, todos los nucleótidos de un ARNi o sustancialmente todos los nucleótidos de un ARNi están modificados, es decir, en una hebra del ARNi hay presentes no más de 5, 4, 3, 2, o 1 nucleótido no modificado.

Los ácidos nucleicos presentados en la invención se pueden sintetizar o modificar mediante métodos bien establecidos en el arte, tales como los que se describen en “Current protocols in nucleic acid chemistry”, Beaucage, S.L. y col. (Edrs.), John Wiley & Sons, Inc., Nueva York, NY, EE.UU., que se incorpora a la presente a modo de referencia. Las modificaciones incluyen, por ejemplo, modificaciones de extremos, por ejemplo, modificaciones de extremo 5’ (fosforilación, conjugación, uniones invertidas) o modificaciones del extremo 3’ (conjugación, nucleótidos de ADN, uniones invertidas, etc.); modificaciones de bases, por ejemplo, reemplazo con bases estabilizantes, bases desestabilizantes, o bases que se aparean con un repertorio expandido de contrapartes, eliminación de bases (nucleótidos abásicos), o bases conjugadas; modificaciones de azúcares (por ejemplo, en la posición 2’o en la posición 4’) o reemplazo del azúcar; o modificaciones de esqueleto, incluyendo modificación o reemplazo de las uniones fosfodiéster. Los ejemplos específicos de compuestos de ARNi útiles en las formas de realización que se describen en la presente incluyen, a título enunciativo no taxativo ARN que contienen esqueletos modificados o uniones internucleosídicas no naturales. Los ARN que tienen esqueletos modificados incluyen, entre otros, aquellos que no tienen un átomo de fósforo en el esqueleto. Para los propósitos de esta memoria descriptiva, y como se citan a veces en el arte, los ARN modificados que no tienen un átomo de fósforo en su esqueleto internucleosídico también se pueden considerar como oligonucleósidos. En algunas formas de realización, un ARNi modificado tendrá un átomo de fósforo en su esqueleto internucleosídico.

Los esqueletos modificados de ARN incluyen, por ejemplo, fosforotioatos, fosforotioatos quirales, fosforoditioatos, fosfotriésteres,

aminoalquilfosfotriésteres, metil y otros alquil fosfonatos incluyendo 3'-alquilen fosfonatos y fosfonatos quirales, fosfinatos, fosforamidatos incluyendo 3'-amino fosforamidato y aminoalquilfosforamidatos, tionofosforamidatos, tionoalquilfosfonatos, tionoalquilfosfotriésteres, y boranofosfatos que tienen uniones 3'-5' normales, análogos de estos con uniones 2'-5', y aquellos que tienen una polaridad invertida en donde los pares de unidades nucleosídicas adyacentes están conectados por uniones 3'-5' a 5'-3' o 2'-5' a 5'-2'. También se incluyen varias sales, mezclas de sales y formas de ácido libre.

Las Patentes de los EE.UU. representativas que poseen contenidos sobre la preparación de las uniones anteriores que contienen fósforo incluyen, a título enunciativo no taxativo, las Patentes de los EE.UU. 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; 5.405.939; 5.453.496; 5.455.233; 5.466.677; 5.476.925; 5.519.126; 5.536.821; 5.541.316; 5.550.111; 5.563.253; 5.571.799; 5.587.361; 5.625.050; 6.028.188; 6.124.445; 6.160.109; 6.169.170; 6.172.209; 6. 239.265; 6.277.603; 6.326.199; 6.346.614; 6.444.423; 6.531.590; 6.534.639; 6.608.035; 6.683.167; 6.858.715; 6.867.294; 6.878.805; 7.015.315; 7.041.816; 7.273.933; 7.321.029; y la Pat. de los EE.UU. RE39464, cuyos contenidos completos se incorporan a la presente a modo de referencia.

Los esqueletos modificados de ARN que no incluyen un átomo de fósforo en los mismos tienen esqueletos que están formados por uniones internucleosídicas de alquilo o cicloalquilo de cadena corta, uniones internucleosídicas mixtas de heteroátomos y alquilo o cicloalquilo, o una o más uniones internucleosídicas heteroatómicas o heterocíclicas de cadena corta. Estos incluyen a aquellos que tienen uniones morfolino (formados en parte por

la parte de azúcar de un nucleósido); esqueletos de siloxano; esqueletos sulfuro, sulfóxido y sulfona; esqueletos de formacetilo y tioformacetilo; esqueletos de metilen formacetilo y tioformacetilo; esqueletos que contienen alquenos; esqueletos de sulfamato; esqueletos de metilenimino y metilenhidrazino; esqueletos de sulfonato y sulfonamida; esqueletos de amida; y otros que tienen partes componentes mixtas de N, O, S, y CH_2.

Las Patentes de los EE.UU. representativas que poseen contenidos acerca de la preparación delos oligonucleótidos anteriores incluyen, a título enunciativo no taxativo, las Patentes de los EE.UU. Nos. 5.034.506; 5.166.315; 5.185.444; 5.214.134; 5.216.141; 5.235.033; 5.64.562; 5.264.564; 5.405.938; 5.434.257; 5.466.677; 5.470.967; 5.489.677; 5.541.307; 5.561.225; 5.596.086; 5.602.240; 5.608.046; 5.610.289; 5.618.704; 5.623.070; 5.663.312; 5.633.360; 5.677.437; y 5.677.439, cuyos contenidos completos se incorporan a la presente a modo de referencia.

Los miméticos de ARN apropiados están contemplados para su uso en los ARNi que se proveen en la presente, en donde tanto el azúcar como la unión internucleosídica, es decir, el esqueleto, de las unidades nucleotídicas se reemplazan por grupos nuevos. Las unidades de base se mantienen para la hibridización con un compuesto blanco de ácido nucleico apropiado. Uno de dichos compuestos oligoméricos en donde se ha demostrado que un mimético de ARN tiene excelentes propiedades de hibridización se denomina como ácido nucleico peptídico (PNA). En los compuestos de PNA, el esqueleto de azúcar de un ARN se reemplaza por un esqueleto que contiene amida, en particular un esqueleto de aminoetilglicina. Las nucleobases se retienen y se unen directa o indirectamente a átomos de nitrógeno aza de la parte amida del esqueleto. Las

Patentes de los EE.UU. representativas que poseen contenidos acerca de la preparación de compuestos de PNA incluyen, a título enunciativo no taxativo, las Patentes de los EE.UU. Nos. 5.539.082; 5.714.331; y 5.719.262, cuyos contenidos completos se incorporan a la presente a modo de referencia. Otros compuestos de PNA adecuados para usar en los ARNi de la invención se describen, por ejemplo, en Nielsen y col., *Science*, 1991, 254, 1497-1500.

Algunas formas de realización presentadas en la invención incluyen ARN con esqueletos de fosforotioato y oligonucleósidos con esqueletos de heteroátomo, y en particular --CH_2--NH--CH_2-, --CH_2--N(CH_3)--O--CH_2– [conocido como esqueleto de metileno (metilimino) o MMI], --CH_2--O--N(CH_3)–CH_2--, --CH_2--N(CH_3)--N(CH_3)--CH_2-- y --N(CH_3)--CH_2--CH_2--[en donde el esqueleto de fosfodiéster nativo está representado como --O--P--O--CH_2--] de la Patente de los EE.UU. antes mencionada No. 5.489.677, y los esqueletos de amida de la Patente de los EE.UU. antes mencionada No. 5.602.240. En algunas formas de realización, los ARN que se presentan en la presente tienen las estructuras de esqueleto con morfolino de la Patente de los EE.UU. antes mencionada No. 5.034.506.

Los ARN modificados también pueden contener una o más unidades de azúcar sustituido. Los ARNi, por ejemplo, los ARNhd, que se presentan en la presente pueden incluir una de las siguientes modificaciones en la posición 2': OH; F; O-, S-, o N-alquilo; O-, S-, o N-alquenilo; O-, S- o N-alquinilo; o O-alquil-O-alquilo, en donde el alquilo, alquenilo y alquinilo pueden ser C_1 a C_{10} alquilo o C_2 a C_{10} alquenilo y alquinilo sustituidos o no sustituidos. Los ejemplos de modificaciones adecuadas incluyen a O[(CH_2)$_n$O] $_m$$CH_3$, O($CH_2$).$_nOCH_3$, O($CH_2$)$_n$$NH_2$, O($CH_2$) $_n$$CH_3$, O($CH_2$)$_nONH_2$, y O($CH_2$)$_n$ON[($CH_2$)$_n$$CH_3$)]$_2$, en donde

n y m son entre 1 y aproximadamente 10. En otras formas de realización, los ARNhd incluyen una de las siguientes modificaciones en la posición 2': C_1 a C_{10} alquilo inferior, alquilo inferior sustituido, alcarilo, aralquilo, O-alcarilo o O-aralquilo, SH, SCH_3, OCN, Cl, Br, CN, CF_3, OCF_3, $SOCH_3$, SO_2CH_3, ONO_2, NO_2, N_3, NH_2, heterocicloalquilo, heterocicloalcarilo, aminoalquilamino, polialquilamino, sililo sustituido, un grupo de escisión de ARN, un grupo reportero, un intercalador, un grupo para mejorar las propiedades farmacocinéticas de un ARNi, o un grupo para mejorar las propiedades farmacodinámicas de un ARNi, y otros sustituyentes que tienen propiedades similares. En algunas formas de realización, la modificación incluye a 2'-metoxietoxilo (2'-O--$CH_2CH_2OCH_3$, también conocido como 2'-O-(2-metoxietilo) o 2'-MOE) (Martin y col., *Helv. Chim. Acta*, 1995, 78:486-504) es decir, un grupo alcoxi-alcoxilo. Otro ejemplo de modificación es 2'-dimetilaminooxietoxilo, es decir, un grupo $O(CH_2)_2ON(CH_3)_2$, también conocido como 2'-DMAOE, como se describe en los ejemplos más adelante en la presente, y 2'-dimetilaminoetoxietoxilo (también conocido en el arte como 2'-O-dimetilaminoetoxietilo o 2'-DMAEOE), es decir, 2'-O--CH_2--O--CH_2--$N(CH_2)_2$. Ejemplos adicionales de modificaciones incluyen: 5'-Me-2'-F nucleótidos, 5'-Me-2'-OMe nucleótidos, 5'-Me-2'-desoxinucleótidos, (isómeros tanto R como S en estas tres familias); 2'-alcoxialquilo; y 2'-NMA (N-metilacetamida).

Otras modificaciones incluyen 2'-metoxilo (2'-OCH_3), 2'-aminopropoxilo (2'-$OCH_2CH_2CH_2NH_2$) y 2'-flúor (2'-F). También se pueden hacer modificaciones similares en otras posiciones del ARN de un ARNi, en particular en la posición 3' del azúcar del nucleótido 3' terminal o en los ARNhd con uniones 2'-5' y en la posición 5' del nucleótido 5' terminal. Los ARNi también pueden tener miméticos

de azúcar tales como unidades de ciclobutilo en lugar del azúcar pentofuranosilo. Las Patentes de los EE.UU. representativas que poseen contenidos acerca de la preparación de dichas estructuras de azúcar modificado incluyen, a título enunciativo no taxativo, las Patentes de los EE.UU. 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; y 5.700.920, algunas de las cuales son del mismo propietario que la presente solicitud. Los contenidos completos de cada una de las anteriores se incorporan a la presente a modo de referencia.

Un ARNi también puede incluir modificaciones o sustituciones de nucleobase (con frecuencia llamadas en el arte simplemente como “base”). Como se usa en la presente, las nucleobases “no modificadas” o “naturales” incluyen a las bases de purina adenina (A) y guanina (G), y las bases de pirimidina timina (T), citosina (C), y uracilo (U). Las nucleobases modificadas incluyen a otras nucleobases sintéticas y naturales tales como desoxitimina (dT), 5-metilcitosina (5-me-C), 5-hidroximetilo citosina, xantina, hipoxantina, 2-aminoadenina, 6-metilo y otros derivados alquilo de adenina y guanina, derivados 2-propilo y otros derivados alquilo de adenina y guanina, 2-tiouracilo, 2-tiotimina y 2-tiocitosina, 5-halouracilo y citosina, 5-propinil uracilo y citosina, 6-azo uracilo, citosina y timina, 5-uracilo (pseudouracilo), 4-tiouracilo, 8-halo, 8-amino, 8-tiol, 8-tioalquilo, 8-hidroxilo y otras adeninas y guaninas sustituidas en posición 8, 5-halo, en particular 5-bromo, 5-trifluorometilo y otros uracilos y citosinas sustituidas en la posición 5, 7-metilguanina y 7-metiladenina, 8-azaguanina y 8-azaadenina, 7-desazaguanina y 7-desazaadenina y 3-desazaguanina y 3-desazaadenina. Otras nucleobases incluyen a aquellas que

se divulgan en la Patente de los EE.UU. No. 3.687.808, las que se describen en Modified Nucleosides in Biochemistry, Biotechnology and Medicine, Herdewijn, P. ed. Wiley-VCH, 2008; las que se describen en The Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering, páginas 858 a 859, Kroschwitz, J. L, ed. John Wiley & Sons, 1990, las divulgadas por Englisch y col., Angewandte Chemie, International Edition, 1991, 30, 613, y aquellas divulgadas por Sanghvi, Y S., Capítulo 15, dsRNA Research and Applications, páginas 289-302, Crooke, S. T. y Lebleu, B., Ed., CRC Press, 1993. Algunas de estas nucleobases son útiles en particular para incrementar la afinidad de unión de los compuestos oligoméricos que se presentan en la invención. Estas incluyen a pirimidinas 5-sustituidas, 6-azapirimidinas y purinas N-2, N-6 y 0-6 sustituidas, incluyendo a 2-aminopropiladenina, 5-propiniluracilo y 5-propinilcitosina. Se ha demostrado que las sustituciones de 5-metilcitosina incrementan la estabilidad del dúplex de ácido nucleico entre 0,6 y 1,2°C (Sanghvi, Y. S., Crooke, S. T. and Lebleu, B., Eds., dsRNA Research and Applications, CRC Press, Boca Raton, 1993, pp. 276-278) y son ejemplos de sustituciones de base, incluso más en particular cuando se combinan con modificaciones de 2'-O-metoxietil azúcar.

Las Patentes de los EE.UU. representativas que poseen contenidos acerca de la preparación de algunas de las nucleobases modificadas antes indicadas así como de otras nucleobases modificadas incluyen, a título enunciativo no taxativo, las Patentes de los EE.UU. antes indicadas Nos. 3.687.808. 4.845.205; 5.130.30; 5.134.066; 5.175.273; 5.367.066; 5.432.272; 5.457.187; 5.459.255; 5.484.908; 5.502.177; 5.525.711; 5.552.540; 5.587.469; 5.594.121. 5.596.091; 5.614.617; 5.681.941; 5.750.692; 6.015.886; 6.147.200; 6.166.197; 6.222.025; 6.235.887; 6.380.368; 6.528.640; 6.639.062; 6.617.438;

7.045.610; 7.427.672; y 7.495.088, cuyos contenidos completos se incorporan a la presente a modo de referencia.

El ARN de un ARNi también se puede modificar para incluir uno o más ácidos nucleicos bloqueados (LNA). Un ácido nucleico bloqueado es un nucleótido que tiene una unidad de ribosa modificada en donde la unidad de ribosa comprende un puente extra que conecta los carbonos 2' y 4'. Esta estructura "bloquea" en forma eficaz la ribosa en la conformación estructural 3'-endo. Se ha demostrado que el agregado de ácidos nucleicos bloqueados a los ARNpi incrementa la estabilidad del ARNpi en suero, y reduce los efectos inespecíficos (Elmen, J. y col., (2005) *Nucleic Acid Research* 33(1):439-447; Mook, OR. y col., (2007) *Mol Canc Ther* 6(3):833-843; Grunweller, A. y col., (2003) *Nucleic Acid Research* 31(12):3185-3193).

En algunas formas de realización, el ARN de un ARNi también se puede modificar para incluir una o más unidades de azúcar bicíclico. Un “azúcar bicíclico” es un anillo de furanosilo modificado por un puente entre dos átomos. Un “nucleósido bicíclico” (“BNA”) es un nucleósido que tiene una unidad de azúcar que comprende un puente que conecta dos átomos de carbono del anillo del azúcar, mediante lo cual se forma una sistema anular bicíclico. En determinadas formas de realización, el puente conecta el 4′-carbono y el 2′-carbono del anillo de azúcar. Por lo tanto, en algunas formas de realización un agente de la invención puede incluir uno o más ácidos nucleicos bloqueados (LNA). Un ácido nucleico bloqueado es un nucleótido que tiene una unidad de ribosa modificada en donde la unidad de ribosa comprende un puente extra que conecta los carbonos de las posiciones 2' y 4'. En otras palabras, un LNA es un nucleótido que comprende una unidad de azúcar bicíclico que comprende un

puente 4'-CH_2-O-2'. Esta estructura "bloquea" en forma eficaz la ribosa en la conformación estructural 3'-endo. Se ha demostrado que el agregado de ácidos nucleicos bloqueados a los ARNpi incrementa la estabilidad de los ARNpi estabilidad en suero, y reduce los efectos inespecíficos (Elmen, J. y col., (2005) *Nucleic Acid Research* 33(1):439-447; Mook, OR. y col., (2007) *Mol Canc Ther* 6(3):833-843; Grunweller, A. y col., (2003) *Nucleic Acid Research* 31(12):3185-3193). Los ejemplos de nucleósidos bicíclicos para usar en los polinucleótidos de la invención incluyen a título enunciativo no taxativo nucleósidos que comprenden un puente entre los átomos del anillo de ribosilo de las posiciones 4′ y 2′. En determinadas formas de realización, los agentes de polinucleótido antisentido de la invención incluyen uno o más nucleósidos bicíclicos que comprenden un puente entre las posiciones 4′ y 2′. Los ejemplos de dichos nucleósidos bicíclicos con puente entre las posiciones 4′ y 2′ incluyen a título enunciativo no taxativo 4′-(CH_2)—O-2′ (LNA); 4′-(CH_2)—S-2′; 4′-$(CH_2)_2$—O-2′ (ENA); 4′-$CH(CH_3)$—O-2′ (también llamado “etilo constreñido” o “cEt”) y 4′-$CH(CH_2OCH_3)$—O-2′ (y análogos del mismo; véase, por ejemplo, la Patente de los EE.UU. No. 7.399.845); 4′-$C(CH_3)(CH_3)$—O-2′ (y análogos del mismo; véase por ejemplo, la Patente de los EE.UU. No. 8.278.283); 4′-CH_2—$N(OCH_3)$-2′ (y análogos del mismo; véase por ejemplo, la Patente de los EE.UU. No. 8.278.425); 4′-CH_2—O—$N(CH_3)$-2′ (véase, por ejemplo, la Publicación de Patente de los EE.UU. No. 2004/0171570); 4′-CH_2—N(R)—O-2′, en donde R es H, C1-C12 alquilo, o un grupo protector (véase, por ejemplo, la Patente de los EE.UU. No. 7.427.672); 4′-CH_2—$C(H)(CH_3)$-2′ (véase, por ejemplo, Chattopadhyaya y col*., J. Org. Chem*., 2009, 74, 118-134); y 4′-CH_2—$C(=CH_2)$-2′ (y análogos del mismo; véase, por ejemplo, la Patente de los EE.UU. No.

8.278.426). Los contenidos completos de cada una de las referencias anteriores se incorporan a la presente a modo de referencia.

Otras Patentes de los EE.UU. y Publicaciones de Patente de los EE.UU. representativas que poseen contenidos acerca de la preparación de nucleótidos de ácido nucleico bloqueado incluyen, a título enunciativo no taxativo, a las siguientes: Patentes de los EE.UU. Nos. 6.268.490; 6.525.191; 6.670.461; 6.770.748; 6.794.499; 6.998.484; 7.053.207; 7.034.133;7.084.125; 7.399.845; 7.427.672; 7.569.686; 7.741.457; 8.022.193; 8.030.467; 8.278.425; 8.278.426; 8.278.283; US 2008/0039618; y US 2009/0012281, cuyos contenidos completos se incorporan a la presente a modo de referencia.

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

El ARN de un ARNi también se puede modificar para incluir uno o más etil nucleótidos constreñidos. Como se usa en la presente, a "un etil nucleótido constreñido" o "cEt" es un ácido nucleico bloqueado que comprende una unidad de azúcar bicíclico que comprende un puente 4'-CH(CH_3)-O-2'. En una forma de realización, un etil nucleótido constreñido está en la conformación S denominado en la presente como “S-cEt.”

Un ARNi de la invención también puede incluir uno o más “nucleótidos conformacionalmente constreñidos” (“CRN”). Los CRN son análogos de nucleótido con un conector que conecta los carbonos C2’ y C4’ de la ribosa o los carbonos C3 y C5′ de la ribosa. Los CRN bloquean el anillo de ribosa en una conformación estable e incrementan la afinidad de hibridización al ARNm. El conector tiene una longitud suficiente para colocar el oxígeno en una posición

óptima de estabilidad y afinidad lo que resulta en un menor plegamiento del anillo de ribosa.

Las publicaciones representativas que poseen contenidos acerca de la preparación de algunos de los CRN anteriormente mencionados incluyen, a título enunciativo no taxativo, la Publicación de Patente de los EE.UU. No. 2013/0190383; y la Publicación PCT WO 2013/036868, cuyos contenidos completos se incorporan a la presente a modo de referencia.

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

Las Publicaciones de los EE.UU. representativas que poseen contenidos acerca de la preparación de UNA incluyen, a título enunciativo no taxativo, la Patente de los EE.UU. No. 8.314.227; y las Publicaciones de Patente de los EE.UU. Nos. 2013/0096289; 2013/0011922; y 2011/0313020, cuyos contenidos completos se incorporan a la presente a modo de referencia.

Las modificaciones potencialmente estabilizantes en los extremos de las moléculas de ARN pueden incluir N- (acetilaminocaproil)-4-hidroxiprolinol (Hyp-

C6-NHAc), N-(caproil-4-hidroxiprolinol (Hyp-C6), N-(acetil-4-hidroxiprolinol (Hyp-NHAc), timidina-2'-0-desoxitimidina (éter), N-(aminocaproil)-4-hidroxiprolinol (Hyp-C6-amino), 2-docosanoil-uridina-3"- fosfato, base dT invertida (idT) y otros. La divulgación de estas modificaciones se puede hallar en la Publicación PCT No. WO 2011/005861.

Otras modificaciones de los nucleótidos de un ARNi de la invención incluyen un 5' fosfato o mimético 5' fosfato, por ejemplo, un fosfato o mimético de fosfato 5'-terminal en la hebra antisentido de un ARNi. Los miméticos adecuados de fosfato se divulgan en, por ejemplo la Publicación de Patente de los EE.UU. No. 2012/0157511, cuyos contenidos completos se incorporan en la presente a modo de referencia.

A. ARNi modificados que Comprenden Motivos de la Invención

En ciertos aspectos de la invención, los agentes de ARN de hebra doble de la invención incluyen agentes con modificaciones químicas como se divulga, por ejemplo, en WO2013/075035, cuyos contenidos completos se incorporan a la presente a modo de referencia. El documento WO2013/075035 provee motivos de tres modificaciones idénticas en tres nucleótidos consecutivos dentro de una hebra sentido o hebra antisentido de un agente de ARNihd, en particular en el sitio de escisión, o cerca del mismo. En algunas formas de realización, la hebra sentido y la hebra antisentido del agente de ARNihd pueden estar modificadas completamente de alguna otra manera. La introducción de estos motivos interrumpe el patrón de modificación, si está presente, de la hebra sentido o antisentido. El agente de ARNihd opcionalmente se puede conjugar con un ligando derivado de GalNAc, por ejemplo en la hebra sentido.

Más específicamente, cuando la hebra sentido y la hebra antisentido del agente de ARN de hebra doble están completamente modificadas para tener uno o más motivos de tres modificaciones idénticas en tres nucleótidos consecutivos en el sitio de escisión, o cerca del mismo, de al menos una hebra de un agente de ARNihd, se observó actividad de silenciamiento del gen del agente de ARNihd.

En consecuencia, la invención provee agentes de ARN de hebra doble capaces de inhibir la expresión de un gen blanco (es decir, gen AGT) *in vivo*. El agente de ARNi comprende una hebra sentido y una hebra antisentido. Cada hebra del agente de ARNi puede tener, por ejemplo, entre 17 y 30 nucleótidos de longitud, entre 25 y 30 nucleótidos de longitud, entre 27 y 30 nucleótidos de longitud, entre 19 y 25 nucleótidos de longitud, entre 19 y 23 nucleótidos de longitud, entre 19 y 21 nucleótidos de longitud, entre 21 y 25 nucleótidos de longitud, o entre 21 y 23 nucleótidos de longitud.

La hebra sentido y la hebra antisentido típicamente forman un dúplex ARN de hebra doble ("ARNhd"), también denominado en la presente como "agente de ARNihd." La región dúplex de un agente de ARNihd puede tener, por ejemplo, entre 27 y 30 pares de nucleótidos de longitud, entre 19 y 25 pares de nucleótidos de longitud, entre 19 y 23 pares de nucleótidos de longitud, entre 19 y 21 pares de nucleótidos de longitud, entre 21 y 25 pares de nucleótidos de longitud, o entre 21 y 23 pares de nucleótidos de longitud. En otro ejemplo, la longitud de la región dúplex se selecciona entre 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, y 27 nucleótidos de longitud.

En determinadas formas de realización, el agente de ARNihd puede contener una o más regiones de sobreextensión o grupos protectores en el

extremo 3', en el extremo 5', o en ambos extremos de una o de ambas hebras. La sobreextensión puede tener, independientemente, entre 1 y 6 nucleótidos de longitud, entre por ejemplo entre 2 y 6 nucleótidos de longitud, entre 1 y 5 nucleótidos de longitud, entre 2 y 5 nucleótidos de longitud, entre 1 y 4 nucleótidos de longitud, entre 2 y 4 nucleótidos de longitud, entre 1 y 3 nucleótidos de longitud, entre 2 y 3 nucleótidos de longitud, o entre 1 y 2 nucleótidos de longitud. En determinadas formas de realización, las regiones de sobreextensión pueden incluir regiones de sobreextensión extendidas como se indicó anteriormente. Las sobreextensiones pueden ser el resultado de una hebra que es más larga que la otra, o el resultado de dos hebras de la misma longitud que están escalonadas. La sobreextensión puede formar una no coincidencia con el ARNm blanco o la misma puede ser complementaria a las secuencias génicas blanco o puede ser otra secuencia. La primera y la segunda hebra también pueden unirse, por ejemplo, por bases adicionales para formar una horquilla, o por otros conectores distintos a bases.

En determinadas formas de realización, los nucleótidos en la región de sobreextensión del agente de ARNihd pueden ser cada uno en forma independiente un nucleótido modificado o no modificado incluyendo, a título enunciativo no taxativo, modificado en 2'-azucar, tal como, 2'-F, 2'-O-metilo, timidina (T), 2`-O-metoxietil-5-metiluridina (Teo), 2`-O-metoxietiladenosina (Aeo), 2`-O-metoxietil-5-metilcitidina (m5Ceo), y cualquier combinación de los mismos. Por ejemplo, TT puede ser una secuencia de sobreextensión para cualquiera de los extremos de cualquiera de las hebras. La sobreextensión puede formar una no coincidencia con el ARNm blanco o la misma puede ser complementaria a las secuencias génicas blanco, o puede ser otra secuencia.

Las sobreextensiones del extremo 5’ o 3’ de la hebra sentido, la hebra antisentido, o de ambas hebras del agente de ARNihd pueden estar fosforiladas. En algunas formas de realización, la o las regiones de sobreextensión contienen dos nucleótidos que tienen un fosforotioato entre los dos nucleótidos, en donde los dos nucleótidos pueden ser iguales o diferentes. En algunas formas de realización, la sobreextensión está presente en el extremo 3’ de la hebra sentido, de la hebra antisentido, o de ambas hebras. En algunas formas de realización, esta sobreextensión del extremo 3’ está presente en la hebra antisentido. En algunas formas de realización, esta sobreextensión del extremo 3’ está presente en la hebra sentido.

El agente de ARNihd puede contener solamente una sobreextensión individual, que puede fortalecer la actividad de interferencia del ARNi, sin afectar su estabilidad global. Por ejemplo, la sobreextensión de una sola hebra se puede localizar en el extremo 3’ de la hebra sentido o, como alternativa, en el extremo 3’ de la hebra antisentido. EL ARNi también puede tener un extremo romo, localizado en el extremo 5’ de la hebra antisentido (o en el extremo 3’ de la hebra sentido) o *viceversa*. En general, la hebra antisentido del agente de ARNihd tiene una sobreextensión de nucleótidos en el extremo 3’, y el extremo 5’ es romo. Sin pretender estar limitados por la teoría, el extremo romo asimétrico en el extremo 5’ de la hebra antisentido y la sobreextensión del extremo 3’ de la hebra antisentido favorecen la carga de la hebra guía en el proceso de RISC.

En determinadas formas de realización, el agente de ARNihd es un polímero de doble extremo romo de 19 nucleótidos de longitud, en donde la hebra sentido contiene por lo menos un motivo de tres modificaciones 2’-F en tres nucleótidos consecutivos en las posiciones 7, 8, 9 desde el extremo 5’. La

hebra antisentido contiene por lo menos un motivo de tres modificaciones 2'-O-metilo en tres nucleótidos consecutivos en las posiciones 11, 12, 13 desde el extremo 5'.

En otras formas de realización, el agente de ARNihd es un polímero de doble extremo romo de 20 nucleótidos de longitud, en donde la hebra sentido contiene por lo menos un motivo de tres modificaciones 2'-F en tres nucleótidos consecutivos en las posiciones 8, 9, 10 desde el extremo 5'. La hebra antisentido contiene por lo menos un motivo de tres modificaciones 2'-O-metilo en tres nucleótidos consecutivos en las posiciones 11, 12, 13 desde el extremo 5'.

En aún otras formas de realización, el agente de ARNihd es un polímero de doble extremo romo de 21 nucleótidos de longitud, en donde la hebra sentido contiene por lo menos un motivo de tres modificaciones 2'-F en tres nucleótidos consecutivos en las posiciones 9, 10, 11 desde el extremo 5'. La hebra antisentido contiene por lo menos un motivo de tres modificaciones 2'-O-metilo en tres nucleótidos consecutivos en las posiciones 11, 12, 13 desde el extremo 5'.

En determinadas formas de realización, el agente de ARNihd comprende una hebra sentido de 21 nucleótidos y una hebra antisentido de 23 nucleótidos, en donde la hebra sentido contiene por lo menos un motivo de tres modificaciones 2'-F en tres nucleótidos consecutivos en las posiciones 9, 10, 11 desde el extremo 5'; la hebra antisentido contiene por lo menos un motivo de tres modificaciones 2'-O-metilo en tres nucleótidos consecutivos en las posiciones 11, 12, 13 desde el extremo 5', en donde un extremo del agente de ARNi es romo, mientras que el otro extremo comprende una sobreextensión de 2

nucleótidos. Preferiblemente, la sobreextensión de 2 nucleótidos está en el extremo 3’ de la hebra antisentido.

Cuando la sobreextensión de 2 nucleótidos está en el extremo 3’ de la hebra antisentido, puede haber dos uniones internucleotídicas de fosforotioato entre los tres nucleótidos terminales, en donde dos de los tres nucleótidos son los nucleótidos de la sobreextensión, y el tercer nucleótido es un nucleótido apareado vecino al nucleótido de la sobreextensión. En una forma de realización, el agente de ARNi además tiene dos uniones internucleotídicas de fosforotioato entre los tres nucleótidos terminales tanto en el extremo 5’ de la hebra sentido como en el extremo 5’ de la hebra antisentido. En determinadas formas de realización, cada nucleótido en la hebra sentido y la secuencia antisentido del agente de ARNihd, incluyendo los nucleótidos que son parte de los motivos, son nucleótidos modificados. En determinadas formas de realización cada residuo está modificado de manera independiente con un 2’-O-metilo o 3’-flúor, por ejemplo, en un motivo alternante. Opcionalmente, el agente de ARNihd además comprende un ligando (preferiblemente $GalNAc_3$).

En determinadas formas de realización, el agente de ARNihd comprende una hebra sentido y una hebra antisentido, en donde la hebra sentido tiene entre 25 y 30 residuos de nucleótido de longitud, en donde comenzando desde el nucleótido 5' terminal (posición 1) las posiciones 1 a 23 de la primera hebra comprenden por lo menos 8 ribonucleótidos; la hebra antisentido tiene entre 36 y 66 residuos de nucleótido de longitud y, comenzando desde el nucleótido 3’ terminal, comprende al menos 8 ribonucleótidos en las posiciones apareadas con las posiciones 1 a 23 de la hebra sentido para formar un dúplex; en donde por lo menos el nucleótido 3 ' terminal de la hebra antisentido está desapareado

con la hebra sentido, y hasta 6 nucleótidos 3' terminales consecutivos están desapareados con la hebra sentido, mediante lo cual se forma una sobreextensión de hebra individual en el extremo 3' de entre 1 y 6 nucleótidos; en donde el extremo 5' de hebra antisentido comprende entre 10 y 30 nucleótidos consecutivos que están desapareados con la hebra sentido, mediante lo cual se forma una sobreextensión de simple hebra en el extremo 5' de entre 10 y 30 nucleótidos; en donde por lo menos los nucleótidos 5' terminal y 3' terminal de la hebra sentido forman apareamiento de bases con los nucleótidos de la hebra antisentido cuando las hebras sentido y antisentido se alinean para una máxima complementaridad, mediante lo cual se forma una región sustancialmente de tipo dúplex entre las hebras sentido y antisentido; y la hebra antisentido es suficientemente complementaria a un ARN blanco a lo largo de por lo menos 19 ribonucleótidos de longitud de la hebra antisentido para reducir la expresión del gen blanco cuando se introduce el ácido nucleico de hebra doble dentro de una célula de mamífero; y en donde la hebra sentido contiene por lo menos un motivo de tres modificaciones 2'-F en tres nucleótidos consecutivos, en donde por lo menos uno de los motivos se encuentra en el sitio de escisión o cerca del mismo. La hebra antisentido contiene por lo menos un motivo de tres modificaciones 2'-O-metilo en tres nucleótidos consecutivos en el sitio de escisión, o cerca del mismo.

En determinadas formas de realización, el agente de ARNihd comprende hebras sentido y antisentido, en donde el agente de ARNihd comprende una primera hebra que tiene una longitud que es de al menos 25 y como máximo de 29 nucleótidos y una segunda hebra que tiene una longitud que es como máximo de 30 nucleótidos con por lo menos un motivo de tres modificaciones 2'-O-metilo

en tres nucleótidos consecutivos en la posición 11, 12, 13 desde el extremo 5'; en donde el extremo 3' de la primera hebra y el extremo 5' de la segunda hebra forman un extremo romo y la segunda hebra es 1 a 4 nucleótidos más larga en su extremo 3' que la primera hebra, en donde la región dúplex que es de al menos 25 nucleótidos de longitud, y la segunda hebra es suficientemente complementaria con un ARNm blanco a lo largo de por lo menos 19 nucleótidos de la segunda hebra longitud para reducir la expresión del gen blanco cuando el agente de ARNi se introduce en una célula de mamífero, y en donde la escisión mediante Dicer del agente de ARNihd preferiblemente resulta en un ARNpi que comprende el extremo 3' de la segunda hebra, reduciendo de esta manera la expresión del gen blanco en el mamífero. Opcionalmente, el agente de ARNihd además comprende un ligando.

En determinadas formas de realización, la hebra sentido del agente de ARNihd contiene por lo menos un motivo de tres modificaciones idénticas en tres nucleótidos consecutivos, en donde uno de los motivos se encuentra en el sitio de escisión en la hebra sentido.

En determinadas formas de realización, la hebra antisentido del agente de ARNihd también puede contener por lo menos un motivo de tres modificaciones idénticas en tres nucleótidos consecutivos, en donde uno de los motivos se encuentra en el sitio de escisión o cerca del mismo en la hebra antisentido.

Para un agente de ARNihd que tiene una región dúplex de entre 19 y 23 nucleótidos de longitud, el sitio de escisión de la hebra antisentido típicamente se encuentra alrededor de 10, 11, y 12 posiciones desde el extremo 5'. Por lo tanto los motivos de tres modificaciones idénticas pueden encontrarse en las

posiciones 9, 10, 11; las posiciones 10, 11, 12; las posiciones 11, 12, 13; las posiciones 12, 13, 14; o las posiciones 13, 14, 15 de la hebra antisentido, comenzando la cuenta a partir del primer nucleótido desde el extremo 5' de la hebra antisentido, o, comenzando la cuenta desde el primer nucleótido apareado en la región dúplex desde el extremo 5' de la hebra antisentido. El sitio de escisión en la hebra antisentido también puede cambiar de acuerdo con la longitud de la región dúplex del agente de ARNihd desde el extremo 5'.

La hebra sentido del agente de ARNihd puede contener por lo menos un motivo de tres modificaciones idénticas en tres nucleótidos consecutivos en el sitio de escisión de la hebra; y la secuencia antisentido puede tener por lo menos un motivo de tres modificaciones idénticas en tres nucleótidos consecutivos en el sitio de escisión, o cerca del mismo, de la hebra. Cuando la hebra sentido y la secuencia antisentido forman un ARNhd dúplex, la hebra sentido y la secuencia antisentido pueden estar tan alineadas que un motivo de los tres nucleótidos en la hebra sentido y un motivo de los tres nucleótidos en la hebra antisentido tengan por lo menos una superposición de nucleótido, es decir, por lo menos uno de los tres nucleótidos del motivo en la hebra sentido forma un par de bases con por lo menos uno de los tres nucleótidos del motivo en la hebra antisentido. Como alternativa, por lo menos dos nucleótidos pueden superponerse, o los tres nucleótidos pueden superponerse.

En algunas formas de realización, la hebra sentido del agente de ARNihd puede contener más de un motivo de tres modificaciones idénticas en tres nucleótidos consecutivos. El primer motivo puede encontrarse en el sitio de escisión, o cerca del mismo, de la hebra y los otros motivos pueden ser una modificación de ala. El término "modificación de ala" en la presente se refiere a

un motivo que se encuentra en otra parte de la hebra que está separada del motivo en el sitio de escisión, o cerca del mismo, de la misma hebra. La modificación de ala se encuentra adyacente al primer motivo o está separada por al menos uno o más nucleótidos. Cuando los motivos están inmediatamente adyacente entre sí entonces la química de los motivos son diferentes entre sí, y cuando los motivos están separados por uno o más nucleótido las químicas pueden ser iguales o diferentes. Puede haber presentes dos o más modificaciones de ala. Por ejemplo, cuando existen hay presentes dos modificaciones de ala, cada modificación de ala puede encontrarse en un extremo en relación al primer motivo que está en el sitio de escisión, o cerca del mismo, o en cada lado del motivo líder.

De igual modo que la hebra sentido, la hebra antisentido del agente de ARNihd puede contener más de un motivo de tres modificaciones idénticas en tres nucleótidos consecutivos, con por lo menos uno de los motivos que se encuentra en el sitio de escisión o cerca del mismo de la hebra. Esta hebra antisentido también puede contener una o más modificaciones de ala en un alineamiento similar a las modificaciones de ala que pueden estar presentes en la hebra sentido.

En algunas formas de realización, la modificación de ala en la hebra sentido o hebra antisentido del agente de ARNihd típicamente no incluye los primeros uno o dos nucleótidos terminales en el extremo 3', extremo 5', o ambos extremos de la hebra.

En otras formas de realización, la modificación de ala en la hebra sentido o hebra antisentido del agente de ARNihd típicamente no incluye los primeros

uno o dos nucleótidos apareados en la región dúplex en el extremo 3', extremo 5', o ambos extremos de la hebra.

Cuando la hebra sentido y la secuencia antisentido del agente de ARNihd contienen cada una por lo menos una modificación de ala, las modificaciones de ala pueden caer en el mismo extremo de la región dúplex, y tienen una superposición de uno, dos, o tres nucleótidos.

Cuando la hebra sentido y la secuencia antisentido del agente de ARNihd contienen cada una por lo menos dos modificaciones de ala, la hebra sentido y la secuencia antisentido pueden estar tan alineadas que dos modificaciones cada una de una hebra caen en un extremo de la región dúplex, con una superposición de uno, dos, o tres nucleótidos; dos modificaciones cada una de una hebra caen en el otro extremo de la región dúplex, con una superposición de uno, dos o tres nucleótidos; dos modificaciones de una hebra caen en cada lado del motivo líder, con una superposición de uno, dos o tres nucleótidos en la región dúplex.

En algunas formas de realización, cada nucleótido en la hebra sentido y hebra antisentido del agente de ARNihd, que incluye los nucleótidos que son parte de los motivos, pueden estar modificados. Cada nucleótido puede ser modificado con la misma modificación o diferente la cual puede incluir una o más alteraciones de uno o ambos oxígenos de fosfato no conector o de uno o más de los oxígenos de fosfato conector; alteración de un constituyente del azúcar ribosa, por ejemplo, del 2′-hidroxilo en el azúcar ribosa; el reemplazo masivo de la unidad fosfato con conectores "desfosfo"; modificación o reemplazo de una base de origen natural; y reemplazo o modificación del esqueleto ribosa-fosfato.

Debido a que los ácidos nucleicos son polímeros de subunidades, muchas de las modificaciones se producen en una posición que se repite dentro de un ácido nucleico, por ejemplo, una modificación de una base, o una unidad fosfato, o un O no conector de una unidad fosfato. En algunos casos la modificación se encontrará en todas las posiciones sujeto en el ácido nucleico pero en muchos casos no lo hará. A modo de ejemplo, una modificación puede encontrarse solo en una posición de extremo 3' o 5' terminal, solo puede encontrarse en una región terminal, por ejemplo, en una posición en un nucleótido terminal o en los últimos 2, 3, 4, 5, o 10 nucleótidos de una hebra. Una modificación puede encontrarse en una región de hebra doble, una región de hebra simple, o en ambas. Una modificación puede encontrarse en la región de hebra doble de un ARN o puede encontrarse en una región de hebra simple de un ARN. Por ejemplo, una modificación fosforotioato en una O posición de O no conector puede encontrarse solo en uno o ambos extremos terminales, puede encontrarse solo en una región terminal, por ejemplo, en una posición en un nucleótido terminal o en los últimos 2, 3, 4, 5, o 10 nucleótidos de una hebra, o puede encontrarse en las regiones de hebra doble y hebra simple, en particular en los extremos terminales. El extremo o extremos 5' pueden estar fosforilados.

Puede ser posible, por ejemplo, aumentar la estabilidad, para que se incluyan bases particular en sobreextensiones, o para incluir nucleótidos modificados o sustitutos de nucleótido, en sobreextensiones de hebra simple, por ejemplo, en una sobreextensión 5' o 3', o en ambas. Por ejemplo, puede ser deseable incluir nucleótidos purina en sobreextensiones. En algunas formas de realización todas o algunas de las bases en una sobreextensión 3' o 5' pueden estar modificadas, por ejemplo, con una modificación descrita en la presente.

Las modificaciones pueden incluir, por ejemplo, el uso de modificaciones en la posición 2' del azúcar ribosa con modificaciones que son conocidas en el arte, por ejemplo, el uso de desoxirribonucleótidos, con modificación 2'-desoxi-2'-flúor (2'-F) o 2'-O-metilo en lugar del riboazúcar de la nucleobase, y modificaciones en el grupo fosfato, por ejemplo, modificaciones fosforotioato. No se necesita que las sobreextensiones sean homólogas con la secuencia blanco.

En algunas formas de realización, cada residuo de la hebra sentido y hebra antisentido está modificado de manera independiente con LNA, CRN, cET, UNA, HNA, CeNA, 2'-metoxietilo, 2'- O-metilo, 2'-O-alilo, 2'-C-alilo, 2'-desoxi, 2'-hidroxilo, o 2'-flúor. Las hebras pueden contener más de una modificación. En una forma de realización, cada residuo de la hebra sentido y hebra antisentido está modificado de manera independiente con 2'- O-metilo o 2'-flúor.

Típicamente hay presentes al menos dos modificaciones diferentes en la hebra sentido y hebra antisentido. Aquellas dos modificaciones pueden ser las modificaciones 2'- O-metilo o 2'-flúor, u otras.

En determinadas formas de realización, el N_a o N_b comprenden modificaciones de un patrón alternante. El término "motivo alternante" como se usa en la presente se refiere a un motivo que tiene una o más modificaciones, en donde cada modificación se encuentra en nucleótidos anternantes de una hebra. El nucleótido anternante puede referirse a uno por medio de otro nucleótido o uno cada tres nucleótidos, o un patrón similar. Por ejemplo, si A, B y C representan cada una un tipo de modificación del nucleótido, el motivo alternante puede ser "ABABABABABAB…", "AABBAABBAABB…", "AABAABAABAAB…", "AAABAAABAAAB…", "AAABBBAAABBB…", o "ABCABCABCABC…", etc.

El tipo de modificaciones que contiene el motivo alternante puede ser el mismo o diferentes. Por ejemplo, si A, B, C, D representan cada una un tipo de modificación en el nucleótido, el patrón alternante, es decir, modificaciones nucleótido por medio, puede ser el mismo, pero cada una de la hebra sentido o hebra antisentido puede seleccionarse de diferentes posibilidades de modificaciones en el motivo alternante tal como “ABABAB…”, “ACACAC…”, “BDBDBD…” o “CDCDCD…”, etc.

En algunas formas de realización, el agente de ARNihd de la invención comprende el patrón de modificación para el motivo alternante en la hebra sentido en relación al patrón de modificación para el motivo alternante en la hebra antisentido desplazado. El desplazamiento puede ser tal que el grupo modificado de los nucleótidos de la hebra sentido se corresponda con un grupo de nucleótidos modificado de manera diferente de la hebra antisentido y viceversa. Por ejemplo, cuando la hebra sentido está apareada con la hebra antisentido en el ARNhd dúplex, el motivo alternante en la hebra sentido puede comenzar con “ABABAB” desde el 5’ al 3’ de la hebra y el motivo alternante en la hebra antisentido puede comenzar con “BABABA” desde el 5’ al 3’ de la hebra en la región dúplex. A modo de ejemplo adicional, el motivo alternante en la hebra sentido puede comenzar con “AABBAABB” desde 5’ a 3’ de la hebra y el motivo alternante en la hebra antisentido puede comenzar con “BBAABBAA” desde 5’ a 3’ de la hebra en la región dúplex, de forma que hay un desplazamiento completo o parcial de los patrones de modificación entre la hebra sentido y la hebra antisentido.

En algunas formas de realización, el agente de ARNihd que comprende el patrón del motivo alternante de la modificación 2'-O-metilo y la modificación 2’-

F en la hebra sentido inicialmente tiene un desplazamiento en relación al patrón del motivo alternante de la modificación 2'-O-metilo y la modificación 2'-F en la hebra antisentido inicialmente, es decir, el nucleótido con modificación 2'-O-metilo en la hebra sentido aparea sus bases con un nucleótido con modificación 2'-F en la hebra antisentido y viceversa. La posición 1 de la hebra sentido puede comenzar con la modificación 2'-F, y la posición 1 de la hebra antisentido puede comenzar con la modificación 2'- O-metilo.

La introducción de uno o más motivos de tres modificaciones idénticas en tres nucleótidos consecutivos en la hebra sentido o hebra antisentido interrumpe el patrón de modificación inicial presente en la hebra sentido o hebra antisentido. Esta interrupción del patrón de modificación de la hebra sentido o antisentido por introducción de uno o más motivos de tres modificaciones idénticas en tres nucleótidos consecutivos a la hebra sentido o antisentido puede aumentar la actividad de silenciamiento de gen contra el gen blanco.

En algunas formas de realización, cuando el motivo de tres modificaciones idénticas en tres nucleótidos consecutivos se introduce en cualquiera de las hebras, la modificación del siguiente nucleótido al motivo es una modificación diferente a la modificación del motivo. Por ejemplo, la parte de la secuencia que contiene el motivo es "…N_aYYYN_b…", en donde "Y" representa la modificación del motivo de tres modificaciones idénticas en tres nucleótidos consecutivos, y "N_a" y "N_b" representan una modificación del siguiente nucleótido al motivo "YYY" que es diferente a la modificación de Y, y en donde N_a y N_b pueden ser modificaciones iguales o diferentes. Como alternativa, N_a o N_b pueden estar presentes o ausentes cuando hay presente una modificación de ala.

El ARNi además puede comprender por lo menos una unión internucleotídica de fosforotioato o metilfosfonato. La modificación de unión internucleotídica de fosforotioato o metilfosfonato puede encontrarse en cualquier nucleótido de la hebra sentido, hebra antisentido, o ambas hebras en cualquier posición de la hebra. Por ejemplo, la modificación de unión internucleotídica puede encontrarse en cualquier nucleótido en la hebra sentido o hebra antisentido; cada modificación de unión internucleotídica puede encontrarse en un patrón alternante en la hebra sentido o hebra antisentido; o la hebra sentido o hebra antisentido pueden contener ambas modificaciones de unión internucleotídica en un patrón alternante. El patrón alternante de la modificación de unión internucleotídica en la hebra sentido puede ser la misma o diferente de la hebra antisentido, y el patrón alternante de la modificación de unión internucleotídica en la hebra sentido puede tener un desplazamiento en relación al patrón alternante de la modificación de unión internucleotídica en la hebra antisentido. En una forma de realización, un agente de ARNi de hebra doble comprende entre 6 y 8 uniones internucleotídicas de fosforotioato. En algunas formas de realización, la hebra antisentido comprende dos uniones internucleotídicas de fosforotioato en el extremo 5' y dos uniones internucleotídicas de fosforotioato en el extremo 3', y la hebra sentido comprende al menos dos uniones internucleotídicas de fosforotioato en el extremo 5' o en el extremo 3'.

En algunas formas de realización, el agente de ARNihd comprende una modificación de unión internucleotídica fosforotioato o metilfosfonato en la región de sobreextensión. Por ejemplo, la región de sobreextensión puede contener dos nucleótidos que tienen una unión internucleotídica fosforotioato o metilfosfonato

entre los dos nucleótidos. Las modificaciones de unión internucleotítica también pueden ser realizarse para unir los nucleótidos de la sobreextensión con los nucleótidos terminales apareados en la región dúplex. Por ejemplo, por lo menos 2, 3, 4, o todos los nucleótidos de la sobreextensión pueden estar unidos mediante una unión internucleotídica fosforotioato o metilfosfonato, y opcionalmente, puede haber uniones internucleotídicas de fosforotioato o metilfosfonato uniendo la nucleótido de la sobreextensión con un nucleótido apareado que está al lado del nucleótido de la sobreextensión. Por ejemplo, puede haber por lo menos dos uniones internucleotídicas de fosforotioato entre los tres nucleótidos terminales, en donde dos de los tres nucleótidos son nucleótidos de la sobreextensión, y el tercero es un nucleótido apareado al lado del nucleótido de la sobreextensión. Estos tres nucleótidos terminales pueden estar en el extremo 3' de la hebra antisentido, el extremo 3' de la hebra sentido, el extremo 5' de la hebra antisentido, o el extremo 5' de la hebra antisentido.

En algunas formas de realización, la sobreextensión de 2 nucleótidos se encuentra en el extremo 3' de la hebra antisentido, y hay dos uniones internucleotídicas de fosforotioato entre los tres nucleótidos terminales, en donde dos de los tres nucleótidos son los nucleótidos de la sobreextensión, y el tercer nucleótido es un nucleótido apareado al lado del nucleótido de la sobreextensión. Opcionalmente, el agente de ARNihd puede tener de manera adicional dos uniones internucleotídicas de fosforotioato entre los tres nucleótidos terminales en el extremo 5' de la hebra sentido y en el extremo 5' de la hebra antisentido.

En una forma de realización, el agente de ARNihd comprende una o más no coincidencias con el blanco, en el dúplex, o combinaciones de las mismas. La no coincidencia puede encontrarse en la región de sobreextensión o en la región

dúplex. El par de bases puede clasificarse en base a su propensión a promover la disociación o fusión (por ejemplo, en la energía libre de asociación o disociación de un apareamiento particular, en donde la estrategia más simple es examinar los pares en base a los pares individuales, aunque también puede usarse el análisis del vecino siguiente u otro similar). En términos de promover la disociación: se prefiere A:U respecto a G:C; se prefiere G:U respecto a G:C; y se prefiere I:C respecto a G:C (I=inosina). Se prefieren las no coincidencias, por ejemplo, apareamientos no canónicos o diferentes de los canónicos (tal como se describe en otra parte en la presente) respecto a los apareamiento canónicos (A:T, A:U, G:C); y se prefieren los apareamientos que incluyen una base universal respecto a los apareamientos canónicos.

En determinadas formas de realización, el agente de ARNihd comprende al menos uno de los primeros 1, 2, 3, 4, o 5 pares de bases en las regiones dúplex desde el extremo 5' de la hebra antisentido independientemente seleccionados del grupo de: A:U, G:U, I:C, y pares no coincidentes, por ejemplo, apareamientos o apareamientos no canónicos o diferentes de canónicos que incluyen una base universal, para promover la disociación de la hebra antisentido en el extremo 5' del dúplex.

En determinadas formas de realización, el nucleótido en la posición 1 en la región dúplex desde el extremo 5' en la hebra antisentido se selecciona de A, dA, dU, U y dT. Como alternativa, por lo menos uno de los primeros 1, 2, o 3 pares de bases en la región dúplex desde el extremo 5' de la hebra antisentido es un par de bases AU. Por ejemplo, el primer par de bases en la región dúplex desde el extremo 5' de la hebra antisentido es un par de bases AU.

En otras formas de realización, el nucleótido en el extremo 3’ de la hebra sentido es desoxitimina (dT) o el nucleótido en el extremo 3’ de la hebra antisentido es desoxitimina (dT). Por ejemplo, hay una secuencia corta de desoxitimina nucleótidos, por ejemplo, dos nucleótidos dT en el extremo 3’ de la hebra sentido, antisentido, o ambas hebras.

En determinadas formas de realización, la secuencia de la hebra sentido puede estar representada por la fórmula (I):

5' n_p-N_a-(X X X)$_i$-N_b-Y Y Y -N_b-(Z Z Z)$_j$-N_a-n_q 3' (I)

en donde:

i y j son cada uno independientemente 0 o 1;

p y q son cada uno independientemente 0-6;

cada N_a representa independientemente una secuencia de oligonucleótidos que comprende entre 0 y 25 nucleótidos modificados, en donde cada secuencia comprende por lo menos dos nucleótidos modificados de manera diferente;

cada N_b representa independientemente una secuencia de oligonucleótidos que comprende entre 0 y 10 nucleótidos modificados;

cada N_p y n_q representan independientemente un nucleótido de la sobreextensión;

en donde Nb e Y no tienen la misma modificación; y

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

En algunas formas de realización, el N_a o N_b comprenden modificaciones de patrón alternante.

En algunas formas de realización, el motivo YYY se encuentra en el sitio de escisión o cerca del mismo de la hebra sentido. Por ejemplo, cuando el agente de ARNihd tiene una región dúplex de entre 17 y 23 nucleótidos de longitud, el motivo YYY puede encontrarse en o en la vecindad del sitio de escisión (por ejemplo: puede encontrarse en las posiciones 6, 7, 8; 7, 8, 9; 8, 9, 10; 9, 10, 11; 10, 11,12; o 11, 12, 13) de la hebra sentido, comenzando la cuenta desde el primer nucleótido, desde el extremo 5'; u opcionalmente, comenzando la cuenta desde el primer nucleótido apareado en la región dúplex, desde el extremo 5'.

En una forma de realización, i es 1 y j es 0, o i es 0 y j es 1, o i y j son 1. Por lo tanto la hebra sentido puede estar representada por las siguientes fórmulas:

5' n_p-N_a-YYY-N_b-ZZZ-N_a-n_q 3' (Ib);

5' n_p-N_a-XXX-N_b-YYY-N_a-n_q 3' (Ic); o

5' n_p-N_a-XXX-N_b-YYY-N_b-ZZZ-N_a-n_q 3' (Id).

Cuando la hebra sentido está representada por la fórmula (Ib), N_b representa una secuencia de oligonucleótidos que comprende entre 0 y 10, entre 0 y 7, entre 0 y 5, entre 0 y 4, entre 0 y 2, o 0 nucleótidos modificados. Cada N_a independientemente puede representar una secuencia de oligonucleótidos que comprende entre 2 y 20, entre 2 y 15, o entre 2 y 10 nucleótidos modificados.

Cuando la hebra sentido está representada como la fórmula (Ic), N_b representa una secuencia de oligonucleótidos que comprende entre 0 y 10, entre 0 y 7, entre 0 y 10, entre 0 y 7, entre 0 y 5, entre 0 y 4, entre 0 y 2, o 0 nucleótidos modificados. Cada N_a puede representar independientemente una secuencia de oligonucleótidos que comprende entre 2 y 20, entre 2 y 15, o entre 2 y 10 nucleótidos modificados.

Cuando la hebra sentido está representada como la fórmula (Id), cada N_b representa independientemente una secuencia de oligonucleótidos que comprende entre 0 y 10, entre 0 y 7, entre 0 y 5, entre 0 y 4, entre 0 y 2, o 0 nucleótidos modificados. Preferiblemente, N_b es 0, 1, 2, 3, 4, 5, o 6. Cada N_a puede representar independientemente una secuencia de oligonucleótidos que comprende entre 2 y 20, entre 2 y 15, o entre 2 y 10 nucleótidos modificados.

Cada uno de X, Y y Z pueden ser iguales o diferentes entre sí.

En otras formas de realización, i es 0 y j es 0, y la hebra sentido puede estar representada por la fórmula:

5' n_p-N_a-YYY- N_a-n_q 3' (Ia).

Cuando la hebra sentido está representada por la fórmula (Ia), cada N_a independientemente puede representar una secuencia de oligonucleótidos que comprende entre 2 y 20, entre 2 y 15, o entre 2 y 10 nucleótidos modificados.

En una forma de realización, la secuencia de la hebra antisentido del ARNi puede estar representada por la fórmula (II):

5' $n_{q'}$-N_a'-$(Z'Z'Z')_k$-N_b'-Y'Y'Y'-N_b'-$(X'X'X')_l$-N'_a-n_p' 3' (II)

en donde:

k y l son cada uno independientemente 0 o 1;

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

cada N_a' representa independientemente una secuencia de oligonucleótidos que comprende entre 0 y 25 nucleótidos modificados, en donde cada secuencia comprende por lo menos dos nucleótidos modificados de manera diferente;

cada N_b' representa independientemente una secuencia de oligonucleótidos que comprende entre 0 y 10 nucleótidos modificados;

cada N_p' y n_q' representan independientemente un nucleótido de la sobreextensión;

en donde N_b' e Y' no tienen la misma modificación; y

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

En algunas formas de realización, el N_a' o N_b' comprende modificaciones de patrón alternante.

El motivo Y′Y′Y′ se encuentra en el sitio de escisión o cerca del mismo de la hebra antisentido. Por ejemplo, cuando el agente de ARNihd tiene una región dúplex de entre 17 y 23 nucleótidos de longitud, el motivo Y′Y′Y′ puede encontrarse en las posiciones 9, 10, 11; 10, 11, 12; 11, 12, 13; 12, 13, 14; o 13, 14, 15 de la hebra antisentido, comenzando la cuenta desde el primer nucleótido, desde el extremo 5'; u opcionalmente, comenzando la cuenta en el primer nucleótido apareado en la región dúplex, desde el extremo 5'. Preferiblemente, el motivo Y′Y′Y′ se encuentra en las posiciones 11, 12, 13.

En determinadas formas de realización, motivo Y′Y′Y′ son todos nucleótidos con modificación 2'-OMe.

En determinadas formas de realización, k es 1 y l es 0, o k es 0 y l es 1, o k y l son 1.

Por lo tanto la hebra antisentido puede ser representada por las siguientes fórmulas:

5' $n_{q'}$-N_a'-Z′Z′Z′-N_b'-Y′Y′Y′-N_a'-$n_{p'}$ 3'(IIb);

5' $n_{q'}$-N_a'-Y′Y′Y′-N_b'-X′X′X′-$n_{p'}$ 3' (IIc); o

5' $n_{q'}$-N_a'- Z′Z′Z′-N_b'-Y′Y′Y′-N_b'- X′X′X′-N_a'-$n_{p'}$ 3' (IId).

Cuando la hebra antisentido está representada por la fórmula (IIb), N_b' representa una secuencia de oligonucleótidos que comprende entre 0 y 10, entre 0 y 7, entre 0 y 10, entre 0 y 7, entre 0 y 5, entre 0 y 4, entre 0 y 2, o 0 nucleótidos modificados. Cada N_a' representa independientemente una secuencia de oligonucleótidos que comprende entre 2 y 20, entre 2 y 15, o entre 2 y 10 nucleótidos modificados.

Cuando la hebra antisentido está representada como la fórmula (IIc), N_b' representa una secuencia de oligonucleótidos que comprende entre 0 y 10, entre 0 y 7, entre 0 y 10, entre 0 y 7, entre 0 y 5, entre 0 y 4, entre 0 y 2, o 0 nucleótidos modificados. Cada N_a' representa independientemente una secuencia de oligonucleótidos que comprende entre 2 y 20, entre 2 y 15, o entre 2 y 10 nucleótidos modificados.

Cuando la hebra antisentido está representada como la fórmula (IId), cada N_b' representa independientemente una secuencia de oligonucleótidos que comprende entre 0 y 10, entre 0 y 7, entre 0 y 10, entre 0 y 7, entre 0 y 5, entre 0 y 4, entre 0 y 2, o 0 nucleótidos modificados. Cada N_a' representa independientemente una secuencia de oligonucleótidos que comprende entre 2 y 20, entre 2 y 15, o entre 2 y 10 nucleótidos modificados. Preferiblemente, N_b es 0, 1, 2, 3, 4, 5, o 6.

En otras formas de realización, k es 0 y l es 0 y la secuencia antisentido puede estar representada por la fórmula:

5' $n_{p'}$-$N_{a'}$-Y'Y'Y'- $N_{a'}$-$n_{q'}$ 3' (Ia).

Cuando la hebra antisentido está representada como la fórmula (IIa), cada N_a' representa independientemente una secuencia de oligonucleótidos que comprende entre 2 y 20, entre 2 y 15, o entre 2 y 10 nucleótidos modificados.

Cada uno de X′, Y′ y Z′ puede ser el mismo o diferente entre sí.

Cada nucleótido de la hebra sentido y hebra antisentido puede estar independientemente modificado con LNA, CRN, UNA, cEt, HNA, CeNA, 2'-metoxietilo, 2'-O-metilo, 2'-O-alilo, 2'-C-alilo, 2'-hidroxilo, o 2'-flúor. Por ejemplo, cada nucleótido de la hebra sentido y hebra antisentido está modificado de manera independiente con 2'-O-metilo o 2'-flúor. Cada X, Y, Z, X′, Y′, y Z′, en particular, puede representar una modificación 2'-O-metilo o una modificación 2'-flúor.

En algunas formas de realización, la hebra sentido del agente de ARNihd puede contener un motivo YYY que se encuentra a 9, 10, y 11 posiciones de la hebra cuando la región dúplex tiene 21 nt, comenzando la cuenta desde el primer nucleótido desde el extremo 5', u opcionalmente, comenzando la cuenta en el primer nucleótido apareado en la región dúplex, desde el extremo 5'; e Y representa una modificación 2'-F. La hebra sentido además puede contener el motivo XXX o los motivos ZZZ como modificaciones de ala en el extremo opuesto de la región dúplex; y XXX y ZZZ representan cada uno independientemente una modificación 2'-OMe o modificación 2'-F.

En algunas formas de realización la hebra antisentido puede contener el motivo Y′Y′Y′ que se encuentra en las posiciones 11, 12, 13 de la hebra, comenzando la cuenta desde el primer nucleótido desde el extremo 5', u opcionalmente, comenzando la cuenta en el primer nucleótido apareado en la región dúplex, desde el extremo 5'; e Y′ representa la modificación 2'-O-metilo. La hebra antisentido además puede contener el motivo X′X′X′ o motivos Z′Z′Z′ como modificaciones de ala en el extremo opuesto de la región dúplex; y X′X′X′

y Z′Z′Z′ representan cada uno independientemente una modificación 2'-OMe o modificación 2'-F.

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

En consecuencia, los agentes de ARNihd para usar en los métodos de la invención pueden comprender una hebra sentido y una hebra antisentido, en donde cada hebra tiene entre 14 y 30 nucleótidos, con el ARNi dúplex representado mediante la fórmula (III):

sentido: 5' n_p -N_a-(X X X)$_i$ -N_b- Y Y Y -N_b -(Z Z Z)$_j$-N_a-n_q 3'

antisentido: 3' n_p'-N_a'-(X'X'X')$_k$-N_b'-Y'Y'Y'-N_b'-(Z'Z'Z')$_l$-N_a'-n_q' 5'

(III)

en donde:

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

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

cada N_a y N_a' representa independientemente una secuencia de oligonucleótidos que comprende entre 0 y 25 nucleótidos modificados, en donde cada secuencia comprende por lo menos dos nucleótidos modificados de manera diferente;

cada N_b y N_b' representa independientemente una secuencia de oligonucleótidos que comprende entre 0 y 10 nucleótidos modificados;

en donde cada N_p', n_p, n_q', y n_q, cada uno de cuales puede estar presente o no, representa independientemente un nucleótido de la sobreextensión; y

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

En una forma de realización, i es 0 y j es 0; o i es 1 y j es 0; o i es 0 y j es 1; o i y j son 0; o i y j son 1. En otra forma de realización, k es 0 y l es 0; o k es 1 y l es 0; k es 0 y l es 1; o k y l son 0; o k y l son 1.

Los ejemplos de combinaciones de la hebra sentido y hebra antisentido que forman un ARNi dúplex incluyen las fórmulas a continuación:

5' n_p - N_a -Y Y Y -N_a-n_q 3'

3' n_p'-N_a'-Y′Y′Y′ -N_a'n_q' 5'

(IIIa)

5' n_p -N_a -Y Y Y -N_b -Z Z Z -N_a-n_q 3'

3' n_p'-N_a'-Y′Y′Y′-N_b'-Z′Z′Z′-N_a'n_q' 5'

(IIIb)

5' n_p-N_a- X X X -N_b -Y Y Y - N_a-n_q 3'

3' n_p'-N_a'-X′X′X′-N_b'-Y′Y′Y′-N_a'-n_q' 5'

(IIIc)

5' n_p -N_a -X X X -N_b-Y Y Y -N_b- Z Z Z -N_a-n_q 3'

3' n_p'-N_a'-X′X′X′-N_b'-Y′Y′Y′-N_b'-Z′Z′Z′-N_a-n_q' 5'

(IIId)

Cuando el agente de ARNihd está representado por la fórmula (IIIa), cada N_a representa independientemente una secuencia de oligonucleótidos que comprende entre 2 y 20, entre 2 y 15, o entre 2 y 10 nucleótidos modificados.

Cuando el agente de ARNihd está representado por la fórmula (IIIb), cada N_b representa independientemente una secuencia de oligonucleótidos que

comprende entre 1 y 10, entre 1 y 7, entre 1 y 5, o entre 1 y 4 nucleótidos modificados. Cada N_a representa independientemente una secuencia de oligonucleótidos que comprende entre 2 y 20, entre 2 y 15, o entre 2 y 10 nucleótidos modificados.

Cuando el agente de ARNihd está representado como la fórmula (IIIc), cada N_b, N_b' representa independientemente una secuencia de oligonucleótidos que comprende entre 0 y 10, entre 0 y 7, entre 0 y 10, entre 0 y 7, entre 0 y 5, entre 0 y 4, entre 0 y 2, o 0 nucleótidos modificados. Cada N_a representa independientemente una secuencia de oligonucleótidos que comprende entre 2 y 20, entre 2 y 15, o entre 2 y 10 nucleótidos modificados.

Cuando el agente de ARNihd está representado como la fórmula (IIId), cada N_b, N_b' representa independientemente una secuencia de oligonucleótidos que comprende entre 0 y 10, entre 0 y 7, entre 0 y 10, entre 0 y 7, entre 0 y 5, entre 0 y 4, entre 0 y 2, o 0 nucleótidos modificados. Cada N_a, N_a' representa independientemente una secuencia de oligonucleótidos que comprende entre 2 y 20, entre 2 y 15, o entre 2 y 10 nucleótidos modificados. Cada uno de N_a, N_a', N_b, y N_b' independientemente comprende modificaciones de patrón alternante.

Cada uno de X, Y, y Z en las fórmulas (III), (IIIa), (IIIb), (IIIc), y (IIId) puede ser el mismo o diferente entre sí.

Cuando el agente de ARNihd está representado por la fórmula (III), (IIIa), (IIIb), (IIIc), y (IIId), por lo menos uno de los nucleótidos Y puede formar un par de bases con uno de los nucleótidos Y′. Como alternativa, por lo menos dos de los nucleótidos Y forman pares de bases con los correspondientes nucleótidos Y′; o los tres nucleótidos Y forman todos pares de bases con los correspondientes nucleótidos Y′.

Cuando el agente de ARNihd está representado por la fórmula (IIIb) o (IIId), por lo menos uno de los nucleótidos Z puede formar un par de bases con uno de los nucleótidos Z′. Como alternativa, por lo menos dos de los nucleótidos Z forman pares de bases con los correspondientes nucleótidos Z′; o los tres nucleótidos Z forman todos pares de bases con los correspondientes nucleótidos Z′.

Cuando el agente de ARNihd está representado como la fórmula (IIIc) o (IIId), por lo menos uno de los nucleótidos X puede formar un par de bases con uno de los nucleótidos X′. Como alternativa, por lo menos dos de los nucleótidos X forman pares de bases con los correspondientes nucleótidos X′; o los tres nucleótidos X forman todos pares de bases con los correspondientes nucleótidos X′.

En determinadas formas de realización, la modificación en el nucleótido Y es diferente de la modificación en el nucleótido Y', la modificación en el nucleótido Z es diferente de la modificación en el nucleótido Z', o la modificación en el nucleótido X es diferente de la modificación en el nucleótido X'.

En determinadas formas de realización, cuando el agente de ARNihd está representado por la fórmula (IIId), las modificaciones N_a son modificaciones 2′-O-metilo o 2´-flúor. En otras formas de realización, cuando el agente de ARNi está representado por la fórmula (IIId), las modificaciones N_a son modificaciones 2′-O-metilo o 2´-flúor y $n_p' > 0$ y por lo menos un n_p' está unido a un nucleótido vecino mediante una unión fosforotioato. En aún otras formas de realización, cuando el agente de ARNi está representado por la fórmula (IIId), las modificaciones N_a son modificaciones 2′-O-metilo o 2´-flúor, $n_p' > 0$ y por lo menos un n_p' está unido a un nucleótido vecino mediante una unión fosforotioato, y la

hebra sentido está conjugada a uno o más de los derivados de GalNAc unidos mediante un conector ramificado divalente o trivalente (que se describe más adelante). En otras formas de realización, cuando el agente de ARNi está representado por la fórmula (IIId), las modificaciones N_a son modificaciones 2′-O-metilo o 2´-flúor, $n_p' > 0$ y por lo menos un n_p' está unido a un nucleótido vecino mediante una unión fosforotioato, la hebra sentido comprende al menos una unión fosforotioato, y la hebra sentido está conjugada a uno o más de los derivados de GalNAc unidos mediante un conector ramificado divalente o trivalente.

En algunas formas de realización, cuando el agente de ARNihd está representado por la fórmula (IIIa), las modificaciones N_a son modificaciones 2′-O-metilo o 2´-flúor, $n_p' > 0$ y por lo menos un n_p' está unido a un nucleótido vecino mediante una unión fosforotioato, la hebra sentido comprende al menos una unión fosforotioato, y la hebra sentido está conjugada a uno o más de los derivados de GalNAc unidos mediante un conector ramificado divalente o trivalente.

En algunas formas de realización, el agente de ARNihd es un multímero que contiene por lo menos dos dúplex representados por las fórmulas (III), (IIIa), (IIIb), (IIIc), y (IIId), en donde los dúplex están conectados mediante un conector. El conector puede ser escindible o no escindible. Opcionalmente, el multímero además comprende un ligando. Cada uno de los dúplex puede estar dirigido al mismo gen o a dos genes diferentes; o cada uno de los dúplex puede estar dirigido al mismo gen en dos sitios blanco diferentes.

En algunas formas de realización, el agente de ARNihd es un multímero que contiene tres, cuatro, cinco, seis, o más dúplex representados por las

fórmulas (III), (IIIa), (IIIb), (IIIc), y (IIId), en donde los dúplex están conectados mediante un conector. El conector puede ser escindible o no escindible. Opcionalmente, el multímero además comprende un ligando. Cada uno de los dúplex puede estar dirigido al mismo gen o dos genes diferentes; o cada uno de los dúplex puede estar dirigido al mismo gen en dos sitios blanco diferentes.

En una forma de realización, dos agentes de ARNihd representados por al menos una de las fórmulas (III), (IIIa), (IIIb), (IIIc), y (IIId) están unidos entre sí en el extremo 5', y uno o ambos de los extremos 3', y están opcionalmente conjugados a un ligando. Cada uno de los agentes puede estar dirigido al mismo gen o a dos genes diferentes; o cada uno de los agentes puede estar dirigido al mismo gen en dos sitios blanco diferentes.

En determinadas formas de realización, un agente de ARNi de la invención puede contener un número bajo de nucleótidos que contienen una modificación 2'-flúor, por ejemplo, 10 o menos nucleótidos con modificación 2'-flúor. Por ejemplo, el agente de ARNi puede contener 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 o 0 nucleótidos con una modificación 2'-flúor. En una forma de realización específica, el agente de ARNi de la invención contiene 10 nucleótidos con una modificación 2'-flúor, por ejemplo, 4 nucleótidos con una modificación 2'-flúor en la hebra sentido y 6 nucleótidos con una modificación 2'-flúor en la hebra antisentido. En otra forma de realización específica, el agente de ARNi de la invención contiene 6 nucleótidos con una modificación 2'-flúor, por ejemplo, 4 nucleótidos con una modificación 2'-flúor en la hebra sentido y 2 nucleótidos con una modificación 2'-flúor en la hebra antisentido.

En otras formas de realización, un agente de ARNi de la invención puede contener un número ultrabajo de nucleótidos que contienen una modificación 2'-

flúor, por ejemplo, 2 o menos nucleótidos que contienen una modificación 2'-flúor. Por ejemplo, el agente de ARNi puede contener 2, 1 o 0 nucleótidos con una modificación 2'-flúor. En una forma de realización específica, el agente de ARNi puede contener 2 nucleótidos con una modificación 2'-flúor, por ejemplo, 0 nucleótidos con una modificación 2-flúor en la hebra sentido y 2 nucleótidos con una modificación 2'-flúor en la hebra antisentido.

Diferentes publicaciones describen ARNis multiméricos que pueden usarse en los métodos de la invención. Dichas publicaciones incluyen WO2007/091269, Patente de los EE.UU. No. 7.858.769, WO2010/141511, WO2007/117686, WO2009/014887, y WO2011/031520 cuyos contenidos completos se incorporan a la presente a modo de referencia.

Tal como se describe con mayor detalle más adelante, el ARNi que contiene conjugaciones de una o más unidades de hidrato de carbono a un ARNi puede optimizar una o más propiedades del ARNi. En muchos casos, la unidad hidrato de carbono estará unida a una subunidad modificada del ARNi. Por ejemplo, el azúcar ribosa de una o más subunidades ribonucleótido de un ARNi puede estar reemplazado por otra unidad, por ejemplo, un vehículo no hidrato de carbono (preferiblemente cíclico) al cual está unido un ligando hidrato de carbono. Una subunidad ribonucleótido en la cual el azúcar ribosa de la subunidad ha sido reemplazada de tal manera que se la refiere en la presente como una subunidad de modificación de reemplazo de ribosa (RRMS). Un vehículo cíclico puede ser un sistema de anillo carbocíclico, es decir, todos los átomos del anillo son átomos de carbono, o un sistema de anillo heterocíclico, es decir, uno o más átomos del anillo pueden ser un heteroátomo, por ejemplo, nitrógeno, oxígeno, azufre. El vehículo cíclico puede ser un sistema de anillo

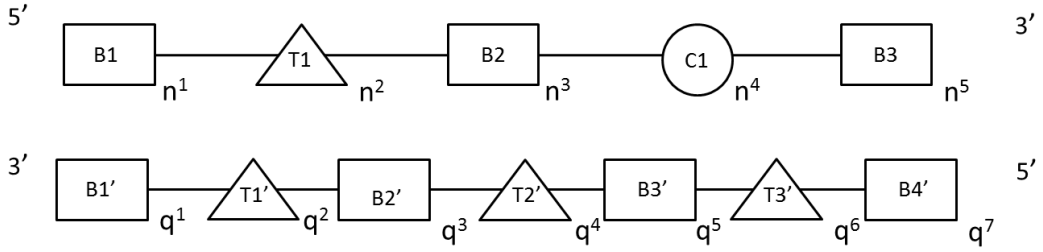
monocíclico, o puede contener dos o más anillos, por ejemplo anillos fusionados. El vehículo cíclico puede ser un sistema de anillo completamente saturado, o puede contener uno o más enlaces dobles.

El ligando puede estar unido al polinucleótido mediante un vehículo. Los vehículos incluyen (i) por lo menos un "punto de unión al esqueleto", preferiblemente dos "puntos de unión al esqueleto" y (ii) por lo menos un "punto de unión de anclaje". Un "punto de unión al esqueleto" como se usa en la presente se refiere a un grupo funcional, por ejemplo un grupo hidroxilo, o en general, un enlace disponible para, y que es adecuado para la incorporación del vehículo al esqueleto, por ejemplo, el fosfato, o fosfato modificado, por ejemplo, esqueleto, que contiene azufre, de un ácido ribonucleico. Un "punto de unión de anclaje" (TAP) en algunas formas de realización se refiere a un átomo de anillo constituyente del vehículo cíclico, por ejemplo, un átomo de carbono o un heteroátomo (diferente de un átomo que provee un punto de unión al esqueleto), que conecta una unidad seleccionada. La unidad puede ser, por ejemplo, un hidrato de carbono, por ejemplo monosacárido, disacárido, trisacárido, tetrasacárido, oligosacárido, o polisacárido. Opcionalmente, la unidad seleccionada se conecta mediante un anclaje interviniente al vehículo cíclico. Por lo tanto, el vehículo cíclico con frecuencia incluirá un grupo funcional, por ejemplo, un grupo amino, o en general, provee un enlace, que es adecuado para la incorporación o anclaje de otra entidad química, por ejemplo, un ligando al anillo constituyente.

El ARNi puede estar conjugado a un ligando mediante un vehículo, en donde el vehículo puede ser un grupo cíclico o grupo acíclico; preferiblemente, el grupo cíclico se selecciona de pirrolidinilo, pirazolinilo, pirazolidinilo,

imidazolinilo, imidazolidinilo, piperidinilo, piperazinilo, [1,3]dioxolano, oxazolidinilo, isoxazolidinilo, morfolinilo, tiazolidinilo, isotiazolidinilo, quinoxalinilo, piridazinonilo, tetrahidrofurilo, y decalina; preferiblemente, el grupo acíclico es un esqueleto serinol o esqueleto dietanolamina.

En otra forma de realización de la invención, un agente de ARNi comprende una hebra sentido y una hebra antisentido, en donde cada hebra tiene entre 14 y 40 nucleótidos. El agente de ARNi puede estar representado por la fórmula (L):

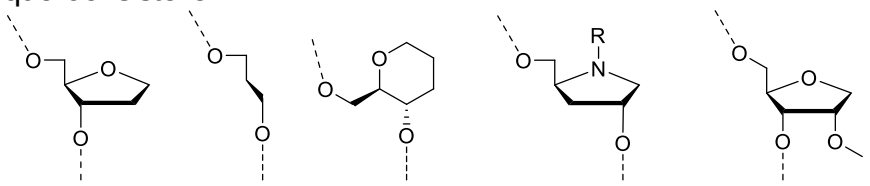


(L),

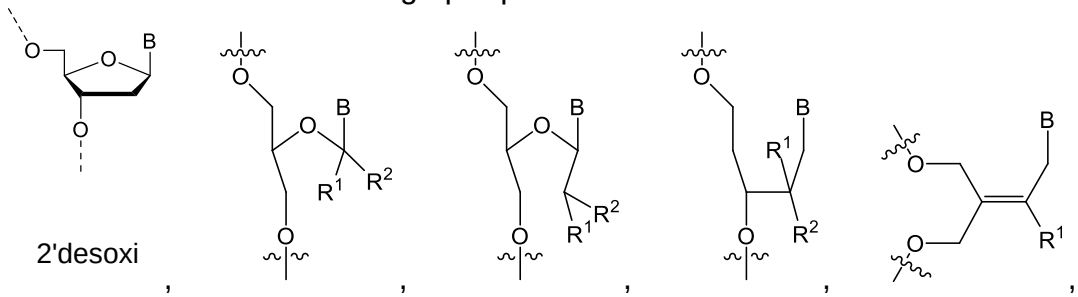
En la fórmula (L), B1, B2, B3, B1', B2', B3', y B4' son cada uno independientemente un nucleótido que contiene una modificación seleccionada del grupo que consiste en 2'-O-alquilo, alcoxilo con sustitución 2', alquilo con sustitución 2', 2'-halo, ENA, y BNA/LNA. En una forma de realización, B1, B2, B3, B1', B2', B3', y B4' contienen cada uno modificaciones 2'-OMe. En una forma de realización, B1, B2, B3, B1', B2', B3', y B4' contienen cada uno modificaciones 2'-OMe o 2'-F. En una forma de realización, por lo menos uno de B1, B2, B3, B1', B2', B3', y B4' contiene la modificación 2'-O-N-metilacetamido (2'-O-NMA).

C1 es un nucleótido de desestabilización térmica colocado en un sitio opuesto a la región semilla de la hebra antisentido (es decir, en las posiciones 2-8 del extremo 5' de la hebra antisentido). Por ejemplo, C1 se encuentra en una posición de la hebra sentido que se aparea con un nucleótido en las posiciones 2-8 del extremo 5' de la hebra antisentido. En un ejemplo, C1 se encuentra en la

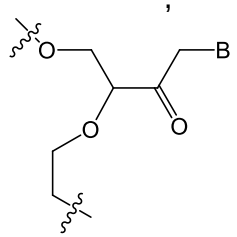
posición 15 desde el extremo 5' de la hebra sentido. El nucleótido C1 porta la modificación de desestabilización térmica que puede incluir una modificación abásica; no coincidencia con el nucleótido opuesto en el dúplex; y modificación de azúcar tal como una modificación 2'-desoxi o nucleótido acíclico por ejemplo, ácidos nucleicos no bloqueados (UNA) o ácido nucleico glicólico (GNA). En una forma de realización, C1 tiene una modificación de desestabilización térmica seleccionada del grupo que consiste en: i) no coincidencia con el nucleótido opuesto en la hebra antisentido; ii) modificación abásica seleccionada del grupo que consiste en:



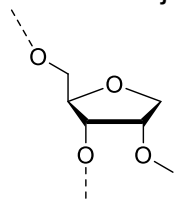
; y iii) modificación de azúcar seleccionada del grupo que consiste en:



2'desoxi , , , , , y



, en donde B es una nucleobase modificada o sin modificar, R^1 y R^2 son independientemente H, halógeno, OR_3, o alquilo; y R_3 es H, alquilo, cicloalquilo, arilo, aralquilo, heteroarilo o azúcar. En una forma de realización, la modificación de desestabilización térmica en C1 es una no coincidencia seleccionada del grupo que consiste en G:G, G:A, G:U, G:T, A:A, A:C, C:C, C:U,

C:T, U:U, T:T, y U:T; y opcionalmente, por lo menos una nucleobase en el par no coincidente es una nucleobase 2'-desoxi. En un ejemplo, la modificación de desestabilización térmica en C1 es GNA o  .

T1, T1', T2', y T3' en donde cada una representa independientemente un nucleótido que comprende una modificación que provee al nucleótido un impedimento estérico que es menor o igual al impedimento estérico de una modificación 2'-OMe. Un impedimento estérico se refiere a la suma de efectos estéricos de una modificación. Los métodos para determinar los efectos estéricos de una modificación de un nucleótido son conocidos para una persona con experiencia en el arte. La modificación puede encontrarse en la posición 2' de un azúcar ribosa del nucleótido, o una modificación en un nucleótido no ribosa, nucleótido acíclico, o el esqueleto del nucleótido que es similar o equivalente a la posición 2' del azúcar ribosa, y provee al nucleótido un impedimento estérico que es menor que o igual al impedimento estérico de una modificación 2'-OMe. Por ejemplo, T1, T1', T2', y T3' se seleccionan independientemente cada uno de ADN, ARN, LNA, 2'-F, y 2'-F-5'-metil. En una forma de realización, T1 es ADN. En una forma de realización, T1' es ADN, ARN o LNA. En una forma de realización, T2' es ADN o ARN. En una forma de realización, T3' es ADN o ARN.

n^1, n^3, y q^1 tienen independientemente 4 a 15 nucleótidos de longitud.

n^5, q^3, y q^7 tienen independientemente 1-6 nucleótido(s) de longitud.

n^4, q^2, y q^6 tienen independientemente 1-3 nucleótido(s) de longitud; como alternativa, n^4 es 0.

q^5 independientemente tiene 0-10 nucleótido(s) de longitud.

n^2 y q^4 tienen independientemente 0-3 nucleótido(s) de longitud.

Como alternativa, n^4 tiene 0-3 nucleótido(s) de longitud.

En una forma de realización, n^4 puede ser 0. En un ejemplo, n^4 es 0, y q^2 y q^6 son 1. En otro ejemplo, n^4 es 0, y q^2 y q^6 son 1, con dos modificaciones de unión internucleotídica fosforotioato en la posición 1-5 de la hebra sentido (contando desde el extremo 5' de la hebra sentido), y dos modificaciones de unión internucleotídica fosforotioato en las posiciones 1 y 2 y dos modificaciones de unión internucleotídica fosforotioato en las posiciones 18-23 de la hebra antisentido (contando desde el extremo 5' de la hebra antisentido).

En una forma de realización, n^4, q^2, y q^6 son cada uno 1.

En una forma de realización, n^2, n^4, q^2, q^4, y q^6 son cada uno 1.

En una forma de realización, C1 se encuentra en la posición 14-17 del extremo 5' de la hebra sentido, cuando la hebra sentido tiene 19-22 nucleótidos de longitud, y n^4 es 1. En una forma de realización, C1 se encuentra en la posición 15 del extremo 5' de la hebra sentido.

En una forma de realización, T3' comienza en la posición 2 desde el extremo 5' de la hebra antisentido. En un ejemplo, T3' se encuentra en la posición 2 desde el extremo 5' de la hebra antisentido y q^6 es igual a 1.

En una forma de realización, T1' comienza en la posición 14 desde el extremo 5' de la hebra antisentido. En un ejemplo, T1' se encuentra en la posición 14 desde el extremo 5' de la hebra antisentido y q^2 es igual a 1.

En una forma de realización ejemplificativa, T3' comienza desde la posición 2 desde el extremo 5' de la hebra antisentido y T1' comienza desde la posición 14 desde el extremo 5' de la hebra antisentido. En un ejemplo, T3' comienza desde la posición 2 desde el extremo 5' de la hebra antisentido y q^6 es

igual a 1 y T1' comienza desde la posición 14 desde el extremo 5' de la hebra antisentido y q^2 es igual a 1.

En una forma de realización, T1' y T3' están separados por 11 nucleótidos de longitud (es decir sin contar los nucleótidos T1' y T3').

En una forma de realización, T1' se encuentra en la posición 14 desde el extremo 5' de la hebra antisentido. En un ejemplo, T1' se encuentra en la posición 14 desde el extremo 5' de la hebra antisentido y q^2 es igual a 1, y la modificación en la posición o posiciones 2' en una no ribosa, acíclica o esqueleto que proveen menos impedimento estérico que una ribosa 2'-OMe.

En una forma de realización, T3' se encuentra en la posición 2 desde el extremo 5' de la hebra antisentido. En un ejemplo, T3' se encuentra en la posición 2 desde el extremo 5' de la hebra antisentido y q^6 es igual a 1, y la modificación en la posición o posiciones 2' en una no ribosa, acíclica o esqueleto que proveen menos o igual impedimento estérico que una ribosa 2'-OMe.

En una forma de realización, T1 se encuentra en el sitio de escisión de la hebra sentido. En un ejemplo, T1 se encuentra en la posición 11 desde el extremo 5' de la hebra sentido, cuando la hebra sentido tiene 19-22 nucleótidos de longitud, y n^2 es 1. En una forma de realización ejemplificativa, T1 se encuentra en el sitio de escisión de la hebra sentido en la posición 11 desde el extremo 5' de la hebra sentido, cuando la hebra sentido tiene 19-22 nucleótidos de longitud, y n^2 es 1.

En una forma de realización, T2' comienza en la posición 6 desde el extremo 5' de la hebra antisentido. En un ejemplo, T2' se encuentra en las posiciones 6-10 desde el extremo 5' de la hebra antisentido, y q^4 es 1.

En una forma de realización ejemplificativa, T1 se encuentra en el sitio de escisión de la hebra sentido, por ejemplo, en la posición 11 desde el extremo 5' de la hebra sentido, cuando la hebra sentido tiene 19-22 nucleótidos de longitud, y n^2 es 1; T1' se encuentra en la posición 14 desde el extremo 5' de la hebra antisentido, y q^2 es igual a 1, y la modificación de T1' se encuentra en la posición 2' de un azúcar ribosa o en las posiciones en una no ribosa, acíclica o esqueleto que provee menos impedimento estérico que una ribosa 2'-OMe; T2' se encuentra en las posiciones 6-10 desde el extremo 5' de la hebra antisentido, y q^4 es 1; y T3' se encuentra en la posición 2 desde el extremo 5' de la hebra antisentido, y q^6 es igual a 1, y la modificación de T3' se encuentra en la posición o en las posiciones 2' en una no ribosa, acíclica o esqueleto que proveen menos o igual impedimento estérico que una ribosa 2'-OMe.

En una forma de realización, T2' comienza en la posición 8 desde el extremo 5' de la hebra antisentido. En un ejemplo, T2' comienza en la posición 8 desde el extremo 5' de la hebra antisentido, y q^4 es 2.

En una forma de realización, T2' comienza en la posición 9 desde el extremo 5' de la hebra antisentido. En un ejemplo, T2' se encuentra en la posición 9 desde el extremo 5' de la hebra antisentido, y q^4 es 1.

En una forma de realización, B1' es 2'-OMe o 2'-F, q^1 es 9, T1' es 2'-F, q^2 es 1, B2' es 2'-OMe o 2'-F, q^3 es 4, T2' es 2'-F, q^4 es 1, B3' es 2'-OMe o 2'-F, q^5 es 6, T3' es 2'-F, q^6 es 1, B4' es 2'-OMe, y q^7 es 1; con dos modificaciones de unión internucleotídica fosforotioato en las posiciones 1-5 de la hebra sentido (contando desde el extremo 5' de la hebra sentido), y dos modificaciones de unión internucleotídica fosforotioato en las posiciones 1 y 2 y dos modificaciones

de unión internucleotídica fosforotioato en las posiciones 18-23 de la hebra antisentido (contando desde el extremo 5' de la hebra antisentido).

En una forma de realización, n^4 es 0, B3 es 2'-OMe, n^5 es 3, B1' es 2'-OMe o 2'-F, q^1 es 9, T1' es 2'-F, q^2 es 1, B2' es 2'-OMe o 2'-F, q^3 es 4, T2' es 2'-F, q^4 es 1, B3' es 2'-OMe o 2'-F, q^5 es 6, T3' es 2'-F, q^6 es 1, B4' es 2'-OMe, y q^7 es 1; con dos modificaciones de unión internucleotídica fosforotioato en las posiciones 1-5 de la hebra sentido (contando desde el extremo 5' de la hebra sentido), y dos modificaciones de unión internucleotídica fosforotioato en las posiciones 1 y 2 y dos modificaciones de unión internucleotídica fosforotioato en las posiciones 18-23 de la hebra antisentido (contando desde el extremo 5' de la hebra antisentido).

En una forma de realización, B1 es 2'-OMe o 2'-F, n^1 es 8, T1 es 2'F, n^2 es 3, B2 es 2'-OMe, n^3 es 7, n^4 es 0, B3 es 2'OMe, n^5 es 3, B1' es 2'-OMe o 2'-F, q^1 es 9, T1' es 2'-F, q^2 es 1, B2' es 2'-OMe o 2'-F, q^3 es 4, T2' es 2'-F, q^4 es 2, B3' es 2'-OMe o 2'-F, q^5 es 5, T3' es 2'-F, q^6 es 1, B4' es 2'-OMe, y q^7 es 1.

En una forma de realización, B1 es 2'-OMe o 2'-F, n^1 es 8, T1 es 2'F, n^2 es 3, B2 es 2'-OMe, n^3 es 7, n^4 es 0, B3 es 2'-OMe, n^5 es 3, B1' es 2'-OMe o 2'-F, q^1 es 9, T1' es 2'-F, q^2 es 1, B2' es 2'-OMe o 2'-F, q^3 es 4, T2' es 2'-F, q^4 es 2, B3' es 2'-OMe o 2'-F, q^5 es 5, T3' es 2'-F, q^6 es 1, B4' es 2'-OMe, y q^7 es 1; con dos modificaciones de unión internucleotídica fosforotioato en las posiciones 1-5 de la hebra sentido (contando desde el extremo 5' de la hebra sentido), y dos modificaciones de unión internucleotídica fosforotioato en las posiciones 1 y 2 y dos modificaciones de unión internucleotídica fosforotioato en las posiciones 18-23 de la hebra antisentido (contando desde el extremo 5' de la hebra antisentido).

En una forma de realización, B1 es 2'-OMe o 2'-F, n^1 es 6, T1 es 2'F, n^2

es 3, B2 es 2'-OMe, n^3 es 7, n^4 es 0, B3 es 2'OMe, n^5 es 3, B1' es 2'-OMe o 2'-F, q^1 es 7, T1' es 2'-F, q^2 es 1, B2' es 2'-OMe o 2'-F, q^3 es 4, T2' es 2'-F, q^4 es 2, B3' es 2'-OMe o 2'-F, q^5 es 5, T3' es 2'-F, q^6 es 1, B4' es 2'-OMe, y q^7 es 1.

En una forma de realización, B1 es 2'-OMe o 2'-F, n^1 es 6, T1 es 2'F, n^2 es 3, B2 es 2'-OMe, n^3 es 7, n^4 es 0, B3 es 2'-OMe, n^5 es 3, B1' es 2'-OMe o 2'-F, q^1 es 7, T1' es 2'-F, q^2 es 1, B2' es 2'-OMe o 2'-F, q^3 es 4, T2' es 2'-F, q^4 es 2, B3' es 2'-OMe o 2'-F, q^5 es 5, T3' es 2'-F, q^6 es 1, B4' es 2'-OMe, y q^7 es 1; con dos modificaciones de unión internucleotídica fosforotioato en las posiciones 1-5 de la hebra sentido (contando desde el extremo 5' de la hebra sentido), y dos modificaciones de unión internucleotídica fosforotioato en las posiciones 1 y 2 y dos modificaciones de unión internucleotídica fosforotioato en las posiciones 18-23 de la hebra antisentido (contando desde el extremo 5' de la hebra antisentido).

En una forma de realización, B1 es 2'-OMe o 2'-F, n^1 es 8, T1 es 2'F, n^2 es 3, B2 es 2'-OMe, n^3 es 7, n^4 es 0, B3 es 2'OMe, n^5 es 3, B1' es 2'-OMe o 2'-F, q^1 es 9, T1' es 2'-F, q^2 es 1, B2' es 2'-OMe o 2'-F, q^3 es 4, T2' es 2'-F, q^4 es 1, B3' es 2'-OMe o 2'-F, q^5 es 6, T3' es 2'-F, q^6 es 1, B4' es 2'-OMe, y q^7 es 1.

En una forma de realización, B1 es 2'-OMe o 2'-F, n^1 es 8, T1 es 2'F, n^2 es 3, B2 es 2'-OMe, n^3 es 7, n^4 es 0, B3 es 2'-OMe, n^5 es 3, B1' es 2'-OMe o 2'-F, q^1 es 9, T1' es 2'-F, q^2 es 1, B2' es 2'-OMe o 2'-F, q^3 es 4, T2' es 2'-F, q^4 es 1, B3' es 2'-OMe o 2'-F, q^5 es 6, T3' es 2'-F, q^6 es 1, B4' es 2'-OMe, y q^7 es 1; con dos modificaciones de unión internucleotídica fosforotioato en las posiciones 1-5 de la hebra sentido (contando desde el extremo 5' de la hebra sentido), y dos modificaciones de unión internucleotídica fosforotioato en las posiciones 1 y 2 y dos modificaciones de unión internucleotídica fosforotioato en las posiciones 18-23 de la hebra antisentido (contando desde el extremo 5' de la hebra antisentido).

En una forma de realización, B1 es 2'-OMe o 2'-F, n^1 es 8, T1 es 2'F, n^2 es 3, B2 es 2'-OMe, n^3 es 7, n^4 es 0, B3 es 2'OMe, n^5 es 3, B1' es 2'-OMe o 2'-F, q^1 es 9, T1' es 2'-F, q^2 es 1, B2' es 2'-OMe o 2'-F, q^3 es 5, T2' es 2'-F, q^4 es 1, B3' es 2'-OMe o 2'-F, q^5 es 5, T3' es 2'-F, q^6 es 1, B4' es 2'-OMe, y q^7 es 1; opcionalmente con por lo menos 2 TT adicionales en el extremo 3' de la hebra antisentido.

En una forma de realización, B1 es 2'-OMe o 2'-F, n^1 es 8, T1 es 2'F, n^2 es 3, B2 es 2'-OMe, n^3 es 7, n^4 es 0, B3 es 2'-OMe, n^5 es 3, B1' es 2'-OMe o 2'-F, q^1 es 9, T1' es 2'-F, q^2 es 1, B2' es 2'-OMe o 2'-F, q^3 es 5, T2' es 2'-F, q^4 es 1, B3' es 2'-OMe o 2'-F, q^5 es 5, T3' es 2'-F, q^6 es 1, B4' es 2'-OMe, y q^7 es 1; opcionalmente con por lo menos 2 TT adicionales en el extremo 3' de la hebra antisentido; con dos modificaciones de unión internucleotídica fosforotioato en las posiciones 1-5 de la hebra sentido (contando desde el extremo 5' de la hebra sentido), y dos modificaciones de unión internucleotídica fosforotioato en las posiciones 1 y 2 y dos modificaciones de unión internucleotídica fosforotioato en las posiciones 18-23 de la hebra antisentido (contando desde el extremo 5' de la hebra antisentido).

En una forma de realización, B1 es 2'-OMe o 2'-F, n^1 es 8, T1 es 2'F, n^2 es 3, B2 es 2'-OMe, n^3 es 7, n^4 es 0, B3 es 2'-OMe, n^5 es 3, B1' es 2'-OMe o 2'-F, q^1 es 9, T1' es 2'-F, q^2 es 1, B2' es 2'-OMe o 2'-F, q^3 es 4, q^4 es 0, B3' es 2'-OMe o 2'-F, q^5 es 7, T3' es 2'-F, q^6 es 1, B4' es 2'-OMe, y q^7 es 1.

En una forma de realización, B1 es 2'-OMe o 2'-F, n^1 es 8, T1 es 2'F, n^2 es 3, B2 es 2'-OMe, n^3 es 7, n^4 es 0, B3 es 2'-OMe, n^5 es 3, B1' es 2'-OMe o 2'-F, q^1 es 9, T1' es 2'-F, q^2 es 1, B2' es 2'-OMe o 2'-F, q^3 es 4, q^4 es 0, B3' es 2'-OMe o 2'-F, q^5 es 7, T3' es 2'-F, q^6 es 1, B4' es 2'-OMe, y q^7 es 1; con dos

modificaciones de unión internucleotídica fosforotioato en las posiciones 1-5 de la hebra sentido (contando desde el extremo 5'), y dos modificaciones de unión internucleotídica fosforotioato en las posiciones 1 y 2 y dos modificaciones de unión internucleotídica fosforotioato en las posiciones 18-23 de la hebra antisentido (contando desde el extremo 5').

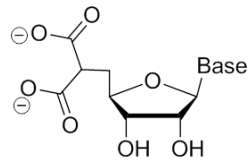
En una forma de realización, B1 es 2'-OMe o 2'-F, n^1 es 8, T1 es 2'F, n^2 es 3, B2 es 2'-OMe, n^3 es 7, n^4 es 0, B3 es 2'OMe, n^5 es 3, B1' es 2'-OMe o 2'-F, q^1 es 9, T1' es 2'-F, q^2 es 1, B2' es 2'-OMe o 2'-F, q^3 es 4, T2' es 2'-F, q^4 es 2, B3' es 2'-OMe o 2'-F, q^5 es 5, T3' es 2'-F, q^6 es 1, B4' es 2'-F, y q^7 es 1.

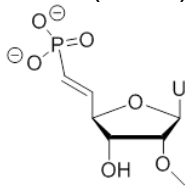
En una forma de realización, B1 es 2'-OMe o 2'-F, n^1 es 8, T1 es 2'F, n^2 es 3, B2 es 2'-OMe, n^3 es 7, n^4 es 0, B3 es 2'-OMe, n^5 es 3, B1' es 2'-OMe o 2'-F, q^1 es 9, T1' es 2'-F, q^2 es 1, B2' es 2'-OMe o 2'-F, q^3 es 4, T2' es 2'-F, q^4 es 2, B3' es 2'-OMe o 2'-F, q^5 es 5, T3' es 2'-F, q^6 es 1, B4' es 2'-F, y q^7 es 1; con dos modificaciones de unión internucleotídica fosforotioato en las posiciones 1-5 de la hebra sentido (contando desde el extremo 5' de la hebra sentido), y dos modificaciones de unión internucleotídica fosforotioato en las posiciones 1 y 2 y dos modificaciones de unión internucleotídica fosforotioato en las posiciones 18-23 de la hebra antisentido (contando desde el extremo 5' de la hebra antisentido).

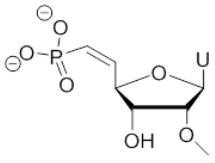
En una forma de realización, B1 es 2'-OMe o 2'-F, n^1 es 8, T1 es 2'F, n^2 es 3, B2 es 2'-OMe, n^3 es 7, n^4 es 0, B3 es 2'-OMe, n^5 es 3, B1' es 2'-OMe o 2'-F, q^1 es 9, T1' es 2'-F, q^2 es 1, B2' es 2'-OMe o 2'-F, q^3 es 4, q^4 es 0, B3' es 2'-OMe o 2'-F, q^5 es 7, T3' es 2'-F, q^6 es 1, B4' es 2'-F, y q^7 es 1.

En una forma de realización, B1 es 2'-OMe o 2'-F, n^1 es 8, T1 es 2'F, n^2 es 3, B2 es 2'-OMe, n^3 es 7, n^4 es 0, B3 es 2'-OMe, n^5 es 3, B1' es 2'-OMe o 2'-F, q^1 es 9, T1' es 2'-F, q^2 es 1, B2' es 2'-OMe o 2'-F, q^3 es 4, q^4 es 0, B3' es 2'-

OMe o 2'-F, q^5 es 7, T3' es 2'-F, q^6 es 1, B4' es 2'-F, y q^7 es 1; con dos modificaciones de unión internucleotídica fosforotioato en las posiciones 1-5 de la hebra sentido (contando desde el extremo 5' de la hebra sentido), y dos modificaciones de unión internucleotídica fosforotioato en las posiciones 1 y 2 y dos modificaciones de unión internucleotídica fosforotioato en las posiciones 18-23 de la hebra antisentido (contando desde el extremo 5' de la hebra antisentido).

El agente de ARNi puede comprender un grupo que contiene fósforo en el extremo 5' de la hebra sentido o hebra antisentido. El grupo que contiene fósforo en el extremo 5' puede ser un extremo 5' fosfato (5'-P), extremo 5' fosforotioato (5'-PS), extremo 5' fosforoditioato (5'-PS_2), extremo 5' vinilfosfonato (5'-VP), extremo 5' metilfosfonato (MePhos), o 5'-desoxi-5'-*C*-malonilo (

). Cuando el grupo que contiene fósforo en el extremo 5' es extremo 5' vinilfosfonato (5'-VP), el 5'-VP puede ser el isómero 5'-*E*-VP (es decir, *trans*-vinilfosfato, 

), isómero 5'-*Z*-VP (es decir, *cis*-vinilfosfato, 

), o mezclas de los mismos.

En una forma de realización, el agente de ARNi comprende un grupo que contiene fósforo en el extremo 5' de la hebra sentido. En una forma de realización, el agente de ARNi comprende un grupo que contiene fósforo en el extremo 5' de la hebra antisentido.

En una forma de realización, el agente de ARNi comprende un 5'-P. En una forma de realización, el agente de ARNi comprende un 5'-P en la hebra antisentido.

En una forma de realización, el agente de ARNi comprende un 5'-PS. En una forma de realización, el agente de ARNi comprende un 5'-PS en la hebra antisentido.

En una forma de realización, el agente de ARNi comprende un 5'-VP. En una forma de realización, el agente de ARNi comprende un 5'-VP en la hebra antisentido. En una forma de realización, el agente de ARNi comprende un 5'-*E*-VP en la hebra antisentido. En una forma de realización, el agente de ARNi comprende un 5'-*Z*-VP en la hebra antisentido.

En una forma de realización, el agente de ARNi comprende un 5'-PS_2. En una forma de realización, el agente de ARNi comprende un 5'-PS_2 en la hebra antisentido.

En una forma de realización, el agente de ARNi comprende un 5'-PS_2. En una forma de realización, el agente de ARNi comprende un 5'-desoxi-5'-*C*-malonilo en la hebra antisentido.

En una forma de realización, B1es 2'-OMe o 2'-F, n^1es 8, T1es 2'F, n^2es 3, B2es 2'-OMe, n^3es 7, n^4es 0, B3es 2'OMe, n^5es 3, B1'es 2'-OMe o 2'-F, q^1es 9, T1'es 2'-F, q^2es 1, B2'es 2'-OMe o 2'-F, q^3es 4, T2'es 2'-F, q^4es 2, B3'es 2'-OMe o 2'-F, q^5es 5, T3'es 2'-F, q^6es 1, B4'es 2'-OMe, y q^7es 1. El agente de ARNi también comprende un 5'-PS.

En una forma de realización, B1 es 2'-OMe o 2'-F, n^1 is 8, T1 es 2'F, n^2 es 3, B2 es 2'-OMe, n^3 es 7, n^4 es 0, B3 es 2'OMe, n^5 es 3, B1' es 2'-OMe o 2'-F, q^1 es 9, T1' es 2'-F, q^2 es 1, B2' es 2'-OMe o 2'-F, q^3 es 4, T2' es 2'-F, q^4 es 2, B3'

es 2'-OMe o 2'-F, q^5 es 5, T3' es 2'-F, q^6 es 1, B4' es 2'-OMe, y q^7 es 1. El agente de ARNi también comprende un 5'-P.

En una forma de realización, B1 es 2'-OMe o 2'-F, n^1 es 8, T1 es 2'F, n^2 es 3, B2 es 2'-OMe, n^3 es 7, n^4 es 0, B3 es 2'OMe, n^5 es 3, B1' es 2'-OMe o 2'-F, q^1 es 9, T1' es 2'-F, q^2 es 1, B2' es 2'-OMe o 2'-F, q^3 es 4, T2' es 2'-F, q^4 es 2, B3' es 2'-OMe o 2'-F, q^5 es 5, T3' es 2'-F, q^6 es 1, B4' es 2'-OMe, y q^7 es 1. El agente de ARNi también comprende un 5'-VP. El 5'-VP puede ser 5'-*E*-VP, 5'-*Z*-VP, o una combinación de los mismos.

En una forma de realización, B1 es 2'-OMe o 2'-F, n^1 es 8, T1 es 2'F, n^2 es 3, B2 es 2'-OMe, n^3 es 7, n^4 es 0, B3 es 2'OMe, n^5 es 3, B1' es 2'-OMe o 2'-F, q^1 es 9, T1' es 2'-F, q^2 es 1, B2' es 2'-OMe o 2'-F, q^3 es 4, T2' es 2'-F, q^4 es 2, B3' es 2'-OMe o 2'-F, q^5 es 5, T3' es 2'-F, q^6 es 1, B4' es 2'-OMe, y q^7 es 1. El agente de ARNi también comprende un 5'-PS_2.

En una forma de realización, B1 es 2'-OMe o 2'-F, n^1 es 8, T1 es 2'F, n^2 es 3, B2 es 2'-OMe, n^3 es 7, n^4 es 0, B3 es 2'OMe, n^5 es 3, B1' es 2'-OMe o 2'-F, q^1 es 9, T1' es 2'-F, q^2 es 1, B2' es 2'-OMe o 2'-F, q^3 es 4, T2' es 2'-F, q^4 es 2, B3' es 2'-OMe o 2'-F, q^5 es 5, T3' es 2'-F, q^6 es 1, B4' es 2'-OMe, y q^7 es 1. El agente de ARNi también comprende un 5'-desoxi-5'-*C*-malonilo.

En una forma de realización, B1 es 2'-OMe o 2'-F, n^1 es 8, T1 es 2'F, n^2 es 3, B2 es 2'-OMe, n^3 es 7, n^4 es 0, B3 es 2'-OMe, n^5 es 3, B1' es 2'-OMe o 2'-F, q^1 es 9, T1' es 2'-F, q^2 es 1, B2' es 2'-OMe o 2'-F, q^3 es 4, T2' es 2'-F, q^4 es 2, B3' es 2'-OMe o 2'-F, q^5 es 5, T3' es 2'-F, q^6 es 1, B4' es 2'-OMe, y q^7 es 1; con dos modificaciones de unión internucleotídica fosforotioato en la posición 1-5 de la hebra sentido (contando desde el extremo 5' de la hebra sentido), y dos modificaciones de unión internucleotídica fosforotioato en las posiciones 1 y 2 y

dos modificaciones de unión internucleotídica fosforotioato en las posiciones 18-23 de la hebra antisentido (contando desde el extremo 5' de la hebra antisentido). El agente de ARNi también comprende un 5'-P.

En una forma de realización, B1 es 2'-OMe o 2'-F, n^1 es 8, T1 es 2'F, n^2 es 3, B2 es 2'-OMe, n^3 es 7, n^4 es 0, B3 es 2'-OMe, n^5 es 3, B1' es 2'-OMe o 2'-F, q^1 es 9, T1' es 2'-F, q^2 es 1, B2' es 2'-OMe o 2'-F, q^3 es 4, T2' es 2'-F, q^4 es 2, B3' es 2'-OMe o 2'-F, q^5 es 5, T3' es 2'-F, q^6 es 1, B4' es 2'-OMe, y q^7 es 1; con dos modificaciones de unión internucleotídica fosforotioato en la posición 1-5 de la hebra sentido (contando desde el extremo 5' de la hebra sentido), y dos modificaciones de unión internucleotídica fosforotioato en las posiciones 1 y 2 y dos modificaciones de unión internucleotídica fosforotioato en las posiciones 18-23 de la hebra antisentido (contando desde el extremo 5' de la hebra antisentido). El agente de ARNi también comprende un 5'-PS.

En una forma de realización, B1 es 2'-OMe o 2'-F, n^1 es 8, T1 es 2'F, n^2 es 3, B2 es 2'-OMe, n^3 es 7, n^4 es 0, B3 es 2'-OMe, n^5 es 3, B1' es 2'-OMe o 2'-F, q^1 es 9, T1' es 2'-F, q^2 es 1, B2' es 2'-OMe o 2'-F, q^3 es 4, T2' es 2'-F, q^4 es 2, B3' es 2'-OMe o 2'-F, q^5 es 5, T3' es 2'-F, q^6 es 1, B4' es 2'-OMe, y q^7 es 1; con dos modificaciones de unión internucleotídica fosforotioato en la posición 1-5 de la hebra sentido (contando desde el extremo 5' de la hebra sentido), y dos modificaciones de unión internucleotídica fosforotioato en las posiciones 1 y 2 y dos modificaciones de unión internucleotídica fosforotioato en las posiciones 18-23 de la hebra antisentido (contando desde el extremo 5' de la hebra antisentido). El agente de ARNi también comprende un 5'-VP. El 5'-VP puede ser 5'-*E*-VP, 5'-*Z*-VP, o una combinación de los mismos.

En una forma de realización, B1 es 2'-OMe o 2'-F, n^1 es 8, T1 es 2'F, n^2 es 3, B2 es 2'-OMe, n^3 es 7, n^4 es 0, B3 es 2'-OMe, n^5 es 3, B1' es 2'-OMe o 2'-F, q^1 es 9, T1' es 2'-F, q^2 es 1, B2' es 2'-OMe o 2'-F, q^3 es 4, T2' es 2'-F, q^4 es 2, B3' es 2'-OMe o 2'-F, q^5 es 5, T3' es 2'-F, q^6 es 1, B4' es 2'-OMe, y q^7 es 1; con dos modificaciones de unión internucleotídica fosforotioato en la posición 1-5 de la hebra sentido (contando desde el extremo 5' de la hebra sentido), y dos modificaciones de unión internucleotídica fosforotioato en las posiciones 1 y 2 y dos modificaciones de unión internucleotídica fosforotioato en las posiciones 18-23 de la hebra antisentido (contando desde el extremo 5' de la hebra antisentido). El agente de ARNi también comprende un 5'-PS_2.

En una forma de realización, B1 es 2'-OMe o 2'-F, n^1 es 8, T1 es 2'F, n^2 es 3, B2 es 2'-OMe, n^3 es 7, n^4 es 0, B3 es 2'-OMe, n^5 es 3, B1' es 2'-OMe o 2'-F, q^1 es 9, T1' es 2'-F, q^2 es 1, B2' es 2'-OMe o 2'-F, q^3 es 4, T2' es 2'-F, q^4 es 2, B3' es 2'-OMe o 2'-F, q^5 es 5, T3' es 2'-F, q^6 es 1, B4' es 2'-OMe, y q^7 es 1; con dos modificaciones de unión internucleotídica fosforotioato en la posición 1-5 de la hebra sentido (contando desde el extremo 5' de la hebra sentido), y dos modificaciones de unión internucleotídica fosforotioato en las posiciones 1 y 2 y dos modificaciones de unión internucleotídica fosforotioato en las posiciones 18-23 de la hebra antisentido (contando desde el extremo 5' de la hebra antisentido). El agente de ARNi también comprende un 5'-desoxi-5'-*C*-malonilo.

En una forma de realización, B1 es 2'-OMe o 2'-F, n^1 es 8, T1 es 2'F, n^2 es 3, B2 es 2'-OMe, n^3 es 7, n^4 es 0, B3 es 2'-OMe, n^5 es 3, B1' es 2'-OMe o 2'-F, q^1 es 9, T1' es 2'-F, q^2 es 1, B2' es 2'-OMe o 2'-F, q^3 es 4, q^4 es 0, B3' es 2'-OMe o 2'-F, q^5 es 7, T3' es 2'-F, q^6 es 1, B4' es 2'-OMe, y q^7 es 1. El agente de ARNi también comprende un 5'-P.

En una forma de realización, B1 es 2'-OMe o 2'-F, n^1 es 8, T1 es 2'F, n^2 es 3, B2 es 2'-OMe, n^3 es 7, n^4 es 0, B3 es 2'-OMe, n^5 es 3, B1' es 2'-OMe o 2'-F, q^1 es 9, T1' es 2'-F, q^2 es 1, B2' es 2'-OMe o 2'-F, q^3 es 4, q^4 es 0, B3' es 2'-OMe o 2'-F, q^5 es 7, T3' es 2'-F, q^6 es 1, B4' es 2'-OMe, y q^7 es 1. El agente de ARNhd también comprende un 5'-PS.

En una forma de realización, B1 es 2'-OMe o 2'-F, n^1 es 8, T1 es 2'F, n^2 es 3, B2 es 2'-OMe, n^3 es 7, n^4 es 0, B3 es 2'-OMe, n^5 es 3, B1' es 2'-OMe o 2'-F, q^1 es 9, T1' es 2'-F, q^2 es 1, B2' es 2'-OMe o 2'-F, q^3 es 4, q^4 es 0, B3' es 2'-OMe o 2'-F, q^5 es 7, T3' es 2'-F, q^6 es 1, B4' es 2'-OMe, y q^7 es 1. El agente de ARNi también comprende un 5'-VP. El 5'-VP puede ser 5'-*E*-VP, 5'-*Z*-VP, o una combinación de los mismos.

En una forma de realización, B1 es 2'-OMe o 2'-F, n^1 es 8, T1 es 2'F, n^2 es 3, B2 es 2'-OMe, n^3 es 7, n^4 es 0, B3 es 2'-OMe, n^5 es 3, B1' es 2'-OMe o 2'-F, q^1 es 9, T1' es 2'-F, q^2 es 1, B2' es 2'-OMe o 2'-F, q^3 es 4, q^4 es 0, B3' es 2'-OMe o 2'-F, q^5 es 7, T3' es 2'-F, q^6 es 1, B4' es 2'-OMe, y q^7 es 1. El agente de ARNi también comprende un 5'-PS_2.

En una forma de realización, B1 es 2'-OMe o 2'-F, n^1 es 8, T1 es 2'F, n^2 es 3, B2 es 2'-OMe, n^3 es 7, n^4 es 0, B3 es 2'-OMe, n^5 es 3, B1' es 2'-OMe o 2'-F, q^1 es 9, T1' es 2'-F, q^2 es 1, B2' es 2'-OMe o 2'-F, q^3 es 4, q^4 es 0, B3' es 2'-OMe o 2'-F, q^5 es 7, T3' es 2'-F, q^6 es 1, B4' es 2'-OMe, y q^7 es 1. El agente de ARNi también comprende un 5'-desoxi-5'-*C*-malonilo.

En una forma de realización, B1 es 2'-OMe o 2'-F, n^1 es 8, T1 es 2'F, n^2 es 3, B2 es 2'-OMe, n^3 es 7, n^4 es 0, B3 es 2'-OMe, n^5 es 3, B1' es 2'-OMe o 2'-F, q^1 es 9, T1' es 2'-F, q^2 es 1, B2' es 2'-OMe o 2'-F, q^3 es 4, q^4 es 0, B3' es 2'-OMe o 2'-F, q^5 es 7, T3' es 2'-F, q^6 es 1, B4' es 2'-OMe, y q^7 es 1; con dos

modificaciones de unión internucleotídica fosforotioato en la posición 1-5 de la hebra sentido (contando desde el extremo 5'), y dos modificaciones de unión internucleotídica fosforotioato en las posiciones 1 y 2 y dos modificaciones de unión internucleotídica fosforotioato en las posiciones 18-23 de la hebra antisentido (contando desde el extremo 5'). El agente de ARNi también comprende un 5'-P.

En una forma de realización, B1 es 2'-OMe o 2'-F, n^1 es 8, T1 es 2'F, n^2 es 3, B2 es 2'-OMe, n^3 es 7, n^4 es 0, B3 es 2'-OMe, n^5 es 3, B1' es 2'-OMe o 2'-F, q^1 es 9, T1' es 2'-F, q^2 es 1, B2' es 2'-OMe o 2'-F, q^3 es 4, q^4 es 0, B3' es 2'-OMe o 2'-F, q^5 es 7, T3' es 2'-F, q^6 es 1, B4' es 2'-OMe, y q^7 es 1; con dos modificaciones de unión internucleotídica fosforotioato en la posición 1-5 de la hebra sentido (contando desde el extremo 5'), y dos modificaciones de unión internucleotídica fosforotioato en las posiciones 1 y 2 y dos modificaciones de unión internucleotídica fosforotioato en las posiciones 18-23 de la hebra antisentido (contando desde el extremo 5'). El agente de ARNi también comprende un 5'-PS.

En una forma de realización, B1 es 2'-OMe o 2'-F, n^1 es 8, T1 es 2'F, n^2 es 3, B2 es 2'-OMe, n^3 es 7, n^4 es 0, B3 es 2'-OMe, n^5 es 3, B1' es 2'-OMe o 2'-F, q^1 es 9, T1' es 2'-F, q^2 es 1, B2' es 2'-OMe o 2'-F, q^3 es 4, q^4 es 0, B3' es 2'-OMe o 2'-F, q^5 es 7, T3' es 2'-F, q^6 es 1, B4' es 2'-OMe, y q^7 es 1; con dos modificaciones de unión internucleotídica fosforotioato en la posición 1-5 de la hebra sentido (contando desde el extremo 5'), y dos modificaciones de unión internucleotídica fosforotioato en las posiciones 1 y 2 y dos modificaciones de unión internucleotídica fosforotioato en las posiciones 18-23 de la hebra antisentido (contando desde el extremo 5'). El agente de ARNi también

comprende un 5'-VP. El 5'-VP puede ser 5'-*E*-VP, 5'-*Z*-VP, o una combinación de los mismos.

En una forma de realización, B1 es 2'-OMe o 2'-F, n^1 es 8, T1 es 2'F, n^2 es 3, B2 es 2'-OMe, n^3 es 7, n^4 es 0, B3 es 2'-OMe, n^5 es 3, B1' es 2'-OMe o 2'-F, q^1 es 9, T1' es 2'-F, q^2 es 1, B2' es 2'-OMe o 2'-F, q^3 es 4, q^4 es 0, B3' es 2'-OMe o 2'-F, q^5 es 7, T3' es 2'-F, q^6 es 1, B4' es 2'-OMe, y q^7 es 1; con dos modificaciones de unión internucleotídica fosforotioato en la posición 1-5 de la hebra sentido (contando desde el extremo 5'), y dos modificaciones de unión internucleotídica fosforotioato en las posiciones 1 y 2 y dos modificaciones de unión internucleotídica fosforotioato en las posiciones 18-23 de la hebra antisentido (contando desde el extremo 5'). El agente de ARNi también comprende un 5'-PS_2.

En una forma de realización, B1 es 2'-OMe o 2'-F, n^1 es 8, T1 es 2'F, n^2 es 3, B2 es 2'-OMe, n^3 es 7, n^4 es 0, B3 es 2'-OMe, n^5 es 3, B1' es 2'-OMe o 2'-F, q^1 es 9, T1' es 2'-F, q^2 es 1, B2' es 2'-OMe o 2'-F, q^3 es 4, q^4 es 0, B3' es 2'-OMe o 2'-F, q^5 es 7, T3' es 2'-F, q^6 es 1, B4' es 2'-OMe, y q^7 es 1; con dos modificaciones de unión internucleotídica fosforotioato en la posición 1-5 de la hebra sentido (contando desde el extremo 5'), y dos modificaciones de unión internucleotídica fosforotioato en las posiciones 1 y 2 y dos modificaciones de unión internucleotídica fosforotioato en las posiciones 18-23 de la hebra antisentido (contando desde el extremo 5'). El agente de ARNi también comprende un 5'-desoxi-5'-*C*-malonilo.

En una forma de realización, B1 es 2'-OMe o 2'-F, n^1 es 8, T1 es 2'F, n^2 es 3, B2 es 2'-OMe, n^3 es 7, n^4 es 0, B3 es 2'OMe, n^5 es 3, B1' es 2'-OMe o 2'-F, q^1 es 9, T1' es 2'-F, q^2 es 1, B2' es 2'-OMe o 2'-F, q^3 es 4, T2' es 2'-F, q^4 es 2,

B3' es 2'-OMe o 2'-F, q^5 es 5, T3' es 2'-F, q^6 es 1, B4' es 2'-F, y q^7 es 1. El agente de ARNi también comprende un 5'- P.

En una forma de realización, B1 es 2'-OMe o 2'-F, n^1 es 8, T1 es 2'F, n^2 es 3, B2 es 2'-OMe, n^3 es 7, n^4 es 0, B3 es 2'OMe, n^5 es 3, B1' es 2'-OMe o 2'-F, q^1 es 9, T1' es 2'-F, q^2 es 1, B2' es 2'-OMe o 2'-F, q^3 es 4, T2' es 2'-F, q^4 es 2, B3' es 2'-OMe o 2'-F, q^5 es 5, T3' es 2'-F, q^6 es 1, B4' es 2'-F, y q^7 es 1. El agente de ARNi también comprende un 5'-PS.

En una forma de realización, B1 es 2'-OMe o 2'-F, n^1 es 8, T1 es 2'F, n^2 es 3, B2 es 2'-OMe, n^3 es 7, n^4 es 0, B3 es 2'OMe, n^5 es 3, B1' es 2'-OMe o 2'-F, q^1 es 9, T1' es 2'-F, q^2 es 1, B2' es 2'-OMe o 2'-F, q^3 es 4, T2' es 2'-F, q^4 es 2, B3' es 2'-OMe o 2'-F, q^5 es 5, T3' es 2'-F, q^6 es 1, B4' es 2'-F, y q^7 es 1. El agente de ARNi también comprende un 5'- VP. El 5'-VP puede ser 5'-*E*-VP, 5'-*Z*-VP, o una combinación de los mismos.

En una forma de realización, B1 es 2'-OMe o 2'-F, n^1 es 8, T1 es 2'F, n^2 es 3, B2 es 2'-OMe, n^3 es 7, n^4 es 0, B3 es 2'OMe, n^5 es 3, B1' es 2'-OMe o 2'-F, q^1 es 9, T1' es 2'-F, q^2 es 1, B2' es 2'-OMe o 2'-F, q^3 es 4, T2' es 2'-F, q^4 es 2, B3' es 2'-OMe o 2'-F, q^5 es 5, T3' es 2'-F, q^6 es 1, B4' es 2'-F, y q^7 es 1. El agente de ARN ARNihd también comprende un 5'-PS_2.

En una forma de realización, B1 es 2'-OMe o 2'-F, n^1 es 8, T1 es 2'F, n^2 es 3, B2 es 2'-OMe, n^3 es 7, n^4 es 0, B3 es 2'OMe, n^5 es 3, B1' es 2'-OMe o 2'-F, q^1 es 9, T1' es 2'-F, q^2 es 1, B2' es 2'-OMe o 2'-F, q^3 es 4, T2' es 2'-F, q^4 es 2, B3' es 2'-OMe o 2'-F, q^5 es 5, T3' es 2'-F, q^6 es 1, B4' es 2'-F, y q^7 es 1. El agente de ARNi también comprende un 5'-desoxi-5'-*C*-malonilo.

En una forma de realización, B1 es 2'-OMe o 2'-F, n^1 es 8, T1 es 2'F, n^2 es 3, B2 es 2'-OMe, n^3 es 7, n^4 es 0, B3 es 2'-OMe, n^5 es 3, B1' es 2'-OMe o 2'-

F, q^1 es 9, T1' es 2'-F, q^2 es 1, B2' es 2'-OMe o 2'-F, q^3 es 4, T2' es 2'-F, q^4 es 2, B3' es 2'-OMe o 2'-F, q^5 es 5, T3' es 2'-F, q^6 es 1, B4' es 2'-F, y q^7 es 1; con dos modificaciones de unión internucleotídica fosforotioato en la posición 1-5 de la hebra sentido (contando desde el extremo 5' de la hebra sentido), y dos modificaciones de unión internucleotídica fosforotioato en las posiciones 1 y 2 y dos modificaciones de unión internucleotídica fosforotioato en las posiciones 18-23 de la hebra antisentido (contando desde el extremo 5' de la hebra antisentido). El agente de ARNi también comprende un 5'- P.

En una forma de realización, B1 es 2'-OMe o 2'-F, n^1 es 8, T1 es 2'F, n^2 es 3, B2 es 2'-OMe, n^3 es 7, n^4 es 0, B3 es 2'-OMe, n^5 es 3, B1' es 2'-OMe o 2'-F, q^1 es 9, T1' es 2'-F, q^2 es 1, B2' es 2'-OMe o 2'-F, q^3 es 4, T2' es 2'-F, q^4 es 2, B3' es 2'-OMe o 2'-F, q^5 es 5, T3' es 2'-F, q^6 es 1, B4' es 2'-F, y q^7 es 1; con dos modificaciones de unión internucleotídica fosforotioato en la posición 1-5 de la hebra sentido (contando desde el extremo 5' de la hebra sentido), y dos modificaciones de unión internucleotídica fosforotioato en las posiciones 1 y 2 y dos modificaciones de unión internucleotídica fosforotioato en las posiciones 18-23 de la hebra antisentido (contando desde el extremo 5' de la hebra antisentido). El agente de ARNi también comprende un 5'-PS.

En una forma de realización, B1 es 2'-OMe o 2'-F, n^1 es 8, T1 es 2'F, n^2 es 3, B2 es 2'-OMe, n^3 es 7, n^4 es 0, B3 es 2'-OMe, n^5 es 3, B1' es 2'-OMe o 2'-F, q^1 es 9, T1' es 2'-F, q^2 es 1, B2' es 2'-OMe o 2'-F, q^3 es 4, T2' es 2'-F, q^4 es 2, B3' es 2'-OMe o 2'-F, q^5 es 5, T3' es 2'-F, q^6 es 1, B4' es 2'-F, y q^7 es 1; con dos modificaciones de unión internucleotídica fosforotioato en la posición 1-5 de la hebra sentido (contando desde el extremo 5' de la hebra sentido), y dos modificaciones de unión internucleotídica fosforotioato en las posiciones 1 y 2 y

dos modificaciones de unión internucleotídica fosforotioato en las posiciones 18-23 de la hebra antisentido (contando desde el extremo 5' de la hebra antisentido). El agente de ARNi también comprende un 5'- VP. El 5'-VP puede ser 5'-*E*-VP, 5'-*Z*-VP, o una combinación de los mismos.

En una forma de realización, B1 es 2'-OMe o 2'-F, n^1 es 8, T1 es 2'F, n^2 es 3, B2 es 2'-OMe, n^3 es 7, n^4 es 0, B3 es 2'-OMe, n^5 es 3, B1' es 2'-OMe o 2'-F, q^1 es 9, T1' es 2'-F, q^2 es 1, B2' es 2'-OMe o 2'-F, q^3 es 4, T2' es 2'-F, q^4 es 2, B3' es 2'-OMe o 2'-F, q^5 es 5, T3' es 2'-F, q^6 es 1, B4' es 2'-F, y q^7 es 1; con dos modificaciones de unión internucleotídica fosforotioato en la posición 1-5 de la hebra sentido (contando desde el extremo 5' de la hebra sentido), y dos modificaciones de unión internucleotídica fosforotioato en las posiciones 1 y 2 y dos modificaciones de unión internucleotídica fosforotioato en las posiciones 18-23 de la hebra antisentido (contando desde el extremo 5' de la hebra antisentido). El agente de ARNi también comprende un 5'-PS_2.

En una forma de realización, B1 es 2'-OMe o 2'-F, n^1 es 8, T1 es 2'F, n^2 es 3, B2 es 2'-OMe, n^3 es 7, n^4 es 0, B3 es 2'-OMe, n^5 es 3, B1' es 2'-OMe o 2'-F, q^1 es 9, T1' es 2'-F, q^2 es 1, B2' es 2'-OMe o 2'-F, q^3 es 4, T2' es 2'-F, q^4 es 2, B3' es 2'-OMe o 2'-F, q^5 es 5, T3' es 2'-F, q^6 es 1, B4' es 2'-F, y q^7 es 1; con dos modificaciones de unión internucleotídica fosforotioato en la posición 1-5 de la hebra sentido (contando desde el extremo 5' de la hebra sentido), y dos modificaciones de unión internucleotídica fosforotioato en las posiciones 1 y 2 y dos modificaciones de unión internucleotídica fosforotioato en las posiciones 18-23 de la hebra antisentido (contando desde el extremo 5' de la hebra antisentido). El agente de ARNi también comprende un 5'-desoxi-5'-*C*-malonilo.

En una forma de realización, B1 es 2'-OMe o 2'-F, n^1 es 8, T1 es 2'F, n^2 es 3, B2 es 2'-OMe, n^3 es 7, n^4 es 0, B3 es 2'-OMe, n^5 es 3, B1' es 2'-OMe o 2'-F, q^1 es 9, T1' es 2'-F, q^2 es 1, B2' es 2'-OMe o 2'-F, q^3 es 4, q^4 es 0, B3' es 2'-OMe o 2'-F, q^5 es 7, T3' es 2'-F, q^6 es 1, B4' es 2'-F, y q^7 es 1. El agente de ARNi también comprende un 5'- P.

En una forma de realización, B1 es 2'-OMe o 2'-F, n^1 es 8, T1 es 2'F, n^2 es 3, B2 es 2'-OMe, n^3 es 7, n^4 es 0, B3 es 2'-OMe, n^5 es 3, B1' es 2'-OMe o 2'-F, q^1 es 9, T1' es 2'-F, q^2 es 1, B2' es 2'-OMe o 2'-F, q^3 es 4, q^4 es 0, B3' es 2'-OMe o 2'-F, q^5 es 7, T3' es 2'-F, q^6 es 1, B4' es 2'-F, y q^7 es 1. El agente de ARNi también comprende un 5'-PS.

En una forma de realización, B1 es 2'-OMe o 2'-F, n^1 es 8, T1 es 2'F, n^2 es 3, B2 es 2'-OMe, n^3 es 7, n^4 es 0, B3 es 2'-OMe, n^5 es 3, B1' es 2'-OMe o 2'-F, q^1 es 9, T1' es 2'-F, q^2 es 1, B2' es 2'-OMe o 2'-F, q^3 es 4, q^4 es 0, B3' es 2'-OMe o 2'-F, q^5 es 7, T3' es 2'-F, q^6 es 1, B4' es 2'-F, y q^7 es 1. El agente de ARNi también comprende un 5'- VP. El 5'-VP puede ser 5'-*E*-VP, 5'-*Z*-VP, o una combinación de los mismos.

En una forma de realización, B1 es 2'-OMe o 2'-F, n^1 es 8, T1 es 2'F, n^2 es 3, B2 es 2'-OMe, n^3 es 7, n^4 es 0, B3 es 2'-OMe, n^5 es 3, B1' es 2'-OMe o 2'-F, q^1 es 9, T1' es 2'-F, q^2 es 1, B2' es 2'-OMe o 2'-F, q^3 es 4, q^4 es 0, B3' es 2'-OMe o 2'-F, q^5 es 7, T3' es 2'-F, q^6 es 1, B4' es 2'-F, y q^7 es 1. El agente de ARNi también comprende un 5'-PS_2.

En una forma de realización, B1 es 2'-OMe o 2'-F, n^1 es 8, T1 es 2'F, n^2 es 3, B2 es 2'-OMe, n^3 es 7, n^4 es 0, B3 es 2'-OMe, n^5 es 3, B1' es 2'-OMe o 2'-F, q^1 es 9, T1' es 2'-F, q^2 es 1, B2' es 2'-OMe o 2'-F, q^3 es 4, q^4 es 0, B3' es 2'-

OMe o 2'-F, q^5 es 7, T3' es 2'-F, q^6 es 1, B4' es 2'-F, y q^7 es 1. El agente de ARNi también comprende un 5'-desoxi-5'-*C*-malonilo.

En una forma de realización, B1 es 2'-OMe o 2'-F, n^1 es 8, T1 es 2'F, n^2 es 3, B2 es 2'-OMe, n^3 es 7, n^4 es 0, B3 es 2'-OMe, n^5 es 3, B1' es 2'-OMe o 2'-F, q^1 es 9, T1' es 2'-F, q^2 es 1, B2' es 2'-OMe o 2'-F, q^3 es 4, q^4 es 0, B3' es 2'-OMe o 2'-F, q^5 es 7, T3' es 2'-F, q^6 es 1, B4' es 2'-F, y q^7 es 1; con dos modificaciones de unión internucleotídica fosforotioato en la posición 1-5 de la hebra sentido (contando desde el extremo 5' de la hebra sentido), y dos modificaciones de unión internucleotídica fosforotioato en las posiciones 1 y 2 y dos modificaciones de unión internucleotídica fosforotioato en las posiciones 18-23 de la hebra antisentido (contando desde el extremo 5' de la hebra antisentido). El agente de ARNi también comprende un 5'- P.

En una forma de realización, B1 es 2'-OMe o 2'-F, n^1 es 8, T1 es 2'F, n^2 es 3, B2 es 2'-OMe, n^3 es 7, n^4 es 0, B3 es 2'-OMe, n^5 es 3, B1' es 2'-OMe o 2'-F, q^1 es 9, T1' es 2'-F, q^2 es 1, B2' es 2'-OMe o 2'-F, q^3 es 4, q^4 es 0, B3' es 2'-OMe o 2'-F, q^5 es 7, T3' es 2'-F, q^6 es 1, B4' es 2'-F, y q^7 es 1; con dos modificaciones de unión internucleotídica fosforotioato en la posición 1-5 de la hebra sentido (contando desde el extremo 5' de la hebra sentido), y dos modificaciones de unión internucleotídica fosforotioato en las posiciones 1 y 2 y dos modificaciones de unión internucleotídica fosforotioato en las posiciones 18-23 de la hebra antisentido (contando desde el extremo 5' de la hebra antisentido). El agente de ARNi también comprende un 5'-PS.

En una forma de realización, B1 es 2'-OMe o 2'-F, n^1 es 8, T1 es 2'F, n^2 es 3, B2 es 2'-OMe, n^3 es 7, n^4 es 0, B3 es 2'-OMe, n^5 es 3, B1' es 2'-OMe o 2'-F, q^1 es 9, T1' es 2'-F, q^2 es 1, B2' es 2'-OMe o 2'-F, q^3 es 4, q^4 es 0, B3' es 2'-

OMe o 2'-F, q^5 es 7, T3' es 2'-F, q^6 es 1, B4' es 2'-F, y q^7 es 1; con dos modificaciones de unión internucleotídica fosforotioato en la posición 1-5 de la hebra sentido (contando desde el extremo 5' de la hebra sentido), y dos modificaciones de unión internucleotídica fosforotioato en las posiciones 1 y 2 y dos modificaciones de unión internucleotídica fosforotioato en las posiciones 18-23 de la hebra antisentido (contando desde el extremo 5' de la hebra antisentido). El agente de ARNi también comprende un 5'- VP. El 5'-VP puede ser 5'-*E*-VP, 5'-*Z*-VP, o una combinación de los mismos.

En una forma de realización, B1 es 2'-OMe o 2'-F, n^1 es 8, T1 es 2'F, n^2 es 3, B2 es 2'-OMe, n^3 es 7, n^4 es 0, B3 es 2'-OMe, n^5 es 3, B1' es 2'-OMe o 2'-F, q^1 es 9, T1' es 2'-F, q^2 es 1, B2' es 2'-OMe o 2'-F, q^3 es 4, q^4 es 0, B3' es 2'-OMe o 2'-F, q^5 es 7, T3' es 2'-F, q^6 es 1, B4' es 2'-F, y q^7 es 1; con dos modificaciones de unión internucleotídica fosforotioato en la posición 1-5 de la hebra sentido (contando desde el extremo 5' de la hebra sentido), y dos modificaciones de unión internucleotídica fosforotioato en las posiciones 1 y 2 y dos modificaciones de unión internucleotídica fosforotioato en las posiciones 18-23 de la hebra antisentido (contando desde el extremo 5' de la hebra antisentido). El agente de ARNi también comprende un 5'-PS_2.

En una forma de realización, B1 es 2'-OMe o 2'-F, n^1 es 8, T1 es 2'F, n^2 es 3, B2 es 2'-OMe, n^3 es 7, n^4 es 0, B3 es 2'-OMe, n^5 es 3, B1' es 2'-OMe o 2'-F, q^1 es 9, T1' es 2'-F, q^2 es 1, B2' es 2'-OMe o 2'-F, q^3 es 4, q^4 es 0, B3' es 2'-OMe o 2'-F, q^5 es 7, T3' es 2'-F, q^6 es 1, B4' es 2'-F, y q^7 es 1; con dos modificaciones de unión internucleotídica fosforotioato en la posición 1-5 de la hebra sentido (contando desde el extremo 5' de la hebra sentido), y dos modificaciones de unión internucleotídica fosforotioato en las posiciones 1 y 2 y

dos modificaciones de unión internucleotídica fosforotioato en las posiciones 18-23 de la hebra antisentido (contando desde el extremo 5' de la hebra antisentido). El agente de ARNi también comprende un 5'-desoxi-5'-*C*-malonilo.

En una forma de realización, B1 es 2'-OMe o 2'-F, n^1 es 8, T1 es 2'F, n^2 es 3, B2 es 2'-OMe, n^3 es 7, n^4 es 0, B3 es 2'-OMe, n^5 es 3, B1' es 2'-OMe o 2'-F, q^1 es 9, T1' es 2'-F, q^2 es 1, B2' es 2'-OMe o 2'-F, q^3 es 4, T2' es 2'-F, q^4 es 2, B3' es 2'-OMe o 2'-F, q^5 es 5, T3' es 2'-F, q^6 es 1, B4' es 2'-OMe, y q^7 es 1; con dos modificaciones de unión internucleotídica fosforotioato en la posición 1-5 de la hebra sentido (contando desde el extremo 5' de la hebra sentido), y dos modificaciones de unión internucleotídica fosforotioato en las posiciones 1 y 2 y dos modificaciones de unión internucleotídica fosforotioato en las posiciones 18-23 de la hebra antisentido (contando desde el extremo 5' de la hebra antisentido). El agente de ARNi también comprende un 5'-P y un ligando de direccionamiento. En una forma de realización, el 5'-P se encuentra en el extremo 5' de la hebra antisentido, y el ligando de direccionamiento se encuentra en el extremo 3' de la hebra sentido.

En una forma de realización, B1 es 2'-OMe o 2'-F, n^1 es 8, T1 es 2'F, n^2 es 3, B2 es 2'-OMe, n^3 es 7, n^4 es 0, B3 es 2'-OMe, n^5 es 3, B1' es 2'-OMe o 2'-F, q^1 es 9, T1' es 2'-F, q^2 es 1, B2' es 2'-OMe o 2'-F, q^3 es 4, T2' es 2'-F, q^4 es 2, B3' es 2'-OMe o 2'-F, q^5 es 5, T3' es 2'-F, q^6 es 1, B4' es 2'-OMe, y q^7 es 1; con dos modificaciones de unión internucleotídica fosforotioato en la posición 1-5 de la hebra sentido (contando desde el extremo 5' de la hebra sentido), y dos modificaciones de unión internucleotídica fosforotioato en las posiciones 1 y 2 y dos modificaciones de unión internucleotídica fosforotioato en las posiciones 18-23 de la hebra antisentido (contando desde el extremo 5' de la hebra antisentido).

El agente de ARNi también comprende un 5'-PS y un ligando de direccionamiento. En una forma de realización, el 5'-PS se encuentra en el extremo 5' de la hebra antisentido, y el ligando de direccionamiento se encuentra en el extremo 3' de la hebra sentido.

En una forma de realización, B1 es 2'-OMe o 2'-F, n^1 es 8, T1 es 2'F, n^2 es 3, B2 es 2'-OMe, n^3 es 7, n^4 es 0, B3 es 2'-OMe, n^5 es 3, B1' es 2'-OMe o 2'-F, q^1 es 9, T1' es 2'-F, q^2 es 1, B2' es 2'-OMe o 2'-F, q^3 es 4, T2' es 2'-F, q^4 es 2, B3' es 2'-OMe o 2'-F, q^5 es 5, T3' es 2'-F, q^6 es 1, B4' es 2'-OMe, y q^7 es 1; con dos modificaciones de unión internucleotídica fosforotioato en la posición 1-5 de la hebra sentido (contando desde el extremo 5' de la hebra sentido), y dos modificaciones de unión internucleotídica fosforotioato en las posiciones 1 y 2 y dos modificaciones de unión internucleotídica fosforotioato en las posiciones 18-23 de la hebra antisentido (contando desde el extremo 5' de la hebra antisentido). El agente de ARNi también comprende un 5'-VP (por ejemplo, un 5'-*E*-VP, 5'-*Z*-VP, o una combinación de los mismos), y un ligando de direccionamiento.

En una forma de realización, el 5'-VP se encuentra en el extremo 5' de la hebra antisentido, y el ligando de direccionamiento se encuentra en el extremo 3' de la hebra sentido.

En una forma de realización, B1 es 2'-OMe o 2'-F, n^1 es 8, T1 es 2'F, n^2 es 3, B2 es 2'-OMe, n^3 es 7, n^4 es 0, B3 es 2'-OMe, n^5 es 3, B1' es 2'-OMe o 2'-F, q^1 es 9, T1' es 2'-F, q^2 es 1, B2' es 2'-OMe o 2'-F, q^3 es 4, T2' es 2'-F, q^4 es 2, B3' es 2'-OMe o 2'-F, q^5 es 5, T3' es 2'-F, q^6 es 1, B4' es 2'-OMe, y q^7 es 1; con dos modificaciones de unión internucleotídica fosforotioato en la posición 1-5 de la hebra sentido (contando desde el extremo 5' de la hebra sentido), y dos modificaciones de unión internucleotídica fosforotioato en las posiciones 1 y 2 y

dos modificaciones de unión internucleotídica fosforotioato en las posiciones 18-23 de la hebra antisentido (contando desde el extremo 5' de la hebra antisentido). El agente de ARNi también comprende un 5'-PS_2 y un ligando de direccionamiento. En una forma de realización, el 5'-PS_2 se encuentra en el extremo 5' de la hebra antisentido, y el ligando de direccionamiento se encuentra en el extremo 3' de la hebra sentido.

En una forma de realización, B1 es 2'-OMe o 2'-F, n^1 es 8, T1 es 2'F, n^2 es 3, B2 es 2'-OMe, n^3 es 7, n^4 es 0, B3 es 2'-OMe, n^5 es 3, B1' es 2'-OMe o 2'-F, q^1 es 9, T1' es 2'-F, q^2 es 1, B2' es 2'-OMe o 2'-F, q^3 es 4, T2' es 2'-F, q^4 es 2, B3' es 2'-OMe o 2'-F, q^5 es 5, T3' es 2'-F, q^6 es 1, B4' es 2'-OMe, y q^7 es 1; con dos modificaciones de unión internucleotídica fosforotioato en la posición 1-5 de la hebra sentido (contando desde el extremo 5' de la hebra sentido), y dos modificaciones de unión internucleotídica fosforotioato en las posiciones 1 y 2 y dos modificaciones de unión internucleotídica fosforotioato en las posiciones 18-23 de la hebra antisentido (contando desde el extremo 5' de la hebra antisentido). El agente de ARNi también comprende un 5'-desoxi-5'-*C*-malonilo y un ligando de direccionamiento. En una forma de realización, el 5'-desoxi-5'-*C*-malonilo se encuentra en el extremo 5' de la hebra antisentido, y el ligando de direccionamiento se encuentra en el extremo 3' de la hebra sentido.

En una forma de realización, B1 es 2'-OMe o 2'-F, n^1 es 8, T1 es 2'F, n^2 es 3, B2 es 2'-OMe, n^3 es 7, n^4 es 0, B3 es 2'-OMe, n^5 es 3, B1' es 2'-OMe o 2'-F, q^1 es 9, T1' es 2'-F, q^2 es 1, B2' es 2'-OMe o 2'-F, q^3 es 4, q^4 es 0, B3' es 2'-OMe o 2'-F, q^5 es 7, T3' es 2'-F, q^6 es 1, B4' es 2'-OMe, y q^7 es 1; con dos modificaciones de unión internucleotídica fosforotioato en la posición 1-5 de la hebra sentido (contando desde el extremo 5'), y dos modificaciones de unión

internucleotídica fosforotioato en las posiciones 1 y 2 y dos modificaciones de unión internucleotídica fosforotioato en las posiciones 18-23 de la hebra antisentido (contando desde el extremo 5'). El agente de ARNi también comprende un 5'-P y un ligando de direccionamiento. En una forma de realización, el 5'-P se encuentra en el extremo 5' de la hebra antisentido, y el ligando de direccionamiento se encuentra en el extremo 3' de la hebra sentido.

En una forma de realización, B1 es 2'-OMe o 2'-F, n^1 es 8, T1 es 2'F, n^2 es 3, B2 es 2'-OMe, n^3 es 7, n^4 es 0, B3 es 2'-OMe, n^5 es 3, B1' es 2'-OMe o 2'-F, q^1 es 9, T1' es 2'-F, q^2 es 1, B2' es 2'-OMe o 2'-F, q^3 es 4, q^4 es 0, B3' es 2'-OMe o 2'-F, q^5 es 7, T3' es 2'-F, q^6 es 1, B4' es 2'-OMe, y q^7 es 1; con dos modificaciones de unión internucleotídica fosforotioato en la posición 1-5 de la hebra sentido (contando desde el extremo 5'), y dos modificaciones de unión internucleotídica fosforotioato en las posiciones 1 y 2 y dos modificaciones de unión internucleotídica fosforotioato en las posiciones 18-23 de la hebra antisentido (contando desde el extremo 5'). El agente de ARNi también comprende un 5'-PS y un ligando de direccionamiento. En una forma de realización, el 5'-PS se encuentra en el extremo 5' de la hebra antisentido, y el ligando de direccionamiento se encuentra en el extremo 3' de la hebra sentido.

En una forma de realización, B1 es 2'-OMe o 2'-F, n^1 es 8, T1 es 2'F, n^2 es 3, B2 es 2'-OMe, n^3 es 7, n^4 es 0, B3 es 2'-OMe, n^5 es 3, B1' es 2'-OMe o 2'-F, q^1 es 9, T1' es 2'-F, q^2 es 1, B2' es 2'-OMe o 2'-F, q^3 es 4, q^4 es 0, B3' es 2'-OMe o 2'-F, q^5 es 7, T3' es 2'-F, q^6 es 1, B4' es 2'-OMe, y q^7 es 1; con dos modificaciones de unión internucleotídica fosforotioato en la posición 1-5 de la hebra sentido (contando desde el extremo 5'), y dos modificaciones de unión internucleotídica fosforotioato en las posiciones 1 y 2 y dos modificaciones de

unión internucleotídica fosforotioato en las posiciones 18-23 de la hebra antisentido (contando desde el extremo 5'). El agente de ARNi también comprende un 5'-VP (por ejemplo, un 5'-*E*-VP, 5'-*Z*-VP, o una combinación de los mismos) y un ligando de direccionamiento. En una forma de realización, el 5'-VP se encuentra en el extremo 5' de la hebra antisentido, y el ligando de direccionamiento se encuentra en el extremo 3' de la hebra sentido.

En una forma de realización, B1 es 2'-OMe o 2'-F, n^1 es 8, T1 es 2'F, n^2 es 3, B2 es 2'-OMe, n^3 es 7, n^4 es 0, B3 es 2'-OMe, n^5 es 3, B1' es 2'-OMe o 2'-F, q^1 es 9, T1' es 2'-F, q^2 es 1, B2' es 2'-OMe o 2'-F, q^3 es 4, q^4 es 0, B3' es 2'-OMe o 2'-F, q^5 es 7, T3' es 2'-F, q^6 es 1, B4' es 2'-OMe, y q^7 es 1; con dos modificaciones de unión internucleotídica fosforotioato en la posición 1-5 de la hebra sentido (contando desde el extremo 5'), y dos modificaciones de unión internucleotídica fosforotioato en las posiciones 1 y 2 y dos modificaciones de unión internucleotídica fosforotioato en las posiciones 18-23 de la hebra antisentido (contando desde el extremo 5'). El agente de ARNi también comprende un 5'-PS_2 y un ligando de direccionamiento. En una forma de realización, el 5'-PS_2 se encuentra en el extremo 5' de la hebra antisentido, y el ligando de direccionamiento se encuentra en el extremo 3' de la hebra sentido.

En una forma de realización, B1 es 2'-OMe o 2'-F, n^1 es 8, T1 es 2'F, n^2 es 3, B2 es 2'-OMe, n^3 es 7, n^4 es 0, B3 es 2'-OMe, n^5 es 3, B1' es 2'-OMe o 2'-F, q^1 es 9, T1' es 2'-F, q^2 es 1, B2' es 2'-OMe o 2'-F, q^3 es 4, q^4 es 0, B3' es 2'-OMe o 2'-F, q^5 es 7, T3' es 2'-F, q^6 es 1, B4' es 2'-OMe, y q^7 es 1; con dos modificaciones de unión internucleotídica fosforotioato en la posición 1-5 de la hebra sentido (contando desde el extremo 5'), y dos modificaciones de unión internucleotídica fosforotioato en las posiciones 1 y 2 y dos modificaciones de

unión internucleotídica fosforotioato en las posiciones 18-23 de la hebra antisentido (contando desde el extremo 5'). El agente de ARNi también comprende un 5'-desoxi-5'-*C*-malonilo y un ligando de direccionamiento. En una forma de realización, el 5'-desoxi-5'-*C*-malonilo se encuentra en el extremo 5' de la hebra antisentido, y el ligando de direccionamiento se encuentra en el extremo 3' de la hebra sentido.

En una forma de realización, B1 es 2'-OMe o 2'-F, n^1 es 8, T1 es 2'F, n^2 es 3, B2 es 2'-OMe, n^3 es 7, n^4 es 0, B3 es 2'-OMe, n^5 es 3, B1' es 2'-OMe o 2'-F, q^1 es 9, T1' es 2'-F, q^2 es 1, B2' es 2'-OMe o 2'-F, q^3 es 4, T2' es 2'-F, q^4 es 2, B3' es 2'-OMe o 2'-F, q^5 es 5, T3' es 2'-F, q^6 es 1, B4' es 2'-F, y q^7 es 1; con dos modificaciones de unión internucleotídica fosforotioato en la posición 1-5 de la hebra sentido (contando desde el extremo 5' de la hebra sentido), y dos modificaciones de unión internucleotídica fosforotioato en las posiciones 1 y 2 y dos modificaciones de unión internucleotídica fosforotioato en las posiciones 18-23 de la hebra antisentido (contando desde el extremo 5' de la hebra antisentido). El agente de ARNi también comprende un 5'-P y un ligando de direccionamiento. En una forma de realización, el 5'-P se encuentra en el extremo 5' de la hebra antisentido, y el ligando de direccionamiento se encuentra en el extremo 3' de la hebra sentido.

En una forma de realización, B1 es 2'-OMe o 2'-F, n^1 es 8, T1 es 2'F, n^2 es 3, B2 es 2'-OMe, n^3 es 7, n^4 es 0, B3 es 2'-OMe, n^5 es 3, B1' es 2'-OMe o 2'-F, q^1 es 9, T1' es 2'-F, q^2 es 1, B2' es 2'-OMe o 2'-F, q^3 es 4, T2' es 2'-F, q^4 es 2, B3' es 2'-OMe o 2'-F, q^5 es 5, T3' es 2'-F, q^6 es 1, B4' es 2'-F, y q^7 es 1; con dos modificaciones de unión internucleotídica fosforotioato en la posición 1-5 de la hebra sentido (contando desde el extremo 5' de la hebra sentido), y dos

modificaciones de unión internucleotídica fosforotioato en las posiciones 1 y 2 y dos modificaciones de unión internucleotídica fosforotioato en las posiciones 18-23 de la hebra antisentido (contando desde el extremo 5' de la hebra antisentido). El agente de ARNi también comprende un 5'-PS y un ligando de direccionamiento. En una forma de realización, el 5'-PS se encuentra en el extremo 5' de la hebra antisentido, y el ligando de direccionamiento se encuentra en el extremo 3' de la hebra sentido.

En una forma de realización, B1 es 2'-OMe o 2'-F, n^1 es 8, T1 es 2'F, n^2 es 3, B2 es 2'-OMe, n^3 es 7, n^4 es 0, B3 es 2'-OMe, n^5 es 3, B1' es 2'-OMe o 2'-F, q^1 es 9, T1' es 2'-F, q^2 es 1, B2' es 2'-OMe o 2'-F, q^3 es 4, T2' es 2'-F, q^4 es 2, B3' es 2'-OMe o 2'-F, q^5 es 5, T3' es 2'-F, q^6 es 1, B4' es 2'-F, y q^7 es 1; con dos modificaciones de unión internucleotídica fosforotioato en la posición 1-5 de la hebra sentido (contando desde el extremo 5' de la hebra sentido), y dos modificaciones de unión internucleotídica fosforotioato en las posiciones 1 y 2 y dos modificaciones de unión internucleotídica fosforotioato en las posiciones 18-23 de la hebra antisentido (contando desde el extremo 5' de la hebra antisentido). El agente de ARNi también comprende un 5'-VP (por ejemplo, un 5'-*E*-VP, 5'-*Z*-VP, o una combinación de los mismos) y un ligando de direccionamiento. En una forma de realización, el 5'-VP se encuentra en el extremo 5' de la hebra antisentido, y el ligando de direccionamiento se encuentra en el extremo 3' de la hebra sentido.

En una forma de realización, B1 es 2'-OMe o 2'-F, n^1 es 8, T1 es 2'F, n^2 es 3, B2 es 2'-OMe, n^3 es 7, n^4 es 0, B3 es 2'-OMe, n^5 es 3, B1' es 2'-OMe o 2'-F, q^1 es 9, T1' es 2'-F, q^2 es 1, B2' es 2'-OMe o 2'-F, q^3 es 4, T2' es 2'-F, q^4 es 2, B3' es 2'-OMe o 2'-F, q^5 es 5, T3' es 2'-F, q^6 es 1, B4' es 2'-F, y q^7 es 1; con dos

modificaciones de unión internucleotídica fosforotioato en la posición 1-5 de la hebra sentido (contando desde el extremo 5' de la hebra sentido), y dos modificaciones de unión internucleotídica fosforotioato en las posiciones 1 y 2 y dos modificaciones de unión internucleotídica fosforotioato en las posiciones 18-23 de la hebra antisentido (contando desde el extremo 5' de la hebra antisentido). El agente de ARNi también comprende un 5'-PS_2 y un ligando de direccionamiento. En una forma de realización, el 5'-PS_2 se encuentra en el extremo 5' de la hebra antisentido, y el ligando de direccionamiento se encuentra en el extremo 3' de la hebra sentido.

En una forma de realización, B1 es 2'-OMe o 2'-F, n^1 es 8, T1 es 2'F, n^2 es 3, B2 es 2'-OMe, n^3 es 7, n^4 es 0, B3 es 2'-OMe, n^5 es 3, B1' es 2'-OMe o 2'-F, q^1 es 9, T1' es 2'-F, q^2 es 1, B2' es 2'-OMe o 2'-F, q^3 es 4, T2' es 2'-F, q^4 es 2, B3' es 2'-OMe o 2'-F, q^5 es 5, T3' es 2'-F, q^6 es 1, B4' es 2'-F, y q^7 es 1; con dos modificaciones de unión internucleotídica fosforotioato en la posición 1-5 de la hebra sentido (contando desde el extremo 5' de la hebra sentido), y dos modificaciones de unión internucleotídica fosforotioato en las posiciones 1 y 2 y dos modificaciones de unión internucleotídica fosforotioato en las posiciones 18-23 de la hebra antisentido (contando desde el extremo 5' de la hebra antisentido). El agente de ARNi también comprende un 5'-desoxi-5'-*C*-malonilo y un ligando de direccionamiento. En una forma de realización, el 5'-desoxi-5'-*C*-malonilo se encuentra en el extremo 5' de la hebra antisentido, y el ligando de direccionamiento se encuentra en el extremo 3' de la hebra sentido.

En una forma de realización, B1 es 2'-OMe o 2'-F, n^1 es 8, T1 es 2'F, n^2 es 3, B2 es 2'-OMe, n^3 es 7, n^4 es 0, B3 es 2'-OMe, n^5 es 3, B1' es 2'-OMe o 2'-F, q^1 es 9, T1' es 2'-F, q^2 es 1, B2' es 2'-OMe o 2'-F, q^3 es 4, q^4 es 0, B3' es 2'-

OMe o 2'-F, q^5 es 7, T3' es 2'-F, q^6 es 1, B4' es 2'-F, y q^7 es 1; con dos modificaciones de unión internucleotídica fosforotioato en la posición 1-5 de la hebra sentido (contando desde el extremo 5' de la hebra sentido), y dos modificaciones de unión internucleotídica fosforotioato en las posiciones 1 y 2 y dos modificaciones de unión internucleotídica fosforotioato en las posiciones 18-23 de la hebra antisentido (contando desde el extremo 5' de la hebra antisentido). El agente de ARNi también comprende un 5'-P y un ligando de direccionamiento. En una forma de realización, el 5'-P se encuentra en el extremo 5' de la hebra antisentido, y el ligando de direccionamiento se encuentra en el extremo 3' de la hebra sentido.

En una forma de realización, B1 es 2'-OMe o 2'-F, n^1 es 8, T1 es 2'F, n^2 es 3, B2 es 2'-OMe, n^3 es 7, n^4 es 0, B3 es 2'-OMe, n^5 es 3, B1' es 2'-OMe o 2'-F, q^1 es 9, T1' es 2'-F, q^2 es 1, B2' es 2'-OMe o 2'-F, q^3 es 4, q^4 es 0, B3' es 2'-OMe o 2'-F, q^5 es 7, T3' es 2'-F, q^6 es 1, B4' es 2'-F, y q^7 es 1; con dos modificaciones de unión internucleotídica fosforotioato en la posición 1-5 de la hebra sentido (contando desde el extremo 5' de la hebra sentido), y dos modificaciones de unión internucleotídica fosforotioato en las posiciones 1 y 2 y dos modificaciones de unión internucleotídica fosforotioato en las posiciones 18-23 de la hebra antisentido (contando desde el extremo 5' de la hebra antisentido). El agente de ARNi también comprende un 5'-PS y un ligando de direccionamiento. En una forma de realización, el 5'-PS se encuentra en el extremo 5' de la hebra antisentido, y el ligando de direccionamiento se encuentra en el extremo 3' de la hebra sentido.

En una forma de realización, B1 es 2'-OMe o 2'-F, n^1 es 8, T1 es 2'F, n^2 es 3, B2 es 2'-OMe, n^3 es 7, n^4 es 0, B3 es 2'-OMe, n^5 es 3, B1' es 2'-OMe o 2'-

F, q^1 es 9, T1' es 2'-F, q^2 es 1, B2' es 2'-OMe o 2'-F, q^3 es 4, q^4 es 0, B3' es 2'-OMe o 2'-F, q^5 es 7, T3' es 2'-F, q^6 es 1, B4' es 2'-F, y q^7 es 1; con dos modificaciones de unión internucleotídica fosforotioato en la posición 1-5 de la hebra sentido (contando desde el extremo 5' de la hebra sentido), y dos modificaciones de unión internucleotídica fosforotioato en las posiciones 1 y 2 y dos modificaciones de unión internucleotídica fosforotioato en las posiciones 18-23 de la hebra antisentido (contando desde el extremo 5' de la hebra antisentido). El agente de ARNi también comprende un 5'- VP (por ejemplo, un 5'-*E*-VP, 5'-*Z*-VP, o una combinación de los mismos) y un ligando de direccionamiento. En una forma de realización, el 5'-VP se encuentra en el extremo 5' de la hebra antisentido, y el ligando de direccionamiento se encuentra en el extremo 3' de la hebra sentido.

En una forma de realización, B1 es 2'-OMe o 2'-F, n^1 es 8, T1 es 2'F, n^2 es 3, B2 es 2'-OMe, n^3 es 7, n^4 es 0, B3 es 2'-OMe, n^5 es 3, B1' es 2'-OMe o 2'-F, q^1 es 9, T1' es 2'-F, q^2 es 1, B2' es 2'-OMe o 2'-F, q^3 es 4, q^4 es 0, B3' es 2'-OMe o 2'-F, q^5 es 7, T3' es 2'-F, q^6 es 1, B4' es 2'-F, y q^7 es 1; con dos modificaciones de unión internucleotídica fosforotioato en la posición 1-5 de la hebra sentido (contando desde el extremo 5' de la hebra sentido), y dos modificaciones de unión internucleotídica fosforotioato en las posiciones 1 y 2 y dos modificaciones de unión internucleotídica fosforotioato en las posiciones 18-23 de la hebra antisentido (contando desde el extremo 5' de la hebra antisentido). El agente de ARNi también comprende un 5'-PS_2 y un ligando de direccionamiento. En una forma de realización, el 5'-PS_2 se encuentra en el extremo 5' de la hebra antisentido, y el ligando de direccionamiento se encuentra en el extremo 3' de la hebra sentido.

En una forma de realización, B1 es 2'-OMe o 2'-F, n^1 es 8, T1 es 2'F, n^2 es 3, B2 es 2'-OMe, n^3 es 7, n^4 es 0, B3 es 2'-OMe, n^5 es 3, B1' es 2'-OMe o 2'-F, q^1 es 9, T1' es 2'-F, q^2 es 1, B2' es 2'-OMe o 2'-F, q^3 es 4, q^4 es 0, B3' es 2'-OMe o 2'-F, q^5 es 7, T3' es 2'-F, q^6 es 1, B4' es 2'-F, y q^7 es 1; con dos modificaciones de unión internucleotídica fosforotioato en la posición 1-5 de la hebra sentido (contando desde el extremo 5' de la hebra sentido), y dos modificaciones de unión internucleotídica fosforotioato en las posiciones 1 y 2 y dos modificaciones de unión internucleotídica fosforotioato en las posiciones 18-23 de la hebra antisentido (contando desde el extremo 5' de la hebra antisentido). El agente de ARNi también comprende un 5'-desoxi-5'-*C*-malonilo y un ligando de direccionamiento. En una forma de realización, el 5'-desoxi-5'-*C*-malonilo se encuentra en el extremo 5' de la hebra antisentido, y el ligando de direccionamiento se encuentra en el extremo 3' de la hebra sentido.

En una forma de realización particular, un agente de ARNi de la presente invención comprende:

(a) una hebra sentido que tiene:

(i) una longitud de 21 nucleótidos;

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

(iii) modificaciones 2'-F en las posiciones 1, 3, 5, 7, 9 a 11, 13, 17, 19, y 21, y modificaciones 2'-OMe en las posiciones 2, 4, 6, 8, 12, 14 a 16, 18, y 20 (contando desde el extremo 5');

y

(b) una hebra antisentido que tiene:

(i) una longitud de 23 nucleótidos;

(ii) modificaciones 2'-OMe en las posiciones 1, 3, 5, 9, 11 a 13, 15, 17, 19, 21, y 23, y modificaciones 2'F en las posiciones 2, 4, 6 a 8, 10, 14, 16, 18, 20, y 22 (contando desde el extremo 5'); y

(iii) uniones internucleotídicas de fosforotioato entre las posiciones de nucleótido 21 y 22, y entre las posiciones de nucleótido 22 y 23 (contando desde el extremo 5');

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

En otra forma de realización particular, un agente de ARNi de la presente invención comprende:

(a) una hebra sentido que tiene:

(i) una longitud de 21 nucleótidos;

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

(iii) modificaciones 2'-F en las posiciones 1, 3, 5, 7, 9 a 11, 13, 15, 17, 19, y 21, y modificaciones 2'-OMe en las posiciones 2, 4, 6, 8, 12, 14, 16, 18, y 20 (contando desde el extremo 5'); y

(iv) uniones internucleotídicas de fosforotioato entre las posiciones de nucleótido 1 y 2, y entre las posiciones de nucleótido 2 y 3 (contando desde el extremo 5');

y

(b) una hebra antisentido que tiene:

(i) una longitud de 23 nucleótidos;

(ii) modificaciones 2'-OMe en las posiciones 1, 3, 5, 7, 9, 11 a 13, 15, 17, 19, y 21 a 23, y modificaciones 2'F en las posiciones 2, 4, 6, 8, 10, 14, 16, 18, y 20 (contando desde el extremo 5'); y

(iii) uniones internucleotídicas de fosforotioato entre las posiciones de nucleótido 1 y 2, entre las posiciones de nucleótido 2 y 3, entre las posiciones de nucleótido 21 y 22, y entre las posiciones de nucleótido 22 y 23 (contando desde el extremo 5');

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

En otra forma de realización particular, un agente de ARNi de la presente invención comprende:

(a) una hebra sentido que tiene:

(i) una longitud de 21 nucleótidos;

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

(iii) modificaciones 2'-OMe en las posiciones 1 a 6, 8, 10, y 12 a 21, modificaciones 2'-F en las posiciones 7, y 9, y un desoxinucleótido (por ejemplo dT) en la posición 11 (contando desde el extremo 5'); y

(iv) uniones internucleotídicas de fosforotioato entre las posiciones de nucleótido 1 y 2, y entre las posiciones de nucleótido 2 y 3 (contando desde el extremo 5');

y

(b) una hebra antisentido que tiene:

(i) una longitud de 23 nucleótidos;

(ii) modificaciones 2'-OMe en las posiciones 1, 3, 7, 9, 11, 13, 15, 17, y 19 a 23, y modificaciones 2'-F en las posiciones 2, 4 a 6, 8, 10, 12, 14, 16, y 18 (contando desde el extremo 5'); y

(iii) uniones internucleotídicas de fosforotioato entre las posiciones de nucleótido 1 y 2, entre las posiciones de nucleótido 2 y 3, entre las posiciones de nucleótido 21 y 22, y entre las posiciones de nucleótido 22 y 23 (contando desde el extremo 5');

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

En otra forma de realización particular, un agente de ARNi de la presente invención comprende:

(a) una hebra sentido que tiene:

(i) una longitud de 21 nucleótidos;

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

(iii) modificaciones 2'-OMe en las posiciones 1 a 6, 8, 10, 12, 14, y 16 a 21, y modificaciones 2'-F en las posiciones 7, 9, 11, 13, y 15; y

(iv) uniones internucleotídicas de fosforotioato entre las posiciones de nucleótido 1 y 2, y entre las posiciones de nucleótido 2 y 3 (contando desde el extremo 5');

y

(b) una hebra antisentido que tiene:

(i) una longitud de 23 nucleótidos;

(ii) modificaciones 2'-OMe en las posiciones 1, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, y 21 a 23, y modificaciones 2'-F en las posiciones 2 a 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, y 20 (contando desde el extremo 5'); y

(iii) uniones internucleotídicas de fosforotioato entre las posiciones de nucleótido 1 y 2, entre las posiciones de nucleótido 2 y 3, entre las posiciones de nucleótido 21 y 22, y entre las posiciones de nucleótido 22 y 23 (contando desde el extremo 5');

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

En otra forma de realización particular, un agente de ARNi de la presente invención comprende:

(a) una hebra sentido que tiene:

(i) una longitud de 21 nucleótidos;

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

(iii) modificaciones 2'-OMe en las posiciones 1 a 9, y 12 a 21, y modificaciones 2'-F en las posiciones 10, y 11; y

(iv) uniones internucleotídicas de fosforotioato entre las posiciones de nucleótido 1 y 2, y entre las posiciones de nucleótido 2 y 3 (contando desde el extremo 5');

y

(b) una hebra antisentido que tiene:

(i) una longitud de 23 nucleótidos;

(ii) modificaciones 2'-OMe en las posiciones 1, 3, 5, 7, 9, 11 a 13, 15, 17, 19, y 21 a 23, y modificaciones 2'-F en las posiciones 2, 4, 6, 8, 10, 14, 16, 18, y 20 (contando desde el extremo 5'); y

(iii) uniones internucleotídicas de fosforotioato entre las posiciones de nucleótido 1 y 2, entre las posiciones de nucleótido 2 y 3, entre las posiciones de nucleótido 21 y 22, y entre las posiciones de nucleótido 22 y 23 (contando desde el extremo 5');

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

En otra forma de realización particular, un agente de ARNi de la presente invención comprende:

(a) una hebra sentido que tiene:

(i) una longitud de 21 nucleótidos;

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

(iii) modificaciones 2'-F en las posiciones 1, 3, 5, 7, 9 a 11, y 13, y modificaciones 2'-OMe en las posiciones 2, 4, 6, 8, 12, y 14 a 21; y

(iv) uniones internucleotídicas de fosforotioato entre las posiciones de nucleótido 1 y 2, y entre las posiciones de nucleótido 2 y 3 (contando desde el extremo 5');

y

(b) una hebra antisentido que tiene:

(i) una longitud de 23 nucleótidos;

(ii) modificaciones 2'-OMe en las posiciones 1, 3, 5 a 7, 9, 11 a 13, 15, 17 a 19, y 21 a 23, y modificaciones 2'-F en las posiciones 2, 4, 8, 10, 14, 16, y 20 (contando desde el extremo 5'); y

(iii) uniones internucleotídicas de fosforotioato entre las posiciones de nucleótido 1 y 2, entre las posiciones de nucleótido 2 y 3, entre las posiciones de nucleótido 21 y 22, y entre las posiciones de nucleótido 22 y 23 (contando desde el extremo 5');

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

En otra forma de realización particular, un agente de ARNi de la presente invención comprende:

(a) una hebra sentido que tiene:

(i) una longitud de 21 nucleótidos;

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

(iii) modificaciones 2'-OMe en las posiciones 1, 2, 4, 6, 8, 12, 14, 15, 17, y 19 a 21, y modificaciones 2'-F en las posiciones 3, 5, 7, 9 a 11, 13, 16, y 18; y

(iv) uniones internucleotídicas de fosforotioato entre las posiciones de nucleótido 1 y 2, y entre las posiciones de nucleótido 2 y 3 (contando desde el extremo 5');

y

(b) una hebra antisentido que tiene:

(i) una longitud de 25 nucleótidos;

(ii) modificaciones 2'-OMe en las posiciones 1, 4, 6, 7, 9, 11 a 13, 15, 17, y 19 a 23, modificaciones 2'-F en las posiciones 2, 3, 5, 8, 10, 14, 16, y 18, y desoxi-nucleótidos (por ejemplo dT) en las posiciones 24 y 25 (contando desde el extremo 5'); y

(iii) uniones internucleotídicas de fosforotioato entre las posiciones de nucleótido 1 y 2, entre las posiciones de nucleótido 2 y 3, entre las posiciones de nucleótido 21 y 22, y entre las posiciones de nucleótido 22 y 23 (contando desde el extremo 5');

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

En otra forma de realización particular, un agente de ARNi de la presente invención comprende:

(a) una hebra sentido que tiene:

(i) una longitud de 21 nucleótidos;

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

(iii) modificaciones 2'-OMe en las posiciones 1 a 6, 8, y 12 a 21, y modificaciones 2'-F en las posiciones 7, y 9 a 11; y

(iv) uniones internucleotídicas de fosforotioato entre las posiciones de nucleótido 1 y 2, y entre las posiciones de nucleótido 2 y 3 (contando desde el extremo 5');

y

(b) una hebra antisentido que tiene:

(i) una longitud de 23 nucleótidos;

(ii) modificaciones 2'-OMe en las posiciones 1, 3 a 5, 7, 8, 10 a 13, 15, y 17 a 23, y modificaciones 2'-F en las posiciones 2, 6, 9, 14, y 16 (contando desde el extremo 5'); y

(iii) uniones internucleotídicas de fosforotioato entre las posiciones de nucleótido 1 y 2, entre las posiciones de nucleótido 2 y 3, entre las posiciones de nucleótido 21 y 22, y entre las posiciones de nucleótido 22 y 23 (contando desde el extremo 5');

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

En otra forma de realización particular, un agente de ARNi de la presente invención comprende:

(a) una hebra sentido que tiene:

(i) una longitud de 21 nucleótidos;

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

(iii) modificaciones 2'-OMe en las posiciones 1 a 6, 8, y 12 a 21, y modificaciones 2'-F en las posiciones 7, y 9 a 11; y

(iv) uniones internucleotídicas de fosforotioato entre las posiciones de nucleótido 1 y 2, y entre las posiciones de nucleótido 2 y 3 (contando desde el extremo 5');

y

(b) una hebra antisentido que tiene:

(i) una longitud de 23 nucleótidos;

(ii) modificaciones 2'-OMe en las posiciones 1, 3 a 5, 7, 10 a 13, 15, y 17 a 23, y modificaciones 2'-F en las posiciones 2, 6, 8, 9, 14, y 16 (contando desde el extremo 5'); y

(iii) uniones internucleotídicas de fosforotioato entre las posiciones de nucleótido 1 y 2, entre las posiciones de nucleótido 2 y 3, entre las posiciones de nucleótido 21 y 22, y entre las posiciones de nucleótido 22 y 23 (contando desde el extremo 5');

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

En otra forma de realización particular, un agente de ARNi de la presente invención comprende:

(a) una hebra sentido que tiene:

(i) una longitud de 19 nucleótidos;

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

(iii) modificaciones 2'-OMe en las posiciones 1 a 4, 6, y 10 a 19, y modificaciones 2'-F en las posiciones 5, y 7 a 9; y

(iv) uniones internucleotídicas de fosforotioato entre las posiciones de nucleótido 1 y 2, y entre las posiciones de nucleótido 2 y 3 (contando desde el extremo 5');

y

(b) una hebra antisentido que tiene:

(i) una longitud de 21 nucleótidos;

(ii) modificaciones 2'-OMe en las posiciones 1, 3 a 5, 7, 10 a 13, 15, y 17 a 21, y modificaciones 2'-F en las posiciones 2, 6, 8, 9, 14, y 16 (contando desde el extremo 5'); y

(iii) uniones internucleotídicas de fosforotioato entre las posiciones de nucleótido 1 y 2, entre las posiciones de nucleótido 2 y 3, entre las posiciones de nucleótido 19 y 20, y entre las posiciones de nucleótido 20 y 21 (contando desde el extremo 5');

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

En determinadas formas de realización, el ARNi para usar en los métodos de la invención es un agente seleccionado de los agentes que se enumeran en la Tabla 3, Tabla 5, o Tabla 6. Estos agentes además pueden comprender un ligando.

III. ARNi conjugados a ligandos

Otra modificación del ARN de un ARNi de la invención involucra la unión química al ARNi de uno o más ligandos, unidades o conjugados que aumentan la actividad, distribución celular, o incorporación celular del ARNi por ejemplo, en

una célula. Dichas unidades incluyen a título enunciativo no taxativo unidades lipídicas tales como unidades colesterol (Letsinger y col., *Proc. Natl. Acid. Sci. USA*, 1989, 86: 6553-6556). En otras formas de realización, el ligando es ácido cólico (Manoharan y col., *Biorg. Med. Chem. Let*., 1994, 4:1053-1060), un tioéter, por ejemplo, beril-S-tritiltiol (Manoharan y col., *Ann. N.Y. Acad. Sci*., 1992, 660:306-309; Manoharan y col., *Biorg. Med. Chem. Let*., 1993, 3:2765-2770), un tiocolesterol (Oberhauser y col., *Nucl. Acids Res*., 1992, 20:533-538), una cadena alifática, por ejemplo, residuos dodecandiol o undecilo (Saison-Behmoaras y col., *EMBO J*, 1991, 10:1111-1118; Kabanov y col., *FEBS Lett*., 1990, 259:327-330; Svinarchuk y col., *Biochimie*, 1993, 75:49-54), un fosfolípido, por ejemplo, di-hexadecil-rac-glicerol o trietil-amonio 1,2-di-O-hexadecil-rac-glicero-3-fosfonato (Manoharan y col., *Tetrahedron Lett*., 1995, 36:3651-3654; Shea y col., *Nucl. Acids Res*., 1990, 18:3777-3783), una poliamina o una cadena de polietilenglicol (Manoharan y col., *Nucleosides & Nucleotides*, 1995, 14:969-973), o ácido adamantano acético (Manoharan y col., *Tetrahedron Lett*., 1995, 36:3651-3654), una unidad palmitilo (Mishra y col., *Biochim. Biophys. Acta*, 1995, 1264:229-237), o una unidad octadecilamina o unidad hexilamino-carboniloxicolesterol (Crooke y col., J. *Pharmacol. Exp. Ther*., 1996, 277:923-937).

En determinadas formas de realización, un ligando altera la distribución, direccionamiento, o vida de un agente de ARNi en el cual se incorpora. En formas de realización preferidas se provee una afinidad aumentada a un ligando por un blanco seleccionado, por ejemplo, molécula, célula o tipo de célula, compartimiento, por ejemplo, un compartimiento celula o de órgano, tejido, órgano o región del cuerpo, como, por ejemplo, en comparación a especies que

no tienen dicho ligando. Los ligandos preferidos no intervienen en el apareamiento del dúplex en un ácido nucleico en dúplex.

Los ligandos pueden incluir una sustancia de origen natural, tal como una proteína (por ejemplo, albúmina sérica humana (HSA), lipoproteína de baja densidad (LDL), o globulina); hidrato de carbono (por ejemplo, un dextrano, pululano, quitina, quitosano, inulina, ciclodextrina, N-acetilglucosamina, N-acetilgalactosamina, o ácido hialurónico); o un lípido. El ligando también puede ser una molécula recombinante o sintética, tal como un polímero sintético, por ejemplo, un poliaminoácido sintético. Los ejemplos de poliaminoácidos incluyen un poliaminoácido que es una polilisina (PLL), ácido poli L-aspártico, ácido poli L-glutámico, copolímero de estireno-ácido maleico anhídrido, copolímero de poli(L-láctido-co-glicolado), copolímero de divinil éter-anhídrido maleico, copolímero de N-(2-hidroxipropil)metacrilamida (HMPA), polietilenglicol (PEG), alcohol polivinílico (PVA), poliuretano, poli(ácido 2-etilacrílico), polímeros de N-isopropilacrilamida, o polifosfazina. Los ejemplos de poliaminas incluyen: polietilenimina, polilisina (PLL), espermina, espermidina, poliamina, seudopéptido-poliamina, poliamina péptidomimética, poliamina dendrímero, arginina, amidina, protamina, lípido catiónico, porfirina catiónica, sal cuaternaria de una poliamina, o un péptido hélice alfa.

Los ligandos también pueden incluir grupos de direccinamiento, por ejemplo, agente de direccionamiento a célula o tejido, por ejemplo, una lectina, glicoproteína, lípido o proteína, por ejemplo, un anticuerpo, que se une a un tipo específico de célula tal como una célula de riñón. Un grupo de direccionamiento puede ser una tirotrofina, melanotropina, lectina, glicoproteína, proteína tensioactiva A, hidrato de carbono mucina, lactosa multivalente, galactosa

multivalente, N-acetil-galactosamina, N-acetil-glucosamina, manosa multivalente, fucosa multivalente, poliaminoácidos glicosilados, galactosa multivalente, transferrina, bisfosfonato, poliglutamato, poliaspartato, un lípido, colesterol, un esteroide, ácido biliar, folato, vitamina B12, vitamina A, biotina, o un péptido RGD o un mimético de péptido RGD. En determinadas formas de realización, el ligando es una galactosa multivalente, por ejemplo, una N-acetil-galactosamina.

Otros ejemplos de ligandos incluyen colorantes, agentes intercalantes (por ejemplo acridinas), entrecruzadores (por ejemplo psoraleno, mitomicina C), porfirinas (TPPC4, texafirina, Safirina), hidrocarbonos aromáticos policíclicos (por ejemplo, fenazina, dihidrofenazina), endonucleasas artificiales (por ejemplo EDTA), moléculas lipofílicas, por ejemplo, colesterol, ácido cólico, ácido adamantano acético, ácido 1-pireno butírico, dihidrotestosterona, 1,3-Bis-O(hexadecil)glicerol, grupo geraniloxihexilo, hexadecilglicerol, borneol, mentol, 1,3-propanediol, grupo heptadecilo, ácido palmítico, ácido mirístico, ácido O3-(oleoil)litocólico, ácido O3-(oleoil)colénico, dimetoxitritilo, o fenoxazina) y conjugados de péptidos (por ejemplo, péptido antenapedia, péptido Tat), agentes alquilantes, fosfato, amino, mercapto, PEG (por ejemplo, PEG-40K), MPEG, $[MPEG]_2$, poliamino, alquilo, alquilo sustituido, marcadores radiomarcados, enzimas, haptenos (por ejemplo biotina), facilitadores de transporte/absorción (por ejemplo, aspirina, vitamina E, ácido fólico), ribonucleasas sintéticas (por ejemplo, imidazol, bisimidazol, histamina, cúmulos de imidazol, conjugados de acridina-imidazol, complejos de Eu^{3+} de tetraazamacrociclos), dinitrofenilo, HRP, o AP.

Los ligandos pueden ser proteínas, por ejemplo, glicoproteínas, o péptidos, por ejemplo, moléculas que tienen una afinidad específica por un coligando, o anticuerpos por ejemplo, un anticuerpo, que se unen a un tipo específico de célula tal como una célula hepática. Los ligandos también pueden incluir hormonas y receptores de hormonas. También pueden incluir especies no peptídicas, tales como lípidos, lectinas, hidratos de carbono, vitaminas, cofactores, lactosa multivalente, galactosa multivalente, N-acetil-galactosamina, N-acetil-glucosamina, manosa multivalente, o fucosa multivalente. El ligando puede ser, por ejemplo, un lipopolisacárido, un activador de la p38 MAP quinasa, o un activador de NF-κB.

El ligando puede ser una sustancia, por ejemplo, un fármaco, que puede aumentar la incorporación del agente de ARNi en la célula, por ejemplo, mediante la alteración del citoesqueleto de la célula, por ejemplo, por alteración de los microtúbulos, microfilamentos, o filamentos intermedios de la célula. El fármaco puede ser, por ejemplo, taxol, vincristina, vinblastina, citocalasina, nocodazol, japlakinolide, latrunculina A, faloidina, swinholide A, indanocina, o mioservina.

En algunas formas de realización, un ligando unido a un ARNi tal como se describe en la presente actúa como un modulador farmacocinético (modulador PK). Los moduladores PK incluyen lipofílos, ácidos biliares, esteroides, análogos de fosfolípidos, péptidos, agentes de unión a proteínas, PEG, vitaminas, etc. Los ejemplos de moduladores PK incluyen, a título enunciativo no taxativo, colesterol, ácidos grasos, ácido cólico, ácido litocólico, dialquilglicéridos, diacilglicérido, fosfolípidos, esfingolípidos, naproxeno, ibuprofeno, vitamina E, biotina. Los oligonucleótidos que comprenden un número de uniones fosforotioato también

se sabe que se unen a proteínas séricas, por lo tanto los oligonucleótidos cortos, por ejemplo, oligonucleótidos de aproximadamente 5 bases, 10 bases, 15 bases, o 20 bases, que comprenden múltiples uniones fosforotioato en el esqueleto también son útiles como ligandos en la presente invención (por ejemplo como ligandos moduladores PK). Además, los aptámeros que se unen a componentes séricos (por ejemplo proteínas séricas) también son adecuados para usar como ligandos moduladores de PK en las formas de realización que se describen en la presente.

Los ARNi conjugados a ligando de la invención pueden sintetizarse mediante el uso de un oligonucleótido que porta una funcionalidad reactiva sobresaliente, tal como aquella derivada de la unión de una molécula conectora en el oligonucleótido (descrito más adelante). Este oligonucleótido reactivo puede hacerse reaccionar directamente con ligandos disponibles comercialmente, ligandos que se sintetizan portando cualquiera de una variedad de grupos protectores, o ligandos que tienen una unidad conectora unida a los mismos.

Los oligonucleótidos usados en los conjugados de la presente invención pueden elaborarse de manera conveniente y de rutina mediante la técnica bien conocida de síntesis en fase sólida. El equipamiento para dicha síntesis es comercializado por empresas que incluyen, por ejemplo, Applied Biosystems® (Foster City, Calif.). De manera adicional o como alternativa, puede emplearse cualquier otro método conocido en el arte para dicha síntesis. También se conoce que se usan técnicas para preparar otros oligonucleótidos, tales como los fosforotioatos y derivados alquilados.

En los ARNi conjugados a ligandos y moléculas ligando que portan nucleósidos unidos específicos de secuencia de la presente invención, los oligonucleótidos y oligonucleósidos pueden ensamblarse en un sintetizador de ADN adecuado utilizando precursores de nucleótidos o nucleósidos estándares, o precursores conjugados de nucleótidos o nucleósidos que ya portan la unidad de unión, precursores ligando-nucleótido o nucleósido-conjugado que ya portan la molécula ligando, o bloques de ensamblaje que portan ligando no nucleósido.

Cuando se usan precursores de nucleótido-conjugado que ya portan la unidad de unión, la síntesis de los nucleósidos unidos específicos de secuencia se completa típicamente, y la molécula ligando se hace reaccionar luego con la unidad de unión para formar el oligonucleótido conjugado a ligando. En algunas formas de realización, los oligonucleótidos o nucleósidos unidos de la presente invención se sintetizan mediante un sintetizador automatizado usando fosforamiditas derivadas de conjugados ligando-nucleósido además de las fosforamiditas estándares y fosforamiditas no estándares que se encuentran disponibles comercialmente y se utilizan de rutina en la síntesis de oligonucleótidos.

A. Conjugados lipídicos

En determinadas formas de realización, el ligando o conjugado es un lípido o una molécula basada en lípidos. Dicho lípido o molécula basada en lípidos preferiblemente se une a una proteína sérica, por ejemplo, albúmina sérica humana (HSA). Un ligando de unión a HSA permite la distribución del conjugado a un tejido blanco, por ejemplo, un tejido blanco no riñón del cuerpo. Por ejemplo, el tejido blanco puede ser el hígado, que incluye células del parénquima del hígado. También pueden usarse como ligandos otras moléculas

que pueden unirse a HSA. Por ejemplo, puede usarse naproxeno o aspirina. Un lípido o ligando basado en lípidos puede (a) aumentar la resistencia a la degradación del conjugado, (b) aumentar el direccionamiento o transporte a una célula o membrana de célula blanco, o (c) puede usarse para ajustar la unión a una proteína sérica, por ejemplo, HSA.

Puede usarse un ligando basado en lípidos para inhibir, por ejemplo, controlar la unión del conjugado a un tejido blanco. Por ejemplo, un lípido o ligando basado en lípidos que se une más fuertemente a HSA será menos probable que se dirija al riñón y por lo tanto menos probable que sea depurado del cuerpo. Un lípido o ligando basado en lípidos que se une menos fuertemente a HSA puede usarse para dirigir el conjugado al riñón.

En determinadas formas de realización, el ligando basado en lípidos se une a HSA. Preferiblemente, se une a HSA con una afinidad suficiente de forma que el conjugado se distribuirá preferiblemente a un tejido no riñón. Sin embargo, se prefiere que la afinidad no sea tan fuerte de forma que la unión HSA-ligando no sea revertida.

En otras formas de realización, el ligando basado en lípidos se une a HSA débilmente o casi nada, de forma que el conjugado preferiblemente se distribuirá al riñón. También pueden usarse otras unidades que dirigen a células renales en lugar del, o además del, ligando basado en lípidos.

En otro aspecto, el ligando es una unidad, por ejemplo, una vitamina, que puede ser incorporada por una célula blanco, por ejemplo, una célula en proliferación. Estas son en particular útiles para tratar trastornos caracterizados por proliferación celular no deseada, por ejemplo, del tipo maligna o no maligna, por ejemplo, células cancerígenas. Los ejemplos de vitaminas incluyen vitamina

A, E y K. Otras vitaminas ejemplificativas incluyen vitamina B, por ejemplo, ácido fólico, B12, riboflavina, biotina, piridoxal u otras vitaminas o nutrientes incorporados por las células blanco tales como las células del hígado. También se incluyen HSA y lipoproteína de baja densidad (LDL).

B. Agentes de permeación en células

En otro aspecto, el ligando es un agente de permeación en células, preferiblemente un agente de permeación en células helicoidal. Preferiblemente, el agente es anfipático. Un agente ejemplificativo es un péptido tal como tat o antennapedia. Si el agente es un péptido, puede ser modificado, incluyendo un peptidilmimético, invertómeros, uniones no peptídicas o seudopaptídicas, y el uso de D-aminoácidos. El agente helicoidal preferiblemente es un agente de alfa-hélice, el cual preferiblemente tiene una fase lipofílica y una lipofóbica.

El ligando puede ser un péptido o peptidomimético. Un peptidomimético (también referido en la presente como un oligopeptidomimético) es una molécula que es capaz de plegarse en una estructura en tres dimensiones definida similar a un péptido natural. La unión del péptido y peptidomiméticos a agentes de ARNi puede afectar la distribución farmacocinética del ARNi, tal como por aumentar el reconocimiento celular y la absorción. La unidad peptídica o peptidomimética puede tener aproximadamente entre 5 y 50 aminoácidos de longitud, por ejemplo, aproximadamente 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, o 50 aminoácidos de longitud.

Un péptido o peptidomimético puede ser, por ejemplo, un péptido de permeación en célula, péptido catiónico, péptido anfipático, o péptido hidrofóbico (por ejemplo, que consiste principalmente de Tyr, Trp, o Phe). La unidad peptídica puede ser un péptido dendrímero, péptido con restricción o péptido

entrecruzado. En otra alternativa, la unidad peptídica puede incluir una secuencia de translocación en membrana (MTS) hidrofóbica. Un péptido que contiene una MTS hidrofóbica ejemplificativa es RFGF que tiene la secuencia de aminoácidos AAVALLPAVLLALLAP (SEQ ID NO: 15). Un análogo de RFGF (por ejemplo, secuencia de aminoácidos AALLPVLLAAP (SEQ ID NO: 16) que contiene una MTS hidrofóbica también puede ser una unidad de direccionamiento. La unidad peptídica puede ser un péptido de "administración", el cual puede portar moléculas polares grandes que incluyen péptidos, oligonucleótidos, y proteínas a través de las membranas celulares. Por ejemplo, se ha encontrado que las secuencias de la proteína Tat de VIH (GRKKRRQRRRPPQ (SEQ ID NO: 17) y la proteína antennapedia de Drosophila (RQIKIWFQNRRMKWKK (SEQ ID NO: 18) tienen la capacidad de funcionar como péptidos de administración. Un péptido o peptidomimético puede estar codificado por una secuencia al azar de ADN, tal como un péptido identificado a partir de una biblioteca de presentación en fagos, o una biblioteca combinatoria de una esfera un compuesto (OBOC) (Lam y col., Nature, 354:82-84, 1991). Los ejemplos de un péptido o peptidomimético unido a un agente de ARNhd por medio de una unidad monomérica incorporada para propósitos de direccionamiento a célula es un péptido-(RGD) arginina-glicina-ácido aspártico, o RGD mimético. Una unidad peptídica puede variar en un rango de longitud de entre aproximadamente 5 aminoácidos y aproximadamente 40 aminoácidos. Las unidades peptídicas pueden tener una modificación estructural, de manera de aumentar la estabilidad o propiedades conformacionales directas. Puede utilizarse cualquiera de las modificaciones estructurales descritas más adelante.

Un péptido RGD para usar en las composiciones y métodos de la invención puede ser lineal o cíclico, y puede estar modificado, por ejemplo, glicosilado o metilado, para facilitar el direccionamiento a uno o más tejidos específicos. Los péptidos que contienen RGD y peptidomiméticos pueden incluir D-aminoácidos, así como RGD miméticos sintéticos. Además de RGD, pueden usarse otras unidades que están dirigidas al ligando integrina. Los conjugados preferidos de este ligando están dirigidos a PECAM-1 o VEGF.

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

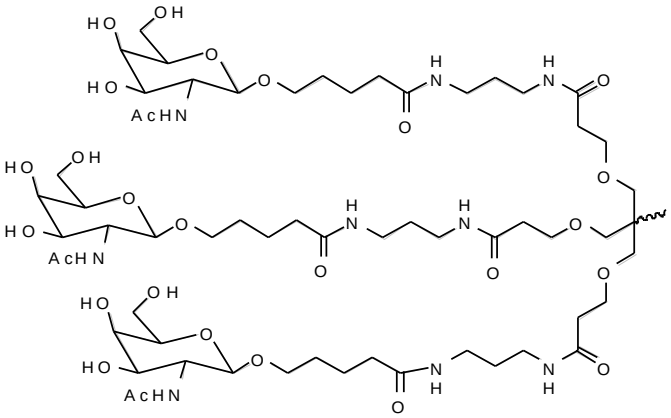
C. Conjugados de hidratos de carbono

En algunas formas de realización de las composiciones y métodos de la invención, un ARNi además comprende un hidrato de carbono. El ARNi conjugado con hidrato de carbono es ventajoso para la administración *in vivo* de ácidos nucleicos, así como composiciones adecuadas para el uso terapéutico *in vivo*, tal como se describe en la presente. Como se usa en la presente, "hidrato

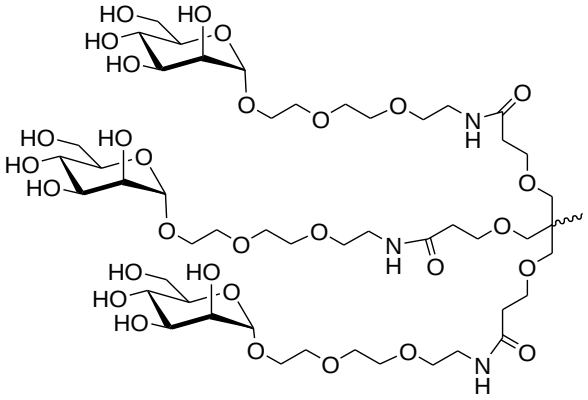
de carbono" se refiere a un compuesto que es un hidrato de carbono *per se* elaborado por una o más unidades de monosacárido que tiene por lo menos 6 átomos de carbono (el cual puede ser lineal, ramificado o cíclico) con un átomo de oxígeno, nitrógeno o azufre unido al cada átomo de carbono; o un compuesto que tiene como parte del mismo una unidad de hidrato de carbono compuesta por una o más unidades de monosacárido en donde cada una tiene por lo menos seis átomos de carbono (el cual puede ser lineal, ramificado o cíclico), con un átomo de oxígeno, nitrógeno o azufre unido a cada átomo de carbono. Los hidratos de carbono representativos incluyen los azúcares (mono, di, tri, y oligosacáridos que contienen aproximadamente 4, 5, 6, 7, 8, o 9 unidades de monosacárido), y polisacáridos tales como almidones, glucógeno, celulosa y gomas de polisacárido. Los monosacáridos específicos incluyen azúcares C5 y superiores (por ejemplo, C5, C6, C7, o C8); los di y trisacáridos incluyen azúcares que tienen dos o tres unidades de monosacárido (por ejemplo, C5, C6, C7, o C8).

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

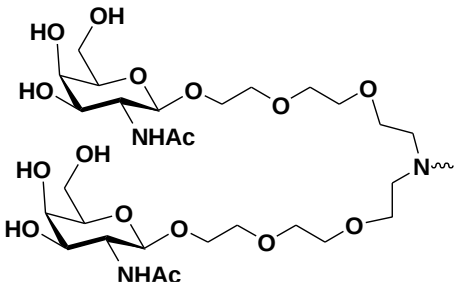
En una forma de realización, un conjugado de hidrato de carbono para usar en las composiciones y métodos de la invención se selecciona del grupo que consiste en:



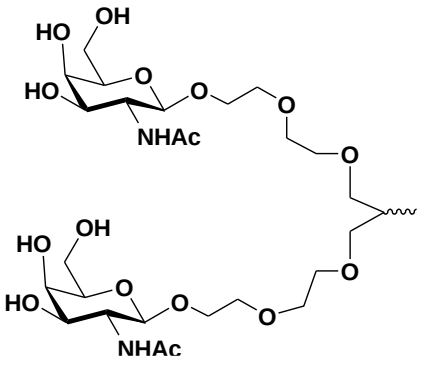
Fórmula II,



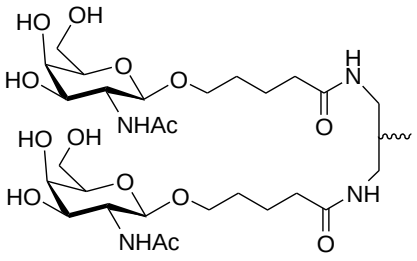
Fórmula III,



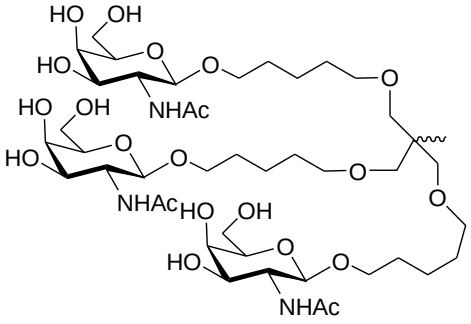
Fórmula IV,



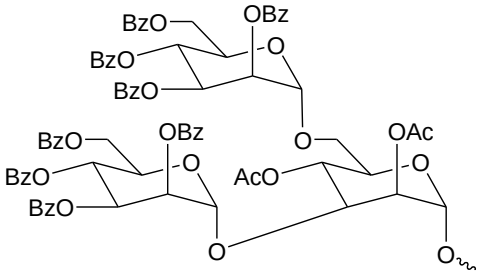
Fórmula V,



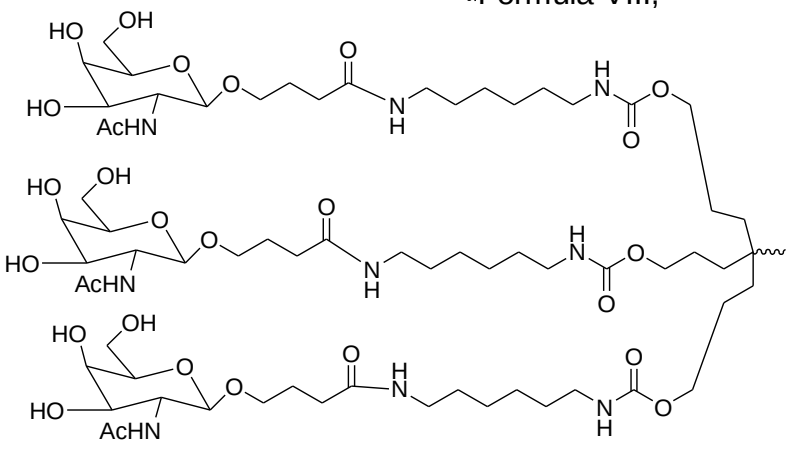
Fórmula VI,



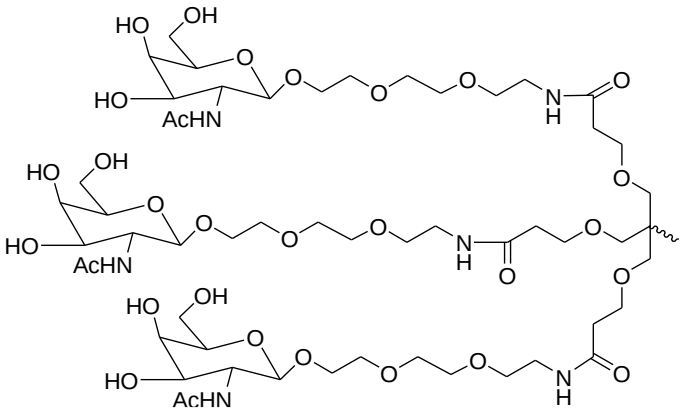
Fórmula VII,



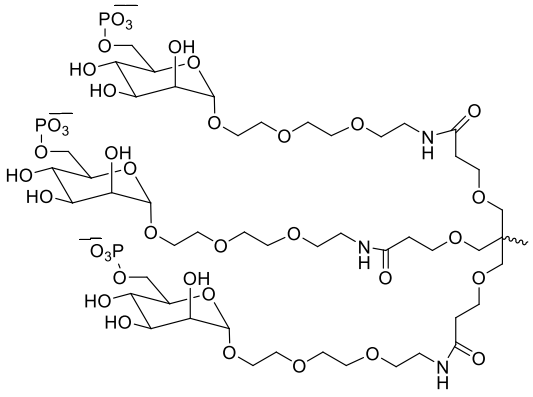
Fórmula VIII,



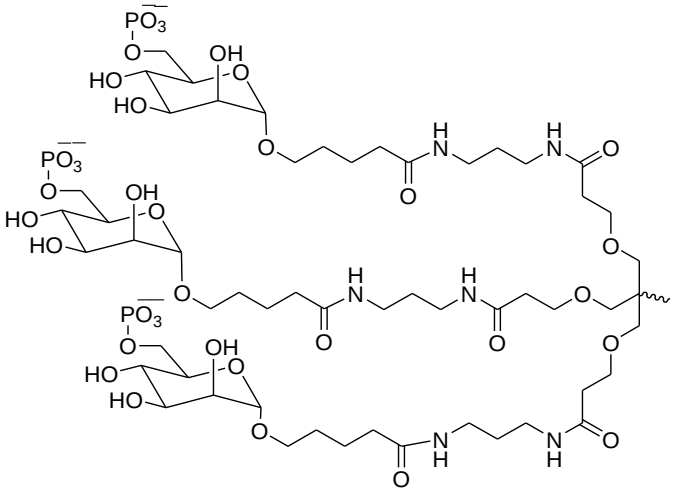
Fórmula IX,



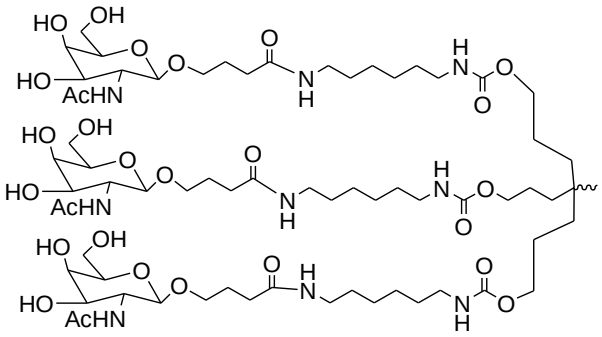
Fórmula X,



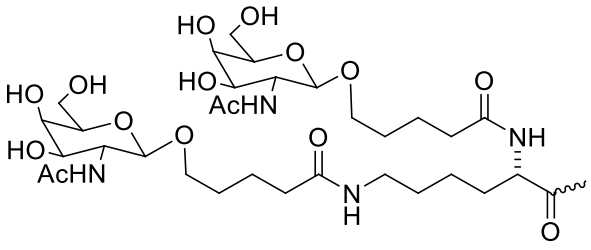
Fórmula XI,



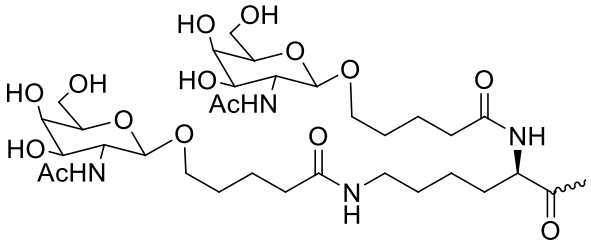
Fórmula XII,



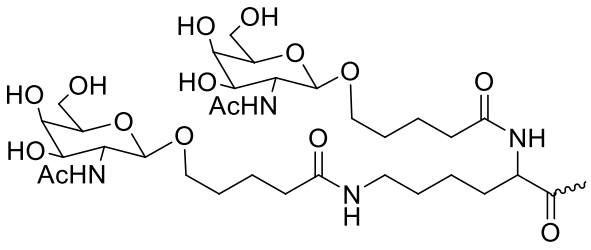
Fórmula XIII,



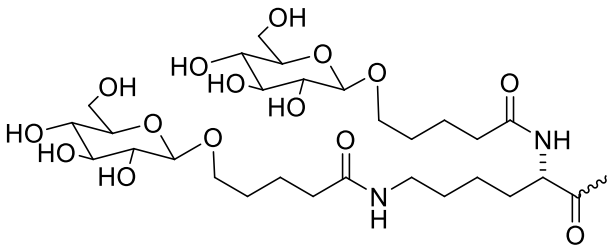
Fórmula XIV,



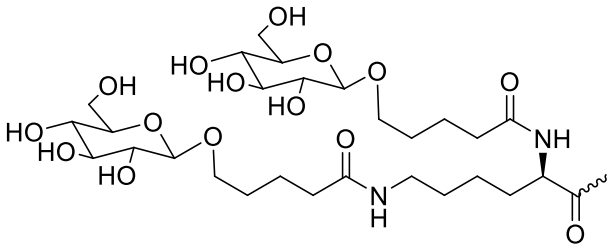
Fórmula XV,



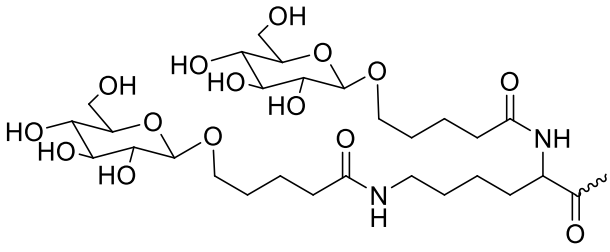
Fórmula XVI,



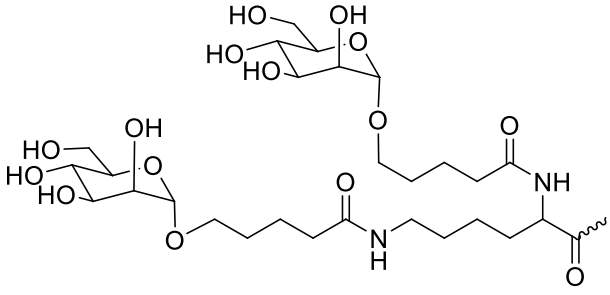
Fórmula XVII,



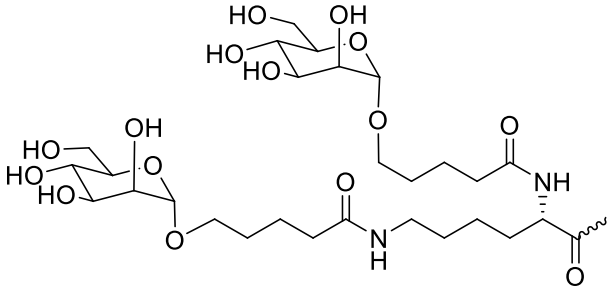
Fórmula XVIII,



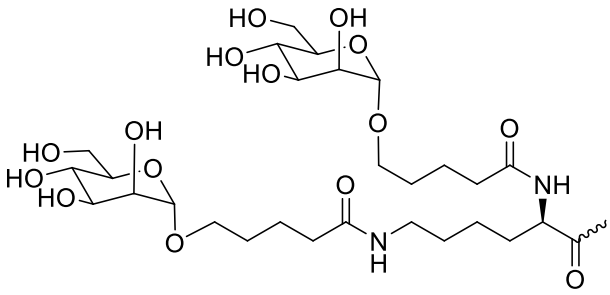
Fórmula XIX,



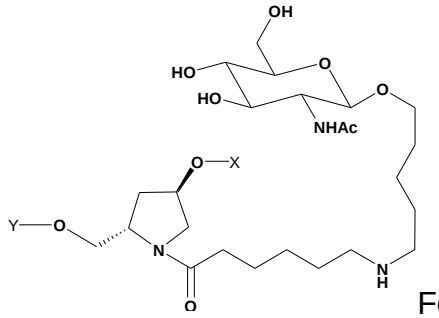
Fórmula XX,



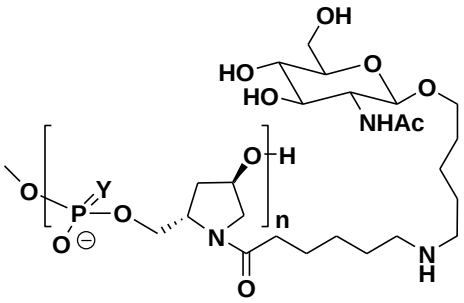
Fórmula XXI,



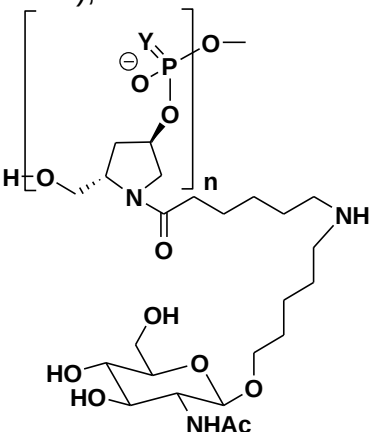
Fórmula XXII,



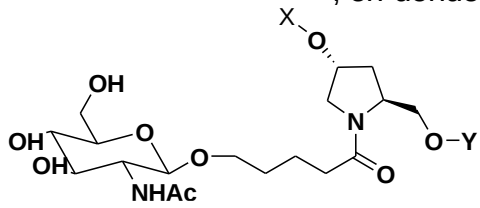
Fórmula XXIII;



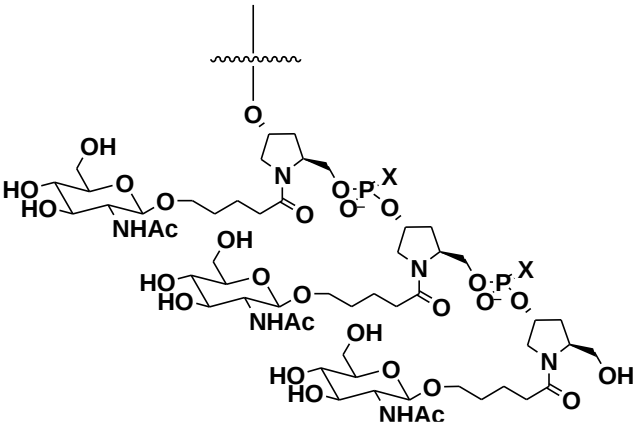
, en donde Y es O o S y n es 3 -6 (Fórmula XXIV);



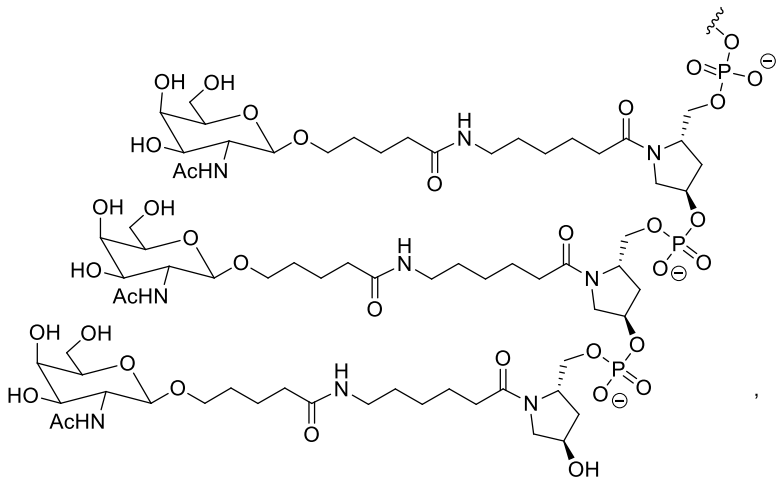
, en donde Y es O o S y n es 3-6 (Fórmula XXV);



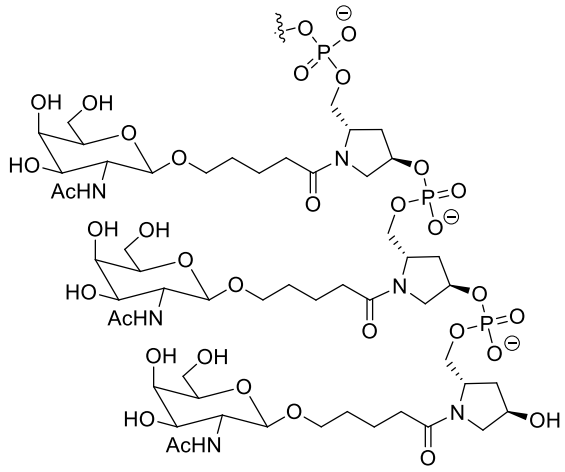
Fórmula XXVI;



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

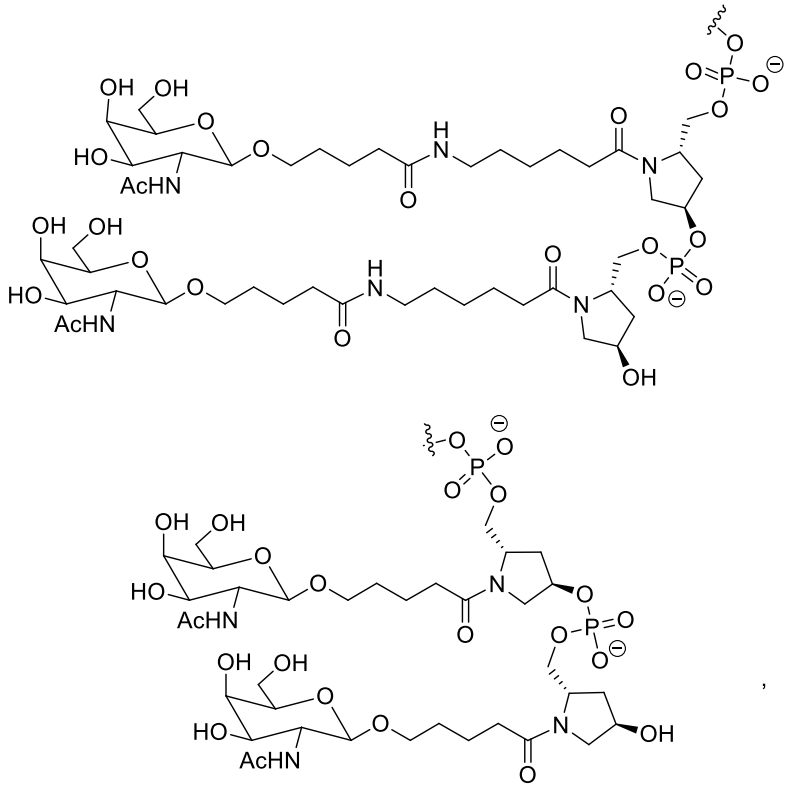


,



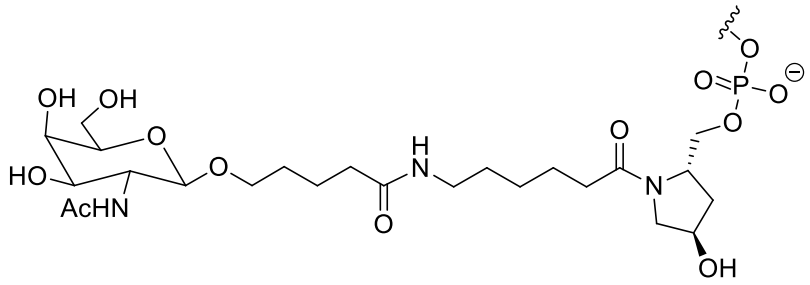
,

Fórmula XXVII; Fórmula XXIX;

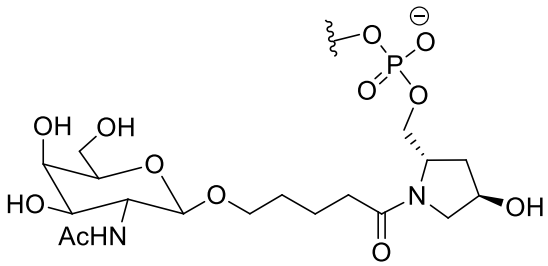


Fórmula XXX;

Fórmula XXXI;

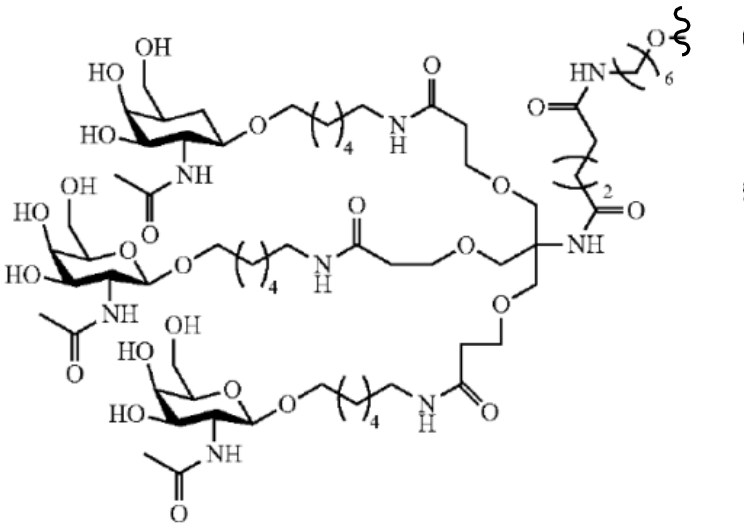


, and



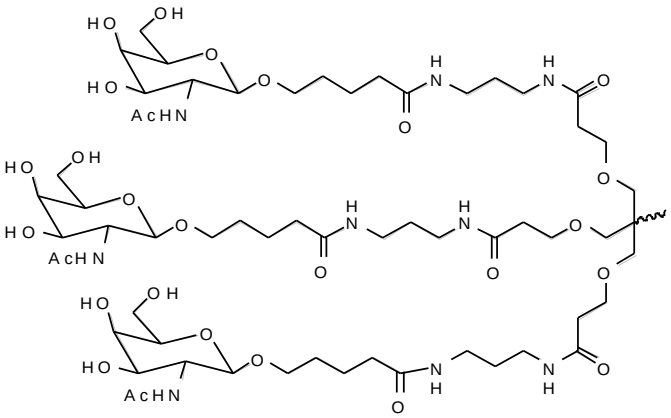
Fórmula XXXII;

Fórmula XXXIII.



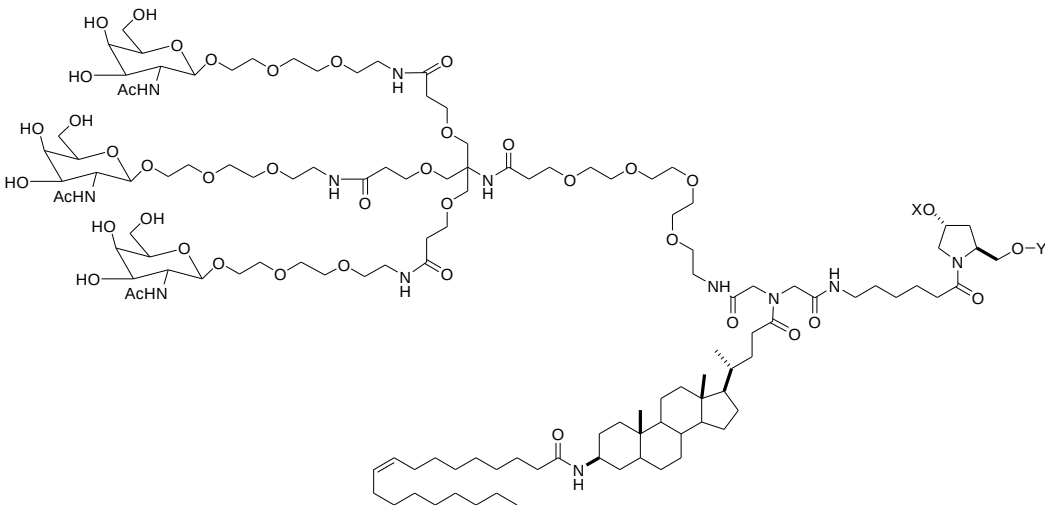
Fórmula XXXIV.

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



Fórmula II.

Otro conjugado de hidrato de carbono representativo para usar en las formas de realización descritas en la presente incluye, a título enunciativo no taxativo,



(Fórmula XXXVI),

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

En ciertas formas de realización de la invención, la GalNAc o el derivado de GalNAc están unidos a un agente de ARNi de la invención a través de un conector monovalente. En algunas formas de realización, la GalNAc o el derivado de GalNAc están unidos a un agente de ARNi de la invención a través de un conector bivalente. En otras formas de realización adicionales de la invención, la GalNAc o el derivado de GalNAc están unidos a un agente de ARNi de la invención a través de un conector trivalente.

En una forma de realización, los agentes de ARNi de hebra doble [ARNihd] de la invención comprenden GalNAc o un derivado de GalNAc unido al agente de ARNi, por ejemplo, el extremo 5 ' de la hebra sentido de un agente de ARNhd, o el extremo 5' de una o de ambas hebras sentido de un agente de ARNi de direccionamiento dual según se describe en el presente documento. En otra forma de realización, los agentes de ARNi de hebra doble de la invención comprenden una pluralidad (por ejemplo, 2, 3, 4, 5 o 6) derivados de GalNAc o GalNAc, cada uno de los cuales está unido independientemente a una pluralidad

de nucleótidos del agente de ARNi de hebra doble a través de una pluralidad de conectores monovalentes.

En algunas formas de realización, por ejemplo, cuando las dos hebras de un agente de ARNi de la invención son parte de una molécula más grande conectada por una cadena ininterrumpida de nucleótidos entre el extremo 3' de una cadena y el extremo 5' de la otra hebra respectiva que forma un bucle de horquilla que comprende una pluralidad de nucleótidos no apareados, donde cada nucleótido no apareado dentro del bucle de horquilla puede comprender independientemente GalNAc o un derivado de GalNAc unido a través de un conector monovalente.

En algunas formas de realización, el conjugado del carbohidrato comprende además uno o más ligandos adicionales según se describió anteriormente, que pueden incluir, pero de manera no taxativa, a: un modulador de PK o un péptido de permeación celular.

Los conjugados de carbohidratos y conectores adicionales apropiados para usar en la presente invención incluyen a los descritos en las publicaciones PCT Nº WO 2014/179620 y WO 2014/179627, cuyos contenidos completos se incorporan aquí por referencia.

D. Conectores

En algunas formas de realización, el conjugado o ligando descrito en el presente documento puede unirse a un oligonucleótido ARNi con diversos conectores que pueden ser escindibles o no escindibles.

El término "conector" o "grupo conector" se refiere a un resto orgánico que conecta dos partes de un compuesto, por ejemplo, que une covalentemente dos partes de un compuesto. Los conectores típicamente comprenden un enlace

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

Un grupo conector escindible es grupo conector suficientemente estable fuera de la célula, pero que al entrar en una célula blanco se escinde para liberar

las dos partes que el conector mantiene unidas. En una forma de realización preferida, el grupo conector escindible se escinde por lo menos aproximadamente 10 veces, 20 veces, 30 veces, 40 veces, 50 veces, 60 veces, 70 veces, 80 veces, 90 veces o más, o por lo menos 100 veces más rápido en una célula blanco o en una primera condición de referencia (que se puede seleccionar, por ejemplo, para imitar o representar condiciones intracelulares) que en la sangre de un sujeto, o en una segunda condición de referencia (que se puede seleccionar, por ejemplo, para imitar o representar condiciones que se encuentran en la sangre o en el suero).

Los grupos conectores escindibles son susceptibles a la acción de los agentes de escisión, por ejemplo, el pH, el potencial redox, o la presencia de moléculas degradantes. En general, los agentes de escisión son más predominantes o se encuentran en niveles más altos o tienen mayores actividades dentro de las células que en el suero o en la sangre. Algunos ejemplos de dichos agentes degradantes incluyen: agentes redox que se seleccionan para sustratos particulares o que no tienen especificidad por un sustrato, que incluyen, por ejemplo, enzimas oxidantes o reductoras o agentes reductores tales como mercaptanos, presentes en las células, que pueden degradar por reducción un grupo conector escindible por redox; esterasas; endosomas o agentes que pueden crear un ambiente ácido, por ejemplo, aquellos que dan como resultado un pH de cinco o menor; enzimas que pueden hidrolizar o degradar un grupo conector escindible por ácidos actuando como un ácido en general, peptidasas (que pueden ser específicas del sustrato) y fosfatasas.

Un grupo conector escindible, como un enlace disulfuro, puede ser

susceptible al pH. El pH del suero humano es 7,4, mientras que el pH intracelular promedio es ligeramente más bajo, y varía entre aproximadamente 7,1-7,3. Los endosomas tienen un pH más ácido, en el rango entre 5,5 y 6,0, y los lisosomas tienen un pH aún más ácido de alrededor de 5,0. Algunos conectores tendrán un grupo conector escindible que se escinde a un pH preferido, liberando así del ligando a un lípido catiónico dentro de la célula, o en el compartimiento de la célula que se desea.

Un conector puede incluir un grupo conector escindible que puede ser escindido por una enzima en particular. El tipo de grupo conector escindible que se incorpora a un conector puede depender de la célula hacia la que se va a dirigir. Por ejemplo, un ligando dirigido hacia el hígado se puede unir a un lípido catiónico a través de un conector que incluye un grupo éster. Las células hepáticas son ricas en esterasas y, por lo tanto, el conector se podrá escindir más eficazmente en las células hepáticas que en los tipos celulares que no son ricos en esterasa. Otros tipos celulares ricos en esterasas incluyen a las células pulmonares, de la corteza renal y los testículos.

Los conectores que contienen enlaces peptídicos se pueden usar cuando se dirigen hacia tipos de células ricos en peptidasas, como las células hepáticas y los sinoviocitos.

En general, la idoneidad de un grupo conector escindible candidato se puede evaluar probando la capacidad de un agente (o condición) degradante de escindir al grupo conector candidato. También sería deseable probar la capacidad del grupo conector escindible candidato de resistir la escisión en la sangre o cuando está en contacto con otro tejido que no sea blanco. Por lo tanto, se puede determinar la susceptibilidad relativa a la escisión entre una primera y

una segunda condición, donde la primera se selecciona de manera que sea indicativa de la escisión en una célula blanco y la segunda se selecciona de manera que sea indicativa de la escisión en otros tejidos o fluidos biológicos, por ejemplo sangre o suero. Las evaluaciones se pueden llevar a cabo en sistemas libres de células, en células, en cultivos celulares, en cultivos de órganos o tejidos, o en animales completos. Puede ser útil realizar evaluaciones iniciales en condiciones de cultivo o sin células y confirmarlas mediante evaluaciones adicionales en animales completos. En algunas formas de realización preferidas, los compuestos candidatos útiles se escinden por lo menos aproximadamente 2, 4, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 veces más rápido en la célula (o en condiciones *in vitro* que se seleccionan para imitar las condiciones intracelulares) en comparación con la sangre o el suero (o en condiciones *in vitro* que se seleccionan para imitar las condiciones extracelulares).

i. Los grupos conectores escindibles por redox

En ciertas formas de realización, un grupo conector escindible es un grupo conector escindible por redox que se escinde por reducción u oxidación. Un ejemplo de grupo conector escindible por reducción es un grupo conector disulfuro (-S-S-). Para determinar si un grupo conector escindible candidato es un "grupo conector escindible por reducción" apropiado o, por ejemplo, si es apropiado para usar con un resto ARNi en particular y un agente de direccionamiento en particular, se pueden consultar los métodos descritos en el presente documento. Por ejemplo, un candidato se puede evaluar mediante incubación con ditiotreitol (DTT) u otro agente reductor utilizando reactivos conocidos en el arte, que imitan la tasa de escisión que se observaría en una célula, por ejemplo, en una célula blanco. Los candidatos también se pueden

evaluar en condiciones que se seleccionan para imitar las condiciones presentes en la sangre o el suero. Según una forma de realización, en la sangre los compuestos candidatos se escinden como máximo aproximadamente un 10%. En otras formas de realización, los compuestos candidatos útiles se degradan por lo menos aproximadamente 2, 4, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, o aproximadamente 100 veces más rápido en la célula (o en condiciones *in vitro* que se seleccionan para imitar las condiciones intracelulares) en comparación con la sangre (o en condiciones *in vitro* que se seleccionan para imitar las condiciones extracelulares). La tasa de escisión de los compuestos candidatos se puede determinar utilizando ensayos estándar de cinética enzimática en condiciones seleccionadas para imitar los medios intracelulares y se puede comparar con otras condiciones seleccionadas para imitar los medios extracelulares.

ii. Los grupos conectores escindibles basados en fosfatos

En otras formas de realización, un conector escindible comprende un grupo conector escindible basado en fosfatos. Un grupo conector escindible se basa en agentes que degradan o hidrolizan el grupo fosfato. Un ejemplo de un agente que escinde los grupos de fosfato en las células son enzimas tales como las fosfatasas presentes en las células. Algunos ejemplos de grupos conectores basados en fosfatos son: -O-P(O)(ORk)-O-, -O-P(S)(ORk)-O-, -O-P(S)(SRk)-O-, -S-P(O)(ORk)-O-, -O-P(O)(ORk)-S-, -S-P(O)(ORk)-S-, -O-P(S)(ORk)-S-, -S-P(S)(ORk)-O-, -O-P(O)(Rk)-O-, -O-P(S)(Rk)-O-, -S-P(O)(Rk)-O-, -S-P(S)(Rk)-O-, -S-P(O)(Rk)-S-, -O-P(S)(Rk)-S-. Algunas formas de realización preferidas son -O-P(O)(OH)-O-, -O-P(S)(OH)-O-, -O-P(S)(SH)-O-, -S-P(O)(OH)-O-, -O-P(O)(OH)-S-, -S-P(O)(OH)-S-, -O-P(S)(OH)-S-, -S-P(S)(OH)-O-, -O-P(O)(H)-O-,

-O-P(S)(H)-O-, -S-P(O)(H)-O, -S-P(S)(H)-O-, -S-P(O)(H)-S-, y -O-P(S)(H)-S-. Una forma de realización preferida es -O-P(O)(OH)-O-. Estos candidatos se pueden evaluar utilizando métodos análogos a los descritos anteriormente.

iii. Los grupos conectores escindibles por ácidos

En otras formas de realización, un conector escindible comprende un grupo conector escindible por ácidos. Un grupo conector escindible por ácidos se puede escindir en condiciones ácidas. En algunas formas de realización preferidas, los grupos conectores escindibles por ácidos se pueden escindir en un medio ácido con un pH de aproximadamente 6,5 o menor (por ejemplo, aproximadamente 6,0, 5,5, 5,0 o menor), o pueden ser escindidos por agentes tales como enzimas que pueden actuar como un ácido en general. En una célula, las organelas específicas de pH bajo, como los endosomas y los lisosomas, pueden proveer un ambiente de escisión para los grupos conectores escindibles por ácidos. Algunos ejemplos de grupos conectores escindibles por ácidos incluyen, pero de manera no taxativa, a: hidrazonas, ésteres y ésteres de aminoácidos. Los grupos escindibles por ácidos pueden tener la fórmula general -C=NN-, C(O) O o -OC(O). Una forma de realización preferida es cuando el carbono unido al oxígeno del éster (el grupo alcoxi) es un grupo arilo, grupo alquilo sustituido o un grupo alquilo terciario tal como dimetil pentilo o t-butilo. Estos candidatos se pueden evaluar utilizando métodos análogos a los descritos anteriormente.

iv. Los grupos conectores basados en ésteres

En otras formas de realización, un conector escindible comprende un grupo conector escindible basado en ésteres. Un grupo conector basado en ésteres es escindido por enzimas como las esterasas y las amidasas presentes

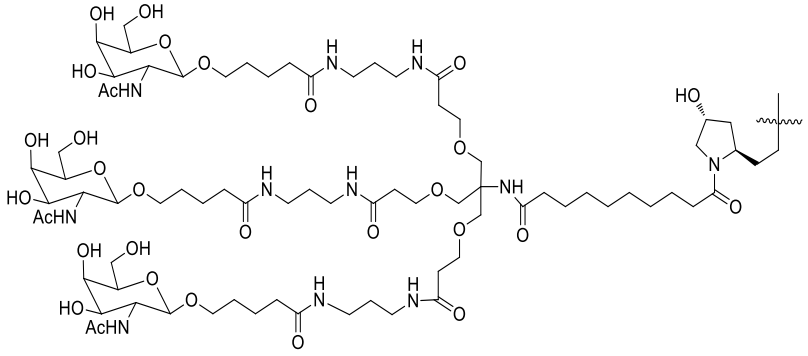
en las células. Algunos ejemplos de grupos conectores escindibles basados en ésteres incluyen, entre otros: ésteres de alquileno, alquenileno y alquinileno. Los grupos conectores escindibles basados en ésteres tienen la fórmula general -C(O) O-, o -OC(O) -. Estos candidatos se pueden evaluar utilizando métodos análogos a los descritos anteriormente.

v. Los grupos escindibles basados en péptidos

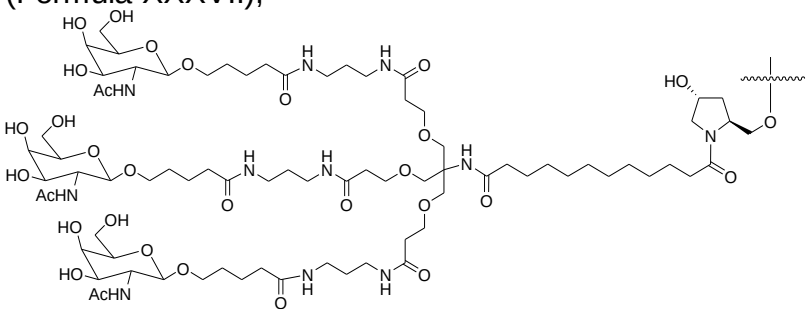
En otras formas de realización adicionales, un conector escindible comprende un grupo conector escindible basado en péptidos. Un grupo conector basado en péptidos es escindido por enzimas tales como peptidasas y proteasas presentes en las células. Los grupos conectores escindibles basados en péptidos poseen enlaces peptídicos formados entre aminoácidos para producir oligopéptidos (por ejemplo, dipéptidos, tripéptidos, etc.) y polipéptidos. Los grupos escindibles basados en péptidos no incluyen el grupo amida (-C(O)NH-). El grupo amida se puede formar entre cualquier alquileno, alquenileno o alquinileno. Un enlace peptídico es un tipo especial de enlace amida formado entre aminoácidos para producir péptidos y proteínas. El grupo conector escindible basado en péptidos se limita generalmente al enlace peptídico (es decir, al enlace amida) formado entre los aminoácidos que producen péptidos y proteínas y no incluye al grupo funcional amida completo. Los grupos conectores escindibles basados en péptidos tienen la fórmula general -NHCHRAC(O)NHCHRBC(O)-, donde RA y RB son los grupos de los dos aminoácidos adyacentes. Estos candidatos se pueden evaluar utilizando métodos análogos a los descritos anteriormente.

En algunas formas de realización, un ARNi de la invención se conjuga con un carbohidrato a través de un conector. Algunos ejemplos no limitantes de

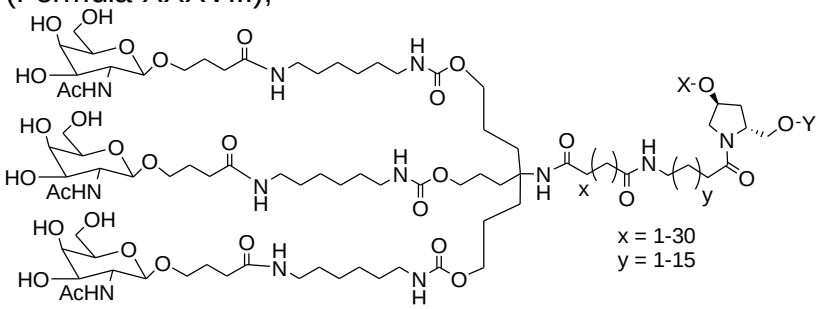
conjugados de carbohidratos con ARNi mediante conectores de las composiciones y métodos de la invención incluyen, pero de manera no taxativa, a:



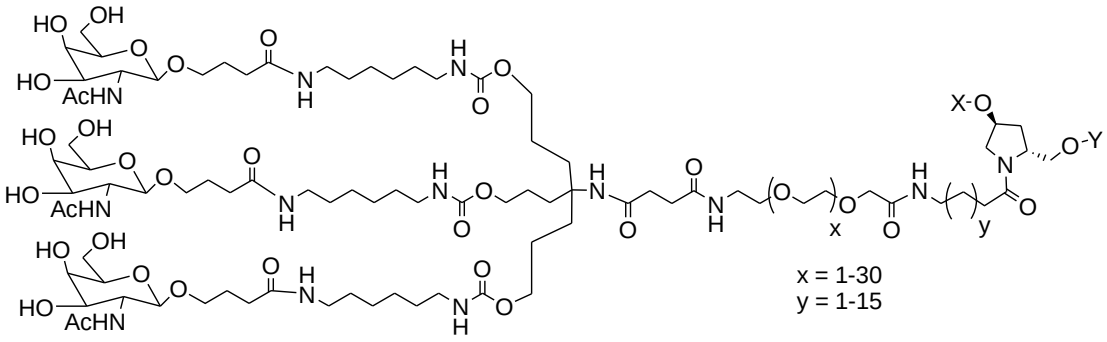
(Fórmula XXXVII),



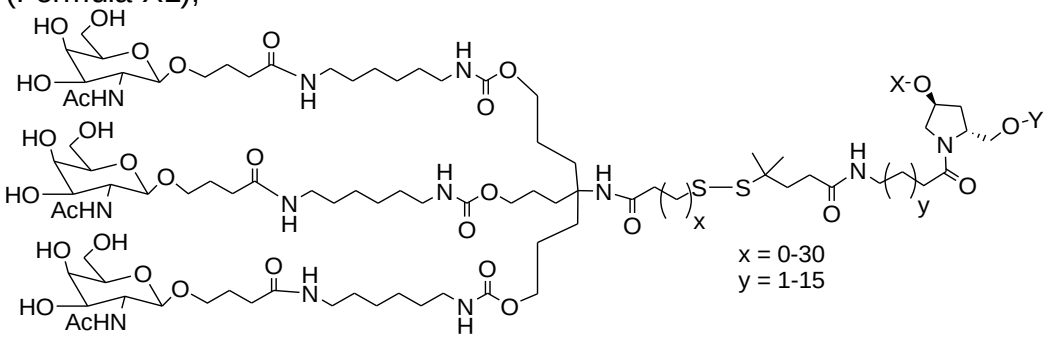
(Fórmula XXXVIII),



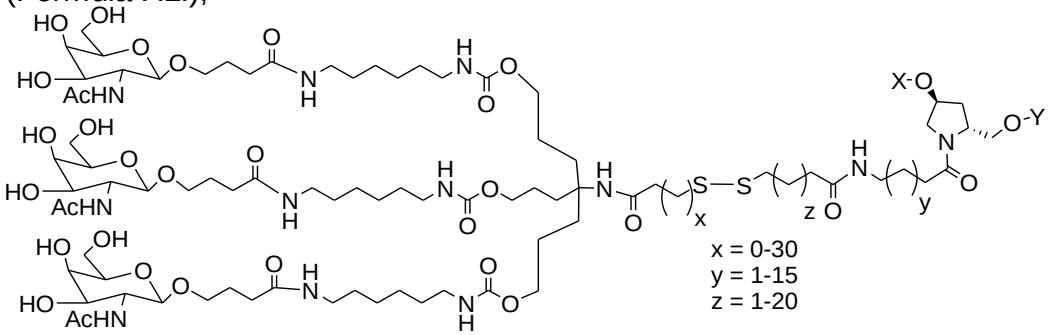
(Fórmula XXXIX),



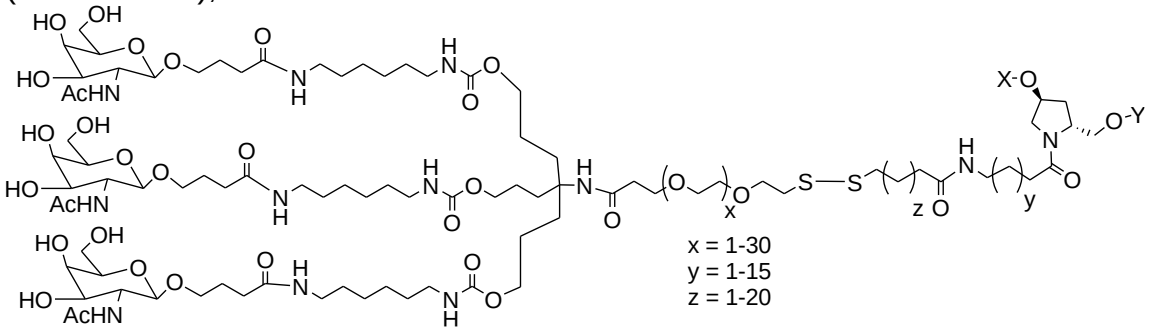
(Fórmula XL),



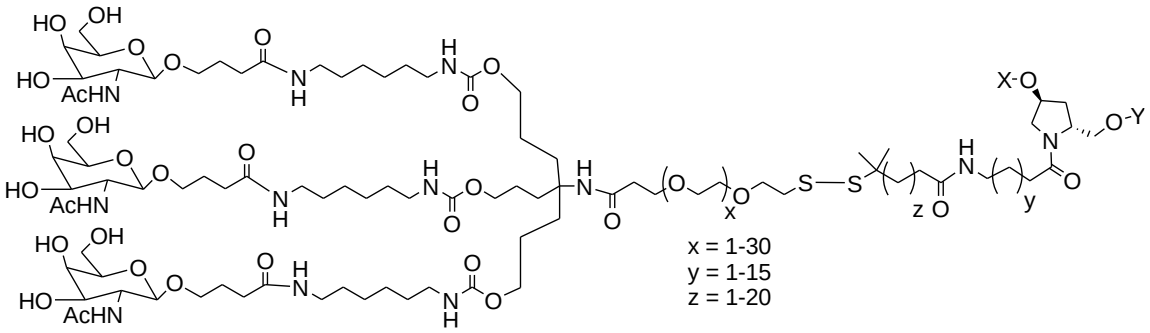
(Fórmula XLI),



(Fórmula XLII),



(Fórmula XLIII), y



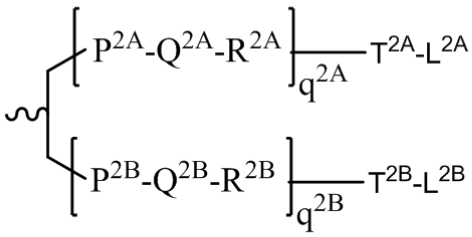
(Fórmula XLIV),

donde uno de X o Y es un oligonucleótido, el otro es un átomo de hidrógeno.

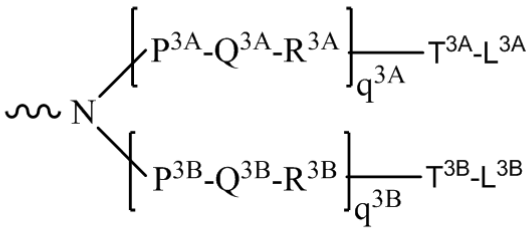
En ciertas formas de realización de las composiciones y métodos de la invención, un ligando consiste en uno o más derivados de "GalNAc" (N-acetilgalactosamina) unidos a través de un conector ramificado bivalente o trivalente.

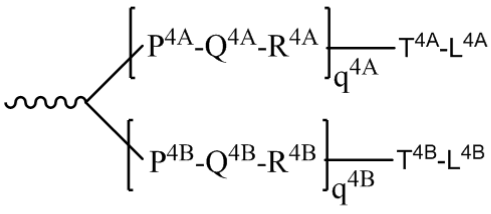
En una forma de realización, un ARNhd de la invención se conjuga con un conector ramificado bivalente o trivalente que se selecciona entre el grupo de estructuras que se muestra en cualquiera de las Fórmulas (XLV) - (XLVI):

Fórmula XXXXV

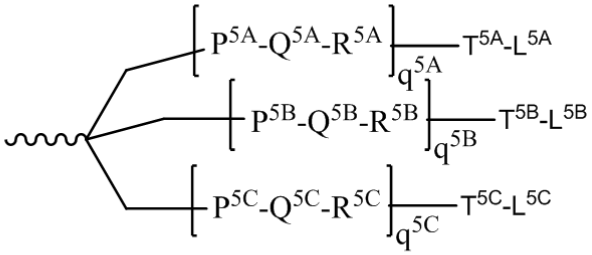


Fórmula XLVI





Fórmula XLVII



Fórmula XLVIII

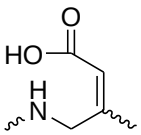
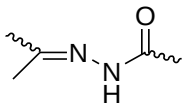
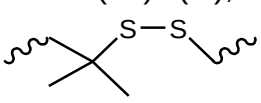
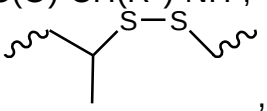
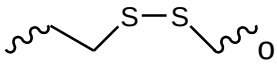
Donde:

cada vez que aparecen, q2A, q2B, q3A, q3B, q4A, q4B, q5A, q5B y q5C, representan independientemente 0-20 y donde la unidad de repetición puede ser igual o diferente;

cada vez que aparecen, cada uno de P^{2A}, P^{2B}, P^{3A}, P^{3B}, P^{4A}, P^{4B}, P^{5A}, P^{5B}, P^{5C}, T^{2A}, T^{2B}, T^{3A}, T^{3B}, T^{4A}, T^{4B}, T^{4A}, T^{5B}, T^{5C} son independientemente entre sí: un grupo ausente, CO, NH, O, S, OC(O), NHC(O), CH_2, CH_2NH o CH_2O;

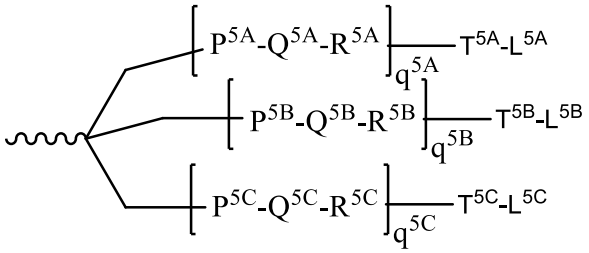
cada vez que aparecen, Q^{2A}, Q^{2B}, Q^{3A}, Q^{3B}, Q^{4A}, Q^{4B}, Q^{5A}, Q^{5B}, Q^{5C} son independientemente: un grupo ausente, alquileno, alquileno sustituido en el que uno o más metilenos pueden estar interrumpidos o pueden terminar en uno o más de: O, S, S(O), SO_2, $N(R^N)$, C(R')=C(R''), C≡C o C(O);

cada vez que aparecen, R^{2A}, R^{2B}, R^{3A}, R^{3B}, R^{4A}, R^{4B}, R^{5A}, R^{5B}, R^{5C} son independientemente: un grupo ausente, NH, O, S, CH_2, C(O)O, C(O)NH,

NHCH(R^a)C(O), -C(O)-CH(R^a)-NH-, CO, CH=N-O,  ,  ,  ,  ,  o heterociclilo;

L^{2A}, L^{2B}, L^{3A}, L^{3B}, L^{4A}, L^{4B}, L^{5A}, L^{5B} y L^{5C} representan el ligando; es decir, cada vez que aparecen cada uno de ellos es independientemente: un monosacárido (tal como GalNAc), disacárido, trisacárido, tetrasacárido, oligosacárido o polisacárido; y Ra es H o una cadena lateral de aminoácido. Los derivados trivalentes de galNAc que se obtienen por conjugación son particularmente útiles para usar con agentes de ARNi para inhibir la expresión de un gen blanco, por ejemplo aquellos con la Fórmula (XLIX):

Fórmula XLIX



Formula (VII)

donde L^{5A}, L^{5B} y L^{5C} representan un monosacárido, tal como un derivado de GalNAc.

Algunos ejemplos de conectores ramificados bivalentes y trivalentes apropiados que conjugan derivados de GalNAc incluyen, pero de manera no taxativa, a las estructuras mencionadas anteriormente como Fórmulas II, VII, XI, X y XIII.

Las patentes de los EE.UU. representativas que divulgan la preparación de conjugados de ARN incluyen, pero de manera no taxativa, a las patentes de los EE.UU. Nº 4.828.979; 4.948.882; 5.218.105; 5.525.465; 5.541.313;

5.545.730; 5.552.538; 5.578.717, 5.580.731; 5.591.584; 5.109.124; 5.118.802; 5.138.045; 5.414.077; 5.486.603; 5.512.439; 5.578.718; 5.608.046; 4.587.044; 4.605.735; 4.667.025; 4.762.779; 4.789.737; 4.824.941; 4.835.263; 4.876.335; 4.904.582; 4.958.013; 5.082.830; 5.112.963; 5.214.136; 5.082.830; 5.112.963; 5.214.136; 5.245.022; 5.254.469; 5.258.506; 5.262.536; 5.272.250; 5.292.873; 5.317.098; 5.371.241, 5.391.723; 5.416.203, 5.451.463; 5.510.475; 5.512.667; 5.514.785; 5.565.552; 5.567.810; 5.574.142; 5.585.481; 5.587.371; 5.595.726; 5.597.696; 5.599.923; 5.599.928; 5.688.941; 6.294.664; 6.320.017; 6.576.752; 6.783.931; 6.900.297; 7.037.646; y 8.106.022, cuyos contenidos completos se incorporan aquí por referencia.

No es necesario que todas las posiciones en un compuesto dado estén modificadas uniformemente, y de hecho, se pueden incorporar más de una de las modificaciones mencionadas anteriormente en un mismo compuesto o inclusive en un solo nucleósido dentro de un ARNi. La presente invención también incluye a los compuestos de ARNi que son compuestos quiméricos.

En el contexto de la presente invención, los compuestos de ARNi "quiméricos" o "quimeras" son compuestos de ARNi, preferiblemente agentes de ARNihd, que contienen dos o más regiones químicamente distintas, cada una de las cuales está compuesta por lo menos por una unidad monomérica, es decir, un nucleótido en el caso de un compuesto de ARNhd. Estos ARNi típicamente contienen por lo menos una región en la que el ARN se modifica para conferirle al ARNi una mayor resistencia a la degradación causada por las nucleasas, una mayor captación celular o una mayor afinidad de unión con el ácido nucleico blanco. Una región adicional del ARNi puede servir como sustrato para enzimas capaces de escindir híbridos ARN:ADN o ARN:ARN. A modo de ejemplo, la

ARNasa H es una endonucleasa celular que escinde la cadena de ARN de un dúplex de ARN:ADN. Por lo tanto, la activación de la ARNasa H, da como resultado la escisión del ARN blanco, lo que mejora enormemente la eficacia de la inhibición del ARNi de expresión génica. En consecuencia, cuando se usan los ARNhd quiméricos frecuentemente se pueden obtener resultados comparables con los de los ARNi más cortos, en comparación con los fosforotioato desoxi ARNhd que se hibridan con la misma región blanco. La escisión del ARN blanco se puede detectar de manera rutinaria mediante electroforesis en gel y, de ser necesario, con las técnicas de hibridación de ácidos nucleicos asociados conocidas en el arte.

En ciertos casos, el ARN de un ARNi puede ser modificado por un grupo que no es un ligando. Se han conjugado al ARNi diversas moléculas que no son ligandos para mejorar la actividad, la distribución celular o la captación celular del ARNi, y los procedimientos para realizar dichas conjugaciones se pueden consultar en la literatura científica. Dichos restos que no son ligandos han incluido restos lipídicos, tales como colesterol (Kubo, T. y colaboradores, *Biochem. Biophys. Res. Comm*., 2007, 365(1):54-61; Letsinger y colaboradores, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, 86:6553), ácido cólico (Manoharan y colaboradores, *Bioorg. Med. Chem. Lett*., 1994, 4:1053), un tioéter, por ejemplo, hexil-S-tritiltiol (Manoharan y colaboradores, *Ann. N.Y. Acad. Sci*., 1992, 660:306; Manoharan y colaboradores, *Bioorg. Med. Chem. Let*., 1993, 3:2765), un tiocolesterol (Oberhauser y colaboradores, *Nucl. Acids Res*., 1992, 20:533), una cadena alifática, por ejemplo, residuos dodecanodiol o undecilo (Saison-Behmoaras y colaboradores, *EMBO J*., 1991, 10:111; Kabanov y colaboradores, *FEBS Lett*., 1990, 259:327; Svinarchuk y colaboradores, *Biochimie*, 1993, 75:49),

un fosfolípido, por ejemplo, di-hexadecil-rac-glicerol o 1,2-di-O-hexadecil-rac-glicero-3-H-fosfonato de trietilamonio (Manoharan y colaboradores, *Tetrahedron Lett*., 1995, 36:3651; Shea y colaboradores, *Nucl. Acids Res*., 1990, 18:3777), Una poliamina o una cadena de polietilenglicol (Manoharan y colaboradores, *Nucleosides & Nucleotides*, 1995, 14:969), o ácido adamantano acético (Manoharan y colaboradores, *Tetrahedron Lett*., 1995, 36:3651), una unidad palmitilo (Mishra y colaboradores, *Biochim. Biophys. Acta*, 1995, 1264:229), o una unidad octadecilamina o hexilamino-carbonil-oxicolesterol (Crooke y colaboradores, *J. Pharmacol. Exp. Ther*., 1996, 277:923). Las Patentes de los EE.UU. representativas en las que se divulga la preparación de dichos conjugados de ARN se han mencionado anteriormente. Los protocolos de conjugación típicos incluyen la síntesis de moléculas de ARN que poseen un aminoconector en una o más posiciones de la secuencia. Luego, el grupo amino reacciona con la molécula que se conjuga utilizando un reactivos de acoplamiento o activación apropiados. La reacción de conjugación se puede realizar con el ARN aún unido al soporte sólido o después de la escisión del ARN, en fase de solución. La purificación del conjugado de ARN por HPLC típicamente provee el conjugado puro.

IV. Administración de un ARNi de la invención

La administración de un ARNi de la invención a una célula, por ejemplo, una célula dentro de un sujeto, por ejemplo un sujeto humano (por ejemplo, un sujeto que lo necesite, por ejemplo un sujeto susceptible o diagnosticado con un trastorno asociado al AGT, por ejemplo, hipertensión) se puede lograr de diversas maneras diferentes. Por ejemplo, la administración se puede realizar poniendo en contacto una célula con un ARNi de la invención ya sea *in vitro* o *in*

vivo. La administración *in vivo* también se puede realizar administrando directamente a un sujeto una composición que comprende un ARNi, por ejemplo, un ARNhd. Como alternativa, la administración *in vivo* se puede realizar administrando indirectamente uno o más vectores que codifican y dirigen la expresión del ARNi. Estas alternativas se exponen en mayor profundidad más adelante.

En general, se puede adaptar cualquier método para administrar una molécula de ácido nucleico (*in vitro* o *in vivo*) para usar con un ARNi de la invención (véase, por ejemplo, Akhtar S. y Julian RL. (1992) Trends Cell. Biol. 2 (5):139-144 y WO94 / 02595, que se incorporan aquí por referencia en toda su extensión). Para la administración *in vivo*, los factores que se deben tomar en consideración para administrar una molécula de ARNi incluyen, por ejemplo, la estabilidad biológica de la molécula que se administra, la prevención de efectos inespecíficos y la acumulación de la molécula administrada en el tejido blanco. La interferencia por ARN también ha tenido éxito con la administración local al SNC mediante inyección directa (Dorn, G., y colaboradores (2004) *Nucleic Acids* 32:e49; Tan, PH., y colaboradores (2005) *Gene Ther*. 12:59-66; Makimura, H., y colaboradores (2002) *BMC Neurosci*. 3:18; Shishkina, GT., y colaboradores (2004) *Neuroscience* 129:521-528; Thakker, ER., y colaboradores (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*. 101:17270-17275; Akaneya, Y., y colaboradores (2005) *J. Neurophysiol*. 93:594-602). La modificación del ARN o el vehículo farmacéutico también puede permitir el direccionamiento del ARNi hacia el tejido blanco y evitar los efectos no deseables cuando no se llega al blanco. Las moléculas de ARNi se pueden modificar por conjugación química con grupos lipofílicos como el colesterol para mejorar la captación celular y prevenir la degradación. Por ejemplo, la inyección

sistémica en ratones de un ARNi dirigido contra ApoB conjugado con una unidad colesterol lipofílica dio como resultado la destrucción del ARNm de apoB tanto en el hígado como en el yeyuno (Soutschek, J., y colaboradores (2004) *Nature* 432:173-178).

En una forma de realización alternativa, el ARNi se puede administrar utilizando sistemas de administración de fármacos tales como una nanopartícula, un dendrímero, un polímero, liposomas o un sistema de administración catiónico. Los sistemas de administración catiónicos cargados positivamente facilitan la unión de una molécula de ARNi (cargada negativamente) y también mejoran las interacciones en la membrana celular cargada negativamente para permitir la captación eficiente del ARNi por parte de la célula. Los lípidos, dendrímeros o polímeros catiónicos se pueden unir al ARNi o se puede inducir la formación de una vesícula o micela que contiene al ARNi (véase, por ejemplo, Kim SH, y colaboradores (2008) J*ournal of Controlled Release* 129(2):107-116). La formación de vesículas o micelas evita además la degradación del ARNi cuando se administra de forma sistémica. Los métodos para elaborar y administrar complejos de ARNi catiónico se encuentran bien dentro de las capacidades de aquellos con experiencia en el arte (véase, por ejemplo, Sorensen, DR, y colaboradores (2003) *J. Mol. Biol* 327:761-766; Verma, UN, y colaboradores (2003) *Clin. Cancer Res*. 9:1291-1300; Arnold, AS y colaboradores (2007) *J. Hypertens*. 25:197-205, que se incorporan por referencia al presente documento en toda su extensión). Algunos ejemplos no limitativos de sistemas de administración de fármacos útiles para la administración sistémica de ARNi incluyen: DOTAP (Sorensen, DR, y otros (2003), supra; Verma, UN, y otros (2003), supra), "partículas sólidas de ácido nucleico y lípido" (Zimmermann, TS,

y colaboradores (2006) *Nature* 441:111-114), cardiolipina (Chien, PY, y colaboradores (2005) *Cancer Gene Ther.* 12:321-328; Pal, A, y colaboradores (2005) *Int J. Oncol*. 26:1087-1091), polietilenimina (Bonnet ME, y colaboradores (2008) *Pharm. Res*. agosto 16, Epub previo a impresión; Aigner, A. (2006) *J. Biomed. Biotechnol*. 71659), péptidos Arg-Gly-Asp (RGD) (Liu, S. (2006) *Mol. Pharm*. 3:472-487), y poliamidoaminas (Tomalia, DA, y colaboradores (2007) *Biochem. Soc. Trans.* 35:61-67; Yoo, H., y colaboradores (1999) *Pharm. Res*. 16:1799-1804). En algunas formas de realización, un ARNi forma un complejo con ciclodextrina para administración sistémica. Los métodos para la administración y las composiciones farmacéuticas de ARNi y ciclodextrinas se pueden ver en la Patente de los EE.UU. Nº 7.427.605, que se incorpora aquí por referencia en toda su extensión.

A. ARNi de la invención codificado por vector

El direccionamiento del ARNi hacia el gen de AGT se puede expresar a partir de unidades de transcripción insertadas en vectores de ADN o ARN (véase, por ejemplo, Couture, A, y colaboradores, TIG. (1996), 12: 5-10; Skillern, A, y colaboradores, Publicación Internacional PCT Nº WO 00/22113, Conrad, Publicación Internacional PCT Nº WO 00/22114, y Conrad, Patente de los EE.UU. Nº 6.054.299). La expresión puede ser transitoria (del orden de horas a semanas) o sostenida (de semanas a meses o más), dependiendo de la construcción específica que se utilice y del tejido blanco o del tipo de célula. Estos transgenes se pueden introducir como una construcción lineal, como un plásmido circular o como un vector viral, que puede ser un vector integrador o no integrador. El transgén también se puede construir de manera que le permita ser heredado como un plásmido extracromosómico (Gassmann, y colaboradores,

Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1995) 92: 1292).

Los sistemas de vectores virales que se pueden utilizar con los métodos y composiciones que se describen aquí incluyen, pero de manera no taxativa, a:, (a) vectores de adenovirus; (b) vectores de retrovirus, que incluyen, entre otros, vectores lentivirales, virus de la leucemia murina de Moloney, etc.; (c) vectores de virus adenoasociados; (d) vectores del virus del herpes simple; (e) vectores SV 40; (f) vectores de virus polioma; (g) vectores de virus de papiloma; (h) vectores de picornavirus; (i) vectores de virus de la viruela tales como un ortopox, por ejemplo, vectores de virus vacuna o avipox, por ejemplo. viruela del canario o viruela aviar; y (j) un adenovirus dependiente de auxiliar o "*gutless*". Los virus defectuosos en su replicación también pueden ser ventajosos. Diferentes vectores se incorporarán o no al genoma de las células. Si se desea, las construcciones pueden incluir secuencias virales para la transfección. Como alternativa, la construcción se puede incorporar a vectores capaces de replicación episomal, por ejemplo los vectores EPV y EBV. Las construcciones para la expresión recombinante de un ARNi generalmente requerirán elementos reguladores, por ejemplo, promotores, potenciadores, etc., para asegurar la expresión de ARNi en las células blanco. Otros aspectos que se deben tomar en consideración para los vectores y construcciones son conocidos en el arte.

V. Composiciones farmacéuticas de la invención

La presente invención también incluye composiciones y formulaciones farmacéuticas que incluyen el ARNi de la invención. En una forma de realización, en el presente documento se proveen composiciones farmacéuticas que contienen un ARNi según se describe en el presente documento, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Las composiciones farmacéuticas que contienen

ARNi son útiles para prevenir o tratar un trastorno asociado con el AGT, por ejemplo, la hipertensión. Dichas composiciones farmacéuticas se formulan dependiendo de la modalidad de administración. Un ejemplo son las composiciones que se formulan para administración sistémica mediante administración parenteral, por ejemplo, por administración subcutánea (SC), intramuscular (IM) o intravenosa (IV). Las composiciones farmacéuticas de la invención se pueden administrar en dosis suficientes para inhibir la expresión de un gen de AGT.

Las composiciones farmacéuticas de la invención se pueden administrar en dosis suficientes para inhibir la expresión de un gen de AGT. En general, una dosis adecuada de un ARNi de la invención se encontrará dentro del rango entre aproximadamente 0,001 y aproximadamente 200,0 miligramos por kilogramo de peso corporal del receptor por día, generalmente dentro del rango entre aproximadamente 1 y 50 mg por kilogramo de peso corporal por día. Típicamente, una dosis adecuada de un ARNi de la invención se encontrará dentro del rango entre aproximadamente 0,1 mg/kg y aproximadamente 5,0 mg/kg, preferiblemente entre aproximadamente 0,3 mg/kg y aproximadamente 3,0 mg/kg. Un régimen de dosis repetidas puede incluir la administración de una cantidad terapéutica de ARNi de forma regular, por ejemplo cada mes, una vez cada 3-6 meses o una vez al año. En ciertas formas de realización, el ARNi se administra entre aproximadamente una vez al mes y aproximadamente una vez cada seis meses.

Después de un régimen de tratamiento inicial, los tratamientos se pueden administrar con menor frecuencia. La duración del tratamiento se puede determinar en base a la gravedad de la enfermedad.

En otras formas de realización, una dosis única de las composiciones farmacéuticas puede ser de larga duración, de modo de administrar las dosis en intervalos no mayores de 1, 2, 3 o 4 meses. En algunas formas de realización de la invención, se administra una dosis única de las composiciones farmacéuticas de la invención aproximadamente una vez al mes. En otras formas de realización de la invención, la dosis única de las composiciones farmacéuticas de la invención se administra trimestralmente (es decir, aproximadamente cada tres meses). En otras formas de realización de la invención, la dosis única de las composiciones farmacéuticas de la invención se administra dos veces al año (es decir, aproximadamente una vez cada seis meses).

Aquellos con experiencia en el arte apreciarán que ciertos factores pueden influir sobre la dosis y el tiempo que son necesarios para tratar efectivamente a un sujeto, e incluyen, entre otras cosas, a las mutaciones presentes en el sujeto, los tratamientos previos, la salud general o la edad del sujeto y otras enfermedades presentes. Además, el tratamiento de un sujeto con una cantidad profiláctica o terapéuticamente eficaz de una composición, según sea lo apropiado, puede incluir un único tratamiento o una serie de tratamientos

El ARNi se puede administrar de una manera que lo dirija hacia un tejido en particular (por ejemplo, hacia hepatocitos).

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención incluyen, pero de manera no taxativa, a, soluciones, emulsiones y formulaciones que contienen liposomas. Estas composiciones se pueden generar a partir de una variedad de componentes que incluyen, pero de manera no taxativa, líquidos preformados, sólidos autoemulsionantes y semisólidos autoemulsionantes. Las formulaciones incluyen aquellas que se dirigen hacia el hígado.

Las formulaciones farmacéuticas de la presente invención, que se pueden presentar convenientemente en forma de dosificación unitaria, se pueden preparar de acuerdo con técnicas convencionales bien conocidas en la industria farmacéutica. Dichas técnicas incluyen el paso de asociar los ingredientes activos con el(los) vehículo(s) o excipiente(s) farmacéutico(s). En general, las formulaciones se preparan asociando de manera uniforme e íntima los ingredientes activos con los vehículos líquidos.

A. Formulaciones adicionales

i. Emulsiones

Las composiciones de la presente invención se pueden preparar y formular como emulsiones. Las emulsiones son típicamente sistemas heterogéneos de un líquido dispersado en otro en forma de gotitas que generalmente superan los 0,1 µm de diámetro (véase, por ejemplo, Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., y Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8ª ed.), New York, NY; Idson, en Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volumen 1, p. 199; Rosoff, en Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., Volumen 1, p. 245; Block en Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volumen 2, p. 335; Higuchi y colaboradores, en Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1985, p. 301). Frecuentemente las emulsiones son sistemas bifásicos que comprenden dos fases líquidas inmiscibles íntimamente mezcladas y mutuamente dispersas. En general, las emulsiones pueden ser de la variedad "agua en aceite" (w/o, por las

siglas en inglés de *water-in-oil*) o aceite en agua (o/w por las siglas en inglés de *oil-in-water*). Cuando una fase acuosa se divide finamente y se dispersa en forma de gotitas diminutas en una masa de fase oleosa, la composición que se obtiene como resultado se denomina "emulsión de agua en aceite" (w/o). Como alternativa, cuando una fase oleosa se divide finamente y se dispersa en pequeñas gotas en una masa de fase acuosa, la composición que se obtiene como resultado se denomina una "emulsión de aceite en agua" (o/w). Las emulsiones pueden contener componentes adicionales además de las fases dispersas, y el fármaco activo puede estar presente como una solución en la fase acuosa, en la fase oleosa o en sí mismo como una fase separada. En las emulsiones también puede haber presentes excipientes farmacéuticos tales como emulsionantes, estabilizantes, colorantes y antioxidantes, según sea necesario. Las emulsiones farmacéuticas también pueden ser emulsiones múltiples que comprenden más de dos fases como, por ejemplo, en el caso de emulsiones "aceite en agua en aceite" (o/w/o) y "agua en aceite en agua" (w/o/w). Dichas formulaciones complejas frecuentemente proveen ciertas ventajas que las emulsiones binarias simples no proveen. Las emulsiones múltiples en las que hay gotitas de aceite individuales de una emulsión del tipo o/w que contienen pequeñas gotitas de agua constituyen una emulsión del tipo w/o/w. De la misma manera, un sistema de gotitas de aceite contenidas en glóbulos de agua estabilizados en una fase oleosa continua provee una emulsión de tipo o/w/o.

Las emulsiones se caracterizan por poseer poca o ninguna estabilidad termodinámica. Frecuentemente, la fase dispersa o discontinua de la emulsión está bien dispersa en la fase externa o continua y se mantiene en esta forma merced a la acción de los emulsionantes o debido a la viscosidad de la

formulación. Otros medios para estabilizar las emulsiones incluyen el uso de emulsionantes que se pueden incorporar a cualquier fase de la emulsión. Los emulsionantes se pueden clasificar ampliamente en cuatro categorías: tensioactivos sintéticos, emulsionantes naturales, bases de absorción y sólidos finamente dispersos (véase, por ejemplo, Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., y Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8ª ed.), New York, NY; Idson, en Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volumen 1, p. 199).

Los tensioactivos sintéticos, que también se conocen como agentes con actividad sobre la tensión superficial, han encontrado una amplia aplicación en la formulación de emulsiones y en la literatura se pueden consultar revisiones sobre los mismos (véase, por ejemplo, Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., y Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8ª ed.), New York, NY; Rieger, en Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volumen 1, p. 285; Idson, en Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 1988, volumen 1, p. 199). Los tensioactivos son típicamente anfifílicos y comprenden una porción hidrofílica y una porción hidrofóbica. La proporción entre la naturaleza hidrofílica y la hidrofóbica del tensioactivo se ha denominado equilibrio hidrófilo / lipófilo (HLB) y es una herramienta valiosa para clasificar y seleccionar tensioactivos en la preparación de formulaciones. Los tensioactivos se pueden clasificar en diferentes clases según la naturaleza del grupo hidrofílico: no iónico, aniónico, catiónico y anfótero (véase, por ejemplo, Ansel's

Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., y Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8ª ed.), New York, NY Rieger, en Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volumen 1, p. 285).

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

En la literatura se pueden consultar revisiones sobre la aplicación de formulaciones en emulsión a través de vías dermatológicas, orales y parenterales, y los métodos para su fabricación (véase, por ejemplo, Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., y Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8ª ed.), New York, NY; Idson, en Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volumen 1, p. 199).

ii. Microemulsiones

En una forma de realización de la presente invención, las composiciones de ARNi y ácidos nucleicos se formulan como microemulsiones. Una microemulsión se puede definir como un sistema de agua, aceite y anfifílico que es una única mezcla líquida ópticamente isotrópica y termodinámicamente estable (véase, por ejemplo, Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug

Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., y Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8ª ed.), New York, NY; Rosoff, en Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volumen 1, p. 245). Típicamente, las microemulsiones son sistemas que se preparan dispersando primero un aceite en una solución acuosa de tensioactivo y luego agregando una cantidad suficiente de un cuarto componente, generalmente un alcohol de longitud de cadena intermedia para formar un sistema transparente. Por lo tanto, las microemulsiones también se han descrito como dispersiones isotrópicas transparentes y termodinámicamente estables de dos líquidos inmiscibles estabilizadas por películas interfaciales de moléculas tensioactivas (Leung y Shah, en: Controlled Release of Drugs: Polymers and Aggregate Systems, Rosoff, M., Ed., 1989, VCH Publishers, New York, páginas 185-215).

iii. Micropartículas

El ARNi de la invención se puede incorporar a una partícula, por ejemplo, a una micropartícula. Las micropartículas se pueden producir mediante secado por aspersión, pero también se pueden producir mediante otros métodos que incluyen liofilización, evaporación, secado en lecho fluido, secado al vacío o una combinación de dichas técnicas.

iv. Potenciadores de la penetración

En una forma de realización, en la presente invención se emplean diversos potenciadores de la penetración para efectuar una administración eficiente de los ácidos nucleicos, particularmente del ARNi, a la piel de los animales. La mayoría de los medicamentos están presentes en solución tanto en forma ionizada como no ionizada. Sin embargo, generalmente solo los fármacos

solubles en lípidos o lipófilos atraviesan fácilmente las membranas celulares. Se ha descubierto que incluso los fármacos no lipófilos pueden atravesar las membranas celulares si la membrana que se va a cruzar se trata con un potenciador de la penetración. Además de contribuir a la difusión de fármacos no lipofílicos a través de las membranas celulares, los potenciadores de la penetración también mejoran la permeabilidad de los fármacos lipofílicos.

Los potenciadores de la penetración se pueden clasificar como pertenecientes a una de las cinco categorías amplias, es decir, tensioactivos, ácidos grasos, sales biliares, agentes quelantes y no tensioactivos no quelantes (véase, por ejemplo, Malmsten, M. Surfactants and polymers in drug delivery, Informa Health Care, New York, NY, 2002; Lee y colaboradores, Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1991, p,92). Cada una de las clases mencionadas anteriormente de mejoradores de la penetración y su uso en la fabricación de composiciones farmacéuticas y la administración de agentes farmacéuticos es bien conocida en el arte.

v. Excipientes

A diferencia de un compuesto vehículo, un "vehículo farmacéutico" o "excipiente" es un solvente, agente de suspensión farmacéuticamente aceptable o cualquier otro vehículo farmacológicamente inerte que se usa para administrar uno o más ácidos nucleicos a un animal. El excipiente puede ser líquido o sólido y se selecciona tomando en consideración la forma de administración que se planea emplear para proveer el volumen, la consistencia, etc., que se deseen, cuando se combina con un ácido nucleico y con los otros componentes de una determinada composición farmacéutica. Dichos agentes son bien conocidos en el arte.

vi. Otros componentes

Las composiciones de la presente invención pueden contener adicionalmente otros componentes complementarios que normalmente se encuentran en las composiciones farmacéuticas, en sus niveles de uso establecidos en el arte. De esta manera, por ejemplo, las composiciones pueden contener materiales farmacéuticamente activos adicionales, compatibles, tales como, por ejemplo, agentes antipruriginosos, astringentes, anestésicos locales o antiinflamatorios, o pueden contener materiales adicionales que son útiles para formular físicamente diversas formas de dosificación de las composiciones de la presente invención, tales como colorantes, agentes aromatizantes, conservantes, antioxidantes, opacificantes, agentes espesantes y estabilizantes. Sin embargo, cuando se agregan dichos materiales, no deben interferir indebidamente con las actividades biológicas de los componentes de las composiciones de la presente invención. Las formulaciones se pueden esterilizar y, si se desea, se pueden mezclar con agentes auxiliares, por ejemplo, lubricantes, conservantes, estabilizantes, agentes humectantes, emulsionantes, sales para influir sobre la presión osmótica, reguladores de pH, colorantes, saborizantes o sustancias aromáticas, y otros compuestos similares que no interaccionen de manera perjudicial con el(los) ácido(s) nucleico(s) de la formulación.

Las suspensiones acuosas pueden contener sustancias que aumentan la viscosidad de la suspensión, que incluyen, por ejemplo, carboximetilcelulosa sódica, sorbitol o dextrano. La suspensión también puede contener estabilizantes.

En algunas formas de realización, las composiciones farmacéuticas de la

invención incluyen (a) uno o más ARNi y (b) uno o más agentes que funcionan mediante un mecanismo diferente al del ARNi y que son útiles para tratar un trastorno asociado con el AGT, por ejemplo, la hipertensión.

La toxicidad y la eficacia profiláctica de dichos compuestos se pueden determinar mediante procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos celulares o animales experimentales, por ejemplo, para determinar la LD50 (la dosis letal para el 50% de la población) y la ED50 (la dosis profilácticamente efectiva en el 50% de la población). La proporción de dosis entre los efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico y se puede expresar como la proporción LD50 / ED50. Se prefieren los compuestos que muestran altos índices terapéuticos.

Los datos que se obtienen a partir de ensayos de cultivos celulares y estudios en animales se pueden usar para formular un rango de dosis para uso en humanos. La dosificación de las composiciones de la presente invención en la invención generalmente se encuentra dentro de un rango de concentraciones en circulación que incluyen a la ED50, preferiblemente una ED80 o ED90, con poca o ninguna toxicidad. La dosis puede variar dentro de este rango dependiendo de la forma de dosificación que se emplee y de la vía de administración que se utilice. Para cualquier compuesto de los que se utilizan en los métodos de la invención, la dosis profilácticamente efectiva se puede estimar inicialmente a partir de ensayos de cultivos celulares. Se puede formular una dosis en modelos animales para lograr un rango de concentración plasmática en circulación del compuesto o, cuando sea apropiado, del producto polipeptídico de una secuencia blanco (por ejemplo, para lograr una menor concentración del polipéptido) que incluye a la IC_{50} (es decir, a la concentración del compuesto de

prueba que logra una inhibición de los síntomas igual a la mitad de la máxima) o niveles más altos de inhibición según lo determinado en el cultivo celular. Dicha información se puede utilizar para determinar con mayor precisión las dosis útiles en los seres humanos. Los niveles en plasma se pueden medir, por ejemplo, mediante cromatografía líquida de alto rendimiento.

Además de su administración, según se expuso anteriormente, el ARNi de la invención se puede administrar en combinación con otros agentes conocidos que se utilizan para la prevención o el tratamiento de un trastorno asociado al AGT, por ejemplo, la hipertensión. En cualquier caso, el médico que lo administra puede ajustar la cantidad y el momento de la administración del ARNi dependiendo de los resultados observados utilizando medidas estándar de la eficacia conocidas en el arte o descritas en este documento.

VI. Métodos para inhibir la expresión del AGT

La presente invención también provee métodos para inhibir la expresión de un gen de AGT en una célula. Los métodos incluyen poner en contacto una célula con un agente de ARNi, por ejemplo, un agente de ARN de hebra doble, en una cantidad eficaz para inhibir la expresión del AGT en la célula, inhibiendo así la expresión del AGT en la célula.

El contacto de una célula con un ARNi, por ejemplo, un agente de ARN de hebra doble, puede hacerse *in vitro* o *in vivo*. Ponerse en contacto a una célula *in vivo* con el ARNi incluye poner en contacto a una célula o un grupo de células dentro de un sujeto, por ejemplo, un sujeto humano, con el ARNi. También son posibles combinaciones de métodos *in vitro* e *in vivo* para poner al ARNi en contacto con la célula. El método para poner en contacto al ARNi con la célula puede ser directo o indirecto, como se explicó anteriormente. Además, el

contacto con la célula se puede lograr a través de un ligando de direccionamiento, incluyendo a cualquiera de los ligandos descritos en el presente documento o conocidos en el arte. En algunas formas de realización preferidas, el ligando de direccionamiento es una unidad carbohidrato, por ejemplo, un ligando $GalNAc_3$, o cualquier otro ligando que dirija al agente de ARNi hacia un sitio de interés.

El término "inhibir", tal como se lo usa en este documento, se usa como sinónimo de "reducir", "silenciar", "regularizar", "suprimir" y otros términos similares, e incluye cualquier nivel de inhibición.

La frase "inhibir la expresión de un AGT" se utiliza con la intención de hacer referencia a la inhibición de la expresión de cualquier gen de AGT (tal como, por ejemplo, un gen de AGT de ratón, un gen de AGT de rata, un gen de AGT de mono o un gen de AGT humano) así como variantes o mutantes de un gen de AGT. Por lo tanto, el gen de AGT puede ser un gen de AGT de tipo salvaje, un gen de AGT mutante o un gen de AGT transgénico en el contexto de una célula, grupo de células u organismos manipulados genéticamente.

"Inhibir la expresión de un gen de AGT" incluye cualquier nivel de inhibición de un gen de AGT, por ejemplo, una supresión por lo menos parcial de la expresión de un gen de AGT. La expresión del gen de AGT se puede evaluar dependiendo del nivel, o el cambio en el nivel, de cualquier variable asociada con la expresión génica del AGT, por ejemplo, el nivel de ARNm del AGT o el nivel de la proteína AGT. Este nivel se puede evaluar en una célula individual o en un grupo de celdas, incluyendo, por ejemplo, en una muestra obtenida de un sujeto. Se entiende que el AGT se expresa predominantemente en el hígado, pero también en el cerebro, la vesícula biliar, el corazón y el riñón, y está

presente en la circulación.

La inhibición se puede evaluar mediante una disminución absoluta o relativa del nivel de una o más variables que están asociadas a la expresión del AGT en comparación con un nivel de control. El nivel de control puede ser cualquier tipo de nivel de control que se utilice en el arte, por ejemplo, un nivel de referencia previo a la dosis, o un nivel determinado en un sujeto, célula o muestra similar que no se haya tratado o que haya sido tratado con un control (tal como, por ejemplo, con un control que solamente contiene un regulador de pH o un control de agente inactivo).

En algunas formas de realización de los métodos de la invención, la expresión de un gen de AGT se inhibe en por lo menos 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% o 95%, o por debajo del nivel de detección del ensayo. En algunas formas de realización preferidas, la expresión de un gen de AGT se inhibe en por lo menos un 70%. Se entiende además que en algunas formas de realización preferidas puede ser deseable la inhibición de la expresión del AGT en ciertos tejidos, por ejemplo, en el hígado, sin una inhibición significativa de la expresión en otros tejidos, por ejemplo, en el cerebro; el nivel de expresión se determina utilizando el método de ensayo que se provee en el Ejemplo 2 con una concentración de ARNip 10 nM en la línea celular correspondiente de especies adecuadas.

En ciertas formas de realización, la inhibición de la expresión *in vivo* se determina mediante el noqueo del gen humano en un roedor que expresa el gen humano, por ejemplo, un ratón infectado con AAV que expresa el gen humano blanco (es decir, del AGT), por ejemplo, cuando se administra una dosis única a 3 mg/kg en el nadir de la expresión de ARN. El noqueo de la expresión de un

gen endógeno en un sistema modelo animal también se puede determinar, por ejemplo, después de la administración de una dosis única a 3 mg/kg en el nadir de la expresión del ARN. Dichos sistemas son útiles cuando las secuencias de ácidos nucleicos del gen humano y el gen del modelo animal son lo suficientemente similares para que el ARNi humano proporcione una desactivación efectiva del gen del modelo animal. La expresión de ARN en el hígado se determina utilizando los métodos de PCR que se proveen en el Ejemplo 2.

La inhibición de la expresión de un gen de AGT se puede manifestar mediante una reducción de la cantidad de ARNm expresada por una primera célula o por un grupo de células (dichas células pueden estar presentes, por ejemplo, en una muestra que se obtuvo de un sujeto) en la(s) cual(es) se ha transcrito un gen de AGT y que se ha(n) tratado (por ejemplo, poniendo en contacto a la o las células con un ARNi de la invención, o administrando un ARNi de la invención a un sujeto en el cual las células están o estaban presentes) de manera de inhibir la expresión del gen de AGT, en comparación con una segunda célula o grupo de células sustancialmente idénticas a la primera célula o al primer grupo de células, pero que no ha(n) sido tratada(s) (células de control no tratadas con ARNi o no tratados con un ARNi dirigido hacia el gen de interés). En algunas formas de realización preferidas, la inhibición se evalúa mediante el método provisto en el Ejemplo 2 utilizando una concentración de ARNip 10 nM en la línea celular de la misma especie y expresando el nivel de ARNm en células tratadas como un porcentaje del nivel de ARNm en las células de control, usando la siguiente fórmula:

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

En otras formas de realización, la inhibición de la expresión de un gen de AGT se puede evaluar en términos de una reducción de un parámetro que está ligado funcionalmente a la expresión génica del AGT, por ejemplo, el nivel de la proteína AGT en sangre o suero de un sujeto. El silenciamiento génico de AGT se puede determinar en cualquier célula que exprese el AGT, ya sea de manera endógena o heteróloga desde una construcción de expresión, y mediante cualquier ensayo conocido en el arte.

La inhibición de la expresión de una proteína AGT se puede manifestar por una reducción en el nivel de la proteína AGT que expresa una célula o un grupo de células o en una muestra del sujeto (por ejemplo, el nivel de proteína en una muestra de sangre que se tomó de un sujeto). Como se explicó anteriormente, para la evaluación de la supresión del ARNm, la inhibición de los niveles de expresión de las proteínas en una célula o un grupo de células tratadas se puede expresar de manera similar como un porcentaje del nivel de proteína en una célula o un grupo de células de control, o como el cambio en el nivel de proteína en una muestra del sujeto, por ejemplo, de sangre o suero que se tomó del mismo.

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

sujeto con un agente de RNAi o de realizar un control de población que se hizo coincidir apropiadamente en todos los demás parámetros.

El nivel de ARNm de AGT que expresa una célula o un grupo de células se puede determinar utilizando cualquier método conocido en el arte para evaluar la expresión del ARNm. En una forma de realización, el nivel de expresión del AGT en una muestra se determina detectando un polinucleótido transcrito, o una porción del mismo, por ejemplo, ARNm del gen de AGT. El ARN se puede extraer de las células usando técnicas de extracción de ARN que incluyen, por ejemplo, el uso de extracción con fenol ácido / isotiocianato de guanidina (RNAzol B; Biogenesis), kits de preparación de ARN RNeasy™ (Qiagen®) o PAXgene™ (PreAnalytix™, Suiza). Los formatos de ensayo típicos que utilizan hibridación de ácido ribonucleico incluyen ensayos de "run on" nuclear, RT-PCR, ensayos de protección de ARNasa, transferencia Northern, hibridación *in situ* y análisis de micromatrices.

En algunas formas de realización, el nivel de expresión del AGT se determina utilizando una sonda de ácido nucleico. El término "sonda", tal como se usa en este documento, se refiere a cualquier molécula capaz de unirse selectivamente a un AGT específico. Aquellos con experiencia en el arte pueden sintetizar las sondas u obtenerlas de preparados biológicos apropiados. Las sondas pueden ser diseñadas específicamente para ser marcadas. Algunos ejemplos de moléculas que se pueden utilizar como sondas incluyen, pero de manera no taxativa, a, ARN, ADN, proteínas, anticuerpos y moléculas orgánicas.

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

sondas. Un método para la determinación de los niveles de ARNm incluye poner en contacto al ARNm aislado con una molécula de ácido nucleico (sonda) que puede hibridarse con el ARNm de AGT. En una forma de realización, el ARNm se inmoviliza sobre una superficie sólida y se pone en contacto con una sonda, por ejemplo haciendo correr el ARNm aislado sobre un gel de agarosa y transfiriendo al ARNm del gel a una membrana, por ejemplo de nitrocelulosa. En una forma de realización alternativa, la(s) sonda(s) se inmoviliza(n) sobre una superficie sólida y el ARNm se pone en contacto con la(s) sonda(s), por ejemplo, en un chip de matriz de genes Affymetrix®. Aquellos con experiencia en el arte pueden adaptar fácilmente los métodos de detección de ARNm conocidos para usar en la determinación del nivel de ARNm de AGT.

Un método alternativo para determinar el nivel de expresión del AGT en una muestra incluye el proceso de amplificación de ácidos nucleicos o transcriptasa inversa (para preparar ADNc), por ejemplo, del ARNm presente en la muestra, por ejemplo, mediante RT-PCR (la realización experimental expuesta en Mullis, 1987, Patente de los EE.UU. Nº 4.683.202), reacción en cadena de la ligasa (Barany (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 189-193), replicación de secuencia autosostenida (Guatelli y colaboradores (1990) Proc.. Natl. Acad. Sci. USA 87: 1874-1878), sistema de amplificación transcripcional (Kwoh y colaboradores (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:1173-1177), replicasa Q-Beta (Lizardi y colaboradores (1988) Bio / Technology 6: 1197), replicación en círculo rodante (Lizardi y colaboradores, Patente de los EE.UU. N ° 5.854.033) o cualquier otro método de amplificación de ácidos nucleicos, seguido de la detección de las moléculas amplificadas utilizando técnicas bien conocidas por aquellos con experiencia en el arte. Estos esquemas de detección son

especialmente útiles para la detección de moléculas de ácido nucleico si dichas moléculas están presentes en números muy bajos. En ciertos aspectos particulares de la invención, el nivel de expresión del AGT se determina mediante RT-PCR fluorogénica cuantitativa (es decir, usando el Sistema TaqMan™). En algunas formas de realización preferidas, el nivel de expresión se determina mediante el método que se provee en el Ejemplo 2 utilizando una concentración de ARNip 10 nM en la línea celular correspondiente de la misma especie que se usa como control.

Los niveles de expresión del ARNm de AGT se pueden controlar utilizando una transferencia en membrana (como la que se usa en el análisis de hibridación, por ejemplo en los de Northern, Southern, dot y otros similares), o micropocillos, tubos de muestra, geles, perlas o fibras (o cualquier soporte sólido que comprenda ácidos nucleicos unidos). Véanse las Patentes de los EE.UU. números 5.770.722, 5.874.219, 5.744.305, 5.677.195 y 5.445.934, que se incorporan aquí por referencia. La determinación del nivel de expresión del AGT también puede comprender el uso de sondas de ácido nucleico en solución.

En ciertas formas de realización preferidas, el nivel de expresión del ARNm se evalúa utilizando ensayos de ADN ramificado (ADNram) o PCR en tiempo real (qPCR). En los ejemplos que se presentan en este documento se describe el uso de estos métodos y se dan ejemplos del mismo. En algunas formas de realización preferidas, el nivel de expresión se determina mediante el método que se provee en el Ejemplo 2 utilizando una concentración de ARNip 10 nM en la línea celular correspondiente de la misma especie que se usa como control.

El nivel de expresión de la proteína AGT se puede determinar utilizando

cualquier método conocido en el arte para la medición de los niveles de proteína. Dichos métodos incluyen, por ejemplo, electroforesis, electroforesis capilar, cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), cromatografía en capa delgada (TLC), cromatografía de hiperdifusión, reacciones de precipitina en líquidos o en geles, espectroscopia de absorción, ensayos colorimétricos, ensayos espectrofotométricos, citometría de flujo, inmunodifusión (simple o doble), inmunoelectroforesis, transferencia Western, radioinmunoensayos (RIA), ensayos por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), ensayos de inmunofluorescencia, ensayos de electroquimioluminiscencia y otros similares.

En algunas formas de realización, la eficacia de los métodos de la invención se evalúa mediante una disminución del nivel de ARNm o de proteína AGT (por ejemplo, en una biopsia de hígado).

En algunas formas de realización de los métodos de la invención, el ARNi se administra a un sujeto de tal manera que el ARNi se entrega a un sitio específico dentro del sujeto. La inhibición de la expresión del AGT se puede evaluar mediante mediciones del nivel o de cambios en el nivel de ARNm del AGT o proteína AGT en una muestra que se obtuvo de fluido o de tejidos del sitio específico dentro del sujeto (por ejemplo, de hígado o de sangre).

Tal como se usan en el presente documento, se entiende que los términos relacionados con "detectar" o "determinar" un nivel de un analito se refieren a realizar los pasos para determinar la presencia de un material, por ejemplo, de una proteína o un ARN. Tal como se los usa en este documento, los métodos de detección o determinación incluyen la detección o determinación de un nivel de analito que está por debajo [Sic.] del nivel de detección para el método utilizado.

VII. Métodos profilácticos y de tratamiento de la invención

La presente invención también provee métodos para usar un ARNi de la invención o una composición que contiene un ARNi de la invención para inhibir la expresión del AGT, para así prevenir o tratar un trastorno asociado con el AGT, por ejemplo, la alta presión sanguínea, por ejemplo, la hipertensión.

En los métodos de la invención, la célula se puede poner en contacto con el ARNip *in vitro* o *in vivo*, es decir, la célula puede estar dentro de un sujeto.

Una célula adecuada para recibir el tratamiento de los métodos de la invención puede ser cualquier célula que exprese un gen de AGT, por ejemplo, una célula hepática, una célula cerebral, una célula de la vesícula biliar, una célula cardiaca o una célula renal, pero preferiblemente es una célula hepática. Una célula adecuada para usar en los métodos de la invención puede ser una célula de mamífero, por ejemplo, una célula de primate (tal como una célula humana, incluyendo a una célula humana en un animal quimérico no humano, o una célula de primate no humana, por ejemplo, una célula de mono o una célula de chimpancé), o una célula de un animal no primate. En ciertas formas de realización, la célula es una célula humana, por ejemplo, una célula hepática humana. En los métodos de la invención, la expresión del AGT se inhibe en la célula en por lo menos 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90 o 95 veces, o hasta un nivel por debajo del nivel de detección del ensayo.

Los métodos de la invención *in vivo* pueden incluir la administración a un sujeto de una composición que contiene un ARNi, donde el ARNi incluye una secuencia de nucleótidos que es complementaria de por lo menos una parte de un transcrito de ARN del gen de AGT del mamífero al que pertenece el agente de ARNi que se debe administrar. La composición se puede administrar por cualquier medio conocido en el arte, incluyendo, entre otros, a las vías oral,

intraperitoneal o parenteral, que incluyen a las intracraneales (por ejemplo, intraventricular, intraparenquimatosa e intratecal), intravenosa, intramuscular, subcutánea, transdérmica, o por vías aéreas), administración nasal, rectal y tópica (incluyendo a la administración bucal y sublingual). En ciertas formas de realización, las composiciones se administran por infusión o inyección intravenosa. En ciertas formas de realización, las composiciones se administran por inyección subcutánea. En ciertas formas de realización, las composiciones se administran por inyección intramuscular.

En un aspecto, la presente invención también provee métodos para inhibir la expresión de un gen de AGT en un mamífero. Los métodos incluyen administrar al mamífero una composición que comprende un ARNhd dirigido hacia un gen de AGT en una célula del mamífero y mantener al mamífero durante un tiempo suficiente para obtener la degradación del transcrito de ARNm del gen de AGT, inhibiendo así la expresión del gen de AGT en la célula. La reducción de la expresión génica se puede evaluar mediante cualquier método conocido en el arte y mediante métodos que se describen en el presente documento por ejemplo qRT-PCR, por ejemplo, en el Ejemplo 2. La reducción en la producción de proteínas se puede evaluar mediante cualquier método conocido en el arte, por ejemplo ELISA. En ciertas formas de realización, una muestra de biopsia hepática por punción sirve como material tisular para monitorear la reducción de la expresión de gen de AGT o de la proteína AGT. En otras formas de realización, una muestra de sangre sirve como muestra para monitorear la reducción en la expresión de la proteína AGT.

La presente invención provee además métodos de tratamiento para un sujeto que lo necesita, por ejemplo, un sujeto diagnosticado con hipertensión.

La presente invención provee además métodos de profilaxis para un sujeto que lo necesita. Los métodos de tratamiento de la invención incluyen administrar un ARNi de la invención a un sujeto, por ejemplo, a un sujeto que se beneficiaría de una reducción de la expresión del AGT, en una cantidad profilácticamente eficaz de un ARNi dirigido hacia un gen de AGT o una composición farmacéutica que comprende un ARNi dirigido hacia un gen de AGT.

Un ARNi de la invención se puede administrar como un "ARNi libre". Un ARNi libre se administra en ausencia de una composición farmacéutica. El ARNi desnudo puede estar en una solución reguladora de pH adecuada. La solución reguladora de pH puede comprender acetato, citrato, prolamina, carbonato o fosfato, o cualquier combinación de los mismos. En una forma de realización, la solución reguladora de pH es solución salina de pH regulado con fosfato (PBS). El pH y la osmolaridad de la solución reguladora de pH que contiene el ARNi se pueden ajustar de modo que sean apropiados para administrar a un sujeto.

Como alternativa, se puede administrar un ARNi de la invención como una composición farmacéutica, por ejemplo, como una formulación liposómica de ARNhd.

Los sujetos que se beneficiarían con una inhibición de la expresión génica de AGT son sujetos susceptibles de padecer hipertensión o con diagnóstico de hipertensión.

En una forma de realización, el método incluye administrar una composición de la presente invención de tal manera que la expresión del gen de AGT blanco disminuya, por ejemplo durante aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 1-6, 1-3 o 3-6 meses por dosis. En ciertas formas de realización, la composición

se administra una vez cada 3-6 meses.

Preferiblemente, el ARNi es útil para los métodos y composiciones que se presentan en este documento, se dirige específicamente al ARN (primario o procesado) del gen blanco AGT. Las composiciones y métodos para inhibir la expresión de estos genes usando ARNi se pueden preparar y realizar según se describe en este documento.

La administración de ARNi de acuerdo con los métodos de la invención puede dar como resultado la prevención o el tratamiento de un trastorno asociado con el AGT, por ejemplo, presión sanguínea elevada, por ejemplo, hipertensión. Más adelante se proveen criterios de diagnóstico para diversos tipos de presión sanguínea elevada.

A los sujetos se les puede administrar una cantidad terapéutica de ARNi, por ejemplo de entre aproximadamente 0,01 mg/kg y aproximadamente 200 mg/kg.

El ARNi se administra preferiblemente por vía subcutánea, es decir, mediante inyección subcutánea. Se pueden usar una o más inyecciones para administrar la dosis deseada de ARNi a un sujeto. Las inyecciones se pueden repetir durante un período de tiempo.

La administración se puede repetir regularmente. En ciertas formas de realización, después de un régimen de tratamiento inicial, los tratamientos se pueden administrar con menos frecuencia. Un régimen de dosis repetidas puede incluir la administración de una cantidad terapéutica de ARNi de forma regular, por ejemplo entre una vez al mes y una vez al año. En ciertas formas de realización, el ARNi se administra entre aproximadamente una vez al mes y aproximadamente una vez cada tres meses, o entre aproximadamente una vez

cada tres meses y aproximadamente una vez cada seis meses.

VIII. Criterios de diagnóstico, factores de riesgo y tratamientos para la hipertensión

Recientemente se revisaron las guías de práctica para la prevención y el tratamiento de la hipertensión. Reboussin y colaboradores han publicado unos informes extensos (Systematic Review for the 2017 ACC/AHA/AAPA/ABC/ACPM/AGS/APhA/ASH/ASPC/NMA/PCNA Guideline for the Prevention, Detection, Evaluation, and Management of High Blood Pressure in Adults: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines. J Am Coll Cardiol. 2017 nov 7. pii: S0735-1097(17)41517-8. doi: 10.1016/j.jacc.2017.11.004) y Whelton y colaboradores (2017 ACC/AHA/AAPA/ABC/ACPM/AGS/APhA/ASH/ASPC/NMA/PCNA Guideline for the Prevention, Detection, Evaluation, and Management of High Blood Pressure in Adults: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines. J Am Coll Cardiol. 2017 Nov 7. pii: S0735-1097(17)41519-1. doi: 10.1016/j.jacc.2017.11.006). A continuación se proveen algunos puntos destacados de los nuevos lineamientos. Sin embargo, se debe entender que dichos lineamientos ofrecen el conocimiento de aquellos con experiencia en el arte con relación a los criterios de diagnóstico y monitoreo y el tratamiento para la hipertensión en el momento de presentar esta solicitud y se incorporan aquí por referencia.

A. Criterios de diagnóstico

Aunque existe una asociación continua entre una mayor presión sanguínea y el aumento del riesgo de enfermedad cardiovascular, para la toma

de decisiones clínicas y de salud pública es útil clasificar los niveles de presión sanguínea. La presión sanguínea se puede clasificar en 4 niveles según la presión sanguínea promedio medida en un ambiente de atención médica (presiones de consultorio): normal, elevada y en estadio 1 o 2 de hipertensión, según se muestra en la tabla a continuación (de Whelton y colaboradores, 2017).

Categoría de presión sanguínea	**Presión sanguínea sistólica**		**Presión sanguínea diastólica**
Normal	< 120 mmHg	y	< 80 mmHg
Elevada	120-129 mmHg	y	< 80 mmHg
Hipertensión*			
Estadio 1	130-139 mmHg	o	80-89 mmHg
Estadio 2	≥140 mmHg	o	≥ 90 mmHg

* Las personas con presión sanguínea sistólica y presión sanguínea diastólica en 2 categorías deben ser designadas en la categoría de presión sanguínea más alta.

La presión sanguínea indica que la presión sanguínea se basa en un promedio de ≥2 lecturas cuidadosas obtenidas en ≥2 ocasiones. Las mejores prácticas para obtener lecturas cuidadosas de la presión sanguínea se detallan en Whelton y colaboradores, 2017 y son conocidas en el arte.

Esta clasificación difiere de la recomendada anteriormente en el informe JNC 7 (Chobanian y colaboradores; National High Blood Pressure Education Program Coordinating Committee. Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. Hypertension. 2003; 42:1206-52) con hipertensión en estadio 1 ahora

definida como una presión sanguínea sistólica (SBP) de 130-139 o una presión sanguínea diastólica (DBP) de 80-89 mmHg, y con hipertensión en estadio 2 que en el presente documento correspondiente a los estadios 1 y 2 del informe JNC 7. La justificación de esta clasificación se basa en datos de observaciones relacionados con la asociación entre SBP / DBP y riesgo de enfermedad cardiovascular, ensayos clínicos aleatorios de modificación del estilo de vida para obtener una presión sanguínea inferior y ensayos clínicos aleatorios de tratamiento con medicamentos antihipertensivos para prevenir la enfermedad cardiovascular.

El aumento del riesgo de enfermedad cardiovascular en adultos con hipertensión en estadio 2 está bien establecido. Un número creciente de estudios individuales y metaanálisis de datos de observaciones han informado un gradiente de riesgo de enfermedad cardiovascular que crece progresivamente, y va desde la presión sanguínea normal a la presión sanguínea elevada y la hipertensión en el estadio 1. En muchos de estos metaanálisis, los índices de riesgo para enfermedad coronaria y accidente cerebrovascular fueron entre 1,1 y 1,5 para la comparación de SBP / DBP de 120–129 / 80–84 mmHg contra < 120/80 mmHg y entre 1,5 y 2,0 para la comparación de SBP / DBP de 130–139 / 85–89 mmHg contra < 120/80 mmHg. Este gradiente de riesgo fue consistente en los subgrupos definidos por sexo y raza / etnia. El aumento relativo en el riesgo de enfermedad cardiovascular asociado con una mayor presión sanguínea se atenuó, pero sigue presente entre los adultos mayores. Para individuos con presión sanguínea elevada e hipertensión en las etapas 1 y 2 se recomiendan la modificación del estilo de vida y el tratamiento farmacológico antihipertensivo. El beneficio clínico se puede obtener mediante una reducción

del estadio de presión sanguínea elevada, incluso si la presión sanguínea no se normaliza mediante un tratamiento.

B. Factores de riesgo

La hipertensión es una enfermedad compleja que ocurre como resultado de una combinación de factores que incluyen, entre otros, la genética, el estilo de vida, la dieta y los factores de riesgo secundarios. La hipertensión también puede estar asociada con el embarazo. Se entiende que debido a la naturaleza compleja de la hipertensión, pueden ser necesarias múltiples intervenciones para el tratamiento de la misma. Más aún, las intervenciones no farmacológicas, incluyendo la modificación de la dieta y el estilo de vida, pueden ser útiles para la prevención y el tratamiento de la hipertensión. Además, una intervención puede proveer un beneficio clínico sin normalizar completamente la presión sanguínea en un individuo.

1. Factores de riesgo genéticos

Se han identificado diversas formas monogénicas de hipertensión, como el aldosteronismo remediable con glucocorticoides, el síndrome de Liddle, el síndrome de Gordon y otros en los cuales las mutaciones en un único gen explican completamente la fisiopatología de la hipertensión, estos trastornos son poco frecuentes. La tabulación actual de las variantes genéticas conocidas que contribuyen a la presión sanguínea y la hipertensión incluye más de 25 mutaciones raras y 120 polimorfismos de un solo nucleótido. Sin embargo, aunque en algunos individuos los factores genéticos pueden contribuir a la hipertensión, se estima que la variación genética solo es la causa de aproximadamente un 3,5% de la variabilidad de la presión sanguínea.

2. Dieta y consumo de alcohol

Los factores de riesgo ambientales y de estilo de vida que conducen a la hipertensión incluyen una dieta deficiente, una actividad física insuficiente y un consumo excesivo de alcohol. Estos factores pueden hacer que una persona tenga sobrepeso o sea obesa, lo que aumenta aún más la probabilidad de desarrollar o exacerbar la hipertensión. La presión sanguínea elevada está correlacionada aún más fuertemente con el aumento de la proporción cintura-cadera u otras medidas de distribución central de la grasa. La obesidad a una edad temprana y la obesidad en curso están fuertemente correlacionadas con la hipertensión en una etapa posterior de la vida. La obtención de un peso normal puede reducir el riesgo de desarrollar una presión sanguínea elevada hasta el de una persona que nunca ha sido obesa.

La ingesta de sodio, potasio, magnesio y calcio también puede tener un efecto significativo sobre la presión sanguínea. La ingesta de sodio se correlaciona positivamente con la presión sanguínea y representa mucho del aumento de la presión sanguínea relacionado con la edad. Ciertos grupos son más sensibles al aumento del consumo de sodio que otros, incluyendo a los negros y los adultos mayores (> 65 años), y aquellos con un nivel más alto de presión sanguínea o comorbilidades como la enfermedad renal crónica, la diabetes mellitus o el síndrome metabólico. En conjunto, estos grupos constituyen más de la mitad de todos los adultos de EE.UU. La sensibilidad a la sal puede ser un marcador del aumento de la enfermedad cardiovascular y la mortalidad por todas las causas, independientemente de la presión sanguínea. Actualmente, las técnicas para el reconocimiento de la sensibilidad a la sal no son prácticas en un ambiente clínico. Por lo tanto, la sensibilidad a la sal se considera mejor como característica grupal.

La ingesta de potasio está inversamente relacionada con la presión sanguínea y el derrame cerebral, y un nivel más alto de potasio parece atenuar el efecto del sodio sobre la presión sanguínea. Una proporción de sodio-potasio más baja se asocia con una presión sanguínea más baja que la observada para los niveles correspondientes de sodio o potasio por sí mismos. Una observación similar se ha hecho para el riesgo de enfermedad cardiovascular.

El consumo de alcohol se ha asociado durante mucho tiempo con la alta presión sanguínea. En los EE.UU., se ha estimado que el consumo de alcohol representa aproximadamente el 10% de la carga de hipertensión de la población, y que la carga es mayor en hombres que en mujeres.

Se entiende que los cambios en la dieta o el consumo de alcohol pueden ser un aspecto de la prevención o el tratamiento de la hipertensión.

3. Actividad física

Existe una correlación inversa bien establecida entre la actividad física / aptitud física y los niveles de presión sanguínea. Se ha demostrado que incluso niveles modestos de actividad física son beneficiosos para disminuir la hipertensión.

Se entiende que un aumento de la actividad física puede ser un aspecto de la prevención o el tratamiento de la hipertensión.

4. Factores de riesgo secundarios

La hipertensión secundaria puede subyacer a una elevación severa de la presión sanguínea, hipertensión farmacológicamente resistente, aparición repentina de hipertensión, aumento de la presión sanguínea en pacientes con hipertensión controlada previamente mediante tratamiento farmacológico, aparición de hipertensión diastólica en adultos mayores y daño a los órganos

blanco que no guarda proporción con la duración o la gravedad de la hipertensión. Aunque la hipertensión secundaria se debe sospechar en los pacientes más jóvenes (< 30 años) con presión sanguínea elevada, no es infrecuente que la hipertensión primaria se manifieste a una edad más temprana, especialmente en los negros, y algunas formas de hipertensión secundaria, como la enfermedad renovascular, son más frecuentes en la edad avanzada (> 65 años). Muchas de las causas de la hipertensión secundaria están fuertemente asociadas con hallazgos o grupos de hallazgos clínicos que sugieren un trastorno específico. En dichos casos, el tratamiento de la condición subyacente puede resolver los hallazgos de la presión sanguínea elevada sin la administración de los agentes que se usan típicamente para el tratamiento de la hipertensión.

5. Embarazo

El embarazo es un factor de riesgo de la alta presión sanguínea, y la alta presión sanguínea durante el embarazo es un factor de riesgo de enfermedades cardiovasculares y de hipertensión en el futuro. En 2013 el ACOG (por las siglas en inglés de American College of Obstetrics and Gynecology, es decir Colegio Norteamericano de Obstetricia y Ginecología) publicó un informe sobre la hipertensión asociada al embarazo (American College of Obstetricians and Gynecologists, Task Force on Hypertension in Pregnancy. Hypertension in pregnancy. Report of the American College of Obstetricians and Gynecologists' Task Force on Hypertension in Pregnancy. Obstet Gynecol. 2013; 122:1122-31). A continuación se proveen algunos puntos destacados del Informe. Sin embargo, se debe entender que el Informe provee el conocimiento de aquellos con experiencia en el arte con relación a los criterios de diagnóstico y monitoreo y el

tratamiento para la hipertensión en el embarazo al momento de presentar esta solicitud y el mismo se incorpora aquí por referencia.

A continuación, en la tabla se proveen los criterios de diagnóstico para la preeclampsia (de la Tabla 1 del informe del ACOG, 2013).

Presión sanguínea	- ≥ 140 mmHg diastólica o ≥ 90 mmHg diastólica en dos ocasiones con por lo menos 4 horas de diferencia después de las 20 semanas de gestación en una mujer con una presión sanguínea previamente normal - ≥ 160 mmHg sistólica o ≥ 110 mmHg diastólica, la hipertensión se puede confirmar en un corto intervalo (minutos) para facilitar la realización a tiempo del tratamiento antihipertensivo
y	
Proteinuria	- ≥ 300 mg por recolección de orina de 24 horas (o esta cantidad extrapolada para una recolección cronometrada) o - Proporción proteína / creatinina ≥ 0,3 (cada una medida como mg/dl)
O en ausencia de proteinuria, un nuevo inicio de hipertensión con el nuevo inicio de uno de los siguientes:	
Trombocitopenia	- Recuento de plaquetas ≤ 100.000 / microlitros
Insuficiencia renal	- Concentración de creatinina sérica ≥ 1,1 mg/dl o una duplicación de la concentración de la creatinina sérica en ausencia de otra enfermedad renal

Deterioro de la función hepática	- Concentraciones sanguíneas elevadas si las transaminasas hepáticas alcanzan una concentración del doble de la normal
Edema pulmonar	
Síntomas cerebrales o visuales	

La gestión de la presión sanguínea durante el embarazo se complica por el hecho de que muchos agentes antihipertensivos de uso común, incluyendo a los inhibidores de la ECA y los ARB, están contraindicados durante el embarazo debido al potencial daño para el feto. La meta del tratamiento antihipertensivo durante el embarazo incluye la prevención de la hipertensión grave y la posibilidad de prolongar la gestación para que el feto tenga más tiempo para madurar antes del parto. En una revisión del tratamiento para la hipertensión grave asociada con el embarazo no se encontraron pruebas suficientes para recomendar agentes específicos; más bien, se recomendó la experiencia clínica en este contexto (Duley L, Meher S, Jones L. Drugs for treatment of very high blood pressure during pregnancy. Cochrane Database Syst Rev. 2013;7:CD001449).

C. Tratamientos

El tratamiento de la alta presión sanguínea es complejo, ya que se presenta frecuentemente con otras comorbilidades, que frecuentemente incluyen una reducción de la función renal, por las que el sujeto también puede estar en tratamiento. Los médicos que tratan adultos con alta presión sanguínea deben centrarse en la salud general del paciente, con un énfasis particular en la

reducción del riesgo de futuros resultados adversos de enfermedades cardiovasculares. Todos los factores de riesgo de los pacientes se deben manejar de manera integrada con un conjunto integral de estrategias farmacológicas y no farmacológicas. A medida que aumenta la presión sanguínea y el riesgo de futuros eventos de enfermedades cardiovasculares, se debe intensificar la gestión de la presión sanguínea.

Mientras que el tratamiento de la presión sanguínea elevada con medicamentos que reducen la presión sanguínea solo sobre la base del nivel de presión sanguínea se considera rentable, el uso de una combinación de riesgo absoluto de enfermedad cardiovascular y el nivel de presión sanguínea para guiar dicho tratamiento es más eficiente y rentable para reducir el riesgo de enfermedad cardiovascular que el solo uso de la presión sanguínea. Muchos pacientes que comenzaron con un solo agente posteriormente requerirán ≥2 medicamentos de diferentes clases farmacológicas para alcanzar sus objetivos de presión sanguínea. El conocimiento de los mecanismos farmacológicos de acción de cada agente es importante. Los regímenes farmacológicos con actividad complementaria, en los que se utiliza un segundo agente antihipertensivo para bloquear las respuestas compensatorias al agente inicial o afectar a un mecanismo de presión diferente, pueden provocar una disminución aditiva de la presión sanguínea. Por ejemplo, los diuréticos tiazídicos pueden estimular el sistema renina-angiotensina-aldosterona. Al agregar un inhibidor de la ECA o ARB a la tiazida, se puede obtener un efecto aditivo en la reducción de la presión sanguínea. El uso de la terapia de combinación también puede mejorar la adherencia al tratamiento. Hay disponibles diversas combinaciones de terapias con 2 y 3 medicamentos antihipertensivos a dosis fijas, con mecanismos

de acción complementarios entre los componentes.

A continuación se ofrece la tabla 18 de Whelton y colaboradores, una lista de medicamentos antihipertensivos orales de 2017. Se proveen clases de agentes terapéuticos para el tratamiento de la alta presión sanguínea y los medicamentos que se encuentran dentro de dichas clases. También se proveen rangos de dosis, frecuencias y comentarios.

Clase	Fármaco	Dosis habitual, rango (mg/d)*	Frecuencia diaria	Comentarios
Agentes primarios				
Diuréticos tipo tiazida o tiazida	Clortalidona	12,5-25	1	• Se prefiere la clortalidona sobre la base de una vida media prolongada y una reducción probada de la ECV. • Monitoreo de hiponatremia e hipopotasemia, ácido úrico y niveles de calcio. • Usar con precaución en pacientes con antecedentes de gota aguda, a menos que el paciente esté en terapia para reducir el ácido úrico.
	Hidroclorotiazida	25-50	1	
	Indapamida	1,25-2,5	1	
	Metolazona	2,5-10	1	
Inhibidores de la ECA	Benazepril	10-40	1 or 2	• No usar en combinación con ARB ni inhibidores directos de la renina
	Captopril	12,5-150	2 o 3	

	Enalapril	5-40	1 or 2	• Existe un mayor riesgo de hiperpotasemia, especialmente en pacientes con enfermedad renal crónica o en aquellos que toman suplementos de K^+ o medicamentos que ahorran K^+. • En los pacientes con estenosis bilateral grave de la arteria renal existe riesgo de insuficiencia renal aguda. • No usar si el paciente tiene antecedentes de angioedema con inhibidores de la ECA. • Evitar en el embarazo.
	Fosinopril	10-40	1	
	Lisinopril	10-40	1	
	Moexipril	7,5-30	1 or 2	
	Perindopril	4-16	1	
	Quinapril	10-80	1 or 2	
	Ramipril	2,5-10	1 or 2	
	Trandolapril	1-4	1	
ARB	Azilsartán	40-80	1	• No usar en combinación con inhibidores de la ECA ni con inhibidores directos de la renina. • Existe un mayor riesgo de hiperpotasemia en la enfermedad renal crónica
	Candesartán	8-32	1	
	Eprosartán	600-800	1 o 2	
	Irbesartán	150-300	1	
	Losartán	50-100	1 o 2	

	Olmesartán	20-40	1	o en aquellos que toman suplementos de K^+ o medicamentos que ahorran K^+. • En pacientes con estenosis bilateral severa de la arteria renal existe riesgo de insuficiencia renal aguda. • No usar si el paciente tiene antecedentes de angioedema con ARB. Los pacientes con antecedentes de angioedema con un inhibidor de la ECA pueden recibir un ARB a partir de las 6 semanas posteriores a la interrupción del tratamiento. • Evitar en el embarazo.
	Telmisartán	20-80	1	
	Valsartán	80-320	1	
BCC-dihidropiridinas	Amlodipina	2,5-10	1	• Evitar el uso en pacientes con Insuficiencia cardiaca con HFrEF; de ser necesario se puede usar amlodipina o felodipina. • Están asociados con el edema del pies
	Felodipina	5-10	1	
	Isradipina	5-10	2	
	Nicardipina SR	5-20	1	
	Nifedipina LA	60-120	1	

	Nisoldipina	30-90	1	relacionado con la dosis, que es más común en mujeres que en hombres.
BCC-nondihidropiridinas	Diltiazem SR	180-360	2	• Evitar el uso rutinario con bloqueadores beta debido a un mayor riesgo de bradicardia y bloqueo cardíaco. • No usar en pacientes con HFrEF. • Existen interacciones del fármaco con el diltiazem y el verapamilo (sustrato principal e inhibidor moderado de CYP3A4)
	Diltiazem ER	120-480	1	
	Verapamilo IR	40-80	3	
	Verapamilo SR	120-480	1 o 2	
	Verapamilo de liberación retardada - liberación prolongada (diversas formas)	100-480	1 (Por la tarde)	
Agentes secundarios				
Diuréticos del asa	Bumetanida	0,5-4	2	• Hay diuréticos preferidos en pacientes con insuficiencia cardiaca sintomática. Se
	Furosemida	20-80	2	

	Torasemida	5-10	1	prefieren a las tiazidas en pacientes con enfermedad renal crónica de moderada a grave (por ejemplo, tasa de filtración glomerular < 30 ml/min).
Diuréticos ahorradores de potasio	Amilorida	5-10	1 o 2	• Estos son agentes de monoterapia y agentes antihipertensivos mínimamente eficaces.. • En pacientes con hipopotasemia en monoterapia con tiazida se puede considerar la terapia de combinación de diuréticos ahorradores de potasio con tiazida. • Se debe evitar en pacientes con enfermedad renal crónica significativa (por ejemplo, tasa de filtración glomerular < 45 ml/min).
	Triamtereno	50-100	1 o 2	
Diuréticos -	Eplerenona	50-100	12	• Estos son agentes preferidos en el

antagonistas de la aldosterona	Espironolactona	25-100	1	aldosteronismo primario y la hipertensión resistente. • La espironolactona se asocia con un mayor riesgo de ginecomastia e impotencia en comparación con la eplerenona. • Esta es una terapia complementaria común en la hipertensión resistente. • Evitar su uso con suplementos de K^+, otros diuréticos de K^+, o significativa disfunción renal. • La eplerenona frecuentemente requiere una dosis de dos veces al día para una obtener reducción adecuada de la presión sanguínea.
Bloqueantes beta - cardioselectivos	Atenolol	25-100	12	• Los bloqueantes beta no se recomiendan como agentes de primera línea a menos que el paciente padezca cardiopatía isquémica o insuficiencia cardiaca.
	Betaxolol	5-20	1	
	Bisoprolol	2,5-10	1	
	Metoprolol	100-400	2	

	tartrato			• Estos son los preferidos en pacientes con enfermedades broncoespásticas de las vías respiratorias que requieren un bloqueante beta. • Se prefieren el bisoprolol y el metoprolol succinato en pacientes con HFrEF • Evitar el cese abrupto.
	Metoprolol succinato	50-200	1	
Bloqueante beta - Cardioselectivo y vasodilatador.	Nebivolol	5-40	1	• El Nebivolol induce la vasodilatación inducida por óxido nítrico. • Evitar el cese abrupto.
Bloqueantes beta - no cardioselectivos	Nadolol	40-120	1	• Evitar en pacientes con enfermedad reactiva de las vías respiratorias. • Evitar el cese abrupto.
	Propranolol IR	160-480	2	
	Propranolol LA	80-320	1	
Bloqueantes beta - actividad simpaticomimética intrínseca	Acebutolol	200-800	2	• Evitar en generalmente, especialmente en pacientes con IHD o insuficiencia cardiaca. • Evitar el cese abrupto.
	Carteolol	2,5-10	1	
	Penbutolol	10-40	1	
	Pindolol	10-60	2	

Bloqueantes beta - receptores alfa y beta combinados	Carvedilol	12,5-50	2	• En pacientes con HFrEF se prefiere el carvedilol. • Evitar el cese abrupto.
	Carvedilol fosfato	20-80	1	
	Labetalol	200-800	2	
Inhibidor directo de la renina.	Aliskiren	150-300	1	• No usar en combinación con inhibidores de la ECA o ARB. • Aliskiren es de acción muy prolongada.. • En la enfermedad renal crónica o en aquellos que toman suplementos de K^+ o medicamentos ahorradores de de K^+ existe un mayor riesgo de hiperpotasemia. • El Aliskiren puede causar insuficiencia renal aguda en pacientes con estenosis bilateral grave de la arteria renal. • Evitar en el embarazo
bloqueantes alfa-1	Doxazosina	1-8	1	• Se asocian con hipotensión ortostática, especialmente en adultos mayores.
	Prazosina	2-20	2 o 3	

	Terazosina	1-20	1 o 2	• Se pueden considerar agentes de segunda línea en pacientes con HPB concomitante.
Agonista alfa$_1$ central y otros fármacos de acción central	Clonidina oral	0,1-0,8	2	• Estos generalmente se reservan como última línea debido a los efectos adversos significativos sobre el SNC, especialmente en adultos mayores. • Evitar la interrupción brusca de la clonidina, que puede provocar una crisis hipertensiva; la clonidina se debe retirar gradualmente para evitar la hipertensión de rebote.
	Parche de clonidina	0,1-0,3	1 semanal	
	Metildopa	250-1000	2	
	Guanfacina	0,5-2	1	
Vasodilatadores	Hidralazina	250-200	2 o 3	• Estos fármacos están asociados con la

directos	Minoxidilo	5-100	1-3	retención de sodio y agua y con la taquicardia refleja; utilizar con un diurético y bloqueante beta. • En las dosis más altas la hidralazina está asociada con el síndrome de tipo lupus inducido por fármacos. • El minoxidilo está asociado con el hirsutismo y requiere un diurético de asa. El minoxidilo puede inducir efusión pericárdica.

* Las dosis pueden diferir de aquellas que figuran en las etiquetas aprobadas por la FDA (disponible en https://dailymed.nlm.nih.gov/dailymed/). ECA se refiere a la enzima convertidora de angiotensina; ARB, bloqueante del receptor de angiotensina; BP, presión sanguínea; HPB, hiperplasia prostática benigna; BCC, bloqueante del canal de calcio; CKD o ERC, enfermedad renal crónica; SNC, sistema nervioso central; ECV, enfermedad cardiovascular; ER, liberación prolongada; TFG o GFR, tasa de filtración glomerular; IC o HF, insuficiencia cardiaca; HFrEF, insuficiencia cardiaca con reducción de la fracción de eyección; DHI, cardiopatía isquémica; IR, liberación inmediata; LA acción prolongada; y SR, liberación sostenida.

De, Chobanian y colaboradores (2003) The JNC 7 Report. *JAMA* 289(19):2560.

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos, que no se deben interpretar como limitantes. El contenido completo de todas las referencias, patentes y solicitudes de patente publicadas que se citan en esta solicitud, así como el Listado de Secuencias, se incorporan aquí por referencia.

EJEMPLOS

Ejemplo 1. Síntesis de ARNi

Origen de los reactivos.

Cuando en el presente documento no se menciona específicamente el origen de un reactivo, es porque dicho reactivo se puede obtener de cualquier proveedor de reactivos para biología molecular en un estándar de calidad/pureza apto para su aplicación en biología molecular.

Diseño del ARNip

Se diseñó un conjunto de ARNip dirigido hacia el gen de AGT humano (humano: NCBI refseqID NM_000029,3; NCBI GeneID: 183) utilizando scripts de R y Python personalizados. El ARNm humano de NM_000029 REFSEQ, versión 3, tiene una longitud de 2587 bases.

En la Tabla 3 se muestra una lista detallada de las secuencias de nucleótidos de hebras sentido y antisentido del AGT no modificado. En la Tabla 5 se muestra una lista detallada de las secuencias de nucleótidos de hebras sentido y antisentido del AGT modificado.

Síntesis del ARNip

Los ARNip se sintetizaron y se alinearon utilizando métodos de rutina conocidos en el arte.

Ejemplo 2. Métodos de tamizado *in vitro*

Cultivos celulares y transfecciones en 384 pocillos

Las células Hep3b (ATCC, Manassas, VA) se cultivaron hasta casi la confluencia a 37 °C en una atmósfera con 5% de CO_2 en Medio Esencial Mínimo de Eagle (Gibco) suplementado con 10% de FBS (ATCC) antes desprenderlas de la placa por tripsinización.

La transfección se realizó mediante el agregado de 4,9µl de Opti-MEM más 0,1µl de Lipofectamina RNAiMax por pocillo (Invitrogen, Carlsbad CA. cat # 13778-150) a 5µl de cada dúplex de ARNip a un pocillo individual en una placa de 384 pocillos. Luego se incubó la mezcla a la temperatura ambiente durante 20 minutos. A continuación, se agregaron a la mezcla ARNip 50 µl de medio de crecimiento completo que contenía 5.000 células Hep3b. Las células se incubaron durante 24 horas antes de la purificación del ARN. Los experimentos de dosis única se realizaron a una concentración final del dúplex 10 nM y 0,1 nM, y los experimentos de respuesta a la dosis se realizaron utilizando una dilución en serie de ocho puntos a seis veces en el rango entre 10 nM y 37,5 fM.

Los agentes de ARNhd adicionales dirigidos hacia un ARNm de AGT se describen en la publicación PCT Nº WO 2015/179724, cuyos contenidos completos se incorporan aquí por referencia.

Aislamiento del ARN total usando el kit de aislamiento de ARNm DYNABEADS (Invitrogen™, parte #: 610-12)

Las células se lisaron en 75 µl de regulador de pH de lisis/unión que contenía 3 µl de perlas por pocillo y se mezclaron durante 10 minutos en un agitador electrostático. Los pasos de lavado se automatizaron en un aparato Biotek EL406, utilizando un soporte de placa magnética. Las perlas se lavaron (en 90 µl) una vez con regulador de pH A, una vez con regulador de pH B y dos

veces con regulador de pH E, con pasos de aspiración intermedios. Después de una aspiración final, se agregó a cada pocillo una mezcla completa de 10 µL a la temperatura ambiente, según se describe más adelante.

Síntesis de ADNc utilizando el kit de transcripción inversa de ADNc de alta capacidad ABI (Applied Biosystems, Foster City, CA, número de catálogo 4368813):

A cada pocillo se le agregó una mezcla madre de 1ul de regulador de pH 10X, 0,4µl de dNTPs 25X, 1µl de cebadores aleatorios, 0,5µl de transcriptasa inversa, 0,5µl de inhibidor de ARNasa y 6,6µl de H_2O por reacción. Las placas se sellaron, se agitaron durante 10 minutos en un agitador electrostático y luego se incubaron a 37 °C durante 2 horas. Después de esto, las placas se agitaron a 80 °C durante 8 minutos.

PCR en tiempo real:

A cada pocillo de las placas de 384 pocillos (Nº de cat. 04887301001 de Roche) se le agregaron 2 µl de ADNc a una mezcla madre que contenía 0,5 µl de sonda TaqMan GAPDH humana (4326317E), 0,5 µl de AGT humano (Hs00174854m1), 2 µl de agua libre de nucleasas y 5 µl de mezcla madre de sonda Lightcicler 480 (Roche Nº de catálogo 04887301001). La PCR en tiempo real se realizó en un sistema de PCR en tiempo real LightCicler480 (Roche).

Para calcular el cambio relativo en veces, se analizaron los datos utilizando el método de ΔΔCt y se normalizaron para los ensayos realizados con células transfectadas con ADN-1955 10 nM, o células transfectadas de manera simulada. Las IC_{50} se calcularon utilizando un modelo de ajuste de 4 parámetros utilizando XLFit y se normalizaron PARa células transfectadas con AD-1955 o transfectadas de forma simulada. Las secuencias sentido y antisentido de AD-

1955 son: sentido: cuuAcGcuGAGuAcuucGAdTsdT (SEQ ID N°: 19); y antisentido: UCGAAGuACUcAGCGuAAGdTsdT (SEQ ID N°: 20). En la Tabla 4 se muestran los resultados del tamizado.

Tabla 2. Abreviaturas de monómeros de nucleótidos que se utilizaron en la representación de las secuencias de ácido nucleico. Se entenderá que cuando estos monómeros estén presentes en un oligonucleótido, estarán unidos entre sí por enlaces fosfodiéster 5'-3'.

Abreviatura	**Nucleótido(s)**
A	Adenosina-3'-fosfato
Ab	beta-L-adenosina-3`-fosfato
Abs	beta-L-adenosina-3`-fosforotioato
Af	2'-fluoroadenosina-3'-fosfato
Afs	2'-fluoroadenosina-3'-fosforotioato
As	adenosina-3'-fosforotioato
C	citidina-3'-fosfato
Cb	beta-L-citidina-3`-fosfato
Cbs	beta-L-citidina-3'-fosforotioato
Cf	2'-fluorocitidina-3'-fosfato
Cfs	2'-fluorocitidina-3'-fosforotioato
Cs	citidina-3'-fosforotioato
G	guanosina-3'-fosfato
Gb	beta-L-guanosina-3`-fosfato
Gbs	beta-L-guanosina-3`-fosforotioato
Gf	2'-fluoroguanosina-3'-fosfato
Gfs	2'-fluoroguanosina-3'-fosforotioato

Abreviatura	Nucleótido(s)
Gs	guanosina-3’-fosforotioato
T	5’-metiluridina-3’-fosfato
Tf	2’-fluoro-5-metiluridina-3’-fosfato
Tfs	2’-fluoro-5-metiluridina-3’-fosforotioato
Ts	5-metiluridina-3’-fosforotioato
U	Uridina-3’-fosfato
Uf	2’-fluorouridina-3’-fosfato
Ufs	2’-fluorouridina -3’-fosforotioato
Us	uridina -3’-fosforotioato
N	Cualquier nucleótido, modificado o no modificado
a	2'-O-metiladenosina-3’-fosfato
as	2'-O-metiladenosina-3’- fosforotioato
c	2'-O-metilcitidina-3’-fosfato
cs	2'-O-metilcitidina-3’- fosforotioato
g	2'-O-metilguanosina-3’-fosfato
gs	2'-O-metilguanosina-3’- fosforotioato
t	2’-O-metil-5-metiluridina-3’-fosfato
ts	2’-O-metil-5-metiluridina-3’-fosforotioato
u	2'-O-metiluridina-3’-fosfato
us	2'-O-metiluridina-3’-fosforotioato
s	conexión fosforotioato
L96	N-[tris(GalNAc-alquil)-amidodecanoil)]-4-hidroxiprolinol (Hip-(GalNAc-alquil)3)

Abreviatura	Nucleótido(s)
Y34	2-hidroximetil-tetrahidrofurano-4-metoxi-3-fosfato (una 2'-OMe furanosa abásica)
Y44	ADN invertido abásico (2-hidroximetil-tetrahidrofurano-5-fosfato)
(Agn)	Adenosina-ácido glicol nucleico (GNA)
(Cgn)	Citidina-ácido glicol nucleico (GNA)
(Ggn)	Guanosina-ácido glicol nucleico (GNA)
(Tgn)	Timidina-ácido glicol nucleico (GNA) Isómero S
P	Fosfato
VP	Vinil-fosfato
(Aam)	2`-O-(N-metilacetamida)adenosina-3`-fosfato
(Aams)	2`-O-(N-metilacetamida)adenosina-3`-fosforotioato
(Gam)	2`-O-(N-metilacetamida)guanosina-3`-fosfato
(Gams)	2`-O-(N-metilacetamida)guanosina-3`-fosforotioato
(Tam)	2`-O-(N-metilacetamida)timidina-3`-fosfato
(Tams)	2`-O-(N-metilacetamida)timidina-3`-fosforotioato
dA	2`-desoxiadenosina-3`-fosfato
dAs	2`-desoxiadenosina-3`-fosforotioato
dC	2`-desoxicitidina-3`-fosfato
dCs	2`-desoxicitidina-3`-fosforotioato
dG	2`-desoxiguanosina-3`-fosfato
dGs	2`-desoxiguanosina-3`-fosforotioato
dT	2`-desoxitimidina-3`-fosfato
dTs	2`-desoxitimidina-3`-fosforotioato
dU	2`-desoxiuridina

Abreviatura	Nucleótido(s)
dUs	2`-desoxiuridina-3`-fosforotioato
(Aeo)	2`-O-metoxietiladenosina-3`-fosfato
(Aeos)	2`-O-metoxietiladenosina-3`-fosforotioato
(Geo)	2`-O-metoxietilguanosina-3`-fosfato
(Geos)	2`-O-metoxietilguanosina-3`-fosforotioato
(Teo)	2`-O-metoxietil-5-metiluridina-3`-fosfato
(Teos)	2`-O-metoxietil-5-metiluridina-3`-fosforotioato
(m5Ceo)	2`-O-metoxietil-5-metilcitidina-3`-fosfato
(m5Ceos)	2`-O-metoxietil-5-metilcitidina-3`-fosforotioato
(A3m)	3`-O-metiladenosina-2`-fosfato
(A3mx)	3`-O-metil-xilofuranosiladenosina-2`-fosfato
(G3m)	3`-O-metilguanosina-2`-fosfato
(G3mx)	3`-O-metil-xilofuranosilguanosina-2`-fosfato
(C3m)	3`-O-metilcitidina-2`-fosfato
(C3mx)	3`-O-metil-xilofuranosilcitidina-2`-fosfato
(U3m)	3`-O-metiluridina-2`-fosfato
U3mx)	3`-O-metil-xilofuranosiluridina-2`-fosfato
(m5Cam)	2`-O-(N-metilacetamida)-5-metilcitidina-3`-fosfato
(m5Cams)	2`-O-(N-metilacetamida)-5-metilcitidina-3`-fosforotioato
(Chd)	2'-O-hexadecil-citidina-3'-fosfato
(Chds)	2'-O-hexadecil-citidina-3'-fosforotioato
(Uhd)	2'-O-hexadecil-uridina-3'-fosfato
(Uhds)	2'-O-hexadecil-uridina-3'-fosforotioato
(pshe)	Hidroxietilfosforotioato

Tabla 3. Secuencias de hebras sentido y antisentido no modificadas de los agentes de ARNhd contra el AGT

Nombre de dúplex	Nombre de oligo sentido	Secuencia sentido 5' a 3'	SEQ ID N°:	Rango en NM_000029.3	Nombre de Oligo antisentido	Secuencia antisentido 5' a 3'	SEQ ID N°:	Rango en NM_000029.3
AD-84704	A-168477	CACAAUGAGAGUACCUGUGAA	21	644-664	A-168478	UUCACAGGUACUCUCAUUGUGGA	205	642-664
AD-84705	A-168479	GUCUCCCACCUUUUCUUCUAA	22	2076-2096	A-168480	UUAGAAGAAAAGGUGGGAGACUG	206	2074-2096
AD-84706	A-168481	ACUUUCCAGCAAAACUCCCUA	23	1586-1606	A-168482	UAGGGAGUUUUGCUGGAAAGUGA	207	1584-1606
AD-84707	A-168483	CCUCAACUGGAUGAAGAAACU	24	1603-1623	A-168484	AGUUUCUUCAUCCAGUUGAGGGA	208	1601-1623
AD-84708	A-168485	CUGUUUGCUGUGUAUGAUCAA	25	1889-1909	A-168486	UUGAUCAUACACAGCAAACAGGA	209	1887-1909
AD-84709	A-168487	UUUGCUGUGUAUGAUCAAAGA	26	1892-1912	A-168488	UCUUUGAUCAUACACAGCAAACA	210	1890-1912
AD-84710	A-168489	CCGACCAGCUUGUUUGUGAAA	27	2283-2303	A-168490	UUUCACAAACAAGCUGGUCGGUU	211	2281-2303
AD-84711	A-168491	UCCAACCGACCAGCUUGUUUA	28	2278-2298	A-168492	UAAACAAGCUGGUCGGUUGGAAU	212	2276-2298
AD-84712	A-168493	CCAUUCCUGUUUGCUGUGUAU	29	1883-1903	A-168494	AUACACAGCAAACAGGAAUGGGC	213	1881-1903
AD-84713	A-168495	CACCUUUUCUUCUAAUGAGUA	30	2082-2102	A-168496	UACUCAUUAGAAGAAAAGGUGGG	214	2080-2102
AD-84714	A-168497	GUUUGCUGUGUAUGAUCAAAA	31	1891-1911	A-168498	UUUUGAUCAUACACAGCAAACAG	215	1889-1911
AD-84715	A-168499	GCUGAGAAGAUUGACAGGUUA	32	1250-1270	A-168500	UAACCUGUCAAUCUUCUCAGCAG	216	1248-1270

Nombre de dúplex	Nombre de oligo sentido	Secuencia sentido 5' a 3'	SEQ ID N°:	Rango en NM_000029.3	Nombre de Oligo antisentido	Secuencia antisentido 5' a 3'	SEQ ID N°:	Rango en NM_000029.3
AD-84716	A-168501	UUCCAGCAAAACUCCCUCAAA	33	1589-1609	A-168502	UUUGAGGGAGUUUUGCUGGAAAG	217	1587-1609
AD-84717	A-168503	UGCUGAGAAGAUUGACAGGUU	34	1249-1269	A-168504	AACCUGUCAAUCUUCUCAGCAGC	218	1247-1269
AD-84718	A-168505	UCUCACUUUCCAGCAAAACUA	35	1582-1602	A-168506	UAGUUUUGCUGGAAAGUGAGACC	219	1580-1602
AD-84719	A-168507	UCCACAAUGAGAGUACCUGUA	36	642-662	A-168508	UACAGGUACUCUCAUUGUGGAUG	220	640-662
AD-84720	A-168509	CCACCUCGUCAUCCACAAUGA	37	631-651	A-168510	UCAUUGUGGAUGACGAGGUGGAA	221	629-651
AD-84721	A-168511	UCACUUUCCAGCAAAACUCCA	38	1584-1604	A-168512	UGGAGUUUUGCUGGAAAGUGAGA	222	1582-1604
AD-84722	A-168513	UCCCUCAACUGGAUGAAGAAA	39	1601-1621	A-168514	UUUCUUCAUCCAGUUGAGGGAGU	223	1599-1621
AD-84723	A-168515	GAGAGUACCUGUGAGCAGCUA	40	650-670	A-168516	UAGCUGCUCACAGGUACUCUCAU	224	648-670
AD-84724	A-168517	AGAAUUCCAACCGACCAGCUU	41	2273-2293	A-168518	AAGCUGGUCGGUUGGAAUUCUUU	225	2271-2293
AD-84725	A-168519	CAUUCCUGUUUGCUGUGUAUA	42	1884-1904	A-168520	UAUACACAGCAAACAGGAAUGGG	226	1882-1904
AD-84726	A-168521	GAAUUCCAACCGACCAGCUUA	43	2274-2294	A-168522	UAAGCUGGUCGGUUGGAAUUCUU	227	2272-2294
AD-84727	A-168523	CAUCCACAAUGAGAGUACCUA	44	640-660	A-168524	UAGGUACUCUCAUUGUGGAUGAC	228	638-660
AD-84728	A-168525	CCCAUUCCUGUUUGCUGUGUA	45	1882-1902	A-168526	UACACAGCAAACAGGAAUGGGCG	229	1880-1902
AD-84729	A-168527	CUGGGUUUAUUUUAGAGAAUA	46	2202-2222	A-168528	UAUUCUCUAAAAUAAACCCAGCA	230	2200-2222

Nombre de dúplex	Nombre de oligo sentido	Secuencia sentido 5' a 3'	SEQ ID N°:	Rango en NM_000029.3	Nombre de Oligo antisentido	Secuencia antisentido 5' a 3'	SEQ ID N°:	Rango en NM_000029.3
AD-84730	A-168529	GCUGGGUUUAUUUUAGAGAAU	47	2201-2221	A-168530	AUUCUCUAAAAUAAACCCAGCAA	231	2199-2221
AD-84731	A-168531	AUGGCAUGCACAGUGAGCUAU	48	861-881	A-168532	AUAGCUCACUGUGCAUGCCAUAU	232	859-881
AD-84732	A-168533	GAGAGAGCCCACAGAGUCUAA	49	1816-1836	A-168534	UUAGACUCUGUGGGCUCUCUCUC	233	1814-1836
AD-84733	A-168535	GCAAGAACCAGUGUUUAGCGA	50	2234-2254	A-168536	UCGCUAAACACUGGUUCUUGCCU	234	2232-2254
AD-84734	A-168537	CCAGCAAAACUCCCUCAACUA	51	1591-1611	A-168538	UAGUUGAGGGAGUUUUGCUGGAA	235	1589-1611
AD-84735	A-168539	CACCUCGUCAUCCACAAUGAA	52	632-652	A-168540	UUCAUUGUGGAUGACGAGGUGGA	236	630-652
AD-84736	A-168541	CGUCAUCCACAAUGAGAGUAA	53	637-657	A-168542	UUACUCUCAUUGUGGAUGACGAG	237	635-657
AD-84737	A-168543	CUCCCACGCUCUCUGGACUUA	54	1211-1231	A-168544	UAAGUCCAGAGAGCGUGGGAGGA	238	1209-1231
AD-84738	A-168545	AACUCCCUCAACUGGAUGAAA	55	1598-1618	A-168546	UUUCAUCCAGUUGAGGGAGUUUU	239	1596-1618
AD-84739	A-168547	UGAGAAGAUUGACAGGUUCAU	56	1252-1272	A-168548	AUGAACCUGUCAAUCUUCUCAGC	240	1250-1272
AD-84740	A-168549	CCUCGUCAUCCACAAUGAGAA	57	634-654	A-168550	UUCUCAUUGUGGAUGACGAGGUG	241	632-654
AD-84741	A-168551	GAGAAGAUUGACAGGUUCAUA	58	1253-1273	A-168552	UAUGAACCUGUCAAUCUUCUCAG	242	1251-1273
AD-84742	A-168553	CUUCUUGGGCUUCCGUAUAUA	59	841-861	A-168554	UAUAUACGGAAGCCCAAGAAGUU	243	839-861
AD-84743	A-168555	UCCACCUCGUCAUCCACAAUA	60	630-650	A-168556	UAUUGUGGAUGACGAGGUGGAAG	244	628-650

Nombre de dúplex	Nombre de oligo sentido	Secuencia sentido 5' a 3'	SEQ ID N°:	Rango en NM_000029.3	Nombre de Oligo antisentido	Secuencia antisentido 5' a 3'	SEQ ID N°:	Rango en NM_000029.3
AD-84744	A-168557	AGAUUGACAGGUUCAUGCAGA	61	1257-1277	A-168558	UCUGCAUGAACCUGUCAAUCUUC	245	1255-1277
AD-84745	A-168559	CUCCCUCAACUGGAUGAAGAA	62	1600-1620	A-168560	UUCUUCAUCCAGUUGAGGGAGUU	246	1598-1620
AD-84746	A-168561	AAUGAGAGUACCUGUGAGCAA	63	647-667	A-168562	UUGCUCACAGGUACUCUCAUUGU	247	645-667
AD-85431	A-168469	CCACCUUUUCUUCUAAUGAGU	64	2081-2101	A-170464	ACUCAUUAGAAGAAAAGGUGGGA	248	2079-2101
AD-85432	A-168471	CGACCAGCUUGUUUGUGAAAA	65	2284-2304	A-170465	UUUUCACAAACAAGCUGGUCGGU	249	2282-2304
AD-85433	A-168473	ACCUUUUCUUCUAAUGAGUCA	66	2083-2103	A-170466	UGACUCAUUAGAAGAAAAGGUGG	250	2081-2103
AD-85434	A-168475	GUCAUCCACAAUGAGAGUACA	67	638-658	A-170467	UGUACUCUCAUUGUGGAUGACGA	251	636-658
AD-85435	A-168477	CACAAUGAGAGUACCUGUGAA	68	644-664	A-170468	UUCACAGGUACUCUCAUUGUGGA	252	642-664
AD-85436	A-168479	GUCUCCCACCUUUUCUUCUAA	69	2076-2096	A-170469	UUAGAAGAAAAGGUGGGAGACUG	253	2074-2096
AD-85437	A-168481	ACUUUCCAGCAAAACUCCCUA	70	1586-1606	A-170470	UAGGGAGUUUUGCUGGAAAGUGA	254	1584-1606
AD-85438	A-168483	CCUCAACUGGAUGAAGAAACU	71	1603-1623	A-170471	AGUUUCUUCAUCCAGUUGAGGGA	255	1601-1623
AD-85439	A-168485	CUGUUUGCUGUGUAUGAUCAA	72	1889-1909	A-170472	UUGAUCAUACACAGCAAACAGGA	256	1887-1909
AD-85440	A-168487	UUUGCUGUGUAUGAUCAAAGA	73	1892-1912	A-170473	UCUUUGAUCAUACACAGCAAACA	257	1890-1912
AD-85441	A-168489	CCGACCAGCUUGUUUGUGAAA	74	2283-2303	A-170474	UUUCACAAACAAGCUGGUCGGUU	258	2281-2303

Nombre de dúplex	Nombre de oligo sentido	Secuencia sentido 5' a 3'	SEQ ID N°:	Rango en NM_000029.3	Nombre de Oligo antisentido	Secuencia antisentido 5' a 3'	SEQ ID N°:	Rango en NM_000029.3
AD-85442	A-168491	UCCAACCGACCAGCUUGUUUA	75	2278-2298	A-170475	UAAACAAGCUGGUCGGUUGGAAU	259	2276-2298
AD-85443	A-168493	CCAUUCCUGUUUGCUGUGUAU	76	1883-1903	A-170476	AUACACAGCAAACAGGAAUGGGC	260	1881-1903
AD-85444	A-168495	CACCUUUUCUUCUAAUGAGUA	77	2082-2102	A-170477	UACUCAUUAGAAGAAAAGGUGGG	261	2080-2102
AD-85445	A-168497	GUUUGCUGUGUAUGAUCAAAA	78	1891-1911	A-170478	UUUUGAUCAUACACAGCAAACAG	262	1889-1911
AD-85446	A-168499	GCUGAGAAGAUUGACAGGUUA	79	1250-1270	A-170479	UAACCUGUCAAUCUUCUCAGCAG	263	1248-1270
AD-85447	A-168501	UUCCAGCAAAACUCCCUCAAA	80	1589-1609	A-170480	UUUGAGGGAGUUUUGCUGGAAAG	264	1587-1609
AD-85448	A-168503	UGCUGAGAAGAUUGACAGGUU	81	1249-1269	A-170481	AACCUGUCAAUCUUCUCAGCAGC	265	1247-1269
AD-85449	A-168505	UCUCACUUUCCAGCAAAACUA	82	1582-1602	A-170482	UAGUUUUGCUGGAAAGUGAGACC	266	1580-1602
AD-85450	A-168507	UCCACAAUGAGAGUACCUGUA	83	642-662	A-170483	UACAGGUACUCUCAUUGUGGAUG	267	640-662
AD-85451	A-168509	CCACCUCGUCAUCCACAAUGA	84	631-651	A-170484	UCAUUGUGGAUGACGAGGUGGAA	268	629-651
AD-85452	A-168511	UCACUUUCCAGCAAAACUCCA	85	1584-1604	A-170485	UGGAGUUUUGCUGGAAAGUGAGA	269	1582-1604
AD-85453	A-168513	UCCCUCAACUGGAUGAAGAAA	86	1601-1621	A-170486	UUUCUUCAUCCAGUUGAGGGAGU	270	1599-1621
AD-85454	A-168515	GAGAGUACCUGUGAGCAGCUA	87	650-670	A-170487	UAGCUGCUCACAGGUACUCUCAU	271	648-670
AD-85455	A-168517	AGAAUUCCAACCGACCAGCUU	88	2273-2293	A-170488	AAGCUGGUCGGUUGGAAUUCUUU	272	2271-2293

Nombre de dúplex	Nombre de oligo sentido	Secuencia sentido 5' a 3'	SEQ ID N°:	Rango en NM_000029.3	Nombre de Oligo antisentido	Secuencia antisentido 5' a 3'	SEQ ID N°:	Rango en NM_000029.3
AD-85456	A-168519	CAUUCCUGUUUGCUGUGUAUA	89	1884-1904	A-170489	UAUACACAGCAAACAGGAAUGGG	273	1882-1904
AD-85457	A-168521	GAAUUCCAACCGACCAGCUUA	90	2274-2294	A-170490	UAAGCUGGUCGGUUGGAAUUCUU	274	2272-2294
AD-85458	A-168523	CAUCCACAAUGAGAGUACCUA	91	640-660	A-170491	UAGGUACUCUCAUUGUGGAUGAC	275	638-660
AD-85459	A-168525	CCCAUUCCUGUUUGCUGUGUA	92	1882-1902	A-170492	UACACAGCAAACAGGAAUGGGCG	276	1880-1902
AD-85460	A-168527	CUGGGUUUAUUUUAGAGAAUA	93	2202-2222	A-170493	UAUUCUCUAAAAUAAACCCAGCA	277	2200-2222
AD-85461	A-168529	GCUGGGUUUAUUUUAGAGAAU	94	2201-2221	A-170494	AUUCUCUAAAAUAAACCCAGCAA	278	2199-2221
AD-85462	A-168531	AUGGCAUGCACAGUGAGCUAU	95	861-881	A-170495	AUAGCUCACUGUGCAUGCCAUAU	279	859-881
AD-85463	A-168533	GAGAGAGCCCACAGAGUCUAA	96	1816-1836	A-170496	UUAGACUCUGUGGGCUCUCUCUC	280	1814-1836
AD-85464	A-168535	GCAAGAACCAGUGUUUAGCGA	97	2234-2254	A-170497	UCGCUAAACACUGGUUCUUGCCU	281	2232-2254
AD-85465	A-168537	CCAGCAAAACUCCCUCAACUA	98	1591-1611	A-170498	UAGUUGAGGGAGUUUUGCUGGAA	282	1589-1611
AD-85466	A-168539	CACCUCGUCAUCCACAAUGAA	99	632-652	A-170499	UUCAUUGUGGAUGACGAGGUGGA	283	630-652
AD-85467	A-168541	CGUCAUCCACAAUGAGAGUAA	100	637-657	A-170500	UUACUCUCAUUGUGGAUGACGAG	284	635-657
AD-85468	A-168543	CUCCCACGCUCUCUGGACUUA	101	1211-1231	A-170501	UAAGUCCAGAGAGCGUGGGAGGA	285	1209-1231
AD-85469	A-168545	AACUCCCUCAACUGGAUGAAA	102	1598-1618	A-170502	UUUCAUCCAGUUGAGGGAGUUUU	286	1596-1618

Nombre de dúplex	Nombre de oligo sentido	Secuencia sentido 5' a 3'	SEQ ID N°:	Rango en NM_000029.3	Nombre de Oligo antisentido	Secuencia antisentido 5' a 3'	SEQ ID N°:	Rango en NM_000029.3
AD-85470	A-168547	UGAGAAGAUUGACAGGUUCAU	103	1252-1272	A-170503	AUGAACCUGUCAAUCUUCUCAGC	287	1250-1272
AD-85471	A-168549	CCUCGUCAUCCACAAUGAGAA	104	634-654	A-170504	UUCUCAUUGUGGAUGACGAGGUG	288	632-654
AD-85472	A-168551	GAGAAGAUUGACAGGUUCAUA	105	1253-1273	A-170505	UAUGAACCUGUCAAUCUUCUCAG	289	1251-1273
AD-85473	A-168553	CUUCUUGGGCUUCCGUAUAUA	106	841-861	A-170506	UAUAUACGGAAGCCCAAGAAGUU	290	839-861
AD-85474	A-168555	UCCACCUCGUCAUCCACAAUA	107	630-650	A-170507	UAUUGUGGAUGACGAGGUGGAAG	291	628-650
AD-85475	A-168557	AGAUUGACAGGUUCAUGCAGA	108	1257-1277	A-170508	UCUGCAUGAACCUGUCAAUCUUC	292	1255-1277
AD-85476	A-168559	CUCCCUCAACUGGAUGAAGAA	109	1600-1620	A-170509	UUCUUCAUCCAGUUGAGGGAGUU	293	1598-1620
AD-85477	A-168561	AAUGAGAGUACCUGUGAGCAA	110	647-667	A-170510	UUGCUCACAGGUACUCUCAUUGU	294	645-667
AD-85478	A-168469	CCACCUUUUCUUCUAAUGAGU	111	2081-2101	A-170511	ACUCAUUAGAAGAAAAGGUGGGA	295	2079-2101
AD-85479	A-168471	CGACCAGCUUGUUUGUGAAAA	112	2284-2304	A-170512	UUUUCACAAACAAGCUGGUCGGU	296	2282-2304
AD-85480	A-168473	ACCUUUUCUUCUAAUGAGUCA	113	2083-2103	A-170513	UGACUCAUUAGAAGAAAAGGUGG	297	2081-2103
AD-85481	A-168475	GUCAUCCACAAUGAGAGUACA	114	638-658	A-170514	UGUACUCUCAUUGUGGAUGACGA	298	636-658
AD-85482	A-168477	CACAAUGAGAGUACCUGUGAA	115	644-664	A-170515	UUCACAGGUACUCUCAUUGUGGA	299	642-664
AD-85483	A-168479	GUCUCCCACCUUUUCUUCUAA	116	2076-2096	A-170516	UUAGAAGAAAAGGUGGGAGACUG	300	2074-2096

Nombre de dúplex	Nombre de oligo sentido	Secuencia sentido 5' a 3'	SEQ ID N°:	Rango en NM_000029.3	Nombre de Oligo antisentido	Secuencia antisentido 5' a 3'	SEQ ID N°:	Rango en NM_000029.3
AD-85484	A-168481	ACUUUCCAGCAAAACUCCCUA	117	1586-1606	A-170517	UAGGGAGUUUUGCUGGAAAGUGA	301	1584-1606
AD-85485	A-168483	CCUCAACUGGAUGAAGAAACU	118	1603-1623	A-170518	AGUUUCUUCAUCCAGUUGAGGGA	302	1601-1623
AD-85486	A-168485	CUGUUUGCUGUGUAUGAUCAA	119	1889-1909	A-170519	UUGAUCAUACACAGCAAACAGGA	303	1887-1909
AD-85487	A-168487	UUUGCUGUGUAUGAUCAAAGA	120	1892-1912	A-170520	UCUUUGAUCAUACACAGCAAACA	304	1890-1912
AD-85488	A-168489	CCGACCAGCUUGUUUGUGAAA	121	2283-2303	A-170521	UUUCACAAACAAGCUGGUCGGUU	305	2281-2303
AD-85489	A-168491	UCCAACCGACCAGCUUGUUUA	122	2278-2298	A-170522	UAAACAAGCUGGUCGGUUGGAAU	306	2276-2298
AD-85490	A-168493	CCAUUCCUGUUUGCUGUGUAU	123	1883-1903	A-170523	AUACACAGCAAACAGGAAUGGGC	307	1881-1903
AD-85491	A-168495	CACCUUUUCUUCUAAUGAGUA	124	2082-2102	A-170524	UACUCAUUAGAAGAAAAGGUGGG	308	2080-2102
AD-85492	A-168497	GUUUGCUGUGUAUGAUCAAAA	125	1891-1911	A-170525	UUUUGAUCAUACACAGCAAACAG	309	1889-1911
AD-85493	A-168499	GCUGAGAAGAUUGACAGGUUA	126	1250-1270	A-170526	UAACCUGUCAAUCUUCUCAGCAG	310	1248-1270
AD-85494	A-168501	UUCCAGCAAAACUCCCUCAAA	127	1589-1609	A-170527	UUUGAGGGAGUUUUGCUGGAAAG	311	1587-1609
AD-85495	A-168503	UGCUGAGAAGAUUGACAGGUU	128	1249-1269	A-170528	AACCUGUCAAUCUUCUCAGCAGC	312	1247-1269
AD-85496	A-168505	UCUCACUUUCCAGCAAAACUA	129	1582-1602	A-170529	UAGUUUUGCUGGAAAGUGAGACC	313	1580-1602
AD-85497	A-168507	UCCACAAUGAGAGUACCUGUA	130	642-662	A-170530	UACAGGUACUCUCAUUGUGGAUG	314	640-662

Nombre de dúplex	Nombre de oligo sentido	Secuencia sentido 5' a 3'	SEQ ID N°:	Rango en NM_000029.3	Nombre de Oligo antisentido	Secuencia antisentido 5' a 3'	SEQ ID N°:	Rango en NM_000029.3
AD-85498	A-168509	CCACCUCGUCAUCCACAAUGA	131	631-651	A-170531	UCAUUGUGGAUGACGAGGUGGAA	315	629-651
AD-85499	A-168511	UCACUUUCCAGCAAAACUCCA	132	1584-1604	A-170532	UGGAGUUUUGCUGGAAAGUGAGA	316	1582-1604
AD-85500	A-168513	UCCCUCAACUGGAUGAAGAAA	133	1601-1621	A-170533	UUUCUUCAUCCAGUUGAGGGAGU	317	1599-1621
AD-85501	A-168515	GAGAGUACCUGUGAGCAGCUA	134	650-670	A-170534	UAGCUGCUCACAGGUACUCUCAU	318	648-670
AD-85502	A-168517	AGAAUUCCAACCGACCAGCUU	135	2273-2293	A-170535	AAGCUGGUCGGUUGGAAUUCUUU	319	2271-2293
AD-85503	A-168519	CAUUCCUGUUUGCUGUGUAUA	136	1884-1904	A-170536	UAUACACAGCAAACAGGAAUGGG	320	1882-1904
AD-85504	A-168521	GAAUUCCAACCGACCAGCUUA	137	2274-2294	A-170537	UAAGCUGGUCGGUUGGAAUUCUU	321	2272-2294
AD-85505	A-168523	CAUCCACAAUGAGAGUACCUA	138	640-660	A-170538	UAGGUACUCUCAUUGUGGAUGAC	322	638-660
AD-85506	A-168525	CCCAUUCCUGUUUGCUGUGUA	139	1882-1902	A-170539	UACACAGCAAACAGGAAUGGGCG	323	1880-1902
AD-85507	A-168527	CUGGGUUUAUUUUAGAGAAUA	140	2202-2222	A-170540	UAUUCUCUAAAAUAAACCCAGCA	324	2200-2222
AD-85508	A-168529	GCUGGGUUUAUUUUAGAGAAU	141	2201-2221	A-170541	AUUCUCUAAAAUAAACCCAGCAA	325	2199-2221
AD-85509	A-168531	AUGGCAUGCACAGUGAGCUAU	142	861-881	A-170542	AUAGCUCACUGUGCAUGCCAUAU	326	859-881
AD-85510	A-168533	GAGAGAGCCCACAGAGUCUAA	143	1816-1836	A-170543	UUAGACUCUGUGGGCUCUCUCUC	327	1814-1836
AD-85511	A-168535	GCAAGAACCAGUGUUUAGCGA	144	2234-2254	A-170544	UCGCUAAACACUGGUUCUUGCCU	328	2232-2254

Nombre de dúplex	Nombre de oligo sentido	Secuencia sentido 5' a 3'	SEQ ID N°:	Rango en NM_000029.3	Nombre de Oligo antisentido	Secuencia antisentido 5' a 3'	SEQ ID N°:	Rango en NM_000029.3
AD-85512	A-168537	CCAGCAAAACUCCCUCAACUA	145	1591-1611	A-170545	UAGUUGAGGGAGUUUUGCUGGAA	329	1589-1611
AD-85513	A-168539	CACCUCGUCAUCCACAAUGAA	146	632-652	A-170546	UUCAUUGUGGAUGACGAGGUGGA	330	630-652
AD-85514	A-168541	CGUCAUCCACAAUGAGAGUAA	147	637-657	A-170547	UUACUCUCAUUGUGGAUGACGAG	331	635-657
AD-85515	A-168543	CUCCCACGCUCUCUGGACUUA	148	1211-1231	A-170548	UAAGUCCAGAGAGCGUGGGAGGA	332	1209-1231
AD-85516	A-168545	AACUCCCUCAACUGGAUGAAA	149	1598-1618	A-170549	UUUCAUCCAGUUGAGGGAGUUUU	333	1596-1618
AD-85517	A-168547	UGAGAAGAUUGACAGGUUCAU	150	1252-1272	A-170550	AUGAACCUGUCAAUCUUCUCAGC	334	1250-1272
AD-85518	A-168549	CCUCGUCAUCCACAAUGAGAA	151	634-654	A-170551	UUCUCAUUGUGGAUGACGAGGUG	335	632-654
AD-85519	A-168551	GAGAAGAUUGACAGGUUCAUA	152	1253-1273	A-170552	UAUGAACCUGUCAAUCUUCUCAG	336	1251-1273
AD-85520	A-168553	CUUCUUGGGCUUCCGUAUAUA	153	841-861	A-170553	UAUAUACGGAAGCCCAAGAAGUU	337	839-861
AD-85521	A-168555	UCCACCUCGUCAUCCACAAUA	154	630-650	A-170554	UAUUGUGGAUGACGAGGUGGAAG	338	628-650
AD-85522	A-168557	AGAUUGACAGGUUCAUGCAGA	155	1257-1277	A-170555	UCUGCAUGAACCUGUCAAUCUUC	339	1255-1277
AD-85523	A-168559	CUCCCUCAACUGGAUGAAGAA	156	1600-1620	A-170556	UUCUUCAUCCAGUUGAGGGAGUU	340	1598-1620
AD-85524	A-168561	AAUGAGAGUACCUGUGAGCAA	157	647-667	A-170557	UUGCUCACAGGUACUCUCAUUGU	341	645-667
AD-85619	A-168469	CCACCUUUUCUUCUAAUGAGU	158	2081-2101	A-170558	ACUCAUUAGAAGAAAAGGUGGGA	342	2079-2101

Nombre de dúplex	Nombre de oligo sentido	Secuencia sentido 5' a 3'	SEQ ID N°:	Rango en NM_000029.3	Nombre de Oligo antisentido	Secuencia antisentido 5' a 3'	SEQ ID N°:	Rango en NM_000029.3
AD-85620	A-168471	CGACCAGCUUGUUUGUGAAAA	159	2284-2304	A-170559	UUUUCACAAACAAGCUGGUCGGU	343	2282-2304
AD-85621	A-168473	ACCUUUUCUUCUAAUGAGUCA	160	2083-2103	A-170560	UGACUCAUUAGAAGAAAAGGUGG	344	2081-2103
AD-85622	A-168475	GUCAUCCACAAUGAGAGUACA	161	638-658	A-170561	UGUACUCUCAUUGUGGAUGACGA	345	636-658
AD-85623	A-168477	CACAAUGAGAGUACCUGUGAA	162	644-664	A-170562	UUCACAGGUACUCUCAUUGUGGA	346	642-664
AD-85624	A-168479	GUCUCCCACCUUUUCUUCUAA	163	2076-2096	A-170563	UUAGAAGAAAAGGUGGGAGACUG	347	2074-2096
AD-85625	A-168481	ACUUUCCAGCAAAACUCCCUA	164	1586-1606	A-170564	UAGGGAGUUUUGCUGGAAAGUGA	348	1584-1606
AD-85626	A-168483	CCUCAACUGGAUGAAGAAACU	165	1603-1623	A-170565	AGUUUCUUCAUCCAGUUGAGGGA	349	1601-1623
AD-85627	A-168485	CUGUUUGCUGUGUAUGAUCAA	166	1889-1909	A-170566	UUGAUCAUACACAGCAAACAGGA	350	1887-1909
AD-85628	A-168487	UUUGCUGUGUAUGAUCAAAGA	167	1892-1912	A-170567	UCUUUGAUCAUACACAGCAAACA	351	1890-1912
AD-85629	A-168489	CCGACCAGCUUGUUUGUGAAA	168	2283-2303	A-170568	UUUCACAAACAAGCUGGUCGGUU	352	2281-2303
AD-85630	A-168491	UCCAACCGACCAGCUUGUUUA	169	2278-2298	A-170569	UAAACAAGCUGGUCGGUUGGAAU	353	2276-2298
AD-85631	A-168493	CCAUUCCUGUUUGCUGUGUAU	170	1883-1903	A-170570	AUACACAGCAAACAGGAAUGGGC	354	1881-1903
AD-85632	A-168495	CACCUUUUCUUCUAAUGAGUA	171	2082-2102	A-170571	UACUCAUUAGAAGAAAAGGUGGG	355	2080-2102
AD-85633	A-168497	GUUUGCUGUGUAUGAUCAAAA	172	1891-1911	A-170572	UUUUGAUCAUACACAGCAAACAG	356	1889-1911

Nombre de dúplex	Nombre de oligo sentido	Secuencia sentido 5' a 3'	SEQ ID N°:	Rango en NM_000029.3	Nombre de Oligo antisentido	Secuencia antisentido 5' a 3'	SEQ ID N°:	Rango en NM_000029.3
AD-85634	A-168499	GCUGAGAAGAUUGACAGGUUA	173	1250-1270	A-170573	UAACCUGUCAAUCUUCUCAGCAG	357	1248-1270
AD-85635	A-168501	UUCCAGCAAAACUCCCUCAAA	174	1589-1609	A-170574	UUUGAGGGAGUUUUGCUGGAAAG	358	1587-1609
AD-85636	A-168503	UGCUGAGAAGAUUGACAGGUU	175	1249-1269	A-170575	AACCUGUCAAUCUUCUCAGCAGC	359	1247-1269
AD-85637	A-168505	UCUCACUUUCCAGCAAAACUA	176	1582-1602	A-170576	UAGUUUUGCUGGAAAGUGAGACC	360	1580-1602
AD-85638	A-168507	UCCACAAUGAGAGUACCUGUA	177	642-662	A-170577	UACAGGUACUCUCAUUGUGGAUG	361	640-662
AD-85639	A-168509	CCACCUCGUCAUCCACAAUGA	178	631-651	A-170578	UCAUUGUGGAUGACGAGGUGGAA	362	629-651
AD-85640	A-168511	UCACUUUCCAGCAAAACUCCA	179	1584-1604	A-170579	UGGAGUUUUGCUGGAAAGUGAGA	363	1582-1604
AD-85641	A-168513	UCCCUCAACUGGAUGAAGAAA	180	1601-1621	A-170580	UUUCUUCAUCCAGUUGAGGGAGU	364	1599-1621
AD-85642	A-168515	GAGAGUACCUGUGAGCAGCUA	181	650-670	A-170581	UAGCUGCUCACAGGUACUCUCAU	365	648-670
AD-85643	A-168517	AGAAUUCCAACCGACCAGCUU	182	2273-2293	A-170582	AAGCUGGUCGGUUGGAAUUCUUU	366	2271-2293
AD-85644	A-168519	CAUUCCUGUUUGCUGUGUAUA	183	1884-1904	A-170583	UAUACACAGCAAACAGGAAUGGG	367	1882-1904
AD-85645	A-168521	GAAUUCCAACCGACCAGCUUA	184	2274-2294	A-170584	UAAGCUGGUCGGUUGGAAUUCUU	368	2272-2294
AD-85646	A-168523	CAUCCACAAUGAGAGUACCUA	185	640-660	A-170585	UAGGUACUCUCAUUGUGGAUGAC	369	638-660
AD-85647	A-168525	CCCAUUCCUGUUUGCUGUGUA	186	1882-1902	A-170586	UACACAGCAAACAGGAAUGGGCG	370	1880-1902

Nombre de dúplex	Nombre de oligo sentido	Secuencia sentido 5' a 3'	SEQ ID N°:	Rango en NM_000029.3	Nombre de Oligo antisentido	Secuencia antisentido 5' a 3'	SEQ ID N°:	Rango en NM_000029.3
AD-85648	A-168527	CUGGGUUUAUUUUAGAGAAUA	187	2202-2222	A-170587	UAUUCUCUAAAAUAAACCCAGCA	371	2200-2222
AD-85649	A-168529	GCUGGGUUUAUUUUAGAGAAU	188	2201-2221	A-170588	AUUCUCUAAAAUAAACCCAGCAA	372	2199-2221
AD-85650	A-168531	AUGGCAUGCACAGUGAGCUAU	189	861-881	A-170589	AUAGCUCACUGUGCAUGCCAUAU	373	859-881
AD-85651	A-168533	GAGAGAGCCCACAGAGUCUAA	190	1816-1836	A-170590	UUAGACUCUGUGGGCUCUCUCUC	374	1814-1836
AD-85652	A-168535	GCAAGAACCAGUGUUUAGCGA	191	2234-2254	A-170591	UCGCUAAACACUGGUUCUUGCCU	375	2232-2254
AD-85653	A-168537	CCAGCAAAACUCCCUCAACUA	192	1591-1611	A-170592	UAGUUGAGGGAGUUUUGCUGGAA	376	1589-1611
AD-85654	A-168539	CACCUCGUCAUCCACAAUGAA	193	632-652	A-170593	UUCAUUGUGGAUGACGAGGUGGA	377	630-652
AD-85655	A-168541	CGUCAUCCACAAUGAGAGUAA	194	637-657	A-170594	UUACUCUCAUUGUGGAUGACGAG	378	635-657
AD-85656	A-168543	CUCCCACGCUCUCUGGACUUA	195	1211-1231	A-170595	UAAGUCCAGAGAGCGUGGGAGGA	379	1209-1231
AD-85657	A-168545	AACUCCCUCAACUGGAUGAAA	196	1598-1618	A-170596	UUUCAUCCAGUUGAGGGAGUUUU	380	1596-1618
AD-85658	A-168547	UGAGAAGAUUGACAGGUUCAU	197	1252-1272	A-170597	AUGAACCUGUCAAUCUUCUCAGC	381	1250-1272
AD-85659	A-168549	CCUCGUCAUCCACAAUGAGAA	198	634-654	A-170598	UUCUCAUUGUGGAUGACGAGGUG	382	632-654
AD-85660	A-168551	GAGAAGAUUGACAGGUUCAUA	199	1253-1273	A-170599	UAUGAACCUGUCAAUCUUCUCAG	383	1251-1273
AD-85661	A-168553	CUUCUUGGGCUUCCGUAUAUA	200	841-861	A-170600	UAUAUACGGAAGCCCAAGAAGUU	384	839-861

Nombre de dúplex	Nombre de oligo sentido	Secuencia sentido 5’ a 3’	SEQ ID N°:	Rango en NM_000029.3	Nombre de Oligo antisentido	Secuencia antisentido 5’ a 3’	SEQ ID N°:	Rango en NM_000029.3
AD-85662	A-168555	UCCACCUCGUCAUCCACAAUA	201	630-650	A-170601	UAUUGUGGAUGACGAGGUGGAAG	385	628-650
AD-85663	A-168557	AGAUUGACAGGUUCAUGCAGA	202	1257-1277	A-170602	UCUGCAUGAACCUGUCAAUCUUC	386	1255-1277
AD-85664	A-168559	CUCCCUCAACUGGAUGAAGAA	203	1600-1620	A-170603	UUCUUCAUCCAGUUGAGGGAGUU	387	1598-1620
AD-85665	A-168561	AAUGAGAGUACCUGUGAGCAA	204	647-667	A-170604	UUGCUCACAGGUACUCUCAUUGU	388	645-667

Tabla 4. Tamizado de dosis individual de AGT 10 nM y 0,1 nM en células Hep3B

ID dúplex	Prom. 10 nM	Desv. Est. 10 nM	Prom. 0,1 nM	Desv. Est. 0,1 nM
AD-67327	6,2	1,5	30,1	5,9
AD-84700	14,5	5,7	127,9	53,6
AD-84701	8,7	6,5	59,7	5,5
AD-84702	11,4	4,2	95,1	14,6
AD-84703	6,7	4,2	36,7	2,4
AD-84704	7,2	4,3	54,9	5,5
AD-84705	7,8	2,3	52,7	10,3
AD-84706	6,3	4,3	65,0	13,0
AD-84707	10,2	9,2	52,2	2,6
AD-84708	10,1	4,1	98,7	24,6
AD-84709	19,0	4,3	102,7	18,5
AD-84710	11,3	7,9	65,9	19,0
AD-84711	10,4	6,5	66,5	13,8
AD-84712	7,5	6,4	66,4	13,9
AD-84713	9,7	5,9	66,4	5,6
AD-84714	13,7	2,0	89,0	28,9
AD-84715	7,7	5,3	59,0	2,7
AD-84716	7,4	2,4	45,9	15,0
AD-84717	14,6	4,2	102,9	15,8
AD-84718	6,8	0,7	66,9	8,3
AD-84719	21,1	4,0	92,5	19,6

ID dúplex	Prom. 10 nM	Desv. Est. 10 nM	Prom. 0,1 nM	Desv. Est. 0,1 nM
AD-84720	11,3	0,4	96,0	22,1
AD-84721	14,7	5,2	88,4	12,7
AD-84722	35,9	14,8	106,6	21,2
AD-84723	13,4	6,5	83,7	25,9
AD-84724	20,8	6,7	108,0	17,6
AD-84725	17,4	1,2	100,5	22,3
AD-84726	9,7	0,6	73,1	9,0
AD-84727	16,5	5,0	102,4	20,5
AD-84728	17,6	2,6	103,6	12,8
AD-84729	11,6	3,4	78,9	16,1
AD-84730	11,2	1,5	77,6	8,7
AD-84731	11,4	2,9	80,4	15,9
AD-84732	26,9	2,6	88,2	19,5
AD-84733	21,4	2,2	101,5	13,9
AD-84734	20,4	1,9	92,8	20,5
AD-84735	11,4	1,9	85,0	6,0
AD-84736	8,4	2,5	68,0	20,7
AD-84737	22,9	4,0	80,0	13,1
AD-84738	16,0	1,8	98,3	29,5
AD-84739	6,6	2,1	40,5	6,8
AD-84740	10,2	1,8	78,9	32,7
AD-84741	6,3	1,0	37,0	9,7
AD-84742	14,1	2,0	86,9	7,4

ID dúplex	Prom. 10 nM	Desv. Est. 10 nM	Prom. 0,1 nM	Desv. Est. 0,1 nM
AD-84743	80,9	9,9	97,6	16,5
AD-84744	23,1	5,8	93,4	18,9
AD-84745	27,8	5,0	79,2	25,3
AD-84746	7,5	1,2	48,0	14,4
AD-85431	12,3	3,9	61,8	29,6
AD-85432	10,1	6,6	50,5	19,8
AD-85433	11,5	4,0	61,4	25,4
AD-85434	5,8	2,5	37,2	20,4
AD-85435	7,3	1,8	44,9	17,8
AD-85436	8,2	4,9	35,2	12,8
AD-85437	7,2	6,3	30,4	18,6
AD-85438	10,4	7,5	41,8	18,1
AD-85439	15,4	3,8	62,1	25,9
AD-85440	26,1	5,1	85,5	34,7
AD-85441	9,9	7,4	50,6	19,3
AD-85442	8,4	5,2	52,4	20,4
AD-85443	11,5	12,9	59,0	25,0
AD-85444	8,4	4,4	48,6	24,9
AD-85445	21,7	6,8	63,2	36,1
AD-85446	14,7	11,5	59,0	27,5
AD-85447	8,4	2,9	52,8	15,5
AD-85448	12,6	4,0	89,5	25,2
AD-85449	8,3	1,5	72,7	14,2

ID dúplex	Prom. 10 nM	Desv. Est. 10 nM	Prom. 0,1 nM	Desv. Est. 0,1 nM
AD-85450	35,3	6,3	91,4	30,0
AD-85451	17,7	2,3	80,7	20,8
AD-85452	21,5	5,2	73,3	27,4
AD-85453	60,5	32,6	69,0	33,9
AD-85454	21,8	8,6	63,2	23,6
AD-85455	34,0	12,4	88,8	23,4
AD-85456	21,6	1,4	91,9	18,1
AD-85457	12,1	2,6	85,6	28,0
AD-85458	29,8	7,1	98,1	25,4
AD-85459	23,8	2,0	101,2	34,7
AD-85460	9,9	1,8	69,0	12,7
AD-85461	11,0	3,7	60,1	13,4
AD-85462	25,7	4,1	78,5	6,8
AD-85463	56,6	13,1	89,7	20,5
AD-85464	21,8	6,3	99,8	34,4
AD-85465	25,2	6,2	99,2	24,6
AD-85466	35,3	8,4	104,2	31,5
AD-85467	12,7	2,7	82,2	8,4
AD-85468	30,9	6,5	93,0	31,2
AD-85469	44,7	8,0	82,1	13,4
AD-85470	7,9	4,6	66,7	11,2
AD-85471	15,8	3,7	95,3	14,0
AD-85472	9,3	3,3	71,3	15,1

ID dúplex	Prom. 10 nM	Desv. Est. 10 nM	Prom. 0,1 nM	Desv. Est. 0,1 nM
AD-85473	21,5	3,9	102,2	22,4
AD-85474	100,2	24,5	110,4	21,9
AD-85475	28,7	8,6	105,2	31,1
AD-85476	35,5	10,2	81,4	13,1
AD-85477	10,1	2,2	76,9	30,6
AD-85478	15,1	1,9	94,6	27,5
AD-85479	18,7	5,8	92,1	26,6
AD-85480	11,8	4,1	68,8	16,7
AD-85481	5,3	1,1	32,9	8,7
AD-85482	7,1	3,4	52,7	11,5
AD-85483	7,9	3,0	61,1	15,3
AD-85484	11,5	3,3	84,6	8,8
AD-85485	11,6	5,5	58,9	19,7
AD-85486	25,3	6,2	94,8	21,4
AD-85487	40,5	10,2	101,0	24,4
AD-85488	32,8	7,4	97,6	24,2
AD-85489	12,8	4,0	87,2	20,9
AD-85490	7,6	0,8	78,5	20,2
AD-85491	12,5	4,5	92,3	19,0
AD-85492	89,7	17,7	112,3	20,2
AD-85493	6,3	2,6	51,0	14,5
AD-85494	11,0	2,4	79,8	24,0
AD-85495	10,4	2,8	70,1	23,2

ID dúplex	Prom. 10 nM	Desv. Est. 10 nM	Prom. 0,1 nM	Desv. Est. 0,1 nM
AD-85496	6,8	2,2	55,0	20,8
AD-85497	72,4	18,6	108,5	36,5
AD-85498	7,3	2,3	85,3	26,5
AD-85499	94,7	6,8	104,2	24,5
AD-85500	63,1	21,9	98,4	21,4
AD-85501	38,3	12,3	129,0	47,3
AD-85502	27,2	8,3	92,0	21,9
AD-85503	36,2	11,5	108,3	25,4
AD-85504	9,2	3,7	56,1	9,4
AD-85505	50,3	12,2	111,6	15,5
AD-85506	40,8	8,7	109,4	31,6
AD-85507	7,7	2,2	64,3	22,6
AD-85508	82,0	21,9	100,9	29,0
AD-85509	20,9	5,5	101,5	23,0
AD-85510	104,0	28,6	90,1	42,0
AD-85511	14,1	2,6	84,2	9,3
AD-85512	50,6	14,7	98,5	30,7
AD-85513	35,0	9,0	78,5	24,4
AD-85514	13,0	0,9	80,3	27,9
AD-85515	69,1	5,7	72,5	35,1
AD-85516	54,0	16,1	88,4	38,9
AD-85517	7,4	1,3	47,9	7,0
AD-85518	12,0	4,6	79,4	42,4

ID dúplex	Prom. 10 nM	Desv. Est. 10 nM	Prom. 0,1 nM	Desv. Est. 0,1 nM
AD-85519	8,9	2,5	54,6	6,2
AD-85520	10,9	3,0	81,3	19,1
AD-85521	79,1	15,6	108,4	35,4
AD-85522	51,3	10,1	114,7	27,9
AD-85523	23,6	2,9	91,3	26,6
AD-85524	9,9	2,8	46,9	10,8
AD-85619	20,7	1,0	114,4	53,5
AD-85620	20,0	5,8	96,8	25,7
AD-85621	8,9	6,9	80,4	20,3
AD-85622	6,4	3,7	50,2	12,9
AD-85623	7,6	6,0	38,0	4,6
AD-85624	9,2	3,7	81,0	15,9
AD-85625	6,0	2,4	58,9	8,7
AD-85626	7,6	6,3	43,8	3,9
AD-85627	25,5	8,3	103,0	20,0
AD-85628	39,0	7,3	114,5	19,9
AD-85629	23,6	18,5	86,1	14,8
AD-85630	17,2	15,9	83,0	22,5
AD-85631	10,1	6,2	79,0	18,2
AD-85632	10,2	4,3	67,5	10,8
AD-85633	42,1	19,9	95,1	4,5
AD-85634	7,5	2,9	54,6	11,7
AD-85635	8,2	2,6	53,5	24,0

ID dúplex	Prom. 10 nM	Desv. Est. 10 nM	Prom. 0,1 nM	Desv. Est. 0,1 nM
AD-85636	11,4	2,2	96,0	23,7
AD-85637	9,9	5,9	58,2	17,0
AD-85638	53,1	6,2	112	31,1
AD-85639	13,7	2,1	96,9	19,6
AD-85640	72,8	11,7	106,9	7,2
AD-85641	47,2	19,8	89,6	9,5
AD-85642	15,3	3,5	86,7	24,5
AD-85643	35,4	12,9	494,9	779,7
AD-85644	79,0	7,2	110,6	23,5
AD-85645	7,8	1,2	63,6	13,1
AD-85646	33,6	8,6	105,6	28,1
AD-85647	19,4	3,1	102,3	9,7
AD-85648	49,0	6,6	106,0	10,7
AD-85649	18,5	2,9	82,4	10,1
AD-85650	69,4	19,0	87,2	15,6
AD-85651	90,4	17,3	106,9	31,9
AD-85652	31,3	8,5	90,0	37,7
AD-85653	47,6	2,8	104,1	20,6
AD-85654	66,7	3,7	97,5	17,8
AD-85655	10,4	0,8	55,4	6,9
AD-85656	96,7	4,3	98,6	23,4
AD-85657	83,6	3,3	86,6	31,4
AD-85658	7,6	1,8	65,4	9,2

ID dúplex	Prom. 10 nM	Desv. Est. 10 nM	Prom. 0,1 nM	Desv. Est. 0,1 nM
AD-85659	14,1	4,2	76,0	33,0
AD-85660	40,9	6,5	95,8	24,0
AD-85661	63,6	10,4	93,0	34,1
AD-85662	83,4	11,5	87,3	17,2
AD-85663	23,0	5,3	79,1	30,8
AD-85664	44,8	2,9	112,2	19,9
AD-85665	13,5	2,5	81,0	25,4

Tabla 5. Secuencias de hebras sentido y antisentido modificadas de los agentes de ARNhd contra el AGTh

Nombre de dúplex	Secuencia sentido modificada 5' a 3'	SEQ ID N°:	Secuencia antisentido modificada 5' a 3'	SEQ ID Nº:	Secuencia de ARNm blanco 5' a 3'	SEQ ID Nº:
AD-84704	csascaauGfaGfAfGfuaccugugaaL96	389	usUfscacAfgGfUfacucUfcAfuugugsgsa	573	UCCACAAUGAGAGUACCUGUGAG	757
AD-84705	gsuscuccCfaCfCfUfuuucuucuaaL96	390	usUfsagaAfgAfAfaaggUfgGfgagacsusg	574	CAGUCUCCCACCUUUUCUUCUAA	758
AD-84706	ascsuuucCfaGfCfAfaaacucccuaL96	391	usAfsgggAfgUfUfuugcUfgGfaaagusgsa	575	UCACUUUCCAGCAAAACUCCCUC	759
AD-84707	cscsucaaCfuGfGfAfugaagaaacuL96	392	asGfsuuuCfuUfCfauccAfgUfugaggsgsa	576	UCCCUCAACUGGAUGAAGAAACU	760
AD-84708	csusguuuGfcUfGfUfguaugaucaaL96	393	usUfsgauCfaUfAfcacaGfcAfaacagsgsa	577	UCCUGUUUGCUGUGUAUGAUCAA	761
AD-84709	ususugcuGfuGfUfAfugaucaaagaL96	394	usCfsuuuGfaUfCfauacAfcAfgcaaascsa	578	UGUUUGCUGUGUAUGAUCAAAGC	762
AD-84710	cscsgaccAfgCfUfUfguuugugaaaL96	395	usUfsucaCfaAfAfcaagCfuGfgucggsusu	579	AACCGACCAGCUUGUUUGUGAAA	763
AD-84711	uscscaacCfgAfCfCfagcuuguuuaL96	396	usAfsaacAfaGfCfugguCfgGfuuggasasu	580	AUUCCAACCGACCAGCUUGUUUG	764
AD-84712	cscsauucCfuGfUfUfugcuguguauL96	397	asUfsacaCfaGfCfaaacAfgGfaauggsgsc	581	GCCCAUUCCUGUUUGCUGUGUAU	765
AD-84713	csasccuuUfuCfUfUfcuaaugaguaL96	398	usAfscucAfuUfAfgaagAfaAfaggugsgsg	582	CCCACCUUUUCUUCUAAUGAGUC	766
AD-84714	gsusuugcUfgUfGfUfaugaucaaaaL96	399	usUfsuugAfuCfAfuacaCfaGfcaaacsasg	583	CUGUUUGCUGUGUAUGAUCAAAG	767
AD-84715	gscsugagAfaGfAfUfugacagguuaL96	400	usAfsaccUfgUfCfaaucUfuCfucagcsasg	584	CUGCUGAGAAGAUUGACAGGUUC	768

Nombre de dúplex	Secuencia sentido modificada 5' a 3'	SEQ ID N°:	Secuencia antisentido modificada 5' a 3'	SEQ ID Nº:	Secuencia de ARNm blanco 5' a 3'	SEQ ID Nº:
AD-84716	ususccagCfaAfAfAfcucccucaaaL96	401	usUfsugaGfgGfAfguuuUfgCfuggaasasg	585	CUUUCCAGCAAAACUCCCUCAAC	769
AD-84717	usgscugaGfaAfGfAfuugacagguuL96	402	asAfsccuGfuCfAfaucuUfcUfcagcasgsc	586	GCUGCUGAGAAGAUUGACAGGUU	770
AD-84718	uscsucacUfuUfCfCfagcaaaacuaL96	403	usAfsguuUfuGfCfuggaAfaGfugagascsc	587	GGUCUCACUUUCCAGCAAAACUC	771
AD-84719	uscscacaAfuGfAfGfaguaccuguaL96	404	usAfscagGfuAfCfucucAfuUfguggasusg	588	CAUCCACAAUGAGAGUACCUGUG	772
AD-84720	cscsaccuCfgUfCfAfuccacaaugaL96	405	usCfsauuGfuGfGfaugaCfgAfgguggsasa	589	UUCCACCUCGUCAUCCACAAUGA	773
AD-84721	uscsacuuUfcCfAfGfcaaaacuccaL96	406	usGfsgagUfuUfUfgcugGfaAfagugasgsa	590	UCUCACUUUCCAGCAAAACUCCC	774
AD-84722	uscsccucAfaCfUfGfgaugaagaaaL96	407	usUfsucuUfcAfUfccagUfuGfagggasgsu	591	ACUCCCUCAACUGGAUGAAGAAA	775
AD-84723	gsasgaguAfcCfUfGfugagcagcuaL96	408	usAfsgcuGfcUfCfacagGfuAfcucucsasu	592	AUGAGAGUACCUGUGAGCAGCUG	776
AD-84724	asgsaauuCfcAfAfCfcgaccagcuuL96	409	asAfsgcuGfgUfCfgguuGfgAfauucususu	593	AAAGAAUUCCAACCGACCAGCUU	777
AD-84725	csasuuccUfgUfUfUfgcuguguauaL96	410	usAfsuacAfcAfGfcaaaCfaGfgaaugsgsg	594	CCCAUUCCUGUUUGCUGUGUAUG	778
AD-84726	gsasauucCfaAfCfCfgaccagcuuaL96	411	usAfsagcUfgGfUfcgguUfgGfaauucsusu	595	AAGAAUUCCAACCGACCAGCUUG	779
AD-84727	csasuccaCfaAfUfGfagaguaccuaL96	412	usAfsgguAfcUfCfucauUfgUfggaugsasc	596	GUCAUCCACAAUGAGAGUACCUG	780
AD-84728	cscscauuCfcUfGfUfuugcuguguaL96	413	usAfscacAfgCfAfaacaGfgAfaugggscsg	597	CGCCCAUUCCUGUUUGCUGUGUA	781
AD-84729	csusggguUfuAfUfUfuuagagaauaL96	414	usAfsuucUfcUfAfaaauAfaAfcccagscsa	598	UGCUGGGUUUAUUUUAGAGAAUG	782

Nombre de dúplex	Secuencia sentido modificada 5' a 3'	SEQ ID N°:	Secuencia antisentido modificada 5' a 3'	SEQ ID Nº:	Secuencia de ARNm blanco 5' a 3'	SEQ ID Nº:
AD-84730	gscsugggUfuUfAfUfuuuagagaauL96	415	asUfsucuCfuAfAfaauaAfaCfccagcsasa	599	UUGCUGGGUUUAUUUUAGAGAAU	783
AD-84731	asusggcaUfgCfAfCfagugagcuauL96	416	asUfsagcUfcAfCfugugCfaUfgccausasu	600	AUAUGGCAUGCACAGUGAGCUAU	784
AD-84732	gsasgagaGfcCfCfAfcagagucuaaL96	417	usUfsagaCfuCfUfguggGfcUfcucucsusc	601	GAGAGAGAGCCCACAGAGUCUAC	785
AD-84733	gscsaagaAfcCfAfGfuguuuagcgaL96	418	usCfsgcuAfaAfCfacugGfuUfcuugcscsu	602	AGGCAAGAACCAGUGUUUAGCGC	786
AD-84734	cscsagcaAfaAfCfUfcccucaacuaL96	419	usAfsguuGfaGfGfgaguUfuUfgcuggsasa	603	UUCCAGCAAAACUCCCUCAACUG	787
AD-84735	csasccucGfuCfAfUfccacaaugaaL96	420	usUfscauUfgUfGfgaugAfcGfaggugsgsa	604	UCCACCUCGUCAUCCACAAUGAG	788
AD-84736	csgsucauCfcAfCfAfaugagaguaaL96	421	usUfsacuCfuCfAfuuguGfgAfugacgsasg	605	CUCGUCAUCCACAAUGAGAGUAC	789
AD-84737	csuscccaCfgCfUfCfucuggacuuaL96	422	usAfsaguCfcAfGfagagCfgUfgggagsgsa	606	UCCUCCCACGCUCUCUGGACUUC	790
AD-84738	asascuccCfuCfAfAfcuggaugaaaL96	423	usUfsucaUfcCfAfguugAfgGfgaguususu	607	AAAACUCCCUCAACUGGAUGAAG	791
AD-84739	usgsagaaGfaUfUfGfacagguucauL96	424	asUfsgaaCfcUfGfucaaUfcUfucucasgsc	608	GCUGAGAAGAUUGACAGGUUCAU	792
AD-84740	cscsucguCfaUfCfCfacaaugagaaL96	425	usUfscucAfuUfGfuggaUfgAfcgaggsusg	609	CACCUCGUCAUCCACAAUGAGAG	793
AD-84741	gsasgaagAfuUfGfAfcagguucauaL96	426	usAfsugaAfcCfUfgucaAfuCfuucucsasg	610	CUGAGAAGAUUGACAGGUUCAUG	794
AD-84742	csusucuuGfgGfCfUfuccguauauaL96	427	usAfsuauAfcGfGfaagcCfcAfagaagsusu	611	AACUUCUUGGGCUUCCGUAUAUA	795
AD-84743	uscscaccUfcGfUfCfauccacaauaL96	428	usAfsuugUfgGfAfugacGfaGfguggasasg	612	CUUCCACCUCGUCAUCCACAAUG	796

Nombre de dúplex	Secuencia sentido modificada 5' a 3'	SEQ ID N°:	Secuencia antisentido modificada 5' a 3'	SEQ ID Nº:	Secuencia de ARNm blanco 5' a 3'	SEQ ID Nº:
AD-84744	asgsauugAfcAfGfGfuucaugcagaL96	429	usCfsugcAfuGfAfaccuGfuCfaaucususc	613	GAAGAUUGACAGGUUCAUGCAGG	797
AD-84745	csuscccuCfaAfCfUfggaugaagaaL96	430	usUfscuuCfaUfCfcaguUfgAfgggagsusu	614	AACUCCCUCAACUGGAUGAAGAA	798
AD-84746	asasugagAfgUfAfCfcugugagcaaL96	431	usUfsgcuCfaCfAfgguaCfuCfucauusgsu	615	ACAAUGAGAGUACCUGUGAGCAG	799
AD-85431	cscsaccuUfuUfCfUfucuaaugaguL96	432	asCfsucauuagaagaAfaAfgguggsgsa	616	UCCCACCUUUUCUUCUAAUGAGU	800
AD-85432	csgsaccaGfcUfUfGfuuugugaaaaL96	433	usUfsuucacaaacaaGfcUfggucgsgsu	617	ACCGACCAGCUUGUUUGUGAAAC	801
AD-85433	ascscuuuUfcUfUfCfuaaugagucaL96	434	usGfsacucauuagaaGfaAfaaggusgsg	618	CCACCUUUUCUUCUAAUGAGUCG	802
AD-85434	gsuscaucCfaCfAfAfugagaguacaL96	435	usGfsuacucucauugUfgGfaugacsgsa	619	UCGUCAUCCACAAUGAGAGUACC	803
AD-85435	csascaauGfaGfAfGfuaccugugaaL96	436	usUfscacagguacucUfcAfuugugsgsa	620	UCCACAAUGAGAGUACCUGUGAG	804
AD-85436	gsuscuccCfaCfCfUfuuucuucuaaL96	437	usUfsagaagaaaaggUfgGfgagacsusg	621	CAGUCUCCCACCUUUUCUUCUAA	805
AD-85437	ascsuuucCfaGfCfAfaaacucccuaL96	438	usAfsgggaguuuugcUfgGfaaagusgsa	622	UCACUUUCCAGCAAAACUCCCUC	806
AD-85438	cscsucaaCfuGfGfAfugaagaaacuL96	439	asGfsuuucuucauccAfgUfugaggsgsa	623	UCCCUCAACUGGAUGAAGAAACU	807
AD-85439	csusguuuGfcUfGfUfguaugaucaaL96	440	usUfsgaucauacacaGfcAfaacagsgsa	624	UCCUGUUUGCUGUGUAUGAUCAA	808
AD-85440	ususugcuGfuGfUfAfugaucaaagaL96	441	usCfsuuugaucauacAfcAfgcaaascsa	625	UGUUUGCUGUGUAUGAUCAAAGC	809
AD-85441	cscsgaccAfgCfUfUfguuugugaaaL96	442	usUfsucacaaacaagCfuGfgucggsusu	626	AACCGACCAGCUUGUUUGUGAAA	810

Nombre de dúplex	Secuencia sentido modificada 5' a 3'	SEQ ID N°:	Secuencia antisentido modificada 5' a 3'	SEQ ID Nº:	Secuencia de ARNm blanco 5' a 3'	SEQ ID Nº:
AD-85442	uscscaacCfgAfCfCfagcuuguuuaL96	443	usAfsaacaagcugguCfgGfuuggasasu	627	AUUCCAACCGACCAGCUUGUUUG	811
AD-85443	cscsauucCfuGfUfUfugcuguguauL96	444	asUfsacacagcaaacAfgGfaauggsgsc	628	GCCCAUUCCUGUUUGCUGUGUAU	812
AD-85444	csasccuuUfuCfUfUfcuaaugaguaL96	445	usAfscucauuagaagAfaAfaggugsgsg	629	CCCACCUUUUCUUCUAAUGAGUC	813
AD-85445	gsusuugcUfgUfGfUfaugaucaaaaL96	446	usUfsuugaucauacaCfaGfcaaacsasg	630	CUGUUUGCUGUGUAUGAUCAAAG	814
AD-85446	gscsugagAfaGfAfUfugacagguuaL96	447	usAfsaccugucaaucUfuCfucagcsasg	631	CUGCUGAGAAGAUUGACAGGUUC	815
AD-85447	ususccagCfaAfAfAfcucccucaaaL96	448	usUfsugagggaguuuUfgCfuggaasasg	632	CUUUCCAGCAAAACUCCCUCAAC	816
AD-85448	usgscugaGfaAfGfAfuugacagguuL96	449	asAfsccugucaaucuUfcUfcagcasgsc	633	GCUGCUGAGAAGAUUGACAGGUU	817
AD-85449	uscsucacUfuUfCfCfagcaaaacuaL96	450	usAfsguuuugcuggaAfaGfugagascsc	634	GGUCUCACUUUCCAGCAAAACUC	818
AD-85450	uscscacaAfuGfAfGfaguaccuguaL96	451	usAfscagguacucucAfuUfguggasusg	635	CAUCCACAAUGAGAGUACCUGUG	819
AD-85451	cscsaccuCfgUfCfAfuccacaaugaL96	452	usCfsauuguggaugaCfgAfgguggsasa	636	UUCCACCUCGUCAUCCACAAUGA	820
AD-85452	uscsacuuUfcCfAfGfcaaaacuccaL96	453	usGfsgaguuuugcugGfaAfagugasgsa	637	UCUCACUUUCCAGCAAAACUCCC	821
AD-85453	uscsccucAfaCfUfGfgaugaagaaaL96	454	usUfsucuucauccagUfuGfagggasgsu	638	ACUCCCUCAACUGGAUGAAGAAA	822
AD-85454	gsasgaguAfcCfUfGfugagcagcuaL96	455	usAfsgcugcucacagGfuAfcucucsasu	639	AUGAGAGUACCUGUGAGCAGCUG	823
AD-85455	asgsaauuCfcAfAfCfcgaccagcuuL96	456	asAfsgcuggucgguuGfgAfauucususu	640	AAAGAAUUCCAACCGACCAGCUU	824

Nombre de dúplex	Secuencia sentido modificada 5' a 3'	SEQ ID N°:	Secuencia antisentido modificada 5' a 3'	SEQ ID Nº:	Secuencia de ARNm blanco 5' a 3'	SEQ ID Nº:
AD-85456	csasuuccUfgUfUfUfgcuguguauaL96	457	usAfsuacacagcaaaCfaGfgaaugsgsg	641	CCCAUUCCUGUUUGCUGUGUAUG	825
AD-85457	gsasauucCfaAfCfCfgaccagcuuaL96	458	usAfsagcuggucgguUfgGfaauucsusu	642	AAGAAUUCCAACCGACCAGCUUG	826
AD-85458	csasuccaCfaAfUfGfagaguaccuaL96	459	usAfsgguacucucauUfgUfggaugsasc	643	GUCAUCCACAAUGAGAGUACCUG	827
AD-85459	cscscauuCfcUfGfUfuugcuguguaL96	460	usAfscacagcaaacaGfgAfaugggscsg	644	CGCCCAUUCCUGUUUGCUGUGUA	828
AD-85460	csusggguUfuAfUfUfuuagagaauaL96	461	usAfsuucucuaaaauAfaAfcccagscsa	645	UGCUGGGUUUAUUUUAGAGAAUG	829
AD-85461	gscsugggUfuUfAfUfuuuagagaauL96	462	asUfsucucuaaaauaAfaCfccagcsasa	646	UUGCUGGGUUUAUUUUAGAGAAU	830
AD-85462	asusggcaUfgCfAfCfagugagcuauL96	463	asUfsagcucacugugCfaUfgccausasu	647	AUAUGGCAUGCACAGUGAGCUAU	831
AD-85463	gsasgagaGfcCfCfAfcagagucuaaL96	464	usUfsagacucuguggGfcUfcucucsusc	648	GAGAGAGAGCCCACAGAGUCUAC	832
AD-85464	gscsaagaAfcCfAfGfuguuuagcgaL96	465	usCfsgcuaaacacugGfuUfcuugcscsu	649	AGGCAAGAACCAGUGUUUAGCGC	833
AD-85465	cscsagcaAfaAfCfUfcccucaacuaL96	466	usAfsguugagggaguUfuUfgcuggsasa	650	UUCCAGCAAAACUCCCUCAACUG	834
AD-85466	csasccucGfuCfAfUfccacaaugaaL96	467	usUfscauuguggaugAfcGfaggugsgsa	651	UCCACCUCGUCAUCCACAAUGAG	835
AD-85467	csgsucauCfcAfCfAfaugagaguaaL96	468	usUfsacucucauuguGfgAfugacgsasg	652	CUCGUCAUCCACAAUGAGAGUAC	836
AD-85468	csuscccaCfgCfUfCfucuggacuuaL96	469	usAfsaguccagagagCfgUfgggagsgsa	653	UCCUCCCACGCUCUCUGGACUUC	837
AD-85469	asascuccCfuCfAfAfcuggaugaaaL96	470	usUfsucauccaguugAfgGfgaguususu	654	AAAACUCCCUCAACUGGAUGAAG	838

Nombre de dúplex	Secuencia sentido modificada 5' a 3'	SEQ ID N°:	Secuencia antisentido modificada 5' a 3'	SEQ ID Nº:	Secuencia de ARNm blanco 5' a 3'	SEQ ID Nº:
AD-85470	usgsagaaGfaUfUfGfacagguucauL96	471	asUfsgaaccugucaaUfcUfucucasgsc	655	GCUGAGAAGAUUGACAGGUUCAU	839
AD-85471	cscsucguCfaUfCfCfacaaugagaaL96	472	usUfscucauuguggaUfgAfcgaggsusg	656	CACCUCGUCAUCCACAAUGAGAG	840
AD-85472	gsasgaagAfuUfGfAfcagguucauaL96	473	usAfsugaaccugucaAfuCfuucucsasg	657	CUGAGAAGAUUGACAGGUUCAUG	841
AD-85473	csusucuuGfgGfCfUfuccguauauaL96	474	usAfsuauacggaagcCfcAfagaagsusu	658	AACUUCUUGGGCUUCCGUAUAUA	842
AD-85474	uscscaccUfcGfUfCfauccacaauaL96	475	usAfsuuguggaugacGfaGfguggasasg	659	CUUCCACCUCGUCAUCCACAAUG	843
AD-85475	asgsauugAfcAfGfGfuucaugcagaL96	476	usCfsugcaugaaccuGfuCfaaucususc	660	GAAGAUUGACAGGUUCAUGCAGG	844
AD-85476	csuscccuCfaAfCfUfggaugaagaaL96	477	usUfscuucauccaguUfgAfgggagsusu	661	AACUCCCUCAACUGGAUGAAGAA	845
AD-85477	asasugagAfgUfAfCfcugugagcaaL96	478	usUfsgcucacagguaCfuCfucauusgsu	662	ACAAUGAGAGUACCUGUGAGCAG	846
AD-85478	cscsaccuUfuUfCfUfucuaaugaguL96	479	asCfsuca(Tgn)uagaagaAfaAfgguggsgsa	663	UCCCACCUUUUCUUCUAAUGAGU	847
AD-85479	csgsaccaGfcUfUfGfuuugugaaaaL96	480	usUfsuuc(Agn)caaacaaGfcUfggucgsgsu	664	ACCGACCAGCUUGUUUGUGAAAC	848
AD-85480	ascscuuuUfcUfUfCfuaaugagucaL96	481	usGfsacu(Cgn)auuagaaGfaAfaaggusgsg	665	CCACCUUUUCUUCUAAUGAGUCG	849
AD-85481	gsuscaucCfaCfAfAfugagaguacaL96	482	usGfsuac(Tgn)cucauugUfgGfaugacsgsa	666	UCGUCAUCCACAAUGAGAGUACC	850
AD-85482	csascaauGfaGfAfGfuaccugugaaL96	483	usUfscac(Agn)gguacucUfcAfuugugsgsa	667	UCCACAAUGAGAGUACCUGUGAG	851
AD-85483	gsuscuccCfaCfCfUfuuucuucuaaL96	484	usUfsaga(Agn)gaaaaggUfgGfgagacsusg	668	CAGUCUCCCACCUUUUCUUCUAA	852

Nombre de dúplex	Secuencia sentido modificada 5' a 3'	SEQ ID N°:	Secuencia antisentido modificada 5' a 3'	SEQ ID Nº:	Secuencia de ARNm blanco 5' a 3'	SEQ ID Nº:
AD-85484	ascsuuucCfaGfCfAfaaacucccuaL96	485	usAfsggg(Agn)guuuugcUfgGfaaagusgsa	669	UCACUUUCCAGCAAAACUCCCUC	853
AD-85485	cscsucaaCfuGfGfAfugaagaaacuL96	486	asGfsuuu(Cgn)uucauccAfgUfugaggsgsa	670	UCCCUCAACUGGAUGAAGAAACU	854
AD-85486	csusguuuGfcUfGfUfguaugaucaaL96	487	usUfsgau(Cgn)auacacaGfcAfaacagsgsa	671	UCCUGUUUGCUGUGUAUGAUCAA	855
AD-85487	ususugcuGfuGfUfAfugaucaaagaL96	488	usCfsuuu(Ggn)aucauacAfcAfgcaaascsa	672	UGUUUGCUGUGUAUGAUCAAAGC	856
AD-85488	cscsgaccAfgCfUfUfguuugugaaaL96	489	usUfsuca(Cgn)aaacaagCfuGfgucggsusu	673	AACCGACCAGCUUGUUUGUGAAA	857
AD-85489	uscscaacCfgAfCfCfagcuuguuuaL96	490	usAfsaac(Agn)agcugguCfgGfuuggasasu	674	AUUCCAACCGACCAGCUUGUUUG	858
AD-85490	cscsauucCfuGfUfUfugcuguguauL96	491	asUfsaca(Cgn)agcaaacAfgGfaauggsgsc	675	GCCCAUUCCUGUUUGCUGUGUAU	859
AD-85491	csasccuuUfuCfUfUfcuaaugaguaL96	492	usAfscuc(Agn)uuagaagAfaAfaggugsgsg	676	CCCACCUUUUCUUCUAAUGAGUC	860
AD-85492	gsusuugcUfgUfGfUfaugaucaaaaL96	493	usUfsuug(Agn)ucauacaCfaGfcaaacsasg	677	CUGUUUGCUGUGUAUGAUCAAAG	861
AD-85493	gscsugagAfaGfAfUfugacagguuaL96	494	usAfsacc(Tgn)gucaaucUfuCfucagcsasg	678	CUGCUGAGAAGAUUGACAGGUUC	862
AD-85494	ususccagCfaAfAfAfcucccucaaaL96	495	usUfsuga(Ggn)ggaguuuUfgCfuggaasasg	679	CUUUCCAGCAAAACUCCCUCAAC	863
AD-85495	usgscugaGfaAfGfAfuugacagguuL96	496	asAfsccu(Ggn)ucaaucuUfcUfcagcasgsc	680	GCUGCUGAGAAGAUUGACAGGUU	864
AD-85496	uscsucacUfuUfCfCfagcaaaacuaL96	497	usAfsguu(Tgn)ugcuggaAfaGfugagascsc	681	GGUCUCACUUUCCAGCAAAACUC	865
AD-85497	uscscacaAfuGfAfGfaguaccuguaL96	498	usAfscag(Ggn)uacucucAfuUfguggasusg	682	CAUCCACAAUGAGAGUACCUGUG	866

Nombre de dúplex	Secuencia sentido modificada 5' a 3'	SEQ ID N°:	Secuencia antisentido modificada 5' a 3'	SEQ ID Nº:	Secuencia de ARNm blanco 5' a 3'	SEQ ID Nº:
AD-85498	cscsaccuCfgUfCfAfuccacaaugaL96	499	usCfsauu(Ggn)uggaugaCfgAfgguggsasa	683	UUCCACCUCGUCAUCCACAAUGA	867
AD-85499	uscsacuuUfcCfAfGfcaaaacuccaL96	500	usGfsgag(Tgn)uuugcugGfaAfagugasgsa	684	UCUCACUUUCCAGCAAAACUCCC	868
AD-85500	uscsccucAfaCfUfGfgaugaagaaaL96	501	usUfsucu(Tgn)cauccagUfuGfagggasgsu	685	ACUCCCUCAACUGGAUGAAGAAA	869
AD-85501	gsasgaguAfcCfUfGfugagcagcuaL96	502	usAfsgcu(Ggn)cucacagGfuAfcucucsasu	686	AUGAGAGUACCUGUGAGCAGCUG	870
AD-85502	asgsaauuCfcAfAfCfcgaccagcuuL96	503	asAfsgcu(Ggn)gucgguuGfgAfauucususu	687	AAAGAAUUCCAACCGACCAGCUU	871
AD-85503	csasuuccUfgUfUfUfgcuguguauaL96	504	usAfsuac(Agn)cagcaaaCfaGfgaaugsgsg	688	CCCAUUCCUGUUUGCUGUGUAUG	872
AD-85504	gsasauucCfaAfCfCfgaccagcuuaL96	505	usAfsagc(Tgn)ggucgguUfgGfaauucsusu	689	AAGAAUUCCAACCGACCAGCUUG	873
AD-85505	csasuccaCfaAfUfGfagaguaccuaL96	506	usAfsggu(Agn)cucucauUfgUfggaugsasc	690	GUCAUCCACAAUGAGAGUACCUG	874
AD-85506	cscscauuCfcUfGfUfuugcuguguaL96	507	usAfscac(Agn)gcaaacaGfgAfaugggscsg	691	CGCCCAUUCCUGUUUGCUGUGUA	875
AD-85507	csusggguUfuAfUfUfuuagagaauaL96	508	usAfsuuc(Tgn)cuaaaauAfaAfcccagscsa	692	UGCUGGGUUUAUUUUAGAGAAUG	876
AD-85508	gscsugggUfuUfAfUfuuuagagaauL96	509	asUfsucu(Cgn)uaaaauaAfaCfccagcsasa	693	UUGCUGGGUUUAUUUUAGAGAAU	877
AD-85509	asusggcaUfgCfAfCfagugagcuauL96	510	asUfsagc(Tgn)cacugugCfaUfgccausasu	694	AUAUGGCAUGCACAGUGAGCUAU	878
AD-85510	gsasgagaGfcCfCfAfcagagucuaaL96	511	usUfsaga(Cgn)ucuguggGfcUfcucucsusc	695	GAGAGAGAGCCCACAGAGUCUAC	879
AD-85511	gscsaagaAfcCfAfGfuguuuagcgaL96	512	usCfsgcu(Agn)aacacugGfuUfcuugcscsu	696	AGGCAAGAACCAGUGUUUAGCGC	880

Nombre de dúplex	Secuencia sentido modificada 5' a 3'	SEQ ID N°:	Secuencia antisentido modificada 5' a 3'	SEQ ID Nº:	Secuencia de ARNm blanco 5' a 3'	SEQ ID Nº:
AD-85512	cscsagcaAfaAfCfUfcccucaacuaL96	513	usAfsguu(Ggn)agggaguUfuUfgcuggsasa	697	UUCCAGCAAAACUCCCUCAACUG	881
AD-85513	csasccucGfuCfAfUfccacaaugaaL96	514	usUfscau(Tgn)guggaugAfcGfaggugsgsa	698	UCCACCUCGUCAUCCACAAUGAG	882
AD-85514	csgsucauCfcAfCfAfaugagaguaaL96	515	usUfsacu(Cgn)ucauuguGfgAfugacgsasg	699	CUCGUCAUCCACAAUGAGAGUAC	883
AD-85515	csuscccaCfgCfUfCfucuggacuuaL96	516	usAfsagu(Cgn)cagagagCfgUfgggagsgsa	700	UCCUCCCACGCUCUCUGGACUUC	884
AD-85516	asascuccCfuCfAfAfcuggaugaaaL96	517	usUfsuca(Tgn)ccaguugAfgGfgaguususu	701	AAAACUCCCUCAACUGGAUGAAG	885
AD-85517	usgsagaaGfaUfUfGfacagguucauL96	518	asUfsgaa(Cgn)cugucaaUfcUfucucasgsc	702	GCUGAGAAGAUUGACAGGUUCAU	886
AD-85518	cscsucguCfaUfCfCfacaaugagaaL96	519	usUfscuc(Agn)uuguggaUfgAfcgaggsusg	703	CACCUCGUCAUCCACAAUGAGAG	887
AD-85519	gsasgaagAfuUfGfAfcagguucauaL96	520	usAfsuga(Agn)ccugucaAfuCfuucucsasg	704	CUGAGAAGAUUGACAGGUUCAUG	888
AD-85520	csusucuuGfgGfCfUfuccguauauaL96	521	usAfsuau(Agn)cggaagcCfcAfagaagsusu	705	AACUUCUUGGGCUUCCGUAUAUA	889
AD-85521	uscscaccUfcGfUfCfauccacaauaL96	522	usAfsuug(Tgn)ggaugacGfaGfguggasasg	706	CUUCCACCUCGUCAUCCACAAUG	890
AD-85522	asgsauugAfcAfGfGfuucaugcagaL96	523	usCfsugc(Agn)ugaaccuGfuCfaaucususc	707	GAAGAUUGACAGGUUCAUGCAGG	891
AD-85523	csuscccuCfaAfCfUfggaugaagaaL96	524	usUfscuu(Cgn)auccaguUfgAfgggagsusu	708	AACUCCCUCAACUGGAUGAAGAA	892
AD-85524	asasugagAfgUfAfCfcugugagcaaL96	525	usUfsgcu(Cgn)acagguaCfuCfucauusgsu	709	ACAAUGAGAGUACCUGUGAGCAG	893
AD-85619	cscsaccuUfuUfCfUfucuaaugaguL96	526	asCfsucau(Tgn)agaagaAfaAfgguggsgsa	710	UCCCACCUUUUCUUCUAAUGAGU	894

Nombre de dúplex	Secuencia sentido modificada 5' a 3'	SEQ ID N°:	Secuencia antisentido modificada 5' a 3'	SEQ ID Nº:	Secuencia de ARNm blanco 5' a 3'	SEQ ID Nº:
AD-85620	csgsaccaGfcUfUfGfuuugugaaaaL96	527	usUfsuuca(Cgn)aaacaaGfcUfggucgsgsu	711	ACCGACCAGCUUGUUUGUGAAAC	895
AD-85621	ascscuuuUfcUfUfCfuaaugagucaL96	528	usGfsacuc(Agn)uuagaaGfaAfaaggusgsg	712	CCACCUUUUCUUCUAAUGAGUCG	896
AD-85622	gsuscaucCfaCfAfAfugagaguacaL96	529	usGfsuacu(Cgn)ucauugUfgGfaugacsgsa	713	UCGUCAUCCACAAUGAGAGUACC	897
AD-85623	csascaauGfaGfAfGfuaccugugaaL96	530	usUfscaca(Ggn)guacucUfcAfuugugsgsa	714	UCCACAAUGAGAGUACCUGUGAG	898
AD-85624	gsuscuccCfaCfCfUfuuucuucuaaL96	531	usUfsagaa(Ggn)aaaaggUfgGfgagacsusg	715	CAGUCUCCCACCUUUUCUUCUAA	899
AD-85625	ascsuuucCfaGfCfAfaaacucccuaL96	532	usAfsggga(Ggn)uuuugcUfgGfaaagusgsa	716	UCACUUUCCAGCAAAACUCCCUC	900
AD-85626	cscsucaaCfuGfGfAfugaagaaacuL96	533	asGfsuuuc(Tgn)ucauccAfgUfugaggsgsa	717	UCCCUCAACUGGAUGAAGAAACU	901
AD-85627	csusguuuGfcUfGfUfguaugaucaaL96	534	usUfsgauc(Agn)uacacaGfcAfaacagsgsa	718	UCCUGUUUGCUGUGUAUGAUCAA	902
AD-85628	ususugcuGfuGfUfAfugaucaaagaL96	535	usCfsuuug(Agn)ucauacAfcAfgcaaascsa	719	UGUUUGCUGUGUAUGAUCAAAGC	903
AD-85629	cscsgaccAfgCfUfUfguuugugaaaL96	536	usUfsucac(Agn)aacaagCfuGfgucggsusu	720	AACCGACCAGCUUGUUUGUGAAA	904
AD-85630	uscscaacCfgAfCfCfagcuuguuuaL96	537	usAfsaaca(Agn)gcugguCfgGfuuggasasu	721	AUUCCAACCGACCAGCUUGUUUG	905
AD-85631	cscsauucCfuGfUfUfugcuguguauL96	538	asUfsacac(Agn)gcaaacAfgGfaauggsgsc	722	GCCCAUUCCUGUUUGCUGUGUAU	906
AD-85632	csasccuuUfuCfUfUfcuaaugaguaL96	539	usAfscuca(Tgn)uagaagAfaAfaggugsgsg	723	CCCACCUUUUCUUCUAAUGAGUC	907
AD-85633	gsusuugcUfgUfGfUfaugaucaaaaL96	540	usUfsuuga(Tgn)cauacaCfaGfcaaacsasg	724	CUGUUUGCUGUGUAUGAUCAAAG	908

Nombre de dúplex	Secuencia sentido modificada 5' a 3'	SEQ ID N°:	Secuencia antisentido modificada 5' a 3'	SEQ ID Nº:	Secuencia de ARNm blanco 5' a 3'	SEQ ID Nº:
AD-85634	gscsugagAfaGfAfUfugacagguuaL96	541	usAfsaccu(Ggn)ucaaucUfuCfucagcsasg	725	CUGCUGAGAAGAUUGACAGGUUC	909
AD-85635	ususccagCfaAfAfAfcucccucaaaL96	542	usUfsugag(Ggn)gaguuuUfgCfuggaasasg	726	CUUUCCAGCAAAACUCCCUCAAC	910
AD-85636	usgscugaGfaAfGfAfuugacagguuL96	543	asAfsccug(Tgn)caaucuUfcUfcagcasgsc	727	GCUGCUGAGAAGAUUGACAGGUU	911
AD-85637	uscsucacUfuUfCfCfagcaaaacuaL96	544	usAfsguuu(Tgn)gcuggaAfaGfugagascsc	728	GGUCUCACUUUCCAGCAAAACUC	912
AD-85638	uscscacaAfuGfAfGfaguaccuguaL96	545	usAfscagg(Tgn)acucucAfuUfguggasusg	729	CAUCCACAAUGAGAGUACCUGUG	913
AD-85639	cscsaccuCfgUfCfAfuccacaaugaL96	546	usCfsauug(Tgn)ggaugaCfgAfgguggsasa	730	UUCCACCUCGUCAUCCACAAUGA	914
AD-85640	uscsacuuUfcCfAfGfcaaaacuccaL96	547	usGfsgagu(Tgn)uugcugGfaAfagugasgsa	731	UCUCACUUUCCAGCAAAACUCCC	915
AD-85641	uscsccucAfaCfUfGfgaugaagaaaL96	548	usUfsucuu(Cgn)auccagUfuGfagggasgsu	732	ACUCCCUCAACUGGAUGAAGAAA	916
AD-85642	gsasgaguAfcCfUfGfugagcagcuaL96	549	usAfsgcug(Cgn)ucacagGfuAfcucucsasu	733	AUGAGAGUACCUGUGAGCAGCUG	917
AD-85643	asgsaauuCfcAfAfCfcgaccagcuuL96	550	asAfsgcug(Ggn)ucgguuGfgAfauucususu	734	AAAGAAUUCCAACCGACCAGCUU	918
AD-85644	csasuuccUfgUfUfUfgcuguguauaL96	551	usAfsuaca(Cgn)agcaaaCfaGfgaaugsgsg	735	CCCAUUCCUGUUUGCUGUGUAUG	919
AD-85645	gsasauucCfaAfCfCfgaccagcuuaL96	552	usAfsagcu(Ggn)gucgguUfgGfaauucsusu	736	AAGAAUUCCAACCGACCAGCUUG	920
AD-85646	csasuccaCfaAfUfGfagaguaccuaL96	553	usAfsggua(Cgn)ucucauUfgUfggaugsasc	737	GUCAUCCACAAUGAGAGUACCUG	921
AD-85647	cscscauuCfcUfGfUfuugcuguguaL96	554	usAfscaca(Ggn)caaacaGfgAfaugggscsg	738	CGCCCAUUCCUGUUUGCUGUGUA	922

Nombre de dúplex	Secuencia sentido modificada 5' a 3'	SEQ ID N°:	Secuencia antisentido modificada 5' a 3'	SEQ ID Nº:	Secuencia de ARNm blanco 5' a 3'	SEQ ID Nº:
AD-85648	csusggguUfuAfUfUfuuagagaauaL96	555	usAfsuucu(Cgn)uaaaauAfaAfcccagscsa	739	UGCUGGGUUUAUUUUAGAGAAUG	923
AD-85649	gscsugggUfuUfAfUfuuuagagaauL96	556	asUfsucuc(Tgn)aaaauaAfaCfccagcsasa	740	UUGCUGGGUUUAUUUUAGAGAAU	924
AD-85650	asusggcaUfgCfAfCfagugagcuauL96	557	asUfsagcu(Cgn)acugugCfaUfgccausasu	741	AUAUGGCAUGCACAGUGAGCUAU	925
AD-85651	gsasgagaGfcCfCfAfcagagucuaaL96	558	usUfsagac(Tgn)cuguggGfcUfcucucsusc	742	GAGAGAGAGCCCACAGAGUCUAC	926
AD-85652	gscsaagaAfcCfAfGfuguuuagcgaL96	559	usCfsgcua(Agn)acacugGfuUfcuugcscsu	743	AGGCAAGAACCAGUGUUUAGCGC	927
AD-85653	cscsagcaAfaAfCfUfcccucaacuaL96	560	usAfsguug(Agn)gggaguUfuUfgcuggsasa	744	UUCCAGCAAAACUCCCUCAACUG	928
AD-85654	csasccucGfuCfAfUfccacaaugaaL96	561	usUfscauu(Ggn)uggaugAfcGfaggugsgsa	745	UCCACCUCGUCAUCCACAAUGAG	929
AD-85655	csgsucauCfcAfCfAfaugagaguaaL96	562	usUfsacuc(Tgn)cauuguGfgAfugacgsasg	746	CUCGUCAUCCACAAUGAGAGUAC	930
AD-85656	csuscccaCfgCfUfCfucuggacuuaL96	563	usAfsaguc(Cgn)agagagCfgUfgggagsgsa	747	UCCUCCCACGCUCUCUGGACUUC	931
AD-85657	asascuccCfuCfAfAfcuggaugaaaL96	564	usUfsucau(Cgn)caguugAfgGfgaguususu	748	AAAACUCCCUCAACUGGAUGAAG	932
AD-85658	usgsagaaGfaUfUfGfacagguucauL96	565	asUfsgaac(Cgn)ugucaaUfcUfucucasgsc	749	GCUGAGAAGAUUGACAGGUUCAU	933
AD-85659	cscsucguCfaUfCfCfacaaugagaaL96	566	usUfscuca(Tgn)uguggaUfgAfcgaggsusg	750	CACCUCGUCAUCCACAAUGAGAG	934
AD-85660	gsasgaagAfuUfGfAfcagguucauaL96	567	usAfsugaa(Cgn)cugucaAfuCfuucucsasg	751	CUGAGAAGAUUGACAGGUUCAUG	935
AD-85661	csusucuuGfgGfCfUfuccguauauaL96	568	usAfsuaua(Cgn)ggaagcCfcAfagaagsusu	752	AACUUCUUGGGCUUCCGUAUAUA	936

Nombre de dúplex	Secuencia sentido modificada 5' a 3'	SEQ ID N°:	Secuencia antisentido modificada 5' a 3'	SEQ ID Nº:	Secuencia de ARNm blanco 5' a 3'	SEQ ID Nº:
AD-85662	uscscaccUfcGfUfCfauccacaauaL96	569	usAfsuugu(Ggn)gaugacGfaGfguggasasg	753	CUUCCACCUCGUCAUCCACAAUG	937
AD-85663	asgsauugAfcAfGfGfuucaugcagaL96	570	usCfsugca(Tgn)gaaccuGfuCfaaucususc	754	GAAGAUUGACAGGUUCAUGCAGG	938
AD-85664	csuscccuCfaAfCfUfggaugaagaaL96	571	usUfscuuc(Agn)uccaguUfgAfgggagsusu	755	AACUCCCUCAACUGGAUGAAGAA	939
AD-85665	asasugagAfgUfAfCfcugugagcaaL96	572	usUfsgcuc(Agn)cagguaCfuCfucauusgsu	756	ACAAUGAGAGUACCUGUGAGCAG	940

Tabla 6. Secuencias modificadas de hebras sentido y antisentido adicionales de los agentes de ARNhd contra el hAGTh

Nombre del dúplex	Nombre de oligo sentido	Secuencia sentido modificada 5' a 3'	SEQ ID Nº:	Rango en NM_000029.3	Nombre de oligo antisentido	Secuencia antisentido modificada	SEQ ID Nº:	Rango en NM_000029.3
AD-126306	A-168475	gsuscaucCfaCfAfAfugagaguacaL96	941	638-658	A-250785	usGfsua(Cgn)ucucauugUfgGfaugacsgsa	951	636-658
AD-126307	A-168477	csascaauGfaGfAfGfuaccugugaaL96	942	644-664	A-250786	usUfsca(Cgn)agguacucUfcAfuugugsgsa	952	642-664
AD-126308	A-168479	gsuscuccCfaCfCfUfuuucuucuaaL96	943	2076-2096	A-250787	usUfsag(Agn)agaaaaggUfgGfgagacsusg	953	2074-2096
AD-126310	A-168483	cscsucaaCfuGfGfAfugaagaaacuL96	944	1603-1623	A-250789	asGfsuu(Tgn)cuucauccAfgUfugaggsgsa	954	1601-1623
AD-126343	A-168549	cscsucguCfaUfCfCfacaaugagaaL96	945	634-654	A-250822	usUfscu(Cgn)auuguggaUfgAfcgaggsusg	955	632-654
AD-133360	A-168475	gsuscaucCfaCfAfAfugagaguacaL96	946	638-658	A-264752	usGfs(Tgn)acucucauugUfgGfaugacsgsa	956	636-658
AD-133361	A-168475	gsuscaucCfaCfAfAfugagaguacaL96	947	638-658	A-264753	usGfsu(Agn)cucucauugUfgGfaugacsgsa	957	636-658
AD-133362	A-168475	gsuscaucCfaCfAfAfugagaguacaL96	948	638-658	A-264754	usGfsuacuc(Tgn)cauugUfgGfaugacsgsa	958	636-658
AD-133374	A-168479	gsuscuccCfaCfCfUfuuucuucuaaL96	949	2076-2096	A-264766	usUfsagaag(Agn)aaaggUfgGfgagacsusg	959	2074-2096
AD-133385	A-168477	csascaauGfaGfAfGfuaccugugaaL96	950	644-664	A-264777	usUfsc(Agn)cagguacucUfcAfuugugsgsa	960	642-664

Ejemplo 3. Tamizado *in vivo* de dúplex de ARNhd en ratones inducidos con AAV que expresan AGT humano

Para expresar el angiotensinógeno humano, los ratones C57 / BL6 se transdujeron primero con un vector de AAV (virus adenoasociado) que expresa la transcripción del AGT humano. Después de por lo menos dos semanas desde la introducción del AAV, se obtuvo sangre de ratones para los niveles basales del AGT humano en circulación, y luego los animales recibieron una dosis individual subcutánea de 3 mg/kg de un agente de ARNhd de un subconjunto de los agentes de ARNhd que se proveen en las Tablas 5 y 6 (N = 3 por grupo). Se obtuvo nuevamente sangre de los animales catorce días después de la dosis del agente de ARNhd. Los niveles del AGT en humanos se cuantificaron utilizando un ELISA específico para angiotensinógeno humano, según el protocolo del fabricante (IBL America # 27412). Los datos se expresaron como porcentajes del valor de referencia y se presentaron como la media más la desviación estándar. Algunos dúplex de ARNhd se seleccionaron para su posterior análisis.

Tabla 7. Tamizado de dosis individuales de 3 mg/kg de AGT en ratón transducido con AAV para AGT humano

ID dúplex	Prom.	Desv. Est.
AD-67327	13,2	4,5
AD-85110	97,0	3,6
AD-85117	86,7	10,8
AD-85118	107,2	14,2
AD-85434	18,4	0,6
AD-85435	25,7	1,7
AD-85438	12,6	2,7

AD-85446	8,4	1,0
AD-85481	27,0	11,5
AD-85482	64,2	13,0
AD-85482	48,5	5,9
AD-85483	38,9	4,6
AD-85485	63,6	3,0
AD-85493	35,7	20,5
AD-85496	78,5	10,3
AD-85517	93,8	4,6
AD-85524	90,4	14,7
AD-85622	38,1	10,6
AD-85623	28,0	8,4
AD-85625	87,6	13,7
AD-85626	29,9	14,0
AD-85634	27,7	4,5
AD-85635	87,1	13,5
AD-126306	12,4	1,4
AD-126307	21,6	9,0
AD-126308	15,7	1,8
AD-126310	38,3	1,1
AD-126343	65,5	13,4
AD-133360	50,6	7,5
AD-133361	23,2	12,4
AD-133362	12,2	4,1
AD-133374	26,2	3,3

AD-133385	33,8	8,7

Ejemplo 4. Tamizado *in vivo* de dúplex de ARNhd en monos *Cynomolgus*

Los dúplex de interés, identificados a partir de los anteriores estudios en ratón, se evaluaron en monos *Cynomolgus*. Los animales (N = 3 por grupo) recibieron el día 1 una dosis individual subcutánea de 3 mg/kg de un agente de ARNhd (AD-85481, AD-126306, AD-126307, AD-126308 o AD-133362). Se obtuvo sangre los días 6, 1, 4, 8, 15, 22, 29, 32, 35, 43, 57, 71, 85 y 99 después de la dosis. Los niveles de AGT en circulación se cuantificaron utilizando un ELISA específico para angiotensinógeno humano (y reactivo cruzado con *Cynomolgus*), de acuerdo con el protocolo del fabricante (IBL America # 27412). Los datos se expresaron como porcentajes del valor de referencia y se presentaron como la media más/menos la desviación estándar. En la Figura 1A se muestran los resultados. Las diferencias aparentes entre AD-85481, AD-126306 y AD-133362 están dentro del rango de variabilidad típica entre estudios en primates no humanos.

Se realizaron estudios de respuesta a la dosis para evaluar la actividad de AD-67327 y AD-85481. Aunque los experimentos se realizaron por separado, se utilizaron esencialmente los mismos métodos y los resultados se presentan juntos en la Figura 1B. Los monos *Cynomolgus* recibieron una sola dosis subcutánea de 0,3 mg/kg, 1 mg/kg o 3 mg/kg de ARNhd el día 1. Se obtuvo sangre los días -6, 1, 8, 15, 22, 29, 36., 43, 50, 57, 64, 71 y 78 después de la dosis para AD-67327 y los días -6, 1, 4, 8, 15, 22, 29, 32, 35, 43, 57, 71, 85, y 99 después de la dosificación para AD-85481. Los niveles de AGT en circulación se cuantificaron utilizando un ELISA específico para angiotensinógeno humano (y

reactivo cruzado con *Cynomolgus*), de acuerdo con el protocolo del fabricante (IBL America # 27412). Los datos se expresaron como porcentajes del valor de referencia y se presentaron como la media más la desviación estándar. En la Figura 1B se muestran los resultados. Estos datos demuestran una mejora de aproximadamente 3 veces de la eficacia y la duración de AD-85481 respecto de AD-67327.

Se realizaron estudios de dosis múltiples para determinar la potencia y la durabilidad de AD-67327 y AD-85481. Aunque los experimentos se realizaron por separado, se utilizaron esencialmente los mismos métodos y los resultados se presentan juntos en la Figura 1C. A los monos *Cynomolgus* se les administró por vía subcutánea una dosis de 1 mg/kg de AD-67327 o AD-85481 una vez cada cuatro semanas durante tres semanas (dosificación q4w) (los días 1, 29 y 57 después de la primera dosis). La sangre para la evaluación del AGT en circulación se obtuvo los días -6, 1, 8, 15, 22, 29, 36, 43, 50, 57, 64, 71 y 78 después de la primera dosis de AD-67327 y los días -8, 1, 4, 8, 15, 22, 29, 36, 43, 57, 64, 71, 85, 99 después de la primera dosis de AD-85481. Estos datos demuestran un aumento de la potencia y la duración del silenciamiento del blanco con AD-85481 en comparación con AD-67327.

Ejemplo 5. Tratamiento de la hipertensión con un ARNhd contra el AGT en un modelo de rata hipertensiva espontánea

Se diseñó un ARNhd específico de rata para probar el efecto del noqueo de AGT en un modelo de rata espontáneamente hipertenso. A las ratas espontáneamente hipertensas (N = 9 por grupo) se les administró por vía subcutánea una dosis de 10 mg/kg del ARNhd contra el AGT específico de rata una vez cada 2 semanas (10 mg/kg q2w), o dosis orales diarias del ARB

valsartán (31 mg/kg/día), o dosis orales diarias del inhibidor de la ECA captopril (100 mg/kg/día). También se evaluaron las combinaciones seleccionadas (el agente de ARNhd específico de rata más valsartán o captopril más valsartán), dosificadas como se indicó anteriormente. Se midió la presión arterial media por telemetría durante un período de 4 semanas. Después de cuatro semanas de tratamiento, los animales se anestesiaron por inyección i.p. de pentobarbital y se extrajo sangre de la vena porta hepática para la medición del AGT plasmática, la renina plasmática, la angiotensina II plasmática, la aldosterona plasmática, el K^+ en plasma y la actividad de la renina plasmática. También se obtuvieron los pesos del corazón y la longitud de la tibia (para la normalización de los pesos del corazón).

El tratamiento con el agente de ARNhd específico de rata redujo los niveles de AGT en plasma en más del 98% cuando se administró solo o en combinación con valsartán con relación a los niveles previos al tratamiento (Figura 2A). También se demostró que el tratamiento con la combinación de valsartán y captopril disminuye significativamente los niveles séricos de AGT. Todos los tratamientos aumentaron el nivel de renina, donde el mayor aumento ocurrió en los animales tratados con una combinación de valsartán y el agente de ARNhd, seguido de un aumento sustancial en el grupo tratado solo con el agente de ARNhd. Sólo se vio que el tratamiento combinado con valsartán y el agente de ARNhd reducía los niveles de angiotensina II en circulación. Después del tratamiento con el agente de ARNhd se observó una tendencia a la reducción del AGT urinario, lo que sugiere que el tratamiento con el agente de ARNhd no inhibe significativamente los niveles de la proteína AGT en el riñón (Figura 3). Se vio que solo la combinación de valsartán y el agente de ARNhd disminuye

significativamente el AGT urinario. Ningún tratamiento alteró los niveles de aldosterona. El K^+ plasmático tendió a aumentar en todos los grupos, con una significancia que solo se alcanzó en el grupo de tratamiento con valsartán más ARNip.

La Figura 2B muestra los niveles medios de presión arterial medidos por telemetría durante el experimento y graficados con relación a los niveles iniciales de presión sanguínea. Cada uno de los tratamientos causó una disminución estadísticamente significativa de la presión sanguínea en comparación con los animales no tratados. Las comparaciones estadísticas ($p < 0,05$) se indican con relación a la línea de base (#) o valsartán más captopril ($). El tratamiento con valsartán más el agente de ARNhd específico de rata fue significativamente mejor para disminuir la presión arterial media que el tratamiento con captopril más valsartán.

La Figura 2C muestra los pesos de los corazones normalizados a las longitudes tibiales para proveer una medida de la hipertrofia cardiaca. Los tratamientos con valsartán más captopril y valsartán más el agente de ARNhd fueron efectivos para reducir la hipertrofia cardiaca con relación al control ($p < 0,05$), con valsartán más el agente de ARNhd también para reducir la hipertrofia cardiaca con relación a valsartán más captopril ($p < 0,05$). La Figura 2E muestra los mismos datos que un diagrama de dispersión del peso del corazón a la longitud tibial respecto de la MAP [por las siglas en inglés de *Mean Arterial Pressure*; presión arterial media]. Se observa una proporción lineal entre la hipertrofia cardiaca y la MAP, donde la dosificación de valsartán más el agente de ARNhd provee la mayor reducción de la hipertrofia cardiaca. El tamaño de los cardiomiocitos se redujo con relación al vehículo en todos los grupos excepto en

el del valsartán (Figura 2F), mientras que el NT-proBNP se redujo en el grupo de captopril más valsartán y se observó una tendencia a la reducción en el grupo de valsartán más ARNhd (Figura 2G).

La Figura 2D muestra el nivel de actividad relativa de la renina a las 4 semanas con relación a la línea de base. La actividad de la renina plasmática (ARP), que refleja una señalización reducida de la angiotensina, indica un claro aumento de la ARP con el tratamiento con el agente de ARNhd ($p < 0,05$ con relación al grupo de referencia y de control, tanto para el agente de ARNhd solo como para el valsartán más ARNip). El ensayo de ARP mide la actividad de la renina cuantificando la cantidad de angiotensina I producida por la renina en una muestra de sangre, en presencia de un exceso de angiotensinógeno. Estos datos demuestran una reducción en la señalización de la angiotensina II después de ese tratamiento con el agente AGT-ARNhd, y que el efecto se ve reforzado por el tratamiento conjunto con valsartán. Debido a la expresión aumentada, la angiotensina II en circulación permanece intacta aún cuando los niveles de AGT hayan sido silenciados casi por completo. Estos datos demuestran que el agente para AGT-ARNhd causa un efecto antihipertensivo similar al valsartán y al captopril. Sin intenciones de ser limitados por la teoría, se propone que solamente al combinar los agentes de ARNhd y valsartán colapsan los niveles de angiotensina II, lo que produce una disminución sinérgica de la presión sanguínea.

Se investigó el efecto de diversos tratamientos sobre la sangre y los niveles de AngI y AngII renales después de cuatro semanas de tratamiento. Las Figuras 4A-4C muestran que el tratamiento con valsartán y captopril, ya sea solos o combinados, aumentó significativamente los niveles de la AngI en sangre

en comparación con el control de vehículo (Figura 4A). El agente de ARNhd solo no alteró significativamente los niveles de la AngI en sangre, pero la combinación de valsartán con el agente de ARNhd redujo significativamente la AngI de la sangre en comparación con el control de vehículo y con el tratamiento solo con el agente de ARNhd. Se observó que el valsartán solo aumenta significativamente la AngII en sangre en comparación con el control de vehículo (Figura 4B). Se vio que la combinación de valsartán con el agente de ARNhd disminuyó significativamente la AngII en sangre en comparación con el control de vehículo. Estos cambios dieron como resultado una reducción significativa de la proporción AngII / AngI en los animales tratados con captopril y captopril + valsartán. Los datos para captopril y valsartán son consistentes con sus mecanismos de acción, mientras que los datos para el ARNhd solo indican poco efecto sobre la AngII / I en sangre.

Las Figuras 5A-5C muestran que el agente de ARNhd redujo la AngI renal sin efecto aparente sobre la AngII renal, para dar como resultado un aumento de la proporción AngII / I en la expresión de las AngII y I renales. La Figura 5A muestra que cada uno de valsartán y captopril incrementaron significativamente la AngI renal, mientras que la combinación de los agentes no tuvo un efecto significativo sobre el nivel de la AngI. La AngI renal disminuyó significativamente por el agente de ARNhd y la combinación del agente de ARNhd con valsartán. Además, el tratamiento de combinación redujo significativamente el nivel de la AngI renal en comparación con el tratamiento con el agente de ARNhd solo. La Figura 5B no muestra ningún cambio significativo de la AngII renal después del tratamiento con ninguna de las monoterapias excepto con captopril, es decir, ni con el valsartán ni con el agente de ARNhd solos. Sin embargo, se demostró que

la combinación de captopril y valsartán y la combinación de valsartán y el agente de ARNhd reducen significativamente la Ang II renal. Los datos para captopril y valsartán son consistentes con sus mecanismos de acción, mientras que los datos para el ARNhd solo indican un pequeño efecto aparente sobre la AngII en los riñones. La proporción AngII / AngI renal aumentó 4 veces después de la administración del agente ARNhd contra el AGT solo (Figura 5C). Por el contrario, se observó una disminución de más del 70% en la proporción Ang II / Ang I después del tratamiento con valsartán, captopril y la combinación de valsartán + captopril. No se observó ningún cambio significativo en la proporción AngII / AngI después del tratamiento con el valsartán + agente ARNhd contra el AGT. Se demostró que el aumento de la AngII renal no es el resultado de alteraciones en los niveles de receptores de angiotensina renal ni de la expresión del ARNm de ECA en la corteza renal o la médula. Las figuras 6A-6C no muestran cambios significativos en el receptor AT1a, el receptor AT1b ni en el nivel de ARNm de ECA en el riñón con ninguna condición de tratamiento, excepto con una. El tratamiento con captopril causó un aumento significativo en el nivel del receptor AT1b en la médula renal. También se evaluó el efecto de los regímenes de tratamiento sobre la función renal. No se observaron cambios en la tasa de filtración glomerular, natriuresis y albuminuria. Esto indica que estos tratamientos no alteraron la función renal.

Durante el experimento se monitorearon el volumen urinario y el sodio urinario. El tratamiento con valsartán + agente ARNhd, valsartán + captopril, y captopril solo causó un aumento significativo del volumen urinario dentro de los grupos entre el inicio y las 4 semanas (Figura 7). La comparación del volumen urinario en los grupos a las 4 semanas mostró un aumento significativo de la

producción urinaria en animales tratados con captopril en comparación con todos los otros grupos. El tratamiento con valsartán + agente ARNhd dio como resultado un aumento significativo de la producción de orina a las 4 semanas en comparación con el tratamiento con valsartán solo o con vehículo. Durante el experimento no se observaron cambios significativos en el sodio urinario a través los grupos ni dentro de los mismos.

Estos datos demuestran que la reducción de la proporción Ang II / I renal durante [el tratamiento] tanto con ACEi como con ARB confirma que la ECA renal genera Ang II, y que la Ang II tisular representa a la Ang II internalizada por AT1R (van Esch y colaboradores, Cardiovasc Res 2010 86 (3): 401-409). Además, la disminución de la Ang I renal después del tratamiento con ARNip de AGT dirigida hacia el hígado demuestra que la generación de Ang renal depende del AGT hepático. Aunque, el AGT urinario deriva en parte de los riñones, este AGT renal no contribuye a la generación de Ang renal, como se había sugerido anteriormente (Matsusaka y colaboradores, JASN 2012 23: 1181-1189). La mayor proporción Ang II / I renal después del tratamiento con ARNhd contra el AGT, que permite que los niveles de Ang II renal permanezcan intactos, lo que sugiere una mayor internalización de la Ang II, aunque en ausencia de un aumento de la expresión del receptor AT1b. De acuerdo con este concepto, la exposición aditiva al ARB virtualmente eliminó la Ang II renal. El tratamiento con el agente ARNhd contra el AGT específico para el hígado reduce de manera sinérgica la presión arterial cuando se combina con bloqueantes del RAS existentes y disminuye la producción de Ang renal, sin efectos negativos evidentes sobre la función renal.

Ejemplo 6. Tratamiento de la hipertensión con un ARNhd contra el

AGT en un modelo de rata con alto contenido de sal

El modelo de rata con sal+DOCA (acetato de desoxicorticosterona) es un modelo bien establecido para la hipertensión en el contexto de altos niveles de sal, y se considera un modelo de hipertensión neurogénica debido al efecto sobre los sistemas nerviosos central y periférico (Basting T y Lazartigues E, Cur Hypertension Rep 2017).

Al llegar, las ratas Sprague-Dawley se dejan aclimatar durante 7 días. Luego, los transmisores de telemetría, se implantan intraabdominalmente, en la aorta abdominal, en las ratas bajo anestesia con isoflurano. Se deja a las ratas recuperarse de este procedimiento durante 10 días. Desde ese momento se miden por telemetría la presión sanguínea, la frecuencia cardiaca y otros indicadores de hipertensión durante un período de 7 semanas. Durante las primeras 4 semanas, en los animales se implanta por vía subcutánea un gránulo de 200 mg de DOCA y los mismos reciben un 0,9% de sal en el agua potable (*ad libitum*) de forma crónica para inducir la hipertensión. Después de este período durante el cual comienza la hipertensión, se inicia un período de tratamiento de 3 semanas. Las ratas se tratan con:

1) vehículo;

2) valsartán, 31 mg/kg/día añadido al agua potable;

3) un agente de ARNhd contra el AGT, 10 mg/kg una vez cada dos semanas, por vía subcutánea;

4) espironolactona, 50 mg/kg/día, de forma subcutánea; una combinación de un agente de ARNhd contra el AGT, 10 mg/kg una vez cada dos semanas, por vía subcutánea, y valsartán, 31 mg/kg/día agregado al agua potable;

5) un agente de ARNhd contra el AGT, 10 mg/kg una vez cada dos

semanas, por vía subcutánea, y espironolactona, 50 mg/kg/día, por vía subcutánea;

6) valsartán, 31 mg/kg/día agregado al agua potable, y espironolactona, 50 mg/kg/día, por vía subcutánea; o

7) un agente de ARNhd contra el AGT, 30 mg/kg una vez cada dos semanas, por vía subcutánea. Además, se usa un grupo de ratas que no reciben DOCA ni sal en el agua potable como control para evaluar el efecto de los tratamientos para normalizar la presión sanguínea.

Ejemplo 7. Tratamiento de la obesidad con un agente de ARNhd contra el AGT en un modelo de ratón de obesidad inducida por dieta (OID) por alimentación con alto contenido de grasas

Se adquirieron ratones obesos (obesidad inducida por la dieta, OID, por las siglas en inglés de *Diet-Induced Obesity*) alimentados con alto contenido de grasas (HFF por las siglas en inglés de *High Fat Fed*) de dieciséis semanas de edad y animales de control de peso normal y se mantuvieron con su respectiva dieta con alto contenido de grasas (60% de las calorías como grasa) o alimento normal. Después de la aclimatación, los animales se dividieron en cuatro grupos: peso normal + PBS; Peso normal + ARNhd contra el AGT; OID + PBS; y OID + ARNhd contra el AGT (n = 5 / grupo). Los animales recibieron 10 mg/kg de ARNhd específico de ratón o PBS cada dos semanas durante 12 semanas a partir de la semana 0. Los animales se pesaron y se les extrajo sangre cada dos semanas. Los niveles de AGT en suero se determinaron por ELISA. Se realizó una prueba de tolerancia a la glucosa en ayunas antes de la primera dosis, 6 semanas después de la primera dosis y doce semanas después de la primera dosis. Al final del estudio se determinaron los pesos de los órganos.

La administración del agente de ARNhd contra el AGT fue eficaz para silenciar el AGT tanto en los animales alimentados con alto contenido de grasas como en los que recibieron alimento normal, con un silenciamiento sostenido de aproximadamente 93% a través de los grupos de tratamiento con agente de ARNhd contra el AGT a partir del primer punto de tiempo, dos semanas después de la primera administración del agente de ARNhd.

El tratamiento con el agente ARNhd contra el AGT fue eficaz para reducir significativamente el aumento de peso en comparación con los ratones con OID tratados con PBS, según se determinó por ANOVA con medidas repetidas de dos vías en los ratones con OID, comenzando a las dos semanas posteriores a la primera dosis y manteniéndose durante todo el estudio (Figura 8A). En un análisis que compara los pesos iniciales, el grupo OID + ARNhd contra el AGT no ganó peso con relación al peso inicial hasta el último punto de tiempo. Antes del punto de tiempo final, los ratones perdieron peso con relación al peso inicial (semanas 2, 4, 6) o no hubo diferencia en el peso (semanas 8, 10). En los ratones alimentados con alimento normal no se observaron diferencias de peso significativas entre los que recibieron PBS y los que recibieron el agente ARNhd contra el AGT hasta las semanas 10 y 12 del estudio.

Al final del estudio se determinaron los pesos de los órganos para evaluar el efecto del tratamiento con el agente ARNhd contra el AGT sobre la ubicación de la deposición de grasa. Los pesos de los hígados de los ratones con OID tratados con ARNhd contra el AGT fueron significativamente menores que para los ratones con OID tratados con PBS (Figura 8B). En los ratones alimentados con comida normal no se observó una diferencia significativa en el peso del hígado entre los tratados con el agente ARNhd contra el AGT y los tratados con

PBS. El peso del tejido adiposo (epidídimo) fue estadísticamente mayor en el grupo OID + ARNip de AGT que en el OID + PBS, mientras que para los animales de peso normal sucedió lo contrario. No hubo diferencias significativas en el peso de los músculos de las pantorrillas de los cuatro grupos.

Las pruebas de tolerancia a la glucosa se realizaron la semana 0 (antes de la dosificación), la semana 6 y la semana 12 utilizando un protocolo estándar. Se midió la glucosa en sangre a los 30, 60, 90 y 120 minutos antes de la administración de la dosis intraperitoneal de glucosa en bolo con un glucómetro AlphaTRAK®2 (Abbott Animal Health). En las Figuras 9A-9C se muestran los resultados. La semana 0 los ratones con OID tenían una tolerancia a la glucosa reducida en comparación con los controles alimentados con alimento normal. Para el punto de tiempo de seis semanas se observó una diferencia significativa en múltiples comparaciones posteriores a la prueba entre los ratones con OID tratados con el agente ARNhd contra el AGT y los ratones con OID tratados con PBS. Para las doce semanas, y excluyendo un animal OID + PBS cuyos valores estaban sobre el límite del glucómetro, siguió existiendo una diferencia significativa entre los ratones con OID tratados con ARNhd contra el AGT y los ratones con OID tratados con PBS. Además, a las seis o las doce semanas, los datos del grupo de OID + ARNip de AGT no fueron diferentes de los datos de los grupos de control (ratones tratados con agente ARNhd contra el AGT o tratados con PBS).

Ejemplo 8. Tratamiento de la NASH con un agente ARNhd contra el AGT en un modelo de ratón con alimento alto en grasa y alto en fructosa

Se usó un modelo de ratón de NASH [por las siglas en inglés de *NonAlcoholic SteatoHepatitis*; esteatohepatitis no alcohólica] (Softic y

colaboradores J Clin Invest 127 (11): 4059-4074, 2017, que se incorpora aquí por referencia) para demostrar la eficacia del ARNip de AGT para tratar NASH y signos de trastorno metabólico.

Se alimentaron ratones C57BL/6 machos de entre seis y ocho semanas de edad que se obtuvieron de Jackson Laboratories con una dieta con alto contenido de grasas que contenía 60% de calorías como grasa más 30% de fructosa en agua (dieta Hf Hfr por las siglas en inglés de *High fat High fructose*; es decir, con alto contenido de grasas y fructosa) durante 12 semanas antes del tratamiento con un agente ARNhd contra el AGT o PBS (control) para inducir NASH o alimentados con una dieta estándar de alimento y agua. El alimento y el agua se suministraron *ad libitum*. A partir de la semana 12, a los ratones alimentados con la dieta Hf HFr se les administró por vía subcutánea una dosis de 10 mg/kg de un agente de ARNhd dirigido contra el AGT cada dos semanas hasta un total de cuatro dosis. Dos semanas después de la dosis final (en la semana 20), se extrajeron los hígados, se aisló el ARN y se determinó el silenciamiento del AGT en el hígado mediante RT-qPCR utilizando el método descrito anteriormente. Se observó una disminución del 93% en el ARNm del AGT hepático en los ratones alimentados con Hf Hfr tratados con ARNhd contra el AGT en comparación con los ratones alimentados con Hf HFr tratados con PBS.

Como se esperaba, el peso corporal (Figura 10A), el aumento del peso acumulado (Figura 10B) y el peso terminal del hígado fueron significativamente mayores en los ratones de control alimentados con Hf HFr que en los ratones alimentados con alimento normal en todos los puntos de tiempo. El tratamiento con el agente ARNhd contra el AGT hizo que los ratones Hf HFr perdiesen peso

desde la semana 12 hasta la semana 20, lo que dio como resultado una disminución significativa del peso corporal terminal en comparación con los ratones tratados con control ($p = 0,0023$). No se observaron diferencias significativas en los pesos hepáticos terminales.

Se evaluaron los lípidos y la glucosa en el suero y el hígado, y la insulina en suero para determinar el efecto del agente ARNhd sobre el modelo Hf HFr. En la semana 20, los niveles de triglicéridos y glucosa en suero fueron sustancialmente iguales en los tres grupos (alimento normal, Hf HFr con ARNhd, Hf HFr de control). Los niveles en suero de colesterol e insulina fueron casi iguales en ambos grupos de Hf HFr, y significativamente mayores que en el grupo que consumió alimento normal, como se esperaba. Se demostró que el tratamiento con el agente ARNhd contra el AGT disminuye significativamente el nivel en suero de ácidos grasos no esterificados (NEFA) ($p = 0,01$). El colesterol en el hígado se elevó en ambos grupos Hf HFr en comparación con el control de alimento normal, pero, nuevamente, no se observó una disminución significativa después del tratamiento con el agente ARNhd contra el AGT. En el grupo tratado con el agente ARNhd contra el AGT se observó una disminución significativa de los triglicéridos hepáticos ($p = 0,017$) y ácidos grasos libres ($p = 0,001$) en comparación con el grupo tratado con el control. En el grupo tratado con el ARNhd contra el AGT se observó una posible tendencia hacia la disminución del ácido tiobarbitúrico (TBA), un indicador de la oxidación de lípidos.

La lesión hepática fue indicada por un aumento significativo en los niveles séricos de alanina aminotransferasa (ALT), aspartato aminotransferasa (AST) y glutamato deshidrogenasa (GLDH) en los ratones Hf Hfr tratados con control, en comparación con los ratones alimentados con alimento normal. El tratamiento

con el agente ARNhd contra el AGT produjo una disminución significativa de la ALT ($p = 0,01$) (Figura 11A) con una tendencia hacia la disminución de la AST (Figura 11B) y GLDH (Figura 11C) en comparación con los ratones Hf HFr tratados de control.

La lesión hepática también se evaluó mediante histopatología y puntuaciones NAS. Como se esperaba, la dieta Hf HFr indujo una significativa esteatosis, degeneración en balón e inflamación lobular, lo que dio como resultado un aumento en la puntuación NAS total en comparación con los ratones alimentados con alimento normal. El tratamiento con el agente ARNhd contra el AGT produjo una disminución significativa de la degeneración en balón ($p = 0,04$), con una tendencia hacia la disminución de la inflamación lobular, lo que dio como resultado una disminución significativa de la puntuación NAS total ($p = 0,01$) en los animales alimentados con Hf HFr tratados con agente ARNhd contra el AGT en comparación con los animales alimentados con Hf HFr tratados con el control.

Estos datos demuestran que el tratamiento con el agente ARNhd contra el AGT es eficaz para mejorar algunos de los signos de NASH. En particular, el tratamiento con el agente ARNhd contra el AGT fue eficaz para reducir el peso y las enzimas de daño hepático, con una reducción significativa de la ALT y una ligera reducción de la AST y la GLDH. También se observaron reducciones de la inflamación lobular y de los puntajes de degeneración en globo, lo que redujo la puntuación total NAS.

EQUIVALENTES

Aquellos con experiencia en el arte reconocerán, o podrán determinar sin utilizar más que la experimentación de rutina, que las formas de realización

específicas y los métodos que se describen en este documento pueden poseer muchos equivalentes. Es la intención que dichos equivalentes sean abarcados por el alcance de las siguientes reivindicaciones.

FIG. 1A

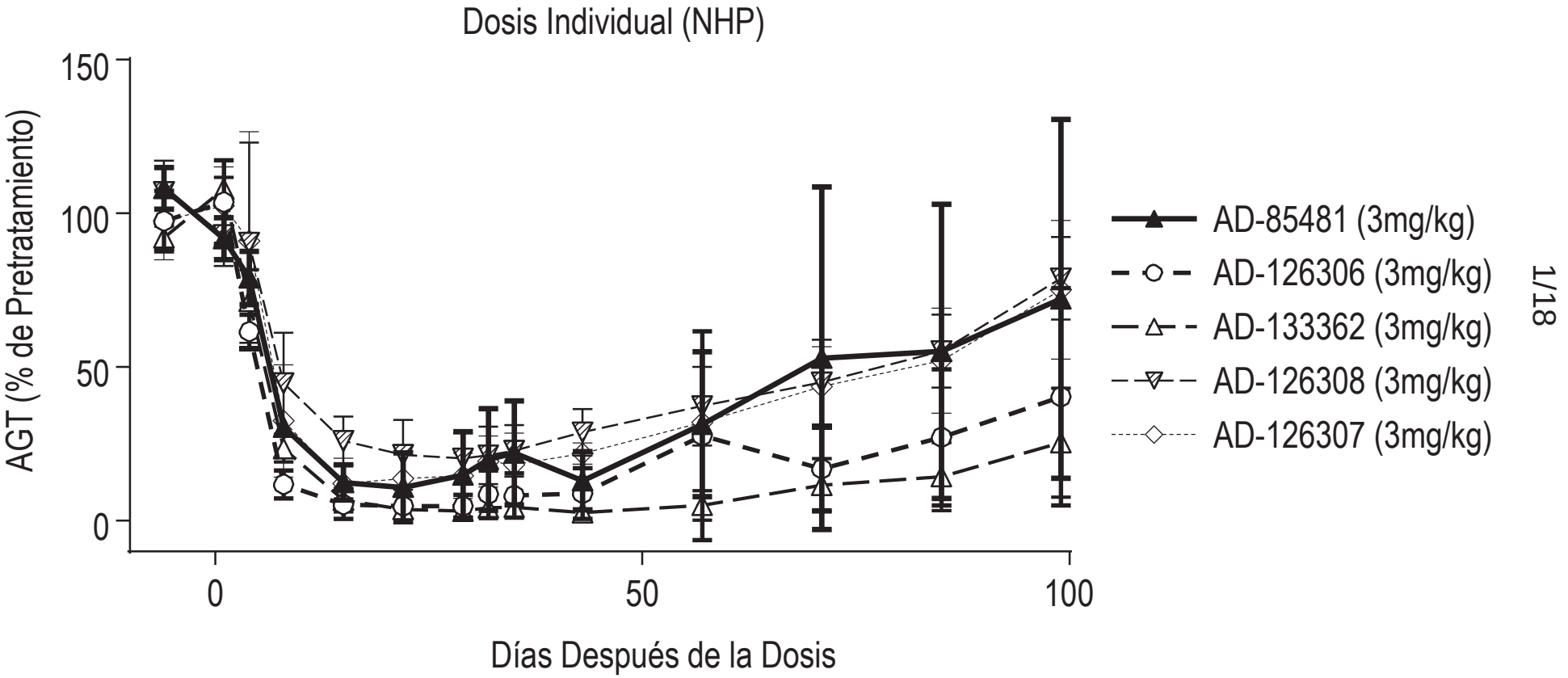

Dosis Individual (NHP)
AGT (% de Pretratamiento)
150
100
50
0
0
50
100
Días Después de la Dosis
AD-85481 (3mg/kg)
AD-126306 (3mg/kg)
AD-133362 (3mg/kg)
AD-126308 (3mg/kg)
AD-126307 (3mg/kg)

FIG. 1B

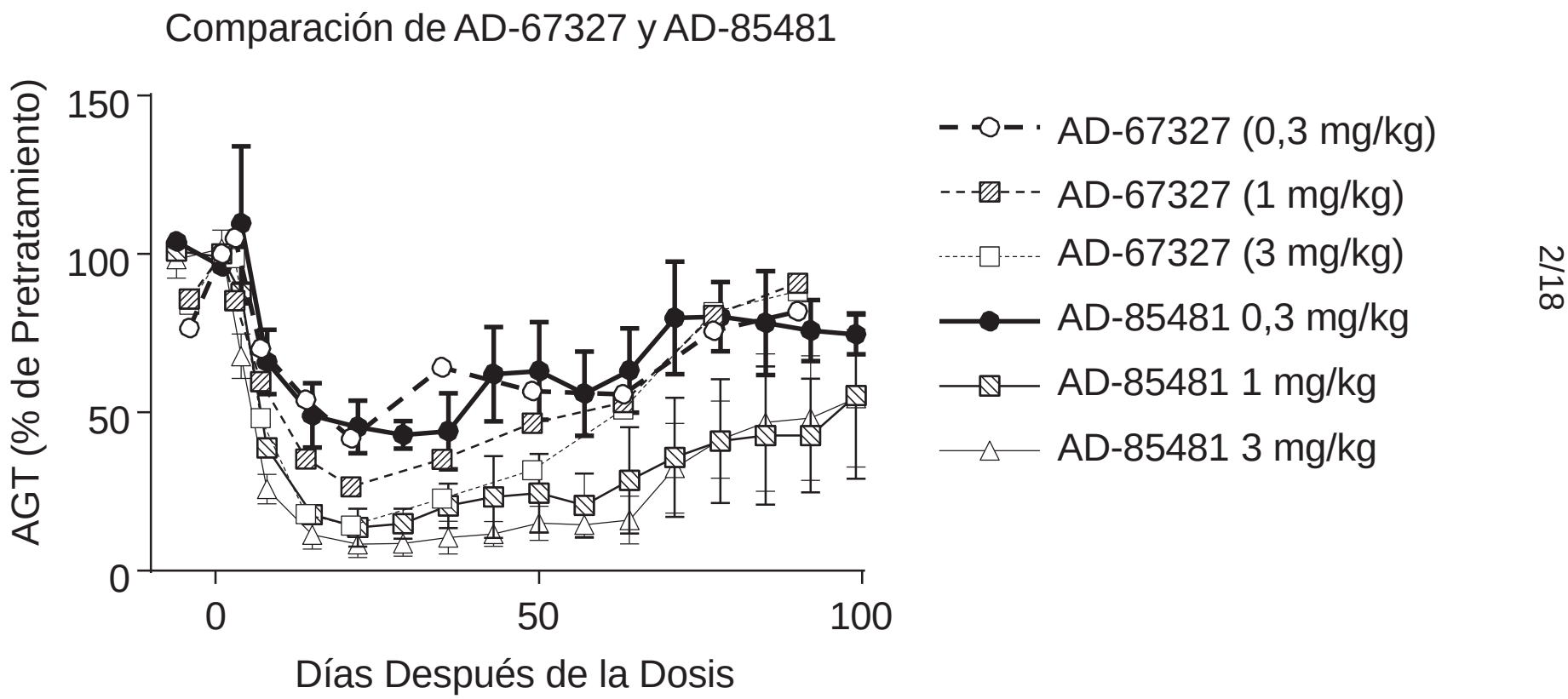

Comparación de AD-67327 y AD-85481
AGT (% de Pretratamiento)
150
100
50
0
0
50
100
Días Después de la Dosis
AD-67327 (0,3 mg/kg)
AD-67327 (1 mg/kg)
AD-67327 (3 mg/kg)
AD-85481 0,3 mg/kg
AD-85481 1 mg/kg
AD-85481 3 mg/kg

FIG. 1C

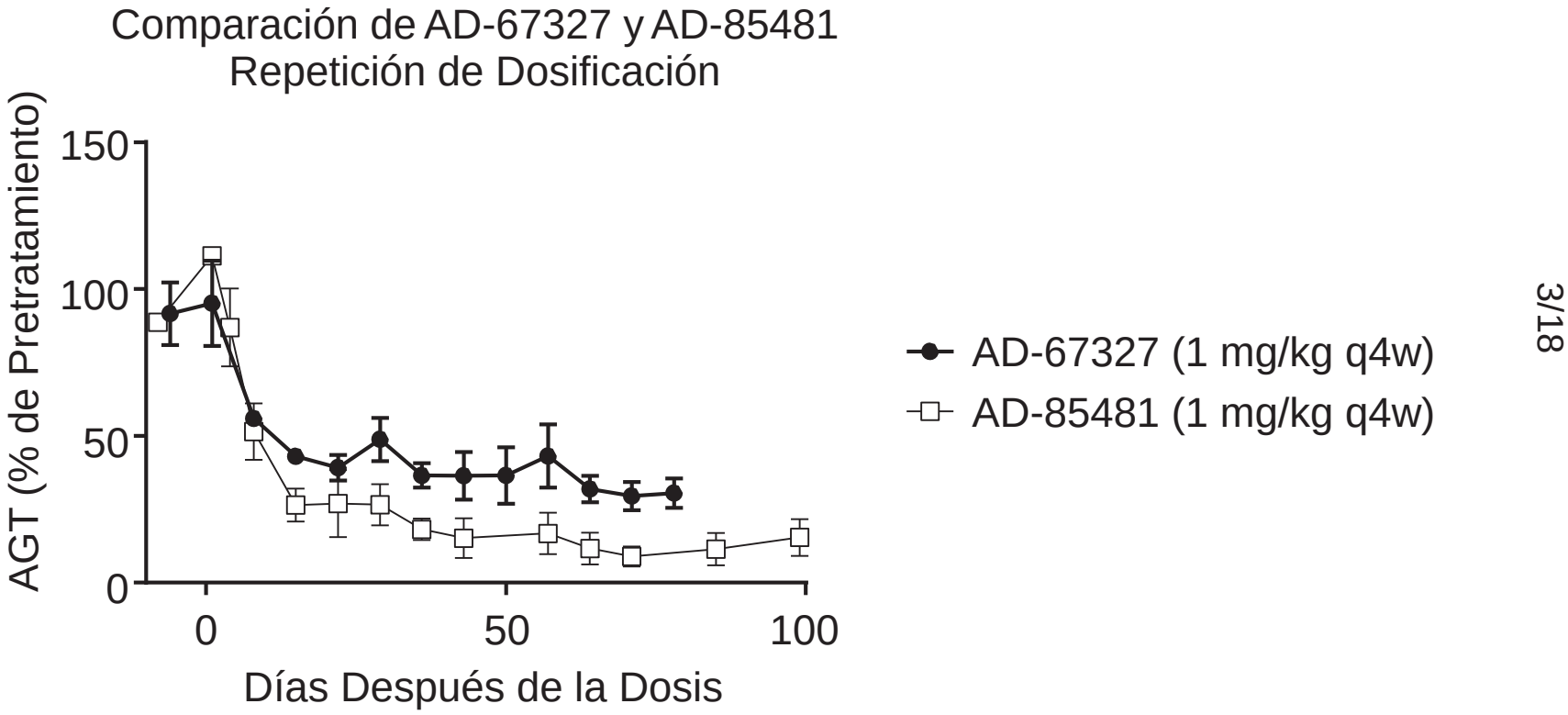

Comparación de AD-67327 y AD-85481
Repetición de Dosificación
AGT (% de Pretratamiento)
150
100
50
0
0
50
100
Días Después de la Dosis
AD-67327 (1 mg/kg q4w)
AD-85481 (1 mg/kg q4w)

FIG. 2A

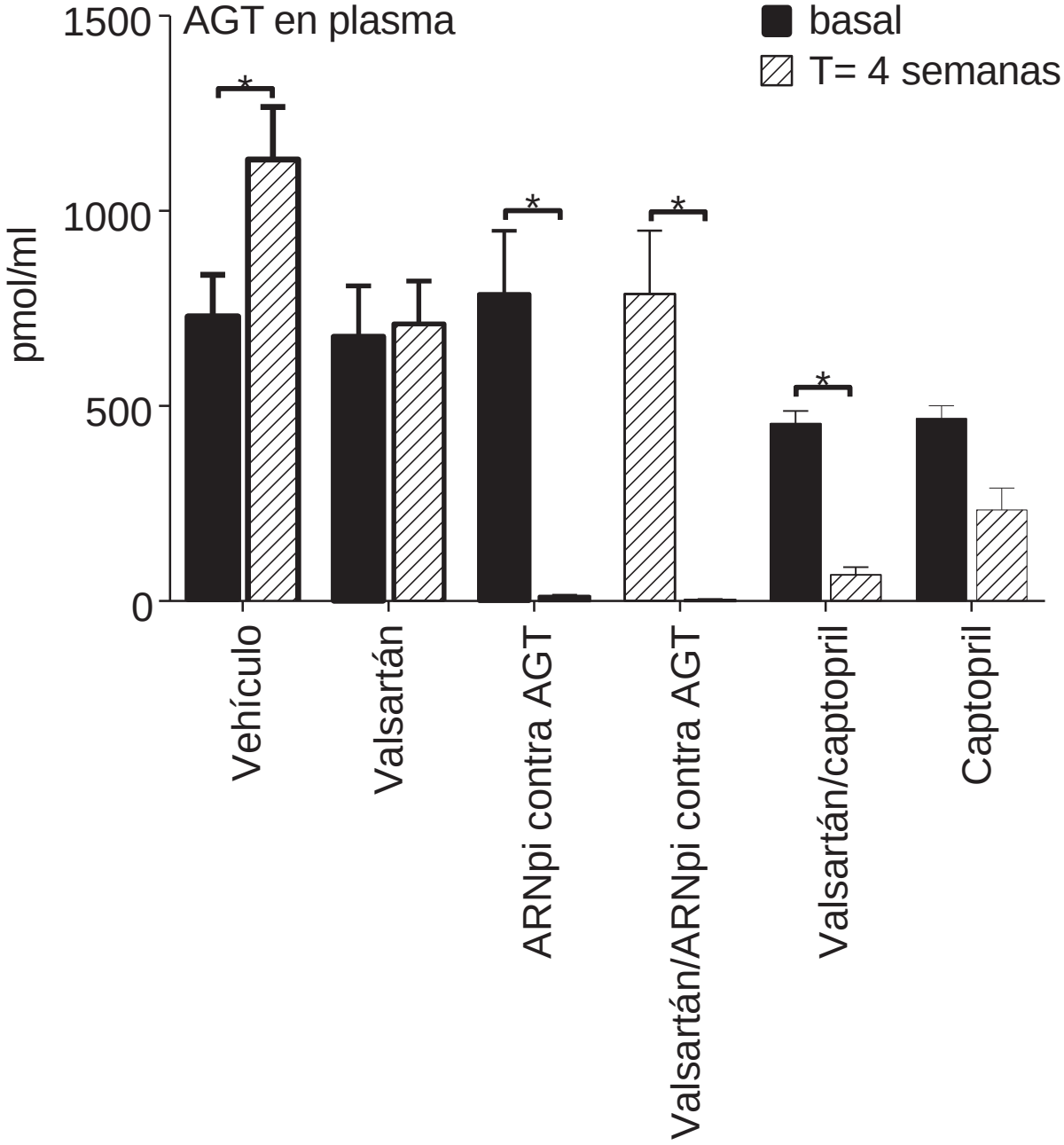

AGT en plasma
basal
T= 4 semanas
pmol/ml
1500
1000
500
0
*
*
*
*
Vehículo
Valsartán
ARNpi contra AGT
Valsartán/ARNpi contra AGT
Valsartán/captopril
Captopril

FIG. 2B

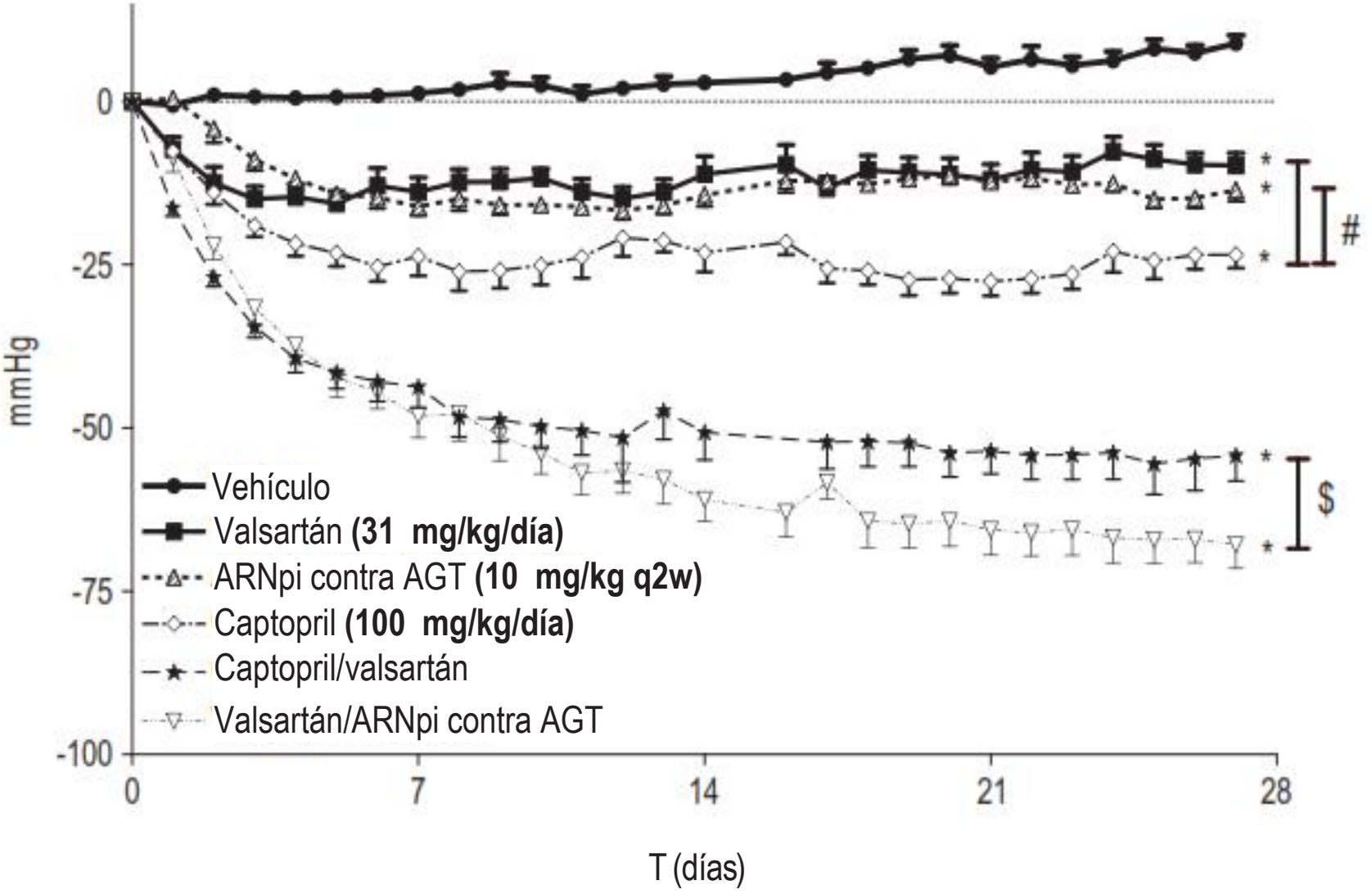

0
-25
-50
-75
-100
mmHg
0
7
14
21
28
T (días)
Vehículo
Valsartán (31 mg/kg/día)
ARNpi contra AGT (10 mg/kg q2w)
Captopril (100 mg/kg/día)
Captopril/valsartán
Valsartán/ARNpi contra AGT
*
*
*
*
*
#
$

FIG. 2C

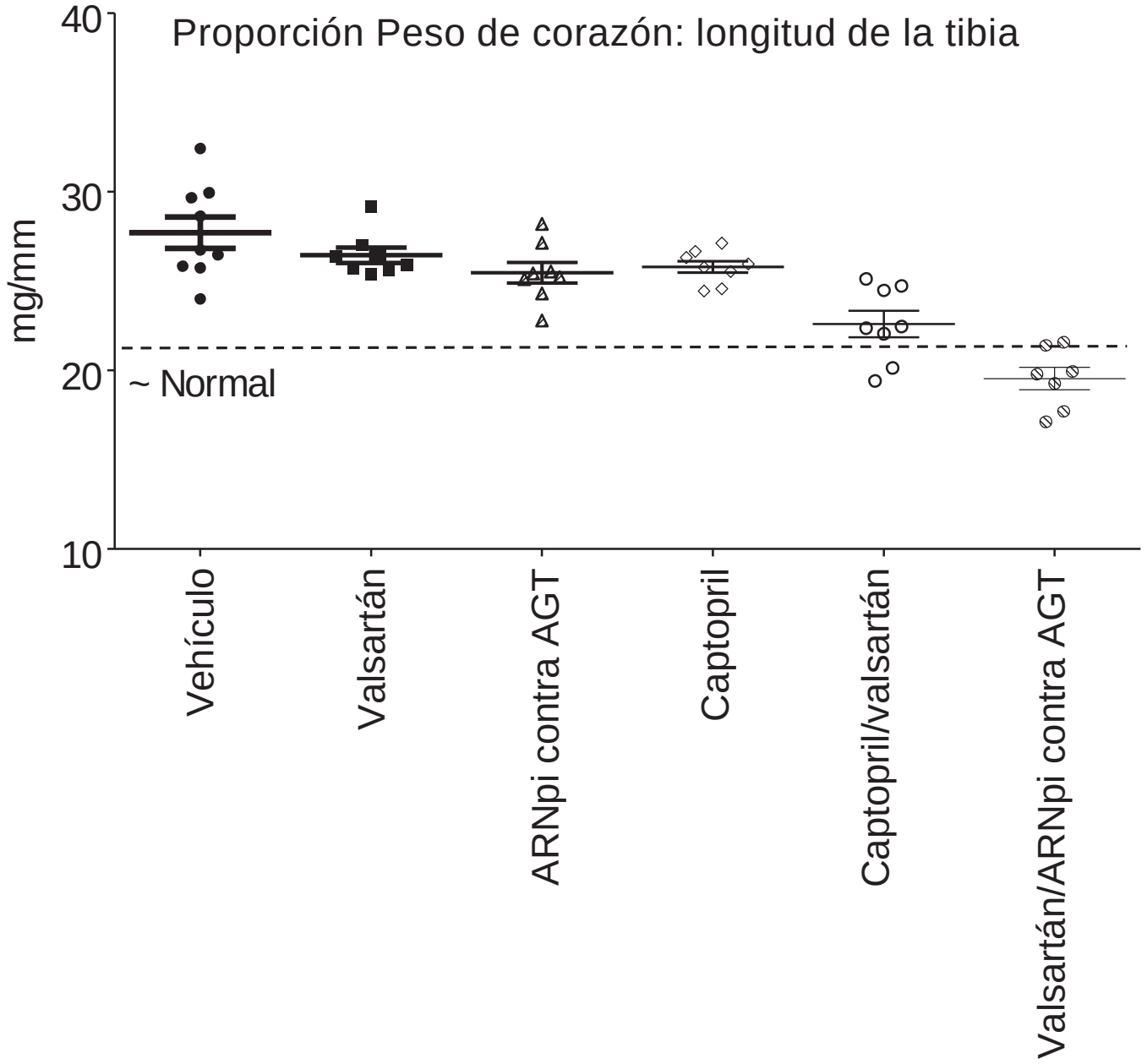

Proporción Peso de corazón: longitud de la tibia
mg/mm
40
30
20
10
~ Normal
Vehículo
Valsartán
ARNpi contra AGT
Captopril
Captopril/valsartán
Valsartán/ARNpi contra AGT

FIG. 2D

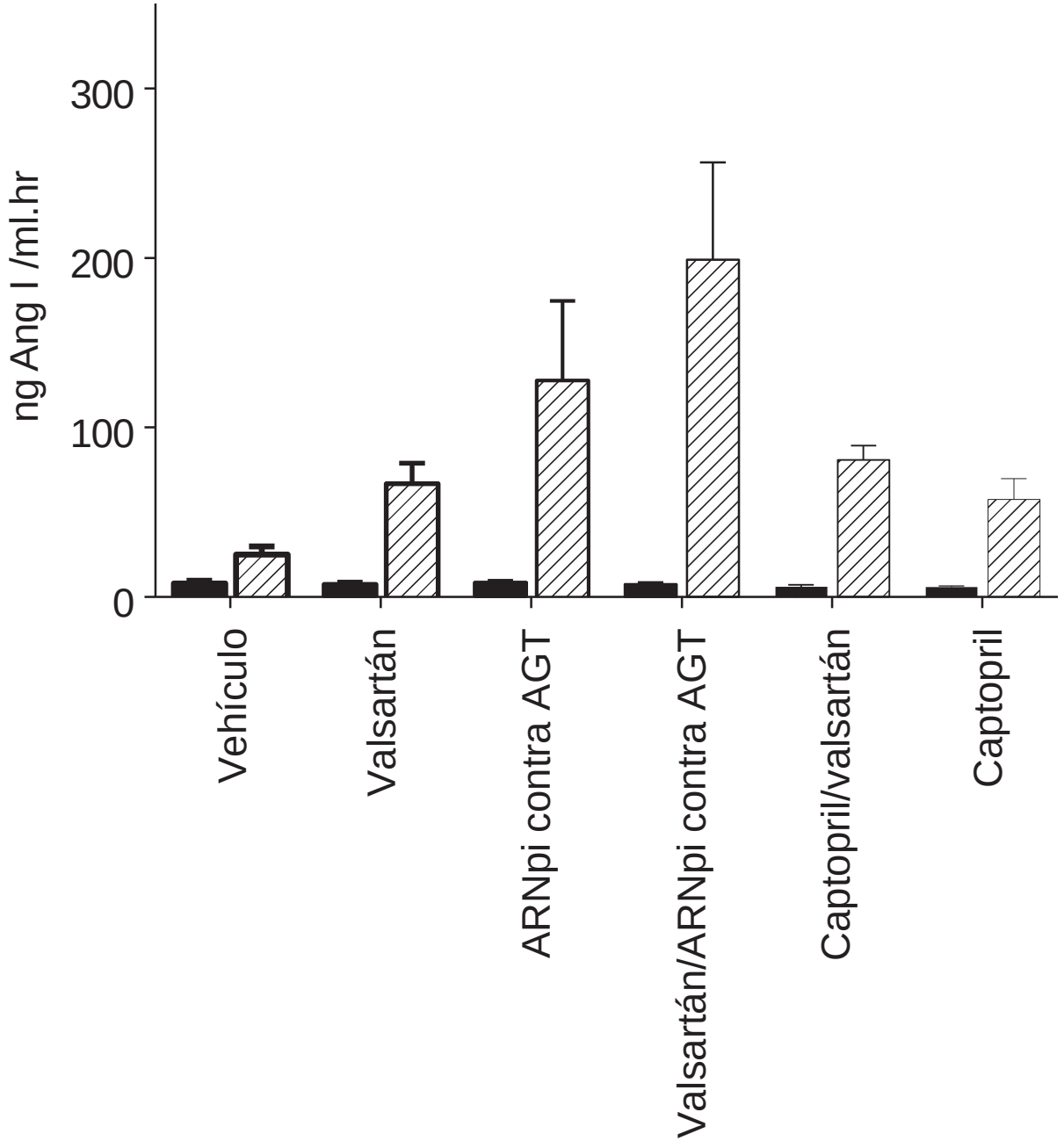

300
200
100
0
ng Ang I /ml.hr
Vehículo
Valsartán
ARNpi contra AGT
Valsartán/ARNpi contra AGT
Captopril/valsartán
Captopril

FIG. 2E

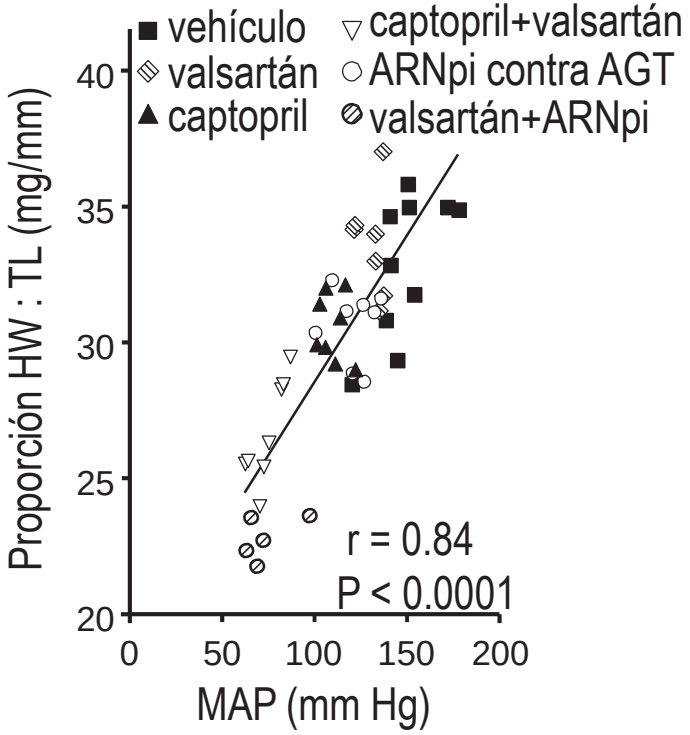


FIG. 2F

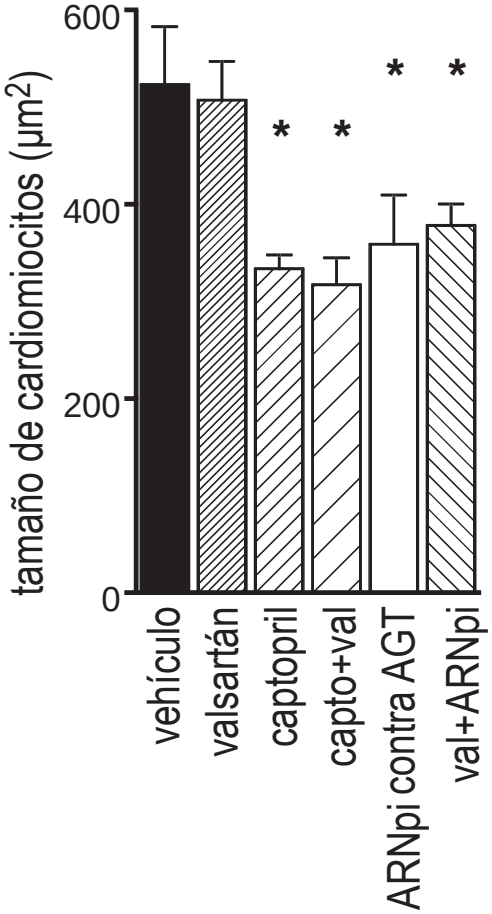


FIG. 2G

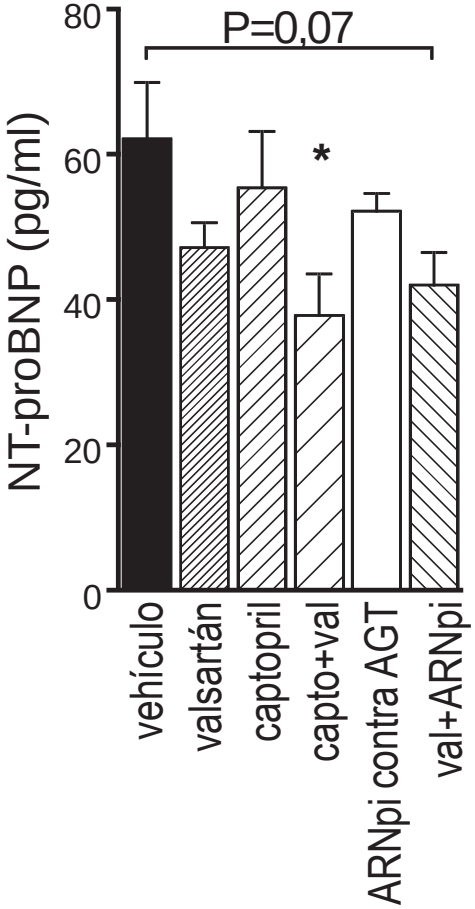


FIG. 3

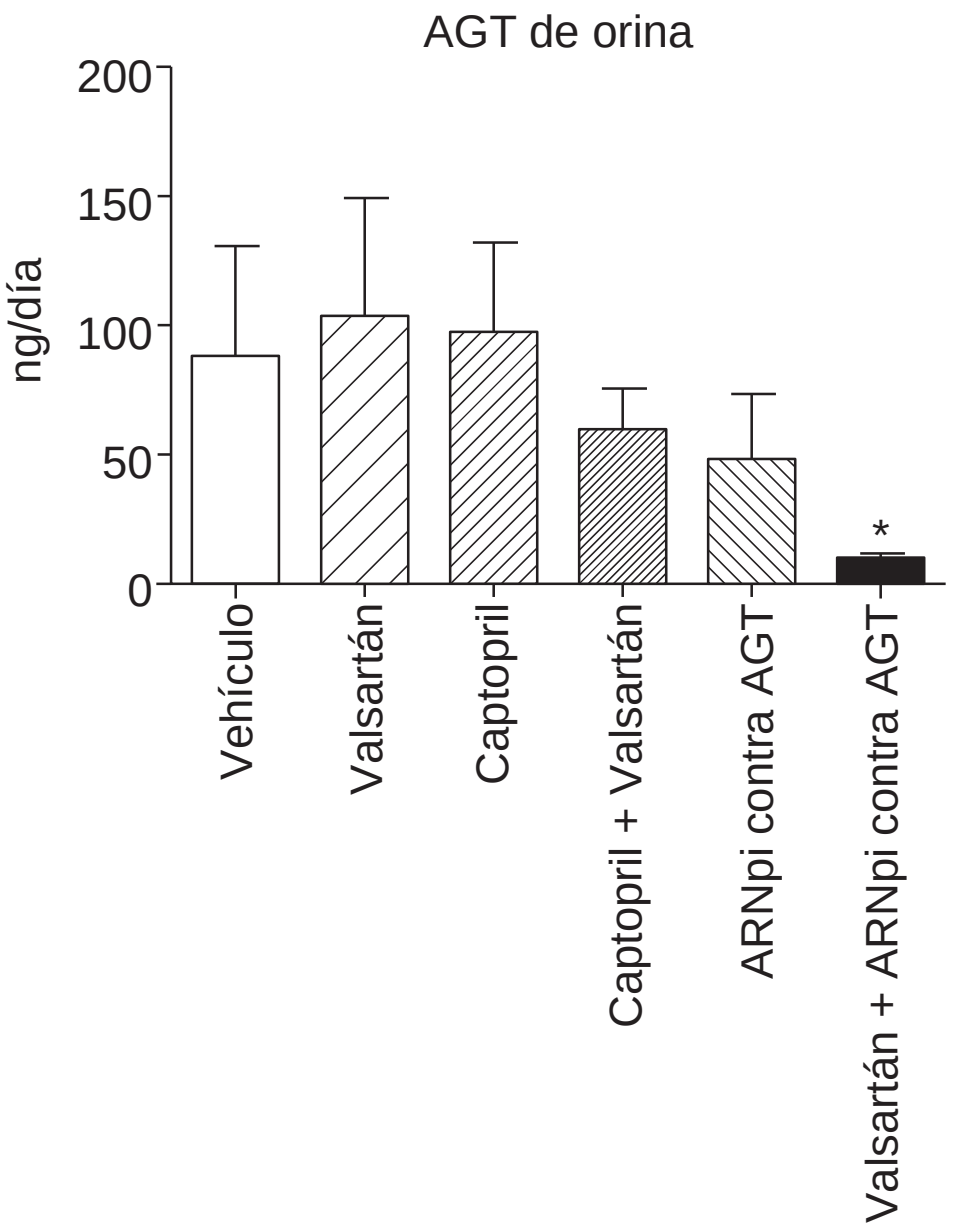

AGT de orina
ng/día
200
150
100
50
0
*
Vehículo
Valsartán
Captopril
Captopril + Valsartán
ARNpi contra AGT
Valsartán + ARNpi contra AGT

FIG. 4A

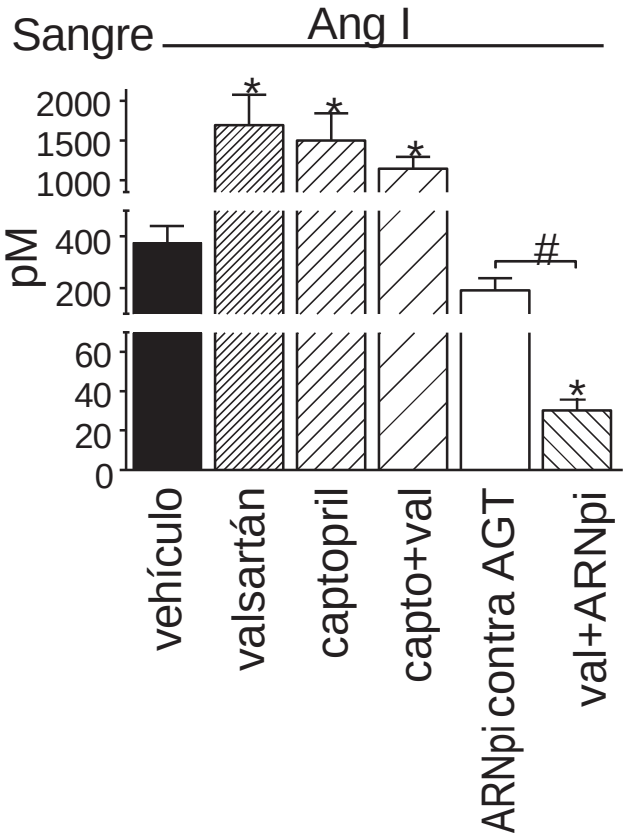


FIG. 4B

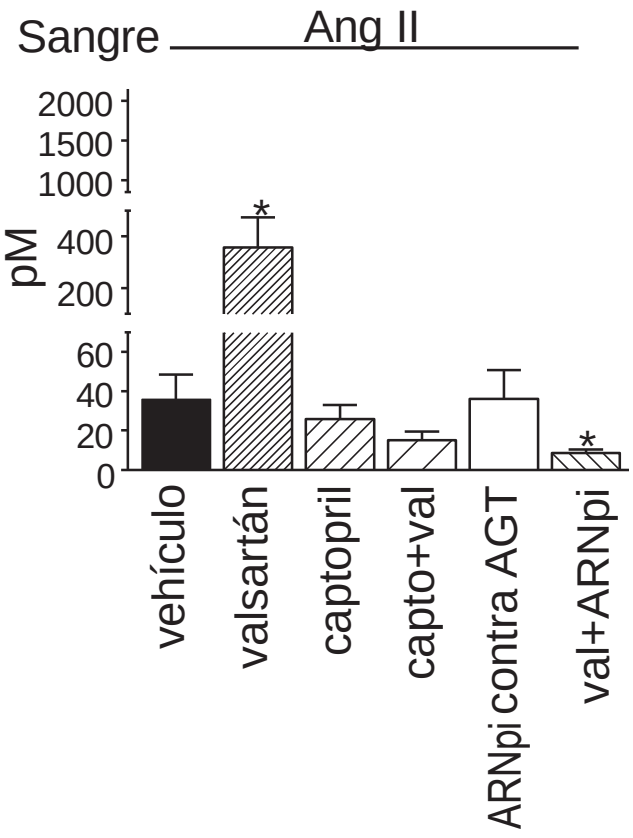


FIG. 4C

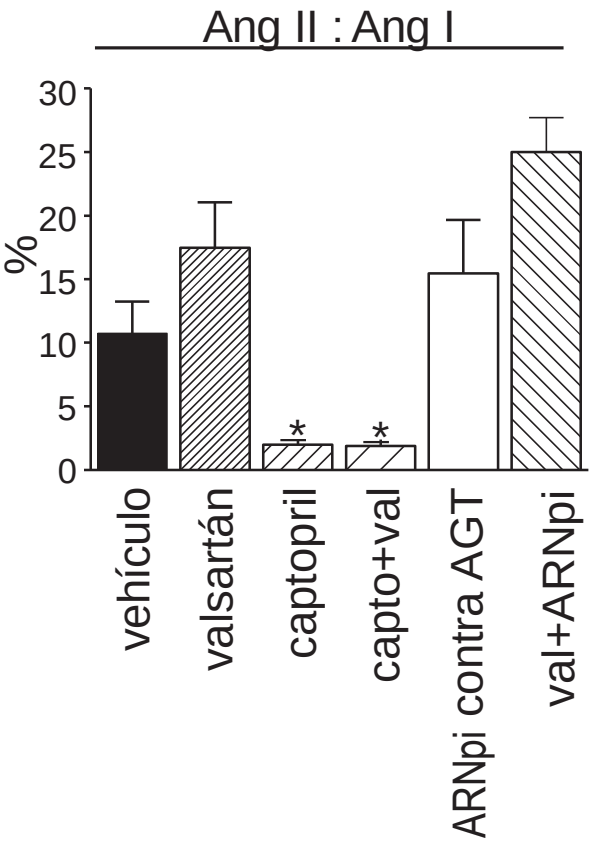


FIG. 5A

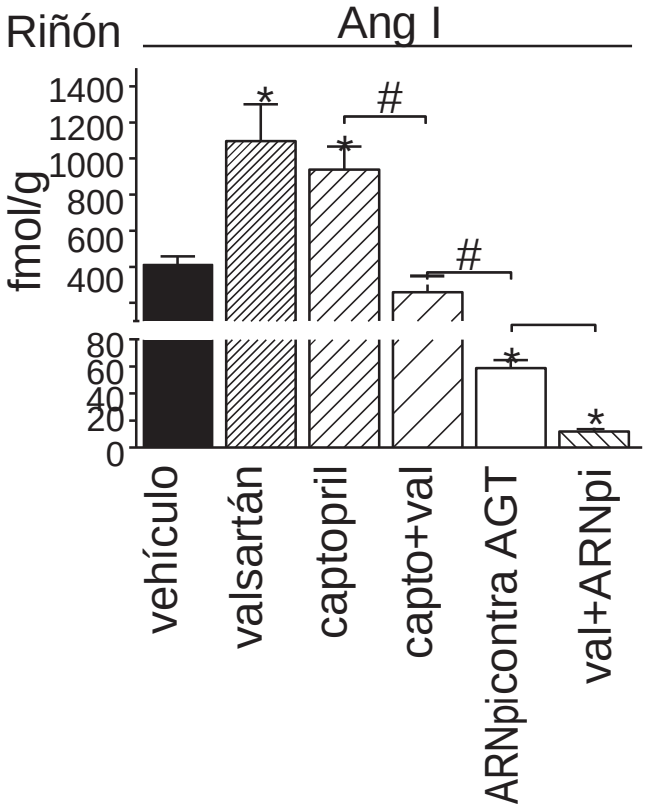


FIG. 5B

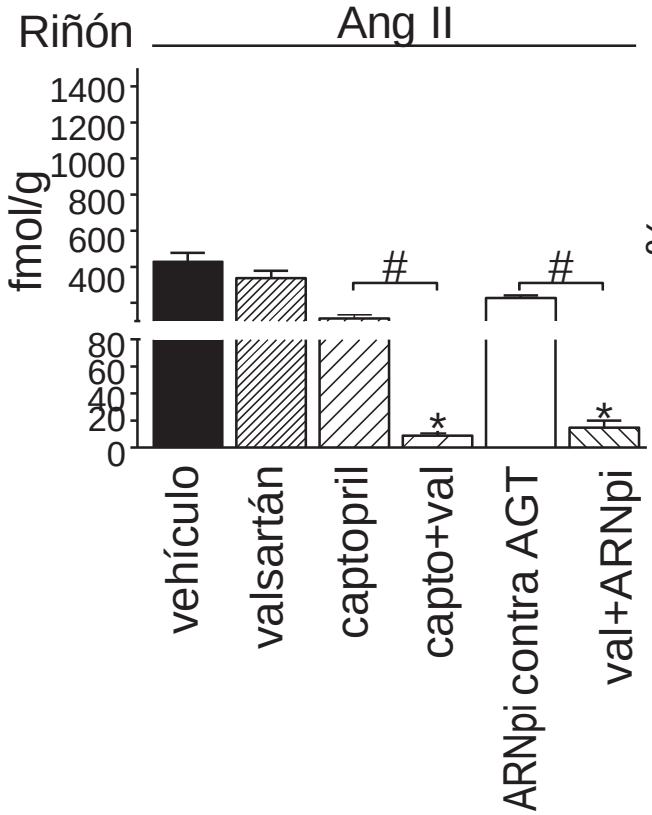


FIG. 5C

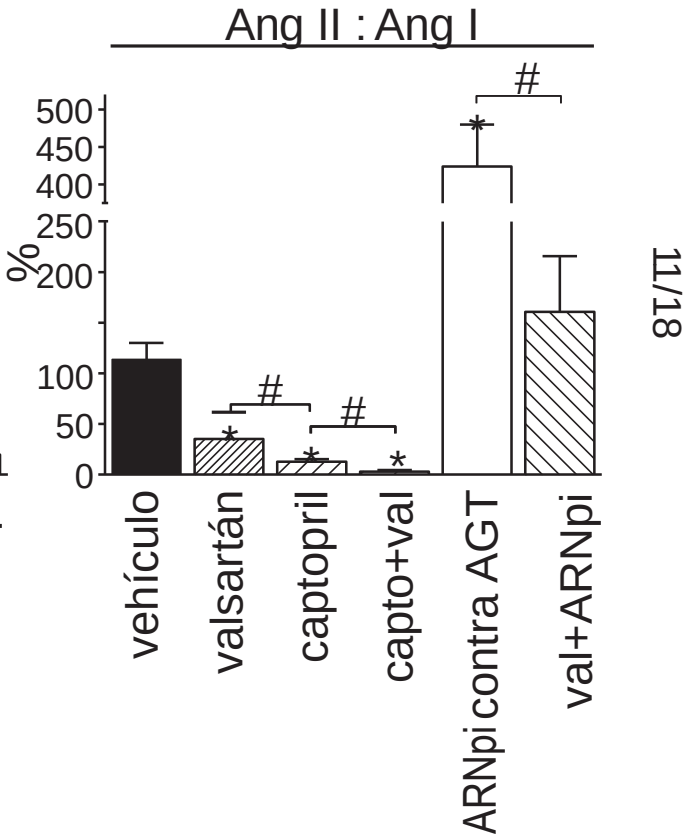


FIG. 6A

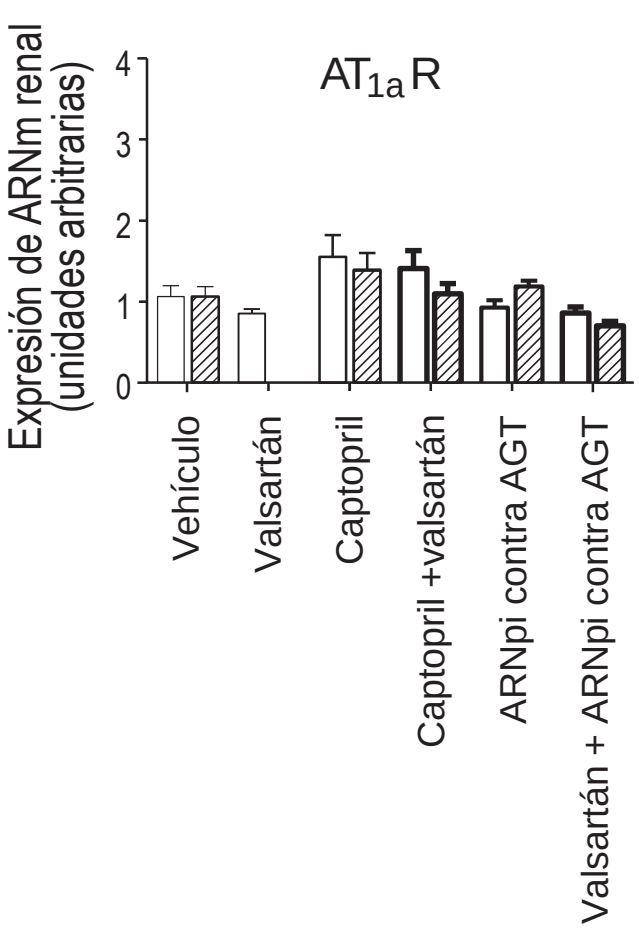


FIG. 6B

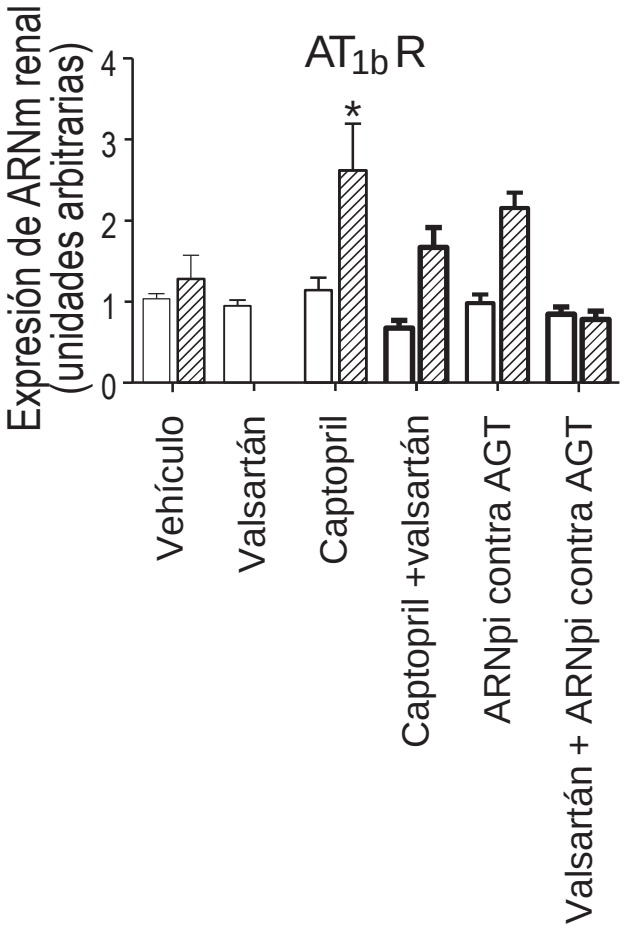


FIG. 6C

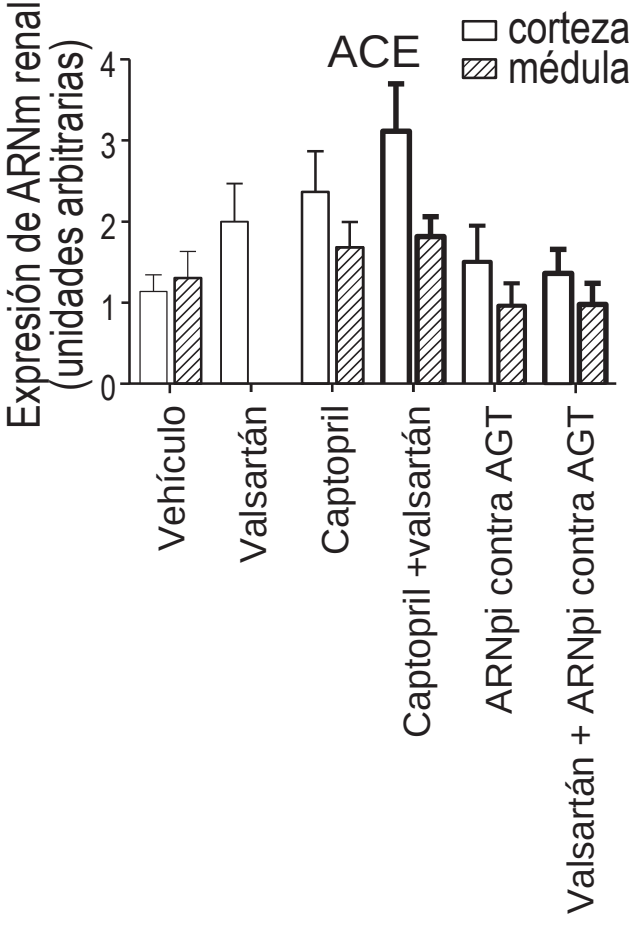
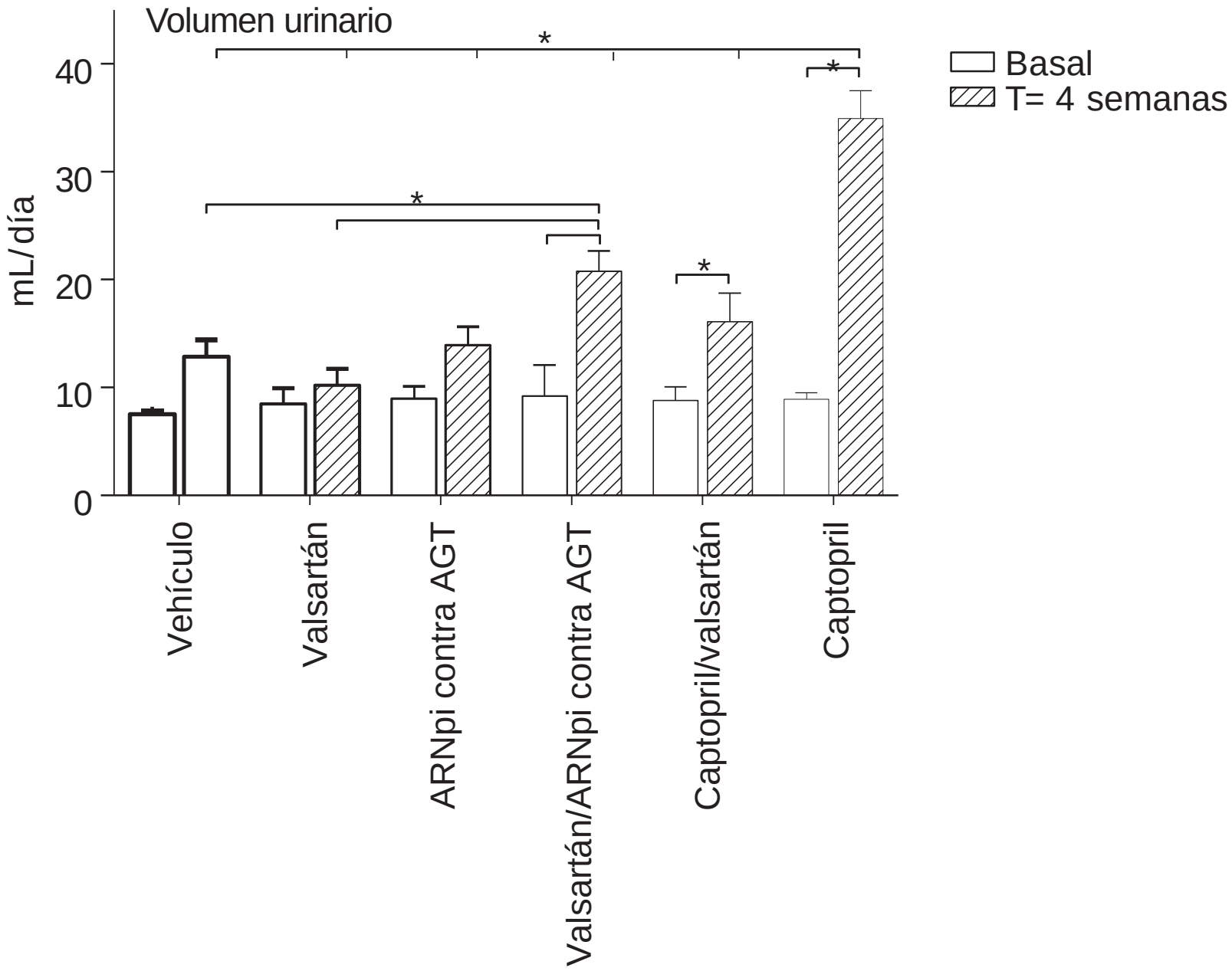


FIG. 7


Volumen urinario
mL/día
0
10
20
30
40
*
*
*
*
Basal
T= 4 semanas
Vehículo
Valsartán
ARNpi contra AGT
Valsartán/ARNpi contra AGT
Captopril/valsartán
Captopril

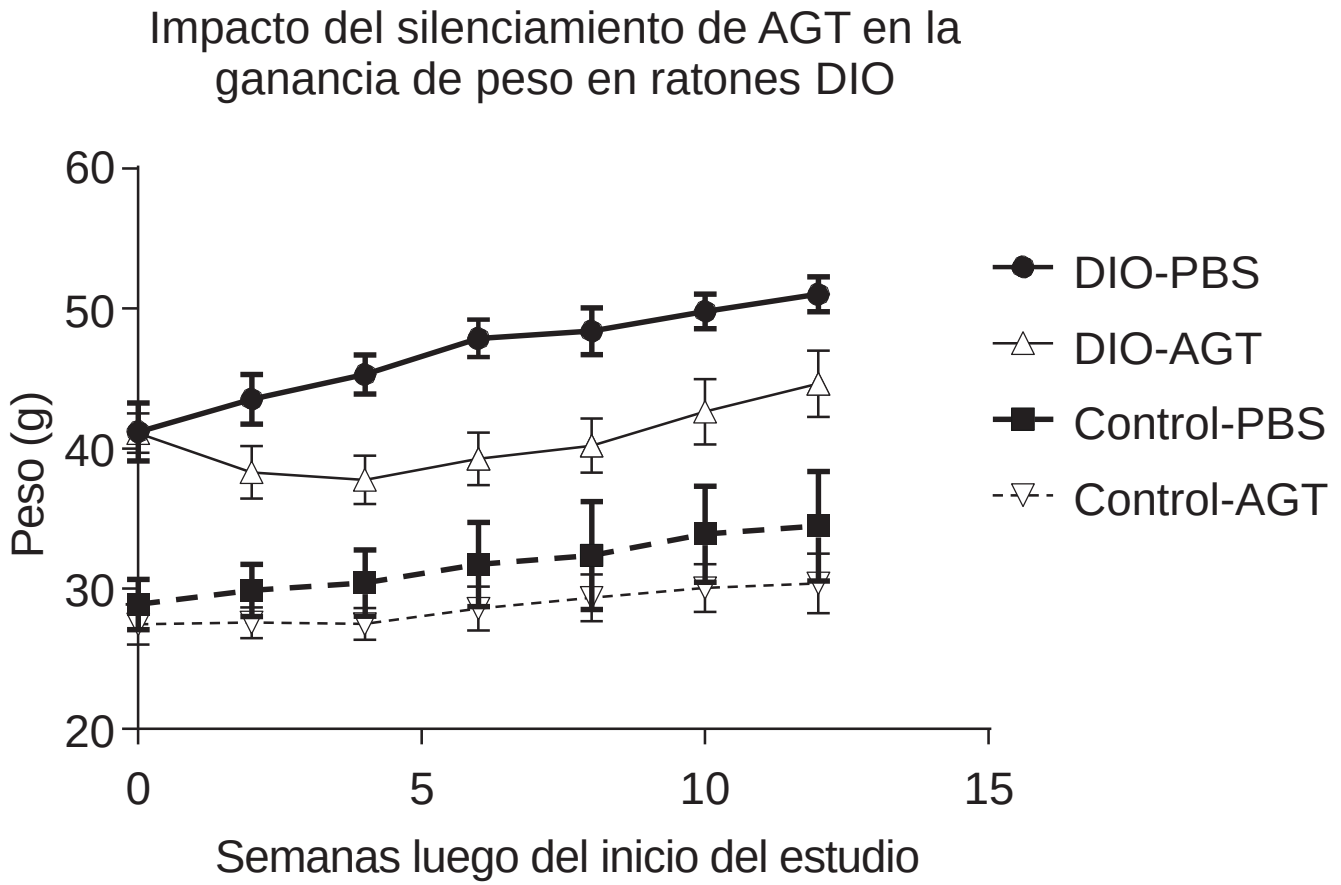

Impacto del silenciamiento de AGT en la ganancia de peso en ratones DIO
Peso (g)
60
50
40
30
20
0
5
10
15
Semanas luego del inicio del estudio
DIO-PBS
DIO-AGT
Control-PBS
Control-AGT

FIG. 8A

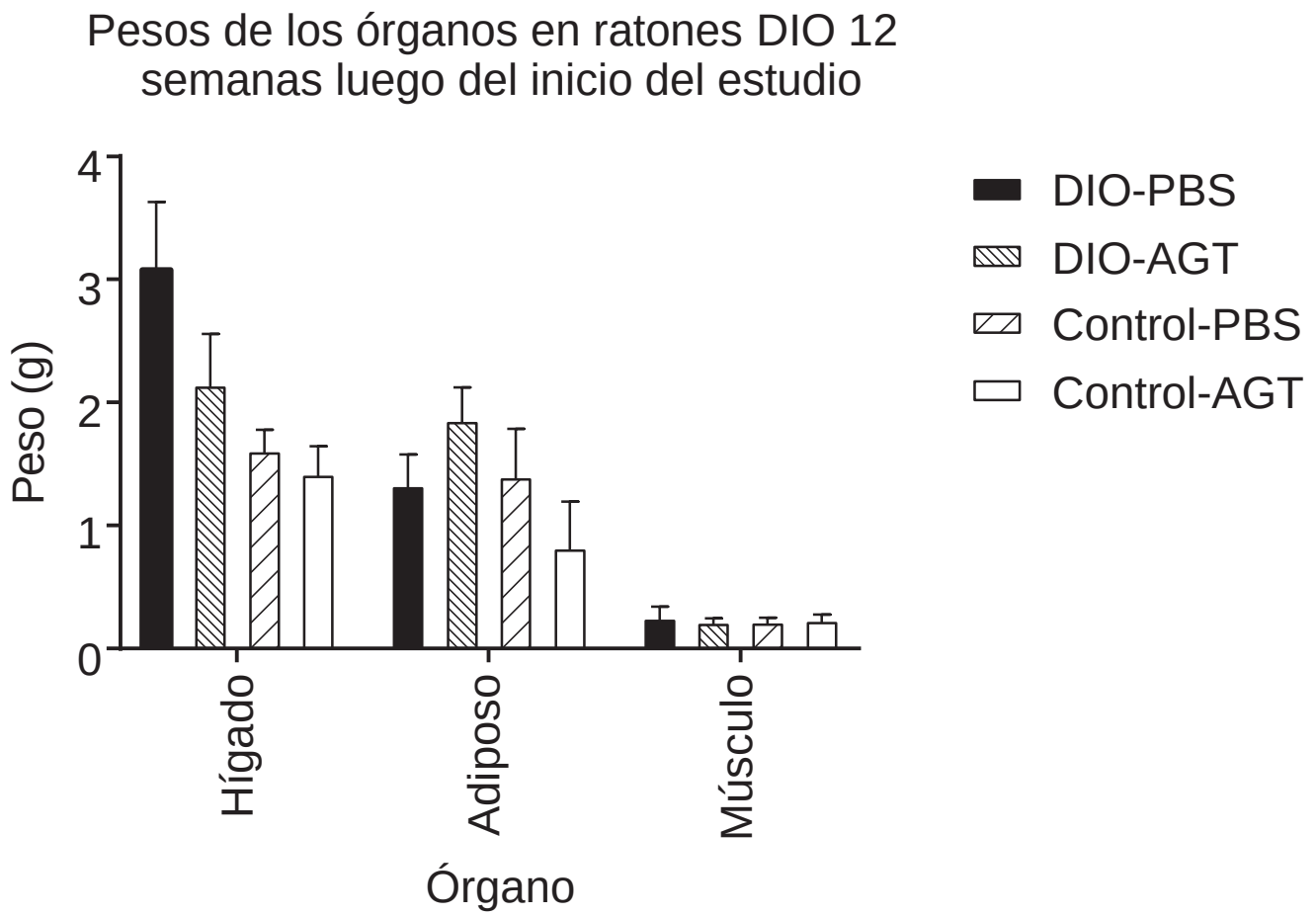

Pesos de los órganos en ratones DIO 12 semanas luego del inicio del estudio
Peso (g)
0
1
2
3
4
Hígado
Adiposo
Músculo
Órgano
DIO-PBS
DIO-AGT
Control-PBS
Control-AGT

FIG. 8B

Impacto del silenciamiento de AGT en la tolerancia a glucosa en ratones DIO

FIG. 9A

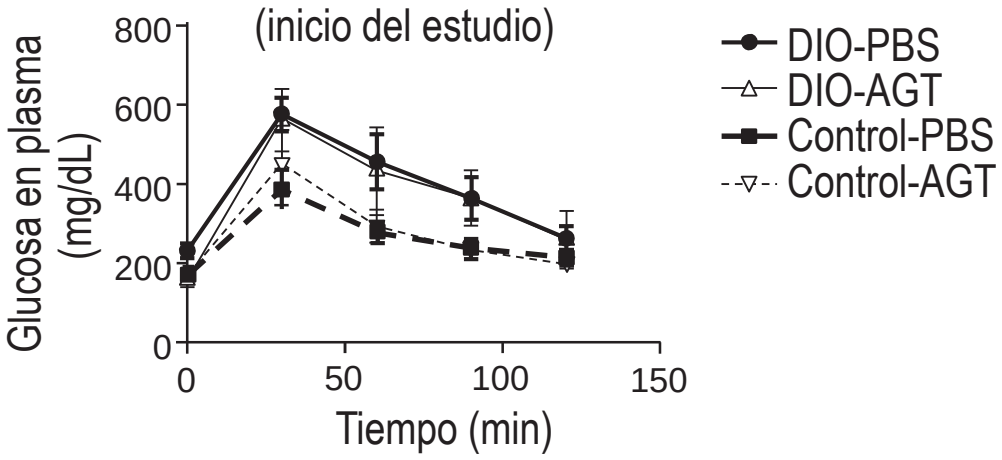
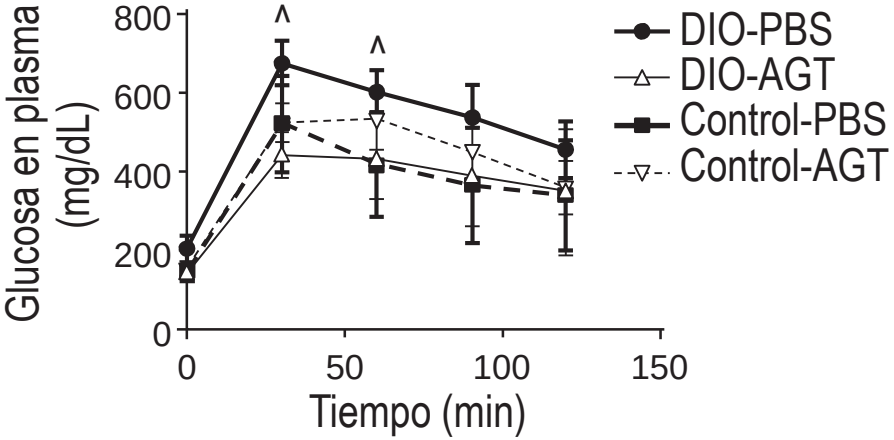


FIG. 9B

Impacto del silenciamiento de AGTen la tolerancia a glucosa en ratones DIO (Seis semanas luego de la dosis)



^ *indica valor(es) por encima del máximo del medidor (699)*

FIG. 9C

Impacto del silenciamiento de AGTen la tolerancia a glucosa en ratones DIO (Doce semanas luego de la dosis)

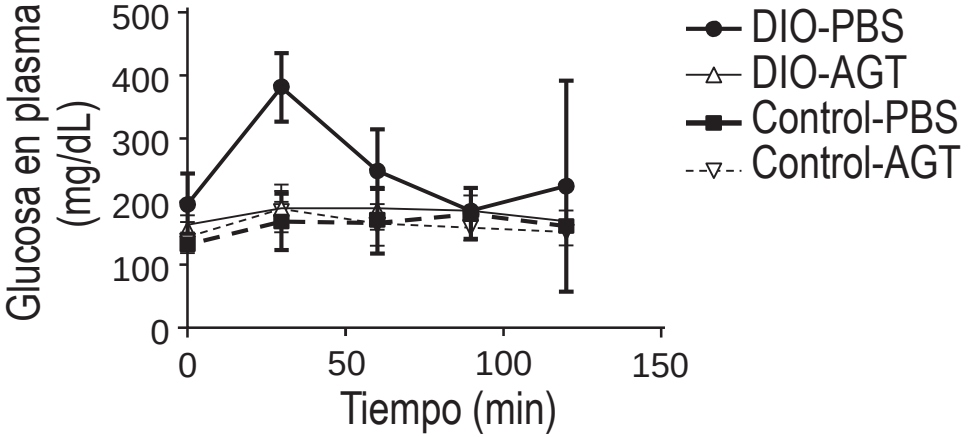


FIG. 10A

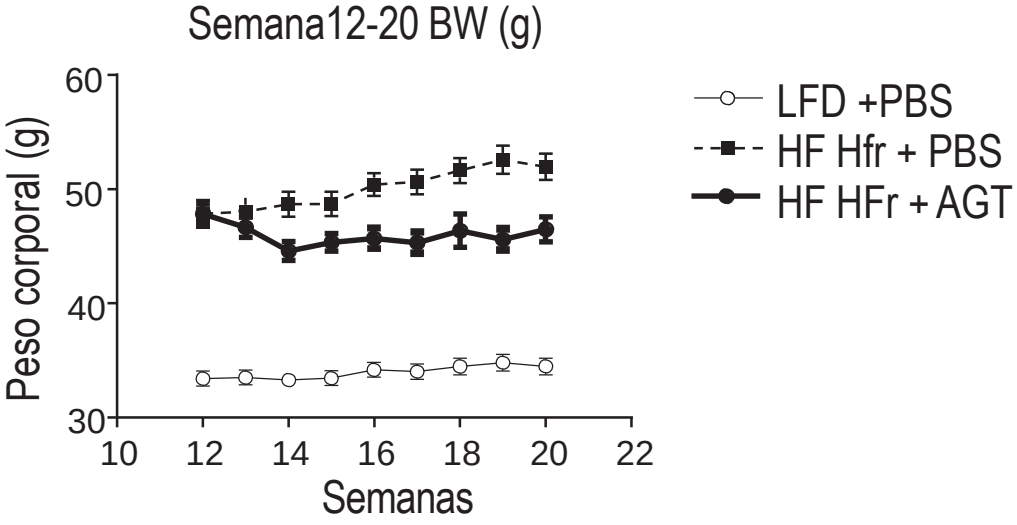


FIG. 10B

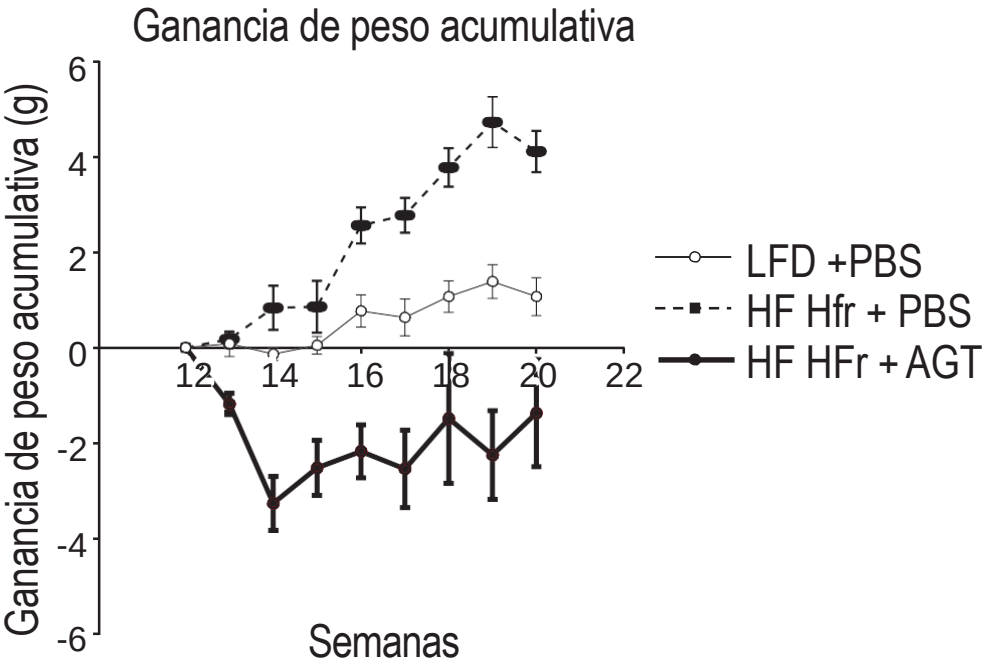


FIG. 11A

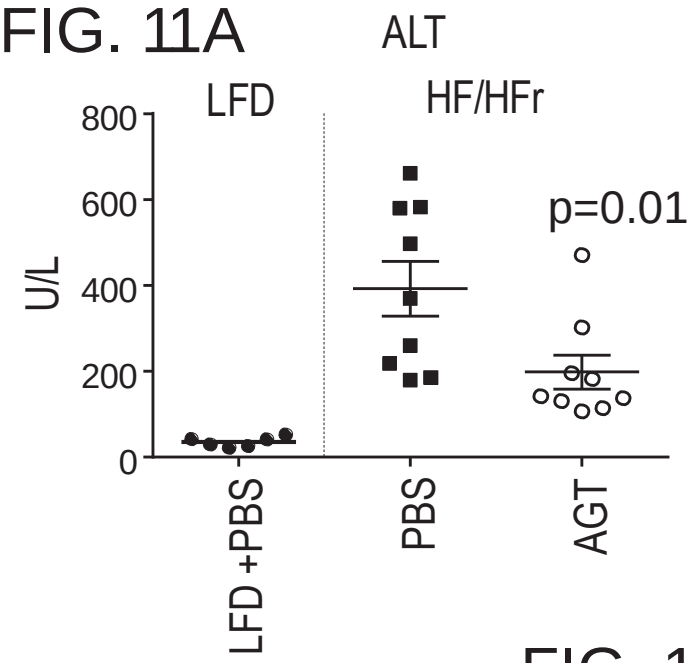


FIG. 11B

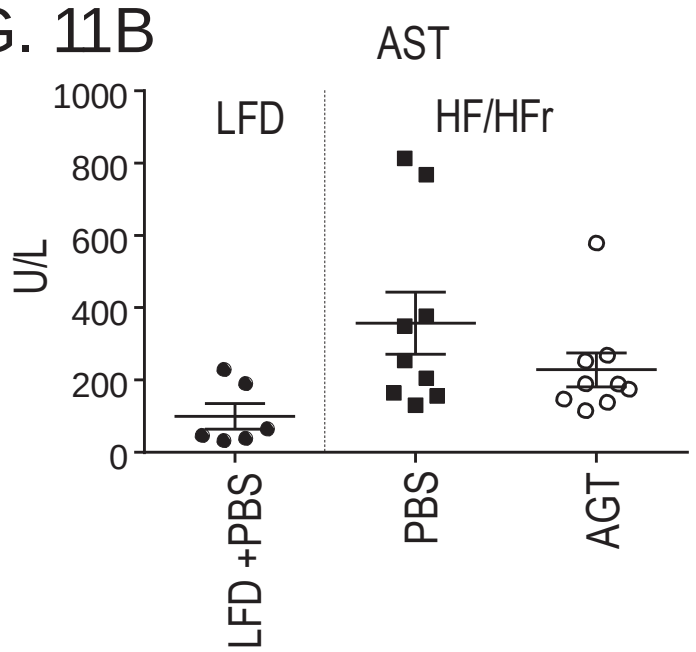


FIG. 11C

