

MÉTODOS Y COMPOSICIONES PARA EL TRATAMIENTO DE UN TRASTORNO ASOCIADO CON ANGIOTENSINÓGENO (AGT)

SOLICITUDES RELACIONADAS

La presente solicitud reivindica el beneficio de prioridad de la Solicitud de Patente Provisional de EE.UU. N° 63/017.854, presentada el 30 de abril de 2020, y la Solicitud de Patente Provisional de EE.UU. N° 62/934.695, presentada el 13 de noviembre de 2019, cuyos contenidos completos se incorporan aquí como referencia.

La presente solicitud está relacionada con la solicitud PCT N° PCT/US2019/032150, presentada el 14 de mayo de 2019, cuyo contenido completo se incorpora aquí como 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 noviembre de 2020 cuyo nombre es: 121301-11120_SL.txt y tiene un tamaño de 24.638 bytes.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

El sistema de renina-angiotensina-aldosterona (RAAS) desempeña un papel crucial en la regulación de la presión sanguínea. La cascada de RAAS comienza con la liberación de renina por 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 (ECA), 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 (AT₁R), 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 AT₁R 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 AT₁R, 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 predominante 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 cardíaca, aneurismas (por ejemplo aneurisma aórtico), enfermedad arterial periférica, daño cardíaco (por ejemplo, agrandamiento o hipertrofia cardíaca) 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 cardíaca. 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 colaboradores 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.* 7 de noviembre de 2017. 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.* 7 de noviembre de 2017. 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 antihipertensivo solo y requieren dos o más agentes antihipertensivos 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 al aumentar el número de medicaciones se incrementan los efectos secundarios. Además, diversos estudios han sugerido una potencial relación entre el uso crónico de medicamentos antihipertensivos y el deterioro de la función renal, en los cuales se vio que los agentes antihipertensivos que se usan para controlar la presión sanguínea también afectan la función renal independientemente de su efecto sobre la presión sanguínea (Tomlinson, y colaboradores (2013) PLoS ONE 8 (11) ID del artículo e78465; The SPRINT Research Group (2015) NEJM 373 (22): 2103–2116, número de ClinicalTrials.gov, NCT01206062; Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) CKD Work Group (2013) *Kidney International Supplements* 3:1–150; Kamaroff, y colaboradores (2018) *Hindawi International J Chron Dis* Article ID 1382705 | <https://doi.org/10.1155/2018/1382705>).

Por lo tanto, en el arte existe la necesidad de disponer de métodos y terapias adicionales para tratar sujetos que padecen hipertensión.

SÍNTESIS DE LA INVENCION

La invención provee métodos y composiciones para inhibir la expresión de un gen de angiotensinógeno (AGT), para tratar a un sujeto que padece un trastorno que se beneficiaría de la reducción de la expresión del AGT, para tratar a un sujeto que padece un trastorno asociado con AGT y para disminuir la presión sanguínea en un sujeto. Los métodos incluyen administrar al sujeto una dosis fija de un agente de ARNi, por ejemplo, un agente de ARNi de hebra doble, dirigido hacia un gen AGT.

En un aspecto, la presente invención provee un método para inhibir la expresión de un gen de angiotensinógeno (AGT) en un sujeto. El método

incluye administrar al sujeto una dosis fija de entre aproximadamente 50 mg y aproximadamente 800 mg (por ejemplo, entre aproximadamente 50 y aproximadamente 200 mg, entre aproximadamente 50 mg y aproximadamente 500 mg, entre aproximadamente 100 mg y aproximadamente 800 mg, entre aproximadamente 100 mg y aproximadamente 500 mg, entre aproximadamente 100 mg y aproximadamente 300 mg, entre aproximadamente 200 mg y aproximadamente 300 mg, entre aproximadamente 200 mg y aproximadamente 400 mg, entre aproximadamente 200 mg y aproximadamente 500 mg, entre aproximadamente 200 mg y aproximadamente 800 mg, entre aproximadamente 300 mg y aproximadamente 800 mg, entre aproximadamente 300 mg y aproximadamente 500 mg, entre aproximadamente 300 mg y aproximadamente 4000 mg [Sic.], entre aproximadamente 400 mg y aproximadamente 800 mg, entre aproximadamente 400 mg y aproximadamente 500 mg, por ejemplo, aproximadamente 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, o aproximadamente 800 mg) de un agente de ácido ribonucleico de hebra doble (ARNi), o de una sal del mismo, donde el agente de ARNi de hebra doble, o la sal del mismo, comprende una hebra sentido y una hebra antisentido que forman una región de hebra doble, donde la hebra antisentido comprende una secuencia de nucleótidos que comprende por lo menos 19 nucleótidos contiguos de la secuencia de nucleótidos UGUACUCUCAUUGUGGAUGACGA (SEQ ID N°: 9) y la hebra sentido comprende una secuencia de nucleótidos que comprende por lo menos 19 nucleótidos contiguos de la secuencia de nucleótidos GUCAUCCACAAUGAGAGUACA (SEQ ID N°: 10); donde el agente de ARNi de hebra doble, o la sal del mismo, comprende por lo menos una modificación de

un nucleótido, y donde por lo menos una de las modificaciones de los nucleótidos es una modificación de nucleótidos térmicamente desestabilizante, inhibiendo así la expresión del gen AGT en el sujeto.

En otro aspecto, la presente invención provee un método para tratar a un sujeto que se beneficiaría de la reducción de la expresión de angiotensinógeno (AGT), por ejemplo, un sujeto en riesgo de desarrollar un trastorno asociado con AGT, por ejemplo, hipertensión. El método incluye administrar al sujeto una dosis fija de entre aproximadamente 50 mg y aproximadamente 800 mg (por ejemplo, entre aproximadamente 50 y aproximadamente 200 mg, entre aproximadamente 50 mg y aproximadamente 500 mg, entre aproximadamente 100 mg y aproximadamente 800 mg, entre aproximadamente 100 mg y aproximadamente 500 mg, entre aproximadamente 100 mg y aproximadamente 300 mg, entre aproximadamente 200 mg y aproximadamente 300 mg, entre aproximadamente 200 mg y aproximadamente 400 mg, entre aproximadamente 200 mg y aproximadamente 500 mg, entre aproximadamente 200 mg y aproximadamente 800 mg, entre aproximadamente 300 mg y aproximadamente 800 mg, entre aproximadamente 300 mg y aproximadamente 500 mg, entre aproximadamente 300 mg y aproximadamente 4000 mg [Sic.], entre aproximadamente 400 mg y aproximadamente 800 mg, entre aproximadamente 400 mg y aproximadamente 500 mg, por ejemplo, aproximadamente 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, o aproximadamente 800 mg) de un agente de ácido ribonucleico de hebra doble (ARNi), o de una sal del mismo, donde el agente de ARNi de hebra doble, o la sal del mismo, comprende una hebra sentido y una hebra antisentido que forman una región de hebra doble, donde la hebra antisentido

comprende una secuencia de nucleótidos que comprende por lo menos 19 nucleótidos contiguos de la secuencia de nucleótidos UGUACUCUCAUUGUGGAUGACGA (SEQ ID N°: 9) y la hebra sentido comprende una secuencia de nucleótidos que comprende por lo menos 19 nucleótidos contiguos de la secuencia de nucleótidos GUCAUCCACAAUGAGAGUACA (SEQ ID N°: 10); donde el agente de ARNi de hebra doble, o la sal del mismo, comprende por lo menos una modificación de un nucleótido, y donde por lo menos una de las modificaciones de los nucleótidos es una modificación de nucleótidos térmicamente desestabilizante, para tratar de esa manera al sujeto que se beneficiaría de la reducción de la expresión del AGT.

En un aspecto, la presente invención provee un método para tratar a un sujeto que padece un trastorno asociado con angiotensinógeno (AGT), por ejemplo, hipertensión. El método incluye administrar al sujeto una dosis fija de entre aproximadamente 50 mg y aproximadamente 800 mg (por ejemplo, entre aproximadamente 50 y aproximadamente 200 mg, entre aproximadamente 50 mg y aproximadamente 500 mg, entre aproximadamente 100 mg y aproximadamente 800 mg, entre aproximadamente 100 mg y aproximadamente 500 mg, entre aproximadamente 100 mg y aproximadamente 300 mg, entre aproximadamente 200 mg y aproximadamente 300 mg, entre aproximadamente 200 mg y aproximadamente 400 mg, entre aproximadamente 200 mg y aproximadamente 500 mg, entre aproximadamente 200 mg y aproximadamente 800 mg, entre aproximadamente 300 mg y aproximadamente 800 mg, entre aproximadamente 300 mg y aproximadamente 500 mg, entre aproximadamente 300 mg y aproximadamente 4000 mg [Sic.], entre aproximadamente 400 mg y

aproximadamente 800 mg, entre aproximadamente 400 mg y aproximadamente 500 mg, por ejemplo, aproximadamente 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, o aproximadamente 800 mg) de un agente de ácido ribonucleico de hebra doble (ARNi), o de una sal del mismo, donde el agente de ARNi de hebra doble, o la sal del mismo, comprende una hebra sentido y una hebra antisentido que forman una región de hebra doble, donde la hebra antisentido comprende una secuencia de nucleótidos que comprende por lo menos 19 nucleótidos contiguos de la secuencia de nucleótidos UGUACUCUCAUUGUGGAUGACGA (SEQ ID N°: 9) y la hebra sentido comprende una secuencia de nucleótidos que comprende por lo menos 19 nucleótidos contiguos de la secuencia de nucleótidos GUCAUCCACAAUGAGAGUACA (SEQ ID N°: 10); donde el agente de ARNi de hebra doble, o la sal del mismo, comprende por lo menos una modificación de un nucleótido, donde por lo menos una de las modificaciones de los nucleótidos es una modificación de nucleótidos térmicamente desestabilizante, para tratar de esa manera al sujeto que padece el trastorno asociado con AGT.

En otro aspecto, la presente invención provee un método para disminuir el nivel de la presión sanguínea en un sujeto, por ejemplo en un sujeto que padece un trastorno asociado con AGT, por ejemplo, hipdertensión. El método incluye administrar al sujeto una dosis fija de entre aproximadamente 50 mg y aproximadamente 800 mg (por ejemplo, entre aproximadamente 50 y aproximadamente 200 mg, entre aproximadamente 50 mg y aproximadamente 500 mg, entre aproximadamente 100 mg y aproximadamente 800 mg, entre aproximadamente 100 mg y aproximadamente 500 mg, entre aproximadamente 100 mg y aproximadamente 300 mg, entre aproximadamente 200 mg y

aproximadamente 300 mg, entre aproximadamente 200 mg y aproximadamente 400 mg, entre aproximadamente 200 mg y aproximadamente 500 mg, entre aproximadamente 200 mg y aproximadamente 800 mg, entre aproximadamente 300 mg y aproximadamente 800 mg, entre aproximadamente 300 mg y aproximadamente 500 mg, entre aproximadamente 300 mg y aproximadamente 4000 mg [Sic.], entre aproximadamente 400 mg y aproximadamente 800 mg, entre aproximadamente 400 mg y aproximadamente 500 mg, por ejemplo, aproximadamente 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, o aproximadamente 800 mg) de un agente de ácido ribonucleico de hebra doble (ARNi), o de una sal del mismo, donde el agente de ARNi de hebra doble, o la sal del mismo, comprende una hebra sentido y una hebra antisentido que forman una región de hebra doble, donde la hebra antisentido comprende una secuencia de nucleótidos que comprende por lo menos 19 nucleótidos contiguos de la secuencia de nucleótidos UGUACUCUCAUUGUGGAUGACGA (SEQ ID N°: 9) y la hebra sentido comprende una secuencia de nucleótidos que comprende por lo menos 19 nucleótidos contiguos de la secuencia de nucleótidos GUCAUCCACAAUGAGAGUACA (SEQ ID N°: 10); donde el agente de ARNi de hebra doble, o la sal del mismo, comprende por lo menos una modificación de un nucleótido, donde por lo menos una de las modificaciones de los nucleótidos es una modificación de nucleótidos térmicamente desestabilizante, disminuyendo así el nivel de la presión sanguínea en el sujeto.

En algunas formas de realización, la dosis fija se administra al sujeto en un intervalo de una vez al mes. En otras formas de realización, la dosis fija se administra al sujeto en un intervalo de una vez por trimestre. En algunas formas

de realización, la dosis fija se administra al sujeto en un intervalo de dos veces al año.

En algunas formas de realización, al sujeto se le administra una dosis fija de entre aproximadamente 50 mg y aproximadamente 200 mg. En otras formas de realización, al sujeto se le administra una dosis fija de entre aproximadamente 200 mg y aproximadamente 400 mg. En algunas formas de realización, al sujeto se le administra una dosis fija de entre aproximadamente 400 mg y aproximadamente 800 mg.

En algunas formas de realización, al sujeto se le administra una dosis fija de aproximadamente 100 mg. En algunas formas de realización, al sujeto se le administra una dosis fija de aproximadamente 200 mg. En algunas formas de realización, al sujeto se le administra una dosis fija de aproximadamente 300 mg. En algunas formas de realización, al sujeto se le administra una dosis fija de aproximadamente 400 mg. En algunas formas de realización, al sujeto se le administra una dosis fija de aproximadamente 500 mg. En otras formas de realización, al sujeto se le administra una dosis fija de aproximadamente 600 mg. En algunas formas de realización, al sujeto se le administra una dosis fija de aproximadamente 800 mg.

En algunas formas de realización, el agente de ARNi de hebra doble, o una sal del mismo, se administra al sujeto por vía subcutánea o intravenosa. En algunas formas de realización, la administración subcutánea es inyección subcutánea, por ejemplo, una autoadministración subcutánea. En otras formas de realización, la administración intravenosa es una inyección intravenosa.

En algunas formas de realización, la hebra antisentido comprende una secuencia de nucleótidos que comprende por lo menos 20 nucleótidos

contiguos de la secuencia de nucleótidos UGUACUCUCAUUGUGGAUGACGA (SEQ ID N°: 9) y la hebra sentido comprende una secuencia de nucleótidos que comprende por lo menos 20 nucleótidos contiguos de la secuencia de nucleótidos GUCAUCCACAAUGAGAGUACA (SEQ ID N°: 10).

En otras formas de realización, la hebra antisentido comprende una secuencia de nucleótidos que comprende por lo menos 21 nucleótidos contiguos de la secuencia de nucleótidos UGUACUCUCAUUGUGGAUGACGA (SEQ ID N°: 9) y la hebra sentido comprende una secuencia de nucleótidos que comprende por lo menos 20 nucleótidos contiguos de la secuencia de nucleótidos GUCAUCCACAAUGAGAGUACA (SEQ ID N°: 10).

En algunas formas de realización, la hebra antisentido comprende una secuencia de nucleótidos que comprende por lo menos 22 nucleótidos contiguos de la secuencia de nucleótidos UGUACUCUCAUUGUGGAUGACGA (SEQ ID N°: 9) y la hebra sentido comprende una secuencia de nucleótidos que comprende por lo menos 20 nucleótidos contiguos de la secuencia de nucleótidos GUCAUCCACAAUGAGAGUACA (SEQ ID N°: 10).

En algunas formas de realización, la hebra antisentido comprende la secuencia de nucleótidos UGUACUCUCAUUGUGGAUGACGA (SEQ ID N°: 9) y la hebra sentido comprende la secuencia de nucleótidos GUCAUCCACAAUGAGAGUACA (SEQ ID N°: 10).

En algunas formas de realización, la hebra antisentido consiste en la secuencia de nucleótidos UGUACUCUCAUUGUGGAUGACGA (SEQ ID N°: 9) y la hebra sentido consiste en la secuencia de nucleótidos GUCAUCCACAAUGAGAGUACA (SEQ ID N°: 10).

En algunas formas de realización, sustancialmente todos los nucleótidos

de la hebra sentido son nucleótidos modificados. En otras formas de realización, sustancialmente todos los nucleótidos de la hebra antisentido son nucleótidos modificados.

En algunas formas de realización, todos los nucleótidos de la hebra sentido son nucleótidos modificados. En algunas formas de realización, todos los nucleótidos de la hebra antisentido son nucleótidos modificados.

En algunas formas de realización, por lo menos una de las modificaciones de nucleótidos se selecciona entre el grupo que consiste en: 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 restringido, 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 entre el 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 entre el 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 algunas formas de realización, por lo menos una de las modificaciones de nucleótidos se selecciona entre el grupo que consiste en: un desoxi-nucleótido, un nucleótido con una modificación 2'-O-metilo, un nucleótido con una modificación 2'-flúor, un nucleótido con una modificación 2'-desoxi, un nucleótido modificado con glicol (GNA) y un nucleótido con una modificación 2-O-(N-metilacetamida); y combinaciones de los mismos.

En algunas formas de realización, la región de hebra doble tiene 19-23 pares de nucleótidos de longitud, 19-21 pares de nucleótidos de longitud, 21-23 pares de nucleótidos de longitud o 21 pares de nucleótidos de longitud.

En algunas formas de realización, cada hebra tiene independientemente entre 19 y 23 nucleótidos de longitud, entre 19 y 25 nucleótidos de longitud o entre 21 y 23 nucleótidos de longitud. En algunas formas de realización, la hebra sentido tiene 21 nucleótidos de longitud y la hebra antisentido tiene 23 nucleótidos de longitud.

En algunas formas de realización, por lo menos una hebra comprende

una sobreextensión en 3' de por lo menos 1 nucleótido o una sobreextensión en 3' de por lo menos 2 nucleótidos.

En algunas formas de realización, el agente de ARNi de hebra doble, o la sal del mismo, comprende además por lo menos una conexión entre nucleótidos mediante un conector fosforotioato o metilfosfonato. En algunas formas de realización, la conexión entre nucleótidos mediante un conector fosforotioato o metilfosfonato se encuentra en el extremo 3' de una hebra. En algunas formas de realización, la hebra es la hebra antisentido. En otras formas de realización, la hebra es la hebra sentido.

En algunas formas de realización, la conexión entre nucleótidos mediante un conector fosforotioato o metilfosfonato se encuentra en el extremo 5' de una hebra. En algunas formas de realización, la hebra es la hebra antisentido. En otras formas de realización, la hebra es la hebra sentido.

En algunas formas de realización, la conexión entre nucleótidos mediante un conector fosforotioato o metilfosfonato se encuentra tanto en el extremo 5' como en el extremo 3' de una hebra. En algunas formas de realización, la hebra es la hebra antisentido.

En un aspecto, la presente invención provee un método para inhibir la expresión de un gen de angiotensinógeno (AGT) en un sujeto. El método incluye administrar al sujeto una dosis fija de entre aproximadamente 50 mg y aproximadamente 800 mg (por ejemplo, entre aproximadamente 50 y aproximadamente 200 mg, entre aproximadamente 50 mg y aproximadamente 500 mg, entre aproximadamente 100 mg y aproximadamente 800 mg, entre aproximadamente 100 mg y aproximadamente 500 mg, entre aproximadamente 100 mg y aproximadamente 300 mg, entre aproximadamente 200 mg y

aproximadamente 300 mg, entre aproximadamente 200 mg y aproximadamente 400 mg, entre aproximadamente 200 mg y aproximadamente 500 mg, entre aproximadamente 200 mg y aproximadamente 800 mg, entre aproximadamente 300 mg y aproximadamente 800 mg, entre aproximadamente 300 mg y aproximadamente 500 mg, entre aproximadamente 300 mg y aproximadamente 4000 mg [Sic.], entre aproximadamente 400 mg y aproximadamente 800 mg, entre aproximadamente 400 mg y aproximadamente 500 mg, por ejemplo, aproximadamente 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, o aproximadamente 800 mg) de un agente de ácido ribonucleico de hebra doble (ARNi), o de una sal del mismo, donde el agente de ARNi de hebra doble, o la sal del mismo, comprende una hebra sentido y una hebra antisentido que forman una región de hebra doble, donde la hebra antisentido comprende una secuencia de nucleótidos modificada que comprende por lo menos 19 nucleótidos contiguos de la secuencia de nucleótidos modificada usGfsuac(Tgn)cucauugUfgGfaugacsgsa (SEQ ID N°: 11) y la hebra sentido comprende una secuencia de nucleótidos modificada que comprende por lo menos 19 nucleótidos contiguos de la secuencia de nucleótidos modificada gsuscaucCfaCfAfAfugagaguaca (SEQ ID N°: 12); donde las modificaciones químicas se definen de la siguiente manera: a es 2'-O-metiladenosina-3'-fosfato, c es 2'-O-metilcitidina-3'-fosfato, g es 2'-O-metilguanosina-3'-fosfato, u es 2'-O-metiluridina-3'-fosfato, Af es 2'-fluoroadenosina-3'-fosfato, Cf es 2'-fluorocitidina-3'-fosfato, Gf es 2'-fluoroguanosina-3'-fosfato, Uf es 2'-fluorouridina-3'-fosfato, (Tgn) es el isómero S del ácido nucleico glicólico de timidina (GNA), y s es una conexión a través de un grupo fosforotioato, para inhibir de esa manera la expresión del gen AGT en el sujeto.

En otro aspecto, la presente invención provee un método para tratar a un sujeto que se beneficiaría de la reducción en la expresión del AGT, por ejemplo, un sujeto en riesgo de desarrollar un trastorno asociado con AGT, por ejemplo, hipertensión. El método incluye administrar al sujeto una dosis fija de entre aproximadamente 50 mg y aproximadamente 800 mg (por ejemplo, entre aproximadamente 50 y aproximadamente 200 mg, entre aproximadamente 50 mg y aproximadamente 500 mg, entre aproximadamente 100 mg y aproximadamente 800 mg, entre aproximadamente 100 mg y aproximadamente 500 mg, entre aproximadamente 100 mg y aproximadamente 300 mg, entre aproximadamente 200 mg y aproximadamente 300 mg, entre aproximadamente 200 mg y aproximadamente 400 mg, entre aproximadamente 200 mg y aproximadamente 500 mg, entre aproximadamente 200 mg y aproximadamente 800 mg, entre aproximadamente 300 mg y aproximadamente 800 mg, entre aproximadamente 300 mg y aproximadamente 500 mg, entre aproximadamente 300 mg y aproximadamente 4000 mg [Sic.], entre aproximadamente 400 mg y aproximadamente 800 mg, entre aproximadamente 400 mg y aproximadamente 500 mg, por ejemplo, aproximadamente 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, o aproximadamente 800 mg) de un agente de ácido ribonucleico de hebra doble (ARNi), o de una sal del mismo, donde el agente de ARNi de hebra doble, o una sal del mismo, comprende una hebra sentido y una hebra antisentido que forman una región de hebra doble, donde la hebra antisentido comprende una secuencia de nucleótidos que comprende por lo menos 19 nucleótidos contiguos de la secuencia de nucleótidos modificada usGfsuac(Tgn)cucauugUfgGfaugacsgsa (SEQ ID N°: 11) y la hebra sentido comprende una secuencia de nucleótidos modificada que comprende

por lo menos 19 nucleótidos contiguos de la secuencia de nucleótidos modificada gsuscauCfaCfAfAfugagaguaca (SEQ ID N°: 12); donde las modificaciones químicas se definen de la siguiente manera: a es 2'-O-metiladenosina-3'-fosfato, c es 2'-O-metilcitidina-3'-fosfato, g es 2'-O-metilguanosina-3'-fosfato, u es 2'-O-metiluridina-3'-fosfato, Af es 2'-fluoroadenosina-3'-fosfato, Cf es 2'-fluorocitidina-3'-fosfato, Gf es 2'-fluoroguanosina-3'-fosfato, Uf es 2'-fluorouridina-3'-fosfato, (Tgn) es el isómero S del ácido nucleico glicólico de timidina (GNA), y s es una conexión a través de un grupo fosforotioato, para tratar de esa manera al sujeto que se beneficiaría de la reducción en la expresión del AGT.

En un aspecto, la presente invención provee un método para tratar a un sujeto que padece un trastorno asociado con AGT, por ejemplo, hipertensión. El método incluye administrar al sujeto una dosis fija de entre aproximadamente 50 mg y aproximadamente 800 mg (por ejemplo, entre aproximadamente 50 y aproximadamente 200 mg, entre aproximadamente 50 mg y aproximadamente 500 mg, entre aproximadamente 100 mg y aproximadamente 800 mg, entre aproximadamente 100 mg y aproximadamente 500 mg, entre aproximadamente 100 mg y aproximadamente 300 mg, entre aproximadamente 200 mg y aproximadamente 300 mg, entre aproximadamente 200 mg y aproximadamente 400 mg, entre aproximadamente 200 mg y aproximadamente 500 mg, entre aproximadamente 200 mg y aproximadamente 800 mg, entre aproximadamente 300 mg y aproximadamente 800 mg, entre aproximadamente 300 mg y aproximadamente 500 mg, entre aproximadamente 300 mg y aproximadamente 4000 mg [Sic.], entre aproximadamente 400 mg y aproximadamente 800 mg, entre aproximadamente 400 mg y aproximadamente 500 mg, por ejemplo,

aproximadamente 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, o aproximadamente 800 mg) de un agente de ácido ribonucleico de hebra doble (ARNi), o de una sal del mismo, donde el agente de ARNi de hebra doble, o la sal del mismo, comprende una hebra sentido y una hebra antisentido que forman una región de hebra doble, donde la hebra antisentido comprende una secuencia de nucleótidos modificada que comprende por lo menos 19 nucleótidos contiguos de la secuencia de nucleótidos modificada usGfsuac(Tgn)cucauugUfgGfaugacsgsa (SEQ ID N°: 11) y la hebra sentido comprende una secuencia de nucleótidos modificada que comprende por lo menos 19 nucleótidos contiguos de la secuencia de nucleótidos modificada gsuscaucCfaCfAfAfugagaguaca (SEQ ID N°: 12); donde las modificaciones químicas se definen de la siguiente manera: a es 2'-O-metiladenosina-3'-fosfato, c es 2'-O-metilcitidina-3'-fosfato, g es 2'-O-metilguanosina-3'-fosfato, u es 2'-O-metiluridina-3'-fosfato, Af es 2'-fluoroadenosina-3'-fosfato, Cf es 2'-fluorocitidina-3'-fosfato, Gf es 2'-fluoroguanosina-3'-fosfato, Uf es 2'-fluorouridina-3'-fosfato, (Tgn) es el isómero S del ácido nucleico glicólico de timidina (GNA), y s es una conexión a través de un grupo fosforotioato, para tratar de esa manera al sujeto que padece el trastorno asociado con AGT.

En otro aspecto, la presente invención provee un método para disminuir el nivel de la presión sanguínea en un sujeto. El método incluye administrar al sujeto una dosis fija de entre aproximadamente 50 mg y aproximadamente 800 mg (por ejemplo, entre aproximadamente 50 y aproximadamente 200 mg, entre aproximadamente 50 mg y aproximadamente 500 mg, entre aproximadamente 100 mg y aproximadamente 800 mg, entre aproximadamente 100 mg y aproximadamente 500 mg, entre aproximadamente 100 mg y aproximadamente

300 mg, entre aproximadamente 200 mg y aproximadamente 300 mg, entre aproximadamente 200 mg y aproximadamente 400 mg, entre aproximadamente 200 mg y aproximadamente 500 mg, entre aproximadamente 200 mg y aproximadamente 800 mg, entre aproximadamente 300 mg y aproximadamente 800 mg, entre aproximadamente 300 mg y aproximadamente 500 mg, entre aproximadamente 300 mg y aproximadamente 4000 mg [Sic.], entre aproximadamente 400 mg y aproximadamente 800 mg, entre aproximadamente 400 mg y aproximadamente 500 mg, por ejemplo, aproximadamente 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, o aproximadamente 800 mg) de un agente de ácido ribonucleico de hebra doble (ARNi), o de una sal del mismo, donde el agente de ARNi de hebra doble, o la sal del mismo, comprende una hebra sentido y una hebra antisentido que forman una región de hebra doble, donde la hebra antisentido comprende una secuencia de nucleótidos modificada que comprende por lo menos 19 nucleótidos contiguos de la secuencia de nucleótidos modificada usGfsuac(Tgn)cucauugUfgGfaugacsgsa (SEQ ID N°: 11) y la hebra sentido comprende una secuencia de nucleótidos modificada que comprende por lo menos 19 nucleótidos contiguos de la secuencia de nucleótidos modificada gsuscaucCfaCfAfAfugagaguaca (SEQ ID N°: 12); donde las modificaciones químicas se definen de la siguiente manera: a es 2'-O-metiladenosina-3'-fosfato, c es 2'-O-metilcitidina-3'-fosfato, g es 2'-O-metilguanosina-3'-fosfato, u es 2'-O-metiluridina-3'-fosfato, Af es 2'-fluoroadenosina-3'-fosfato, Cf es 2'-fluorocitidina-3'-fosfato, Gf es 2'-fluoroguanosina-3'-fosfato, Uf es 2'-fluorouridina-3'-fosfato, (Tgn) es el isómero S del ácido nucleico glicólico de timidina (GNA), y s es una conexión a través de un grupo fosforotioato,

disminuyendo así el nivel de la presión sanguínea en el sujeto.

En algunas formas de realización, la dosis fija se administra al sujeto en un intervalo de una vez al mes. En otras formas de realización, la dosis fija se administra al sujeto en un intervalo de una vez por trimestre. En algunas formas de realización, la dosis fija se administra al sujeto en un intervalo de dos veces al año.

En algunas formas de realización, al sujeto se le administra una dosis fija de entre aproximadamente 50 mg y aproximadamente 200 mg. En otras formas de realización, al sujeto se le administra una dosis fija de entre aproximadamente 200 mg y aproximadamente 400 mg. En algunas formas de realización, al sujeto se le administra una dosis fija de entre aproximadamente 400 mg y aproximadamente 800 mg.

En algunas formas de realización, al sujeto se le administra una dosis fija de aproximadamente 100 mg. En algunas formas de realización, al sujeto se le administra una dosis fija de aproximadamente 200 mg. En algunas formas de realización, al sujeto se le administra una dosis fija de aproximadamente 300 mg. En algunas formas de realización, al sujeto se le administra una dosis fija de aproximadamente 400 mg. En algunas formas de realización, al sujeto se le administra una dosis fija de aproximadamente 500 mg. En otras formas de realización, al sujeto se le administra una dosis fija de aproximadamente 600 mg. En algunas formas de realización, al sujeto se le administra una dosis fija de aproximadamente 800 mg.

En algunas formas de realización, el agente de ARNi de hebra doble, o una sal del mismo, se administra al sujeto por vía subcutánea o intravenosa. En algunas formas de realización, la administración subcutánea es inyección

subcutánea, por ejemplo, una autoadministración subcutánea. En otras formas de realización, la administración intravenosa es una inyección intravenosa.

En algunas formas de realización, la hebra antisentido comprende una secuencia de nucleótidos modificada que comprende por lo menos 20 nucleótidos contiguos de la secuencia de nucleótidos modificada usGfsuac(Tgn)cucauugUfgGfaugacsgsa (SEQ ID N°: 11) y la hebra sentido comprende una secuencia de nucleótidos modificada que comprende por lo menos 20 nucleótidos contiguos de la secuencia de nucleótidos modificada gsuscauCfaCfAfAfugagaguaca (SEQ ID N°: 12).

En algunas formas de realización, la hebra antisentido comprende una secuencia de nucleótidos modificada que comprende por lo menos 21 nucleótidos contiguos de la secuencia de nucleótidos modificada usGfsuac(Tgn)cucauugUfgGfaugacsgsa (SEQ ID N°: 11) y la hebra sentido comprende una secuencia de nucleótidos modificada que comprende por lo menos 20 nucleótidos contiguos de la secuencia de nucleótidos modificada gsuscauCfaCfAfAfugagaguaca (SEQ ID N°: 12).

En algunas formas de realización, la hebra antisentido comprende una secuencia de nucleótidos modificada que comprende por lo menos 22 nucleótidos contiguos de la secuencia de nucleótidos modificada usGfsuac(Tgn)cucauugUfgGfaugacsgsa (SEQ ID N°: 11) y la hebra sentido comprende una secuencia de nucleótidos modificada que comprende por lo menos 20 nucleótidos contiguos de la secuencia de nucleótidos modificada gsuscauCfaCfAfAfugagaguaca (SEQ ID N°: 12).

En algunas formas de realización, la hebra antisentido comprende una secuencia de nucleótidos modificada usGfsuac(Tgn)cucauugUfgGfaugacsgsa

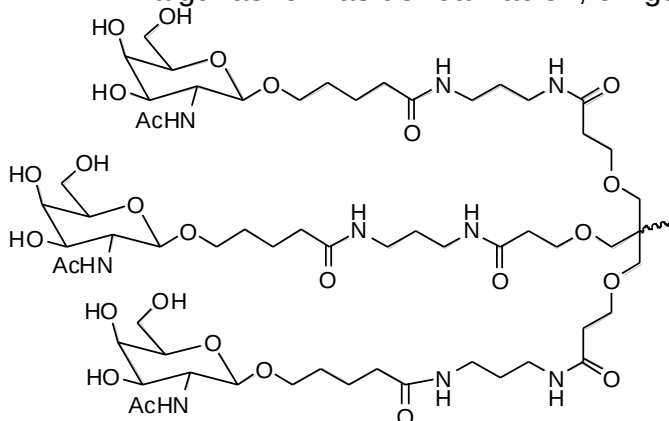
(SEQ ID N°: 11) y la hebra sentido comprende una secuencia de nucleótidos modificada gsuscauCfaCfAfAfugagaguaca (SEQ ID N°: 12).

En otras formas de realización, la hebra antisentido consiste en una secuencia de nucleótidos modificada usGfsuac(Tgn)cucauugUfgGfaugacsgsa (SEQ ID N°: 11) y la hebra sentido consiste en una secuencia de nucleótidos modificada gsuscauCfaCfAfAfugagaguaca (SEQ ID N°: 12).

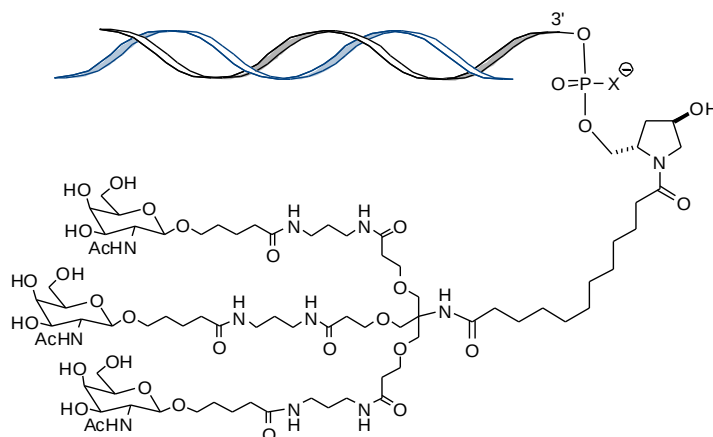
En algunas formas de realización, el agente de ARNi de hebra doble, o una sal del mismo, además comprende un ligando. En otras formas de realización, el ligando se conjuga en el extremo 3' de la hebra sentido.

En algunas formas de realización, el ligando es un derivado de N-acetilgalactosamina (GalNAc). En otras formas de realización, el derivado de GalNAc comprende uno o más derivados de GalNAc unidos a través de un conector ramificado monovalente, bivalente o trivalente.

En algunas formas de realización, el ligando es



En otras formas de realización, el extremo 3' de la hebra sentido se conjuga con el ligando según se muestra en el siguiente esquema



y, donde X es O o S.

En algunas formas de realización, el sujeto es un ser humano. En algunas formas de realización, el sujeto tiene una presión sanguínea sistólica de por lo menos 130 mm Hg o una presión sanguínea diastólica de por lo menos 80 mm Hg. En otras formas de realización, el sujeto tiene una presión sanguínea sistólica de por lo menos 140 mm Hg o una presión sanguínea diastólica de por lo menos 80 mm Hg.

En algunas formas de realización, el sujeto forma parte de un grupo susceptible de presentar sensibilidad a la sal, o tiene sobrepeso, o es obeso, o es una mujer embarazada o que planea quedar embarazada, o tiene diabetes de tipo 2, o tiene diabetes de tipo 1 o presenta una función renal reducida.

En algunas formas de realización, el trastorno que se beneficiaría de la reducción en la expresión del AGT es un trastorno asociado con AGT. En una forma de realización, el trastorno asociado con AGT es hipertensión. En otras formas de realización, el trastorno asociado con AGT se selecciona entre el grupo que consiste en: presión sanguínea elevada, hipertensión, prehipertensión, hipertensión primaria, hipertensión secundaria hipertensión sistólica o diastólica aislada, hipertensión asociada al 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 cardíaca hipertensiva, nefropatía hipertensiva, aterosclerosis, arteriosclerosis, vasculopatía, nefropatía diabética, retinopatía diabética, insuficiencia cardíaca crónica, cardiomiopatía, miopatía cardíaca diabética, hipotensión nocturna, glomeruloesclerosis, coartación de la aorta, aneurisma aórtico, fibrosis ventricular, insuficiencia cardíaca, infarto de miocardio, angina, accidente cerebrovascular, enfermedad renal, insuficiencia renal, esclerosis sistémica, restricción del 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 de tipo 2, y síndrome metabólico. En una forma de realización, el trastorno asociado con AGT es hipertensión. En una forma de realización, la hipertensión se selecciona entre el grupo que consiste en: presión sanguínea elevada, hipertensión, prehipertensión, hipertensión primaria, hipertensión secundaria, hipertensión sistólica o diastólica aislada, hipertensión asociada al embarazo, hipertensión diabética, 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 cardíaca hipertensiva y nefropatía hipertensiva.

En algunas formas de realización, la presión sanguínea comprende a la presión sanguínea sistólica y/o a la presión sanguínea diastólica.

En algunas formas de realización, como resultado de la administración se obtiene una disminución de la expresión del AGT de por lo menos 30%, 40% 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o 95%. En algunas formas de realización, el nivel de la proteína agt en una muestra de sangre o suero del sujeto se reduce en por lo menos 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o 95%.

En algunas formas de realización, como resultado de la administración se obtiene una disminución de la presión sanguínea sistólica y/o de la presión sanguínea diastólica. En algunas formas de realización, la presión sanguínea sistólica y/o la presión sanguínea diastólica se reduce en por lo menos 4 mm Hg, 5 mm Hg, 6 mm Hg, 7 mm Hg, 8 mm Hg, 9 mm Hg o 10 mm Hg.

En algunas 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 entre el grupo que consiste en un diurético, un inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina (ECA), 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 sintético, un agente antimineralocorticoide esteroide; una combinación de cualquiera de los anteriores; y un agente terapéutico contra la hipertensión formulado como una combinación de agentes. En algunas formas de realización, el agente terapéutico adicional comprende un antagonista del receptor de angiotensina II. En otras formas de realización, el antagonista del receptor de angiotensina II se selecciona entre el grupo que consiste en:

losartán, valsartán, olmesartán, eprosartán y azilsartán.

En algunas formas de realización, el agente de ARNi se administra como una composición farmacéutica.

En algunas formas de realización, el agente de ARNi se administra en una solución de pH no regulado. En algunas formas de realización, la solución de pH no regulado es una solución salina o agua.

En algunas formas de realización, el agente de ARNi se administra con una solución reguladora de pH. En algunas formas de realización, la solución reguladora de pH comprende acetato, citrato, prolamina, carbonato o fosfato o cualquier combinación de los mismos. En algunas formas de realización, la solución reguladora de pH es una solución salina de pH regulado al fosfato (PBS).

La presente invención también provee un kit para realizar los métodos de la invención, según se los describe en la presente. El kit comprende a) el agente de ARNi, y b) instrucciones para su uso, y c) opcionalmente, medios para administrar al sujeto el agente de ARNi.

En otro aspecto, la presente invención también provee una composición farmacéutica para el tratamiento de un trastorno asociado con AGT que comprende un agente de ácido ribonucleico de hebra doble (ARNi), o de una sal del mismo, para inhibir la expresión de angiotensinógeno (AGT). La composición farmacéutica comprende un agente de ARNhd que comprende una hebra sentido y una hebra antisentido que forman una región de hebra doble, donde la hebra antisentido comprende una secuencia de nucleótidos que comprende por lo menos 19 nucleótidos contiguos de la secuencia de nucleótidos UGUACUCUCAUUGUGGAUGACGA (SEQ ID N°: 9) y la hebra

sentido comprende una secuencia de nucleótidos que comprende por lo menos 19 nucleótidos contiguos de la secuencia de nucleótidos GUCAUCCACAAUGAGAGUACA (SEQ ID N°: 10); donde no más de cinco de los nucleótidos no comprenden una modificación; donde por lo menos una de las modificaciones de los nucleótidos es una modificación de nucleótidos térmicamente desestabilizante; donde el agente de ARNi de hebra doble se administra en una dosis de por lo menos 50 mg/dosis no más de una vez al mes, por ejemplo, una dosis de entre aproximadamente 50 mg y aproximadamente 800 mg aproximadamente una vez al mes (por ejemplo, entre aproximadamente 50 y aproximadamente 200 mg, entre aproximadamente 50 mg y aproximadamente 500 mg, entre aproximadamente 100 mg y aproximadamente 800 mg, entre aproximadamente 100 mg y aproximadamente 500 mg, entre aproximadamente 100 mg y aproximadamente 300 mg, entre aproximadamente 200 mg y aproximadamente 300 mg, entre aproximadamente 200 mg y aproximadamente 400 mg, entre aproximadamente 200 mg y aproximadamente 500 mg, entre aproximadamente 200 mg y aproximadamente 800 mg, entre aproximadamente 300 mg y aproximadamente 800 mg, entre aproximadamente 300 mg y aproximadamente 500 mg, entre aproximadamente 300 mg y aproximadamente 4000 mg [Sic.], entre aproximadamente 400 mg y aproximadamente 800 mg, entre aproximadamente 400 mg y aproximadamente 500 mg, por ejemplo, aproximadamente 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, o aproximadamente 800 mg).

En ciertas formas de realización, la hebra antisentido comprende una secuencia de nucleótidos que comprende por lo menos 20 nucleótidos

contiguos de la secuencia de nucleótidos UGUACUCUCAUUGUGGAUGACGA (SEQ ID N°: 9), En ciertas formas de realización, la hebra sentido comprende además una secuencia de nucleótidos que comprende por lo menos 20 nucleótidos contiguos de la secuencia de nucleótidos GUCAUCCACAAUGAGAGUACA (SEQ ID N°: 10).

En ciertas formas de realización, la hebra antisentido comprende una secuencia de nucleótidos que comprende por lo menos 21 nucleótidos contiguos de la secuencia de nucleótidos UGUACUCUCAUUGUGGAUGACGA (SEQ ID N°: 9). En ciertas formas de realización, la hebra sentido comprende además la secuencia de nucleótidos GUCAUCCACAAUGAGAGUACA (SEQ ID N°: 10).

En ciertas formas de realización, la hebra antisentido comprende una secuencia de nucleótidos que comprende por lo menos 22 nucleótidos contiguos de la secuencia de nucleótidos UGUACUCUCAUUGUGGAUGACGA (SEQ ID N°: 9), En ciertas formas de realización, la hebra sentido comprende además la secuencia de nucleótidos GUCAUCCACAAUGAGAGUACA (SEQ ID N°: 10).

En ciertas formas de realización, la hebra antisentido comprende la secuencia de nucleótidos UGUACUCUCAUUGUGGAUGACGA (SEQ ID N°: 9). En ciertas formas de realización, la hebra sentido comprende además la secuencia de nucleótidos GUCAUCCACAAUGAGAGUACA (SEQ ID N°: 10).

En ciertas formas de realización, la secuencia de nucleótidos de la hebra antisentido consiste en UGUACUCUCAUUGUGGAUGACGA (SEQ ID N°: 9). En ciertas formas de realización, la secuencia de nucleótidos de la hebra sentido consiste además en GUCAUCCACAAUGAGAGUACA (SEQ ID N°: 10).

En ciertas formas de realización, todos los nucleótidos de la hebra sentido y todos los nucleótidos de la hebra antisentido comprenden una modificación de nucleótidos.

En ciertas formas de realización, por lo menos una de las modificaciones de nucleótidos se selecciona entre el grupo que consiste en: un desoxi-nucleótido, un nucleótido de desoxi-timina (dT) de extremo 3'-terminal, un nucleótido con una modificación 2'-O-metilo, un nucleótido con una modificación 2'-flúor, un nucleótido con una modificación 2'-desoxi, un nucleótido bloqueado, un nucleótido sin bloquear, un nucleótido con restricción conformacional, un etil nucleótido restringido, un nucleótido abásico, un nucleótido modificado en 2' con -amino, un nucleótido modificado en 2' con -O-alilo, un nucleótido modificado en 2' con -C-alquilo, un nucleótido modificado en 2' con -hidroxilo, un nucleótido modificado en 2' con -metoxietilo, un nucleótido modificado en 2' con -O-alquilo, un nucleótido morfolino, un fosforamidato, una base no natural que comprende un nucleótido, un nucleótido modificado con tetrahidropirano, un nucleótido modificado con 1,5-anhidrohexitol, un nucleótido modificado con 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 modificado con glicol (GNA) y un nucleótido con una modificación 2'-O-(N-metilacetamida); y combinaciones de los mismos. En ciertas formas de realización, por lo menos una de las modificaciones de nucleótidos se selecciona entre el grupo que consiste en: un desoxi-nucleótido, un nucleótido con una modificación 2'-O-metilo, un nucleótido con una modificación 2'-flúor,

un nucleótido con una modificación 2'-desoxi, un nucleótido modificado con glicol (GNA) y un nucleótido con una modificación 2-O-(N-metilacetamida); y combinaciones de los mismos.

En ciertas formas de realización, las modificaciones de nucleótidos se seleccionan entre el grupo que consiste en nucleótidos modificados en 2'-metoxietilo, 2'-flúor, 2'-desoxi y GNA.

En ciertas formas de realización, la región de hebra doble tiene una longitud que se selecciona entre: 19-23 pares de nucleótidos de longitud, 19-21 pares de nucleótidos de longitud, 21-23 pares de nucleótidos de longitud, 21 pares de nucleótidos de longitud, 19-30 pares de nucleótidos de longitud, 19-25 pares de nucleótidos de longitud, 23-27 pares de nucleótidos de longitud. En ciertas formas de realización, la región de hebra doble tiene una longitud de 19-21 pares de nucleótidos.

En ciertas formas de realización, cada hebra del ARNi de hebra doble o una sal del mismo, tiene independientemente una longitud que se selecciona entre 19-30 nucleótidos de longitud, 19-23 nucleótidos de longitud y 21-23 nucleótidos de longitud. En ciertas formas de realización, cada hebra tiene, de manera independiente, 21-23 nucleótidos de longitud. En ciertas formas de realización, la hebra sentido tiene 21 nucleótidos de longitud y la hebra antisentido tiene 23 nucleótidos de longitud.

En ciertas formas de realización, por lo menos una hebra comprende una sobreextensión en 3' de por lo menos 1 nucleótido. En ciertas formas de realización, por lo menos una hebra comprende una sobreextensión en 3' de por lo menos 2 nucleótidos.

En ciertas formas de realización, el agente además comprende por lo

menos una conexión entre nucleótidos mediante un conector fosforotioato o metilfosfonato. En ciertas formas de realización, la conexión entre nucleótidos mediante un conector fosforotioato o metilfosfonato se encuentra en el extremo 3' de una hebra. En ciertas formas de realización, la hebra es la hebra antisentido. En ciertas formas de realización, la hebra es la hebra sentido.

En ciertas formas de realización, la conexión entre nucleótidos mediante un conector fosforotioato o metilfosfonato se encuentra en el extremo 5' de una hebra. En ciertas formas de realización, la hebra es la hebra antisentido. En ciertas formas de realización, la hebra es la hebra sentido.

En ciertas formas de realización, la conexión entre nucleótidos mediante un conector fosforotioato o metilfosfonato se encuentra tanto en el extremo 5' como en el extremo 3' de una hebra. En ciertas formas de realización, la hebra es la hebra antisentido.

La invención provee una composición farmacéutica para el tratamiento de un trastorno asociado con AGT que comprende un agente de ácido ribonucleico de hebra doble (ARNi), o de una sal del mismo, para inhibir la expresión de angiotensinógeno (AGT). La composición farmacéutica comprende un agente de ARNi de hebra doble, o una sal del mismo, donde el agente comprende una hebra sentido y una hebra antisentido que forman una región de hebra doble, donde la hebra antisentido comprende una secuencia de nucleótidos modificada que comprende por lo menos 19 nucleótidos contiguos de la secuencia de nucleótidos modificada usGfsuac(Tgn)cucauugUfgGfaugacsgsa (SEQ ID N°: 11) y la hebra sentido comprende una secuencia de nucleótidos modificada que comprende por lo menos 19 nucleótidos contiguos de la secuencia de nucleótidos

gsuscauCfaCfAfAfugagaguaca (SEQ ID N°: 12); donde las modificaciones químicas se definen de la siguiente manera: a es 2'-O-metiladenosina-3'-fosfato, c es 2'-O-metilcitidina-3'-fosfato, g es 2'-O-metilguanosina-3'-fosfato, u es 2'-O-metiluridina-3'-fosfato, Af es 2'-fluoroadenosina-3'-fosfato, Cf es 2'-fluorocitidina-3'-fosfato, Gf es 2'-fluoroguanosina-3'-fosfato, Uf es 2'-fluorouridina-3'-fosfato, (Tgn) es el isómero S del ácido nucleico glicólico de timidina (GNA), y s es una conexión a través de un grupo fosforotioato; y donde la composición farmacéutica se administra en una dosis de por lo menos 50 mg/dosis no más de una vez al mes.

En ciertas formas de realización, la hebra antisentido comprende una secuencia de nucleótidos modificada que comprende por lo menos 20 nucleótidos contiguos de la secuencia de nucleótidos modificada usGfsuac(Tgn)cucauugUfgGfaugacsgsa (SEQ ID N°: 11). En ciertas formas de realización, la hebra sentido comprende además una secuencia de nucleótidos modificada que comprende por lo menos 20 nucleótidos contiguos de la secuencia de nucleótidos modificada gsuscauCfaCfAfAfugagaguaca (SEQ ID N°: 12).

En ciertas formas de realización, la hebra antisentido comprende una secuencia de nucleótidos modificada que comprende por lo menos 21 nucleótidos contiguos de la secuencia de nucleótidos modificada usGfsuac(Tgn)cucauugUfgGfaugacsgsa (SEQ ID N°: 11). En ciertas formas de realización, la hebra sentido comprende además la secuencia de nucleótidos modificada gsuscauCfaCfAfAfugagaguaca (SEQ ID N°: 12).

En ciertas formas de realización, la hebra antisentido comprende una secuencia de nucleótidos modificada que comprende por lo menos 22

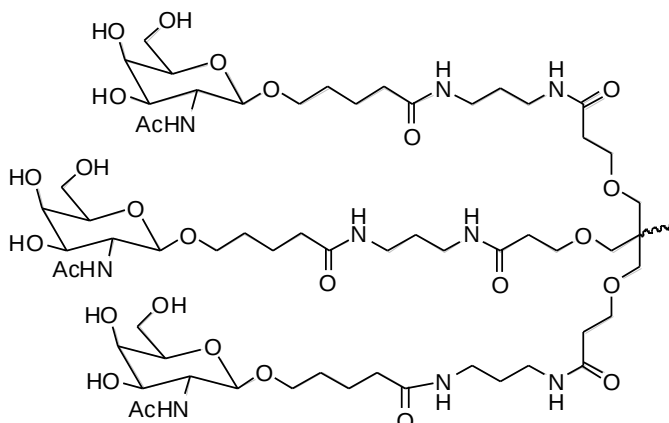
nucleótidos contiguos de la secuencia de nucleótidos modificada usGfsuac(Tgn)cucauugUfgGfaugacsgsa (SEQ ID N°: 11). En ciertas formas de realización, la hebra sentido comprende además la secuencia de nucleótidos modificada gsuscauCfaCfAfAfugagaguaca (SEQ ID N°: 12).

En ciertas formas de realización, la hebra antisentido comprende la secuencia de nucleótidos modificada usGfsuac(Tgn)cucauugUfgGfaugacsgsa (SEQ ID N°: 11). En ciertas formas de realización, la hebra sentido comprende además la secuencia de nucleótidos modificada gsuscauCfaCfAfAfugagaguaca (SEQ ID N°: 12).

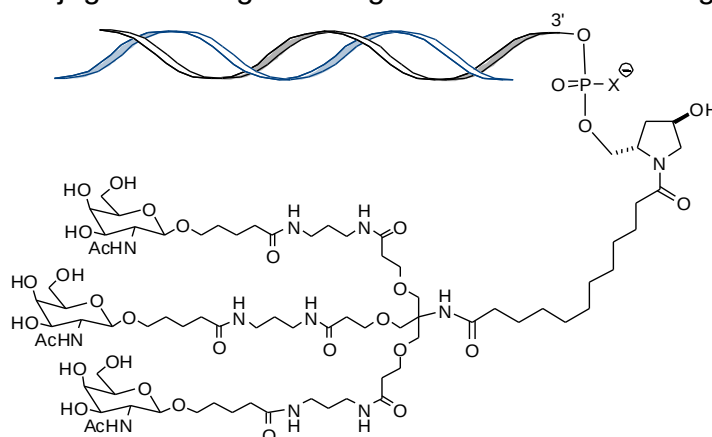
En ciertas formas de realización, la secuencia de nucleótidos modificada de la hebra antisentido consiste en usGfsuac(Tgn)cucauugUfgGfaugacsgsa (SEQ ID N°: 11). En ciertas formas de realización, la secuencia de nucleótidos modificada de la hebra sentido consiste en gsuscauCfaCfAfAfugagaguaca (SEQ ID N°: 12).

En ciertas formas de realización, el agente de ARNi de hebra doble, o una sal del mismo, además comprende un ligando. En ciertas formas de realización, el ligando se conjuga en el extremo 3' de la hebra sentido. En ciertas formas de realización, el ligando es un derivado de N-acetilgalactosamina (GalNAc). En ciertas formas de realización, el derivado de GalNAc comprende uno o más derivados de GalNAc unidos a través de un conector ramificado monovalente, bivalente o trivalente.

En ciertas formas de realización, el ligando es:



En ciertas formas de realización, el extremo 3' de la hebra sentido se conjuga con el ligando según se muestra en el siguiente esquema:



y, donde X es O o S. En ciertas formas de realización, el X es O.

En ciertas formas de realización, la hebra sentido comprende la secuencia de nucleótidos gsuscauCfaCfAfAfugagaguaca, donde el extremo 3' de la hebra sentido se conjuga en L96 (N-[tris(GalNAc-alkyl)-amidodecanoil]-4-hidroxiprolinol Hyp-(GalNAc-alkilo)₃) y la hebra antisentido comprende la secuencia de nucleótidos usGfsuac(Tgn)cucauugUfgGfaugacsgsa; donde las modificaciones químicas se definen de la siguiente manera: a es 2'-O-metiladenosina-3'-fosfato, c es 2'-O-metilcitidina-3'-fosfato, g es 2'-O-metilguanosina-3'-fosfato, u es 2'-O-metiluridina-3'-fosfato, Af es 2'-fluoroadenosina-3'-fosfato, Cf es 2'-fluorocitidina-3'-fosfato, Gf es 2'-

fluoroguanosina-3'-fosfato, Uf es 2'-fluorouridina-3'-fosfato, (Tgn) es el isómero S del ácido nucleico glicólico de timidina (GNA), y s es una conexión a través de un grupo fosforotioato.

En ciertas formas de realización, el agente de ARNi de hebra doble, o una sal del mismo, se administra en una dosis de entre 50 mg y 500 mg por dosis. En ciertas formas de realización, el agente de ARNi de hebra doble, o una sal del mismo, se administra en una dosis de entre 50 y 400 mg por dosis. En ciertas formas de realización, el agente de ARNi de hebra doble, o una sal del mismo, se administra en una dosis de entre 50 y 300 mg por dosis.

En algunas formas de realización, el agente de ARNi de hebra doble, o una sal del mismo, se administra en una dosis fija de entre aproximadamente 50 mg y aproximadamente 200 mg. En otras formas de realización, el agente de ARNi de hebra doble, o una sal del mismo, se administra en una dosis fija de entre aproximadamente 200 mg y aproximadamente 400 mg. En algunas formas de realización, el agente de ARNi de hebra doble, o una sal del mismo, se administra en una dosis fija de entre aproximadamente 400 mg y aproximadamente 800 mg.

En algunas formas de realización, el agente de ARNi de hebra doble, o una sal del mismo, se administra en una dosis fija de aproximadamente 100 mg. En algunas formas de realización, el agente de ARNi de hebra doble, o una sal del mismo, se administra en una dosis fija de aproximadamente 200 mg. En algunas formas de realización, el agente de ARNi de hebra doble, o una sal del mismo, se administra en una dosis fija de aproximadamente 300 mg. En algunas formas de realización, el agente de ARNi de hebra doble, o una sal del mismo, se administra en una dosis fija de aproximadamente 400 mg. En

algunas formas de realización, el agente de ARNi de hebra doble, o una sal del mismo, se administra en una dosis fija de aproximadamente 500 mg. En otras formas de realización, el agente de ARNi de hebra doble, o una sal del mismo, se administra en una dosis fija de aproximadamente 600 mg. En algunas formas de realización, el agente de ARNi de hebra doble, o una sal del mismo, se administra en una dosis fija de aproximadamente 800 mg.

En ciertas formas de realización, la composición farmacéutica se administra con una frecuencia de entre una vez al mes y una vez cada seis meses. En ciertas formas de realización, la composición farmacéutica se administra con una frecuencia de entre una vez al mes y una vez cada tres meses. En ciertas formas de realización, la composición farmacéutica se administra con una frecuencia de entre una vez cada tres meses y una vez cada seis meses.

En algunas formas de realización, la composición farmacéutica se administra al sujeto en un intervalo de una vez al mes. En otras formas de realización, la composición farmacéutica se administra al sujeto en un intervalo de una vez por trimestre. En algunas formas de realización, la composición farmacéutica se administra al sujeto en un intervalo de dos veces al año.

En ciertas formas de realización, el agente de ARNi de hebra doble se administra en una dosis de entre 50 y 400 mg por dosis con una frecuencia de entre una vez al mes y una vez cada seis meses.

En ciertas formas de realización, el trastorno asociado con AGT se selecciona entre el grupo que consiste en: presión sanguínea elevada, hipertensión, prehipertensión, hipertensión primaria, hipertensión secundaria sistólica o diastólica aislada, hipertensión asociada al embarazo, hipertensión

diabética, 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 cardíaca hipertensiva, nefropatía hipertensiva, aterosclerosis, arteriosclerosis, vasculopatía, nefropatía diabética, retinopatía diabética, insuficiencia cardíaca crónica, cardiomiopatía, miopatía cardíaca diabética, hipotensión nocturna, glomeruloesclerosis, coartación de la aorta, aneurisma aórtico, fibrosis ventricular, insuficiencia cardíaca, infarto de miocardio, angina, accidente cerebrovascular, enfermedad renal, insuficiencia renal, esclerosis sistémica, restricción del desarrollo intrauterino (IUGR), restricción del desarrollo fetal, obesidad, esteatosis hepática/hígado graso, esteatohepatitis no alcohólica (NASH), enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD); intolerancia a la glucosa, diabetes de tipo 2 y síndrome metabólico.

En ciertas formas de realización, el sujeto tiene una presión sanguínea sistólica de por lo menos 130 mm Hg o una presión sanguínea diastólica de por lo menos 80 mm Hg. En ciertas formas de realización, el sujeto tiene una presión sanguínea sistólica de por lo menos 140 mm Hg y una presión sanguínea diastólica de por lo menos 80 mm Hg.

En ciertas formas de realización, el sujeto forma parte de un grupo susceptible de presentar sensibilidad a la sal, o tiene sobrepeso, o es obeso, o es una mujer embarazada o que planea quedar embarazada, o tiene diabetes de tipo 2 o tiene diabetes de tipo 1.

En ciertas formas de realización, el sujeto padece un trastorno asociado con AGT y además forma parte de un grupo susceptible de presentar

sensibilidad a la sal, o tiene sobrepeso, o es obeso, o es una mujer embarazada o que planea quedar embarazada, o tiene diabetes de tipo 2 o diabetes de tipo 1.

En ciertas formas de realización, el sujeto presenta una función renal reducida. En ciertas formas de realización, el sujeto padece un trastorno asociado con AGT y además presenta una función renal reducida.

En ciertas formas de realización, la composición farmacéutica además comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En ciertas formas de realización, la composición farmacéutica es para administrar por inyección subcutánea o intravenosa.

La invención provee además el uso de una composición farmacéutica de cualquiera de las anteriores formas de realización en un método para el tratamiento de un trastorno asociado con AGT o para usar en el método de preparación de un medicamento para usar en un método para el tratamiento de un trastorno asociado con AGT.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La Figura 1 es un gráfico que muestra el cambio porcentual de AGT sérico con respecto a la línea basal del AGT, el día 0 después de una única dosis de placebo, 10 mg, 25 mg, 50 mg, 100 mg o 200 mg de AD-85481 por vía subcutánea.

La Figura 2 es un gráfico que muestra los cambios en la presión sanguínea sistólica (SBP por las siglas en inglés de *Systolic Blood Pressure*) y la presión sanguínea diastólica (DBP por las siglas en inglés de *Diastolic Blood Pressure*) la semana 8 con respecto al valor inicial después de una única dosis subcutánea de placebo, o de 10 mg, 25 mg, 50 mg, 100 mg o 200 mg de de

AD-85481. En el eje x se muestra el número de sujetos en cada grupo.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención provee métodos para inhibir la expresión de un gen de angiotensinógeno (AGT). La presente invención también provee métodos para tratar a un sujeto que padece un trastorno que se beneficiaría de la reducción en la expresión del AGT, o para el tratamiento de un trastorno asociado con AGT en un sujeto. Además, la presente invención provee métodos para disminuir el nivel de la presión sanguínea en un sujeto. Los métodos incluyen administrar al sujeto una dosis fija, por ejemplo, de entre aproximadamente 50 mg y aproximadamente 800 mg, de un agente de ARNi de hebra doble, o una sal del mismo, dirigido hacia el AGT, según se describe en la presente.

La siguiente descripción detallada divulga métodos para inhibir la expresión de un gen AGT, métodos para tratar sujetos que se beneficiarían de la reducción de la expresión de un gen AGT, por ejemplo, sujetos susceptibles de padecer un trastorno asociado con AGT, por ejemplo, hipertensión o con diagnóstico del mismo, usando un agente de ARNi de hebra doble, o una sal del mismo, dirigidos hacia el AGT, y composiciones farmacéuticas que comprenden dosis fijas de dichos agentes de ARNi, o sales de los mismos, para inhibir la expresión de un gen AGT.

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 la presente 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.

En caso de surgir conflictos entre una estructura química y un nombre químico, tendrá prioridad la estructura química.

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; Antitripsina; 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 N°: 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 N°: 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 N°: 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 N°: 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?genelId=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 contemplados 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 descrita 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 ARNi”, “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, preferiblemente un sujeto humano.

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 ARNip mediante una endonucleasa de tipo III conocida como Dicer (Sharp y colaboradores (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 colaboradores, (2001) *Nature* 409:363). Los ARNip se incorporan luego a un complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC) en

donde una o más helicasas desenroscan el dúplex de ARNip, permitiendo que la hebra antisentido complementaria guíe el reconocimiento del blanco (Nykanen, y colaboradores, (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 colaboradores, (2001) *Genes Dev.* 15:188). Por lo tanto, en un aspecto la invención se relaciona con un ARN de hebra doble (ARNip) 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 “ARNip” 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 ARNip 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 ARNip de simple hebra en general tienen entre 15 y 30 nucleótidos y están químicamente modificados. El diseño y la prueba de los ARNip de simple hebra se describen en la Patente de los EE.UU. No. 8.101.348 y en Lima y colaboradores, (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 ARNip de hebra simple como se describe la presente o en forma químicamente modificada mediante los métodos que se describen en Lima y colaboradores, (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 no son 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 ARNi, 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. En ciertas formas de realización, la región dúplex tiene una longitud de 19-21 pares de bases. 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 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 conectadas covalentemente. 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 sobresale 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 complementariedad” 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 complementariedad pueden darse en las regiones internas o terminales de la molécula. En general, las faltas de complementariedad 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 complementariedad nucleotídica en la hebra antisentido. En algunas formas de realización, un agente de ARN de hebra doble de la invención incluye una falta de complementariedad nucleotídica en la hebra sentido. En algunas formas de realización, la falta de complementariedad 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 complementariedad 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.

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 complementariedad con respecto a la determinación de la complementariedad. Por ejemplo, un ARNhd que comprende un oligonucleótido de 21 nucleótidos de longitud y otro oligonucleótido de 23 nucleótidos de longitud, en donde el oligonucleótido más largo comprende una secuencia de 21 nucleótidos que es completamente complementaria 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 N°: 1, o un fragmento de la SEQ ID N°: 1, tal como aproximadamente 90%, o aproximadamente 95%, complementaria. En determinadas formas de realización, el fragmento de la SEQ ID N°: 1 son los nucleótidos 638-658 de la SEQ ID N°: 1.

En ciertas formas de realización, la secuencia de nucleótidos de la hebra antisentido de un ARNi de la invención comprende por lo menos 19 nucleótidos contiguos de la secuencia de nucleótidos UGUACUCUCAUUGUGGAUGACGA (SEQ ID N°: 9). En ciertas formas de realización, el ARNi de la invención comprende además una hebra sentido que comprende por lo menos 19 nucleótidos contiguos de la secuencia de nucleótidos GUCAUCCACAAUGAGAGUACA (SEQ ID N°: 10).

En ciertas formas de realización, la secuencia de nucleótidos de la hebra antisentido de un ARNi de la invención comprende la secuencia de nucleótidos UGUACUCUCAUUGUGGAUGACGA (SEQ ID N°: 9). En ciertas formas de realización, el ARNi de la invención comprende además una hebra sentido que comprende a la secuencia de nucleótidos GUCAUCCACAAUGAGAGUACA (SEQ ID N°: 10).

En ciertas formas de realización, la secuencia de nucleótidos de la hebra antisentido de un ARNi de la invención consiste en

UGUACUCUCAUUGUGGAUGACGA (SEQ ID N°: 9). En ciertas formas de realización, el ARNi de la invención comprende además una hebra sentido donde la secuencia de nucleótidos de la hebra consiste en la secuencia de nucleótidos GUCAUCCACAAUGAGAGUACA (SEQ ID N°: 10).

En ciertas formas de realización, la secuencia de nucleótidos modificada de la hebra antisentido de un ARNi de la invención comprende por lo menos 19 nucleótidos contiguos de la secuencia de nucleótidos modificada usGfsuac(Tgn)cucauugUfgGfaugacsgsa (SEQ ID N°: 11). En ciertas formas de realización, el ARNi de la invención comprende además una hebra sentido que comprende una secuencia de nucleótidos modificada que comprende por lo menos 19 nucleótidos contiguos de gsuscauCfaCfAfAfugagaguaca (SEQ ID N°: 12). Las modificaciones químicas se definen de la siguiente manera: a es 2'-O-metiladenosina-3'-fosfato, c es 2'-O-metilcitidina-3'-fosfato, g es 2'-O-metilguanosina-3'-fosfato, u es 2'-O-metiluridina-3'-fosfato, Af es 2'-fluoroadenosina-3'-fosfato, Cf es 2'-fluorocitidina-3'-fosfato, Gf es 2'-fluoroguanosina-3'-fosfato, Uf es 2'-fluorouridina-3'-fosfato, (Tgn) es el isómero S del ácido nucleico glicólico de timidina (GNA), y s es una conexión a través de un grupo fosforotioato; y donde el extremo 3' de la hebra sentido de manera opcional está unido covalentemente a un ligando, por ejemplo, un N-[tris(GalNAc-alquil)-amidodecanoil]-4-hidroxiprolinol (que también se denomina Hyp-(GalNAc-alquil)₃ o L96).

En ciertas formas de realización, la secuencia de nucleótidos modificada de la hebra antisentido de un ARNi de la invención comprende la secuencia de nucleótidos modificada usGfsuac(Tgn)cucauugUfgGfaugacsgsa (SEQ ID N°: 11). En ciertas formas de realización, el ARNi de la invención comprende

además una hebra sentido que comprende a la secuencia de nucleótidos modificada gsuscauCfaCfAfAfugagaguaca (SEQ ID N°: 12).

En ciertas formas de realización, la secuencia de nucleótidos modificada de la hebra antisentido de un ARNi de la invención consiste en usGfsuac(Tgn)cucauugUfgGfaugacsgsa (SEQ ID N°: 11). En ciertas formas de realización, el ARNi de la invención comprende además una hebra sentido donde la secuencia de nucleótidos modificada de la hebra sentido consiste en la secuencia de nucleótidos modificada gsuscauCfaCfAfAfugagaguaca (SEQ ID N°: 12).

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 colaboradores, (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 ser 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 ser humano, tal como un ser 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 ser humano en riesgo de una enfermedad o trastorno que se beneficiaría a partir de la reducción de la expresión de AGT; un ser humano que tiene una enfermedad o trastorno que se beneficiaría a partir de la reducción de la expresión de AGT; o un ser 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 ser humano femenino. En otras formas de realización, el sujeto es un ser humano masculino. En determinadas formas de realización, el sujeto es parte de un grupo susceptible a sensibilidad a la sal, por ejemplo, personas negras o adultos mayores (≥ 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 es una mujer embarazada o que planea quedar embarazada. En ciertas formas de realización, el sujeto presenta una función renal reducida. En ciertas formas de realización el sujeto tiene diabetes de tipo 1. En ciertas formas de realización, el sujeto tiene diabetes de tipo 2.

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 (AT₁R) (por ejemplo, hipertensión, enfermedad renal crónica, accidente cerebrovascular, infarto de miocardio, insuficiencia cardíaca, aneurismas, enfermedad de arterias periféricas, enfermedad cardíaca, 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 cardíacas, frecuencia cardíaca 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 al embarazo (por ejemplo, preeclampsia, y eclampsia), incluyendo, a título enunciativo no taxativo restricción del 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 AT₁R; estabilización (es decir, no empeoramiento) del estado de la activación crónica de AT₁R; mejora o paliación de activación indeseada de AT₁R (por ejemplo, hipertensión, enfermedad renal crónica, accidente cerebrovascular, infarto de miocardio, insuficiencia cardíaca, aneurismas, enfermedad de arterias periféricas, enfermedad cardíaca, 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 cardíacas, frecuencia cardíaca 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 de tipo 2, y síndrome metabólico. "Tratamiento" también puede significar prolongar la sobrevida en comparación con la sobrevida esperada en ausencia de tratamiento.

Tal como se lo usa en la presente, "función renal reducida" y otras condiciones similares se pueden diagnosticar usando cualquiera de diversos criterios reconocidos, por ejemplo, tasa de filtración glomerular (TFG), albuminuria, creatinina o BUN [por las siglas en inglés de *Blood Urea Nitrogen*, es decir, nitrógeno ureico en sangre.]. Tal como se usa en la presente, la función renal reducida puede ser transitoria o crónica. Una TFG de por lo menos 60 se considera normal. Una TFG de 60 o menor indica una función renal reducida, una TFG > 15-60 indica una enfermedad renal, y una TFG menor de 15 es indicativa de insuficiencia renal. Típicamente, la TFG se determina en base a los niveles de creatinina en orina, donde un nivel de creatinina más alto es indicativo de una menor función renal. La presencia de albúmina en la orina también indica una función renal reducida. Para

diagnosticar una función renal reducida se puede determinar el nivel absoluto de albúmina. Para evaluar la función renal también se puede determinar la proporción de albúmina a creatinina. Una proporción de albúmina a creatinina en orina de 30 mg/g o menor es indicativa de una función renal normal. Una proporción de albúmina a creatinina en orina mayor de 30 mg/g es indicativa de una función renal reducida.

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. En ciertas formas de realización, “inferior” se refiere a una reducción del nivel de la proteína agt en el suero después de la administración de una o más dosis de un agente de ARNi de los que se proveen en la presente con relación al nivel en suero de la proteína agt antes de la administración de cualquier dosis de un agente de ARNi de los que se proveen en la presente.

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, donde el sujeto aún no

cumple con los criterios diagnósticos de trastorno asociado con AGT. Tal como se lo usa en el presente documento, la prevención se puede entender como la administración de un agente a un sujeto que aún no cumple los criterios de diagnóstico del trastorno asociado con AGT para retrasar o reducir la probabilidad de que el sujeto desarrolle el trastorno asociado con AGT. Como el agente es un agente farmacéutico, se entiende que normalmente la administración estaría bajo la dirección de un profesional de la salud capaz de identificar a un sujeto que aún no cumple con los criterios de diagnóstico de un trastorno asociado con AGT como susceptible de desarrollar un trastorno asociado con AGT. Los criterios de diagnóstico para la hipertensión y los factores de riesgo para la hipertensión se proveen más adelante. En determinadas formas de realización, la enfermedad o trastorno es por ejemplo, un síntoma de activación de AT₁R, no deseada tal como una hipertensión, enfermedad renal crónica, accidente cerebrovascular, infarto de miocardio, insuficiencia cardíaca, aneurismas, enfermedad de arterias periféricas, enfermedad cardíaca, 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 cardíacas, frecuencia cardíaca 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 de tipo 2, y síndrome metabólico. La probabilidad de desarrollar, por ejemplo, hipertensión, se reduce, por ejemplo, cuando un individuo 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. Provistos de métodos apropiados para identificar sujetos en riesgo de desarrollar cualquiera de las anteriores enfermedades asociadas a AGT, los agentes de ARNi que se proveen en la presente se pueden usar como agentes farmacéuticos para la prevención de enfermedades asociadas con AGT o en métodos para dicho fin. Más adelante se describen los factores de riesgo de diversas enfermedades asociadas con AGT.

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

sanguínea elevada. Los ejemplos no limitantes de enfermedades asociadas a angiotensinógeno incluyen a la hipertensión, por ejemplo, prehipertensión (que también se denomina hipertensión marginal), 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 al 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 cardíaca hipertensiva, nefropatía hipertensiva, aterosclerosis, arteriosclerosis, vasculopatía (incluyendo enfermedad vascular periférica), nefropatía diabética, retinopatía diabética, insuficiencia cardíaca crónica, cardiomiopatía, miopatía cardíaca diabética, glomeruloesclerosis, coartación de la aorta, aneurisma aórtico, fibrosis ventricular, apnea del sueño, insuficiencia cardíaca (por ejemplo, disfunción sistólica de ventrículo izquierdo), insuficiencia cardíaca con reducción de la fracción de eyección), 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 del desarrollo intrauterino (IUGR) o la restricción de desarrollo fetal. En determinadas formas de realización, los

trastornos asociados a 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 de tipo 2, y síndrome metabólico e hipotensión nocturna.

Los umbrales de presión sanguínea 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 al 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 mm Hg 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, relacionado con el acarreo o el transporte del compuesto objeto desde 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.

II. Métodos de la invención

La presente invención provee métodos para inhibir la expresión de un gen de angiotensinógeno (AGT). La presente invención también provee métodos para tratar a un sujeto que se beneficiaría de la reducción en la expresión del AGT (por ejemplo un sujeto en riesgo de desarrollar un trastorno asociado con AGT, por ejemplo, hipertensión), o el tratamiento de un trastorno asociado con AGT, por ejemplo, hipertensión, en un sujeto. Además, la presente invención provee métodos para disminuir el nivel de la presión sanguínea en un sujeto, como por ejemplo un sujeto que padece un trastorno asociado con AGT, por ejemplo, hipertensión. Los métodos incluyen administrar al sujeto una dosis fija, por ejemplo, de entre aproximadamente 50 mg y aproximadamente 800 mg, de un agente de ARNi de hebra doble dirigido hacia el AGT, según se describe en la presente.

Por lo tanto, en un aspecto, la presente invención provee un método para inhibir la expresión de un gen de angiotensinógeno (AGT) en un sujeto. El método comprende administrar al sujeto una dosis fija de entre aproximadamente 50 mg y aproximadamente 800 mg, por ejemplo, entre aproximadamente 50 y aproximadamente 200 mg, entre aproximadamente 50 mg y aproximadamente 500 mg, entre aproximadamente 100 mg y aproximadamente 800 mg, entre aproximadamente 100 mg y aproximadamente 500 mg, entre aproximadamente 100 mg y aproximadamente 300 mg, entre aproximadamente 200 mg y aproximadamente 300 mg, entre aproximadamente 200 mg y aproximadamente 400 mg, entre aproximadamente 200 mg y aproximadamente 500 mg, entre aproximadamente 200 mg y aproximadamente 800 mg, entre aproximadamente 300 mg y aproximadamente 800 mg, entre

aproximadamente 300 mg y aproximadamente 500 mg, entre aproximadamente 300 mg y aproximadamente 4000 mg [Sic.], entre aproximadamente 400 mg y aproximadamente 800 mg, entre aproximadamente 400 mg y aproximadamente 500 mg, por ejemplo, aproximadamente 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, o aproximadamente 800 mg, de un agente de ácido ribonucleico de hebra doble (ARNi) que inhibe la expresión del AGT. También es la intención que los valores y los rangos intermedios de los valores mencionados anteriormente formen parte de la presente invención.

Tal como se lo usa en la presente, el término "inhibir", se usa como sinónimo de "reducir", "silenciar", "reducir la expresión", "suprimir" y otros términos similares, e incluye cualquier nivel de inhibición.

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

"Inhibir la expresión de un gen AGT" incluye cualquier nivel de inhibición de un gen AGT, por ejemplo, la supresión por lo menos parcial de la expresión de un gen AGT. La expresión del gen AGT se puede evaluar en base al nivel, o al cambio del nivel, de cualquier variable asociada con la expresión del gen AGT, por ejemplo, en base al nivel de ARNm de AGT o al nivel de la proteína agt. Este nivel se puede evaluar en una célula individual o en un grupo de células, incluyendo, por ejemplo, a las muestras que se obtuvieron de un

sujeto. Se entiende que el AGT se expresa predominantemente en el hígado, pero también en el cerebro, en la vesícula biliar, el corazón y el riñón, y que la proteína está presente en la circulación.

La inhibición se puede evaluar mediante una disminución de un nivel absoluto o relativo 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 inicial previo a la dosis o un nivel determinado en un sujeto, célula o muestra similar sin tratar, o tratados con un control (por ejemplo, con un control de regulador de pH solo o un control de agente inactivo).

En algunas formas de realización de los métodos de la invención, la expresión de un gen AGT se inhibe en por lo menos 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% o 95%, o hasta quedar por debajo del nivel de detección del ensayo. En algunas formas de realización preferidas, la expresión del gen AGT se inhibe en por lo menos un 50%. Además, se entiende que puede ser deseable inhibir la expresión del AGT en ciertos tejidos, por ejemplo, en el hígado, sin producir una inhibición significativa de la expresión en otros tejidos, por ejemplo, en el cerebro. En algunas formas de realización preferidas, el nivel de expresión se determina usando el método de ensayo que se provee en el Ejemplo 2 de la Solicitud PCT N° PCT/US2019/032150 con una concentración 10 nM de ARNip en la línea celular apropiada de la especie correspondiente.

En ciertas formas de realización, la inhibición *in vivo* de la expresión se determina mediante el silenciamiento del gen humano en un roedor que expresa el gen humano, por ejemplo, un ratón infectado con AAV que expresa

el gen blanco humano (es decir, AGT), por ejemplo, cuando se administra una única dosis de 3 mg/kg en el nadir de expresión del ARN. El silenciamiento de la expresión de un gen endógeno en un sistema modelo animal también se puede determinar, por ejemplo, después de la administración de una única dosis a 3 mg/kg en el nadir de expresión del ARN. Dichos sistemas son útiles cuando la secuencia de ácidos nucleicos del gen humano y del gen del modelo animal se parecen lo suficiente como para que el ARNi humano provea un silenciamiento eficaz del gen del modelo animal. La expresión del ARN en el hígado se determina usando los métodos de PCR que se proveen en el Ejemplo 2 de la Solicitud PCT N° PCT/US2019/032150.

La inhibición de la expresión de un gen AGT se puede manifestar por una reducción de la cantidad del ARNm expresado por una primera célula o grupo de células (dichas células pueden estar presentes, por ejemplo, en una muestra que se obtuvo de un sujeto) en la que se ha transcrito un gen AGT y que ha sido tratada (por ejemplo, poniendo en contacto a la célula o las células con un ARNi de la invención, o administrando un ARNi de la invención a un sujeto en el que están o estuvieron presentes las células) de manera de inhibir la expresión de un gen AGT, en comparación con una segunda célula o grupo de células sustancialmente idénticas a la primera célula o grupo de células pero que no han sido tratadas de esta manera (células de control no tratadas con un ARNi o no tratadas con un ARNi dirigido al gen de interés). En algunas formas de realización preferidas, la inhibición se evalúa mediante el método que se provee en el Ejemplo 2 de la Solicitud PCT N° PCT/US2019/032150 usando una concentración 10 nM de ARNi en la línea celular de la especie correspondiente y expresando el nivel de ARNm en las células tratadas como

un porcentaje del nivel de ARNm en las células de control, utilizando la siguiente fórmula:

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

En otras formas de realización, la inhibición de la expresión de un gen AGT se puede evaluar en términos de una reducción de un parámetro que está ligado funcionalmente a la expresión del gen AGT, por ejemplo, el nivel de la proteína agt en la sangre o el suero de un sujeto. El silenciamiento del gen AGT se puede determinar en cualquier célula que exprese el AGT a partir de una construcción de expresión, ya sea de manera endógena o heteróloga, 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 es expresada por 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 obtuvo de un sujeto). Según se explicó anteriormente, para evaluar la supresión de ARNm, la inhibición de los niveles de expresión de 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, sangre o suero que se obtuvo del mismo.

Una célula de control, un grupo de células o una muestra del sujeto que se puede usar para evaluar la inhibición de la expresión de un gen AGT incluye una célula, un grupo de células o una muestra del sujeto que aún no ha sido puesta en contacto con un agente de ARNi de la invención. Por ejemplo, la

célula de control, el grupo de células o la muestra del sujeto se pueden obtener de un sujeto individual (por ejemplo, un sujeto humano o animal) antes de tratar el sujeto con un agente de ARNi o de una población de control apropiadamente correspondiente.

El nivel de ARNm de AGT que es expresado por una célula o un grupo de células se puede determinar usando cualquier método conocido en el arte para evaluar la expresión de ARNm. En una forma de realización, el nivel de expresión del AGT en una muestra se determina detectando un polinucleótido transcrito, o una porción del mismo, por ejemplo, ARNm del gen AGT. El ARN se puede extraer de las células usando técnicas de extracción de ARN que incluyen, por ejemplo, el uso de extracción con ácido-fenol/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. Tal como se lo usa en la presente, el término "sonda" 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 se pueden diseñar 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 hibridización o amplificación que incluyen, a título enunciativo no taxativo, análisis Southern o Northern, análisis por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y arreglos con sondas. Un método para la determinación de los niveles de ARNm involucra poner en contacto el ARNm aislado con una molécula de ácido nucleico (sonda) que puede hibridar con el ARNm de AGT. En una forma de realización, el ARNm se inmoviliza en una superficie sólida y se pone en contacto con una sonda, por ejemplo corriendo el ARNm aislado en un gel de agarosa y transfiriendo el ARNm del gel a una membrana, tal como nitrocelulosa. En una forma de realización alternativa, la o las sondas se inmovilizan en una superficie sólida y el ARNm se pone en contacto con la o las sondas, por ejemplo, en un arreglo en chip génico Affymetrix®. Una persona con experiencia podrá adaptar fácilmente los métodos conocidos de detección de ARNm para usar para la determinación del nivel de ARNm de AGT.

Un método alternativo para determinar el nivel de expresión de AGT en una muestra involucra el proceso de amplificación de ácido nucleico o transcriptasa reversa (para preparar ADNc) de por ejemplo el ARNm en la muestra, por ejemplo, por RT-PCR (la forma de realización experimental descrita 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 col. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:1874-1878), sistema de amplificación transcripcional (Kwoh y col. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:1173-1177), replicasa Q-Beta (Lizardi y col. (1988) *Bio/Technology* 6:1197), replicación en círculo rodante (Lizardi y col., Patente de los EE.UU. No. 5.854.033) o cualquier otro método de

amplificación de ácido nucleico, seguido por la detección de las moléculas amplificadas usando técnicas bien conocidas para aquellos con experiencia en la materia. Estos esquemas de detección son especialmente útiles para la detección de moléculas de ácido nucleico si dichas moléculas están presentes en muy bajos números. En aspectos particulares de la invención, el nivel de expresión de AGT se determina por RT-PCR cuantitativa fluorogénica (es decir, el sistema TaqMan™). En formas de realización preferidas, el nivel de expresión se determina mediante el método provisto en el Ejemplo 2 de la Solicitud PCT No. PCT/US2019/032150 usando una concentración de ARNip de 10nM en la línea de células con coincidencia de especie.

El nivel de expresión de la proteína AGT se puede determinar usando cualquier método conocido en la materia para la medida de los niveles de proteínas. Dichos métodos incluyen, por ejemplo, cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), espectroscopía de absorción, ensayos colorimétricos, ensayos espectrofotométricos, citometría de flujo, inmunoelectroforesis, transferencia western, radioinmunoensayo (RIA), ensayos de inmunoadsorción ligado a enzima (ELISA), ensayos de inmunofluorescencia, ensayos de electroquimioluminiscencia, y similares.

En algunas formas de realización, la eficacia de los métodos de la invención se evalúa mediante una disminución en el nivel de ARNm o proteína de AGT (por ejemplo, en una biopsia de hígado). En ciertas formas de realización, una muestra de biopsia de hígado por punción sirve como material de tejido para el monitoreo de la reducción en la expresión del gen o proteína de AGT. En otras formas de realización, una muestra de sangre sirve como la

muestra del sujeto para monitorear la reducción en la expresión de proteína AGT.

En algunas formas de realización de los métodos de la invención, el ARNi se administra a un sujeto de manera que el ARNi se administra a un sitio específico en el sujeto. La inhibición de la expresión de AGT se puede evaluar usando las medidas del nivel o cambio en el nivel de ARNm de AGT o proteína AGT en una muestra derivada de fluido o tejido del sitio específico en el sujeto (por ejemplo, hígado o sangre).

Como se usa en la presente, los términos detectar o determinar un nivel de un analito se comprenden como realizar los pasos para determinar si está presente un material, por ejemplo, proteína, ARN. Como se usan en la presente, los métodos para detectar o determinar incluyen la detección o la determinación de un nivel de un analito que se encuentra por debajo del nivel de detección para el método usado.

En otro aspecto, la presente invención provee un método para tratar un sujeto que tiene un trastorno asociado con AGT, por ejemplo, presión sanguínea elevada, por ejemplo, hipertensión. El método comprende administrar al sujeto una dosis fija de entre aproximadamente 50 mg y aproximadamente 800 mg, por ejemplo, aproximadamente entre 50 y 200 mg, aproximadamente entre 200 y 400 mg, aproximadamente entre 400 y 800 mg, por ejemplo, aproximadamente 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, o aproximadamente 800 mg, de un agente de ácido ribonucleico de hebra doble (ARNi) que inhibe la expresión de AGT. Se pretende que los valores y rangos intermedios de los valores indicados precedentemente también sean parte de esta invención.

En algunas formas de realización, el trastorno asociado con AGT se selecciona del grupo que consiste en presión sanguínea elevada, hipertensión, hipertensión al límite, hipertensión primaria, hipertensión secundaria hipertensión sistólica o diastólica aislada, hipertensión asociada a embarazo, hipertensión diabética, 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 cardíaca hipertensiva, nefropatía hipertensiva, aterosclerosis, arteriosclerosis, vasculopatía, nefropatía diabética, retinopatía diabética, insuficiencia cardíaca crónica, cardiomiopatía, miopatía cardíaca diabética, hipotensión nocturna, glomeruloesclerosis, coartación de la aorta, aneurisma de aorta, fibrosis ventricular, insuficiencia cardíaca, infarto de miocardio, angina, accidente cerebrovascular, enfermedad renal, insuficiencia renal, esclerosis sistémica, retraso de crecimiento intrauterino (IUGR) , restricción de crecimiento fetal, obesidad, esteatosis hepática/hígado graso, esteatosis no alcohólica (NASH), enfermedad de hígado graso no alcohólico (NAFLD); intolerancia a la glucosa, diabetes de tipo 2, y síndrome metabólico.

En una forma de realización, el trastorno asociado con AGT es hipertensión. En una forma de realización, la hipertensión es hipertensión al límite, hipertensión primaria, hipertensión secundaria hipertensión sistólica o diastólica aislada, hipertensión asociada a embarazo, hipertensión diabética, 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 cardíaca hipertensiva, o nefropatía hipertensiva.

En un aspecto adicional, la presente invención provee un método para tratar un sujeto que se podría beneficiar con la reducción en la expresión de AGT. El método comprende la administración al sujeto de una dosis fija de entre aproximadamente 50 mg y aproximadamente 800 mg, por ejemplo, aproximadamente entre 50 y 200 mg, aproximadamente entre 200 y 400 mg, aproximadamente entre 400 y 800 mg, por ejemplo, aproximadamente 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, o aproximadamente 800 mg, de un agente ácido ribonucleico de hebra doble (ARNi) que inhibe la expresión de AGT. Se pretende que los valores y rangos intermedios de los valores indicados precedentemente también sean parte de esta invención.

En un aspecto adicional, la presente invención provee un método para disminuir el nivel de presión sanguínea, por ejemplo, presión sanguínea sistólica y/o presión sanguínea diastólica, en un sujeto. El método comprende la administración al sujeto de una dosis fija de entre aproximadamente 50 mg y aproximadamente 800 mg, por ejemplo, aproximadamente entre 50 y 200 mg, aproximadamente entre 200 y 400 mg, aproximadamente entre 400 y 800 mg, por ejemplo, aproximadamente 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, o aproximadamente 800 mg, de un agente de ácido ribonucleico de hebra doble (ARNi) que inhibe la expresión de AGT. Se pretende que los valores y rangos intermedios de los valores indicados precedentemente también sean parte de esta invención.

En los métodos de la invención, una célula, por ejemplo, una célula en un sujeto, tal como un sujeto humano (por ejemplo, un sujeto que lo requiere, tal como un sujeto que tiene un trastorno asociado con AGT), se puede poner en contacto con el ARNip *in vitro* o *in vivo*, es decir, la célula puede estar en un sujeto.

Una célula adecuada para tratamiento usando los métodos de la invención puede ser cualquier célula que expresa un gen de AGT, por ejemplo, una célula hepática, una célula de cerebro, una célula de vesícula biliar, una célula de corazón, o una célula de riñón, pero preferiblemente 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 de humano, que incluye una célula humana en un animal no humano quimérico, o una célula de primate no humano, por ejemplo, una célula de mono o una célula de chimpancé), o una célula no primate. En ciertas formas de realización, la célula es un célula de humano, por ejemplo, una célula hepática de humano. En los métodos de la invención, la expresión de AGT es inhibida en la célula en al menos 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, o 95%, o hasta un nivel por debajo del nivel de detección del ensayo.

En una forma de realización, un agente de ARNhd dirigido contra AGT se administra a un sujeto de manera que los niveles de AGT, por ejemplo, en una célula, tejido, sangre, orina u otro tejido o fluido del sujeto se reducen en al menos aproximadamente 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%,

45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 62%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o al menos aproximadamente 99% o más.

En otra forma de realización, un agente de ARNhd dirigido contra AGT se administra a un sujeto de manera tal que los niveles de presión sanguínea, por ejemplo, presión sanguínea sistólica y/o presión sanguínea diastólica, del sujeto se reducen en al menos aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10 mmHg o más.

La administración del agente de ARNhd de acuerdo con los métodos y usos de la invención puede producir una reducción en la severidad, signos, síntomas, y/o marcadores de dichas enfermedades o trastornos en un paciente con hiperoxaluria primaria. El término “reducción” en este contexto se refiere a una disminución estadísticamente significativa en dicho nivel. La reducción puede ser, por ejemplo, de al menos aproximadamente 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, o aproximadamente 100%.

La eficacia del tratamiento o prevención de la enfermedad se puede evaluar, por ejemplo por medida de la progresión de la enfermedad, remisión de la enfermedad, severidad del síntoma, reducción en el dolor, calidad de vida, dosis de una medicación requerida para mantener un efecto del tratamiento, nivel de un marcador de la enfermedad o cualquier otro parámetro que se pueda medir para una enfermedad dada que está siendo tratada o diana de prevención. La habilidad de una persona con experiencia en la

materia le permitirá monitorear la eficacia del tratamiento o prevención mediante la medida de cualquiera de dichos parámetros, o cualquier combinación de los parámetros. Por ejemplo, la eficacia del tratamiento de hiperoxaluria primaria se puede evaluar, por ejemplo, mediante el monitoreo periódico de los niveles de oxalato en el sujeto que está siendo tratado. Las comparaciones de las últimas medidas con las medidas iniciales proveen al médico una indicación de si el tratamiento es eficaz. La habilidad de una persona con experiencia en la materia le permitirá monitorear la eficacia del tratamiento o prevención por medida de dicho parámetro, o cualquier combinación de los parámetros. En relación a la administración de un agente de ARNhd dirigido contra AGT o composición farmacéutica del mismo, "eficaz contra" la hiperoxaluria primaria indica que la administración de un modo clínicamente apropiado resulta en un efecto beneficioso para al menos una fracción estadísticamente significativa de pacientes, tal como una mejora en los síntomas, una cura, una reducción en la enfermedad, prolongación de la vida, mejora en la calidad de vida, u otro efecto reconocido de manera general como positivo por los médicos familiarizados con el tratamiento de la hiperoxaluria primaria y las causas relacionadas.

Un tratamiento o efecto preventivo es evidente cuando existe una mejora estadísticamente significativa en uno o más parámetros del estado de la enfermedad, o por una falla en el empeoramiento o en el desarrollo de los síntomas en el caso que se podrían haber anticipado de otra manera. A modo de ejemplo, un cambio favorable de al menos 10% en un parámetro de la enfermedad que se puede medir, y preferiblemente por lo menos 20%, 30%, 40%, 50% o más puede ser indicativo de un tratamiento eficaz. La eficacia para

un dado fármaco agente de ARNhd o formulación de ese fármaco también se puede juzgar utilizando un modelo animal experimental para una dada enfermedad tal como es conocido en la materia. Cuando se usa un modelo animal experimental, la eficacia del tratamiento es evidente cuando se observa una reducción estadísticamente significativa en un marcador o síntoma.

Cualquier cambio positivo que provoca por ejemplo, la disminución en la severidad de la enfermedad medida con el uso de la escala apropiada, representa un tratamiento adecuado que usa un agente de ARNhd o formulación del agente de ARNhd como se describe en la presente.

Los métodos *in vivo* de la invención pueden incluir la administración a un sujeto de una composición que contiene un ARNi, en donde el ARNi incluye una secuencia nucleotídica que es complementaria con por lo menos una parte de un transcripto de ARN del gen de AGT del mamífero al cual se administra el agente de ARNi. La composición se puede administrar de acuerdo con medios conocidos en la materia que incluyen, a título enunciativo no taxativo las rutas oral, intraperitoneal o parenteral, que incluye intracraneal (por ejemplo, intraventricular, intraparénquima e intratecal), administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, transdérmica, vías aéreas (aerosol), nasal, rectal y tópica (que incluye 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 mediante inyección subcutánea. En ciertas formas de realización, las composiciones se administran mediante inyección intramuscular.

En algunas formas de realización, la administración es por medio de una inyección de depósito. Una inyección de depósito puede liberar el agente de

ARNhd de una manera consistente durante un periodo de tiempo prolongado. Por lo tanto, una inyección de depósito puede reducir la frecuencia de la dosificación requerida para obtener un efecto deseado, por ejemplo, una inhibición deseada de AGT, o un efecto terapéutico o profiláctico. Una inyección de depósito también puede proveer concentraciones en suero más consistentes. Las inyecciones de depósito pueden incluir inyecciones subcutáneas o inyecciones intramusculares. En formas de realización preferidas, la inyección de depósito es una inyección subcutánea.

En algunas formas de realización, la administración es por medio de una bomba. La bomba puede ser una bomba externa o una bomba implantada de manera quirúrgica. En ciertas formas de realización, la bomba es una bomba osmótica implantada de manera subcutánea. En otras formas de realización, la bomba es una bomba de infusión. Una bomba de infusión se puede usar para las infusiones intravenosa, subcutánea, arterial o epidural. En formas de realización preferidas, la bomba de infusión es una bomba de infusión subcutánea. En otras formas de realización, la bomba es una bomba implantada de manera quirúrgica que administra el agente de ARNhd al hígado.

Otros modos de administración incluyen administración epidural, intracerebral, intracerebroventricular, nasal, intraarterial, intracardiaca, infusión intraósea, intratecal, e intravítrea y pulmonar. El modo de administración se puede seleccionar en base a si se desea tratamiento local o sistémico y en base al área a tratar. La ruta y sitio de administración se pueden elegir para potenciar el direccionamiento.

El ARNi se administra preferiblemente de manera subcutánea, es decir, mediante inyección subcutánea. Se puede usar una o más inyecciones para

administrar la dosis deseada de ARNi a un sujeto. Las inyecciones se pueden repetir durante un periodo de tiempo.

La administración se puede repetir con una frecuencia regular. En ciertas formas de realización, el ARNi se administra entre aproximadamente una vez por mes y aproximadamente una vez por trimestre, es decir, aproximadamente una vez cada tres meses, o entre aproximadamente una vez por trimestre y aproximadamente dos veces por año, es decir, aproximadamente una vez cada seis meses. En ciertas formas de realización, el ARNi se administra una vez por mes. En otras formas de realización, el ARNi se administra cada tres meses, o una vez por trimestre. En aún otra forma de realización, el ARNi se administra cada seis meses o bianual.

Un agente de ARNhd de la invención se puede administrar en forma “desnuda”, o como un “agente de ARNhd libre”. Un agente de ARNhd desnudo se administra en ausencia de una composición farmacéutica. El agente de ARNhd desnudo puede estar en una solución amortiguadora adecuada. La solución amortiguadora puede comprender acetato, citrato, prolamina, carbonato, o fosfato, o cualquier combinación de los mismos. En una forma de realización, la solución amortiguadora es solución salina amortiguada con fosfato (PBS). El pH y la osmolaridad de la solución amortiguadora que contiene el agente de ARNhd se puede ajustar de manera que sea adecuada para la administración a un sujeto.

Como alternativa, se puede administrar un ARNi de la invención como una composición farmacéutica, tal como una formulación liposomal de ARNhd. El agente de ARNi se puede administrar como una composición farmacéutica en una solución sin amortiguar. La solución sin amortiguar puede comprender

solución salina o agua. Como alternativa, el agente de ARNi se puede administrar como una composición farmacéutica en una solución amortiguadora. La solución amortiguadora puede comprender acetato, citrato, prolamina, carbonato, o fosfato o cualquier combinación de los mismos. En una forma de realización, la solución amortiguadora es solución salina amortiguada con fosfato (PBS).

Los sujetos que se podrían beneficiar con una inhibición de la expresión del gen de AGT son sujetos susceptibles o diagnosticados con una enfermedad o trastorno asociado con AGT, por ejemplo, presión sanguínea elevada, por ejemplo, hipertensión. Los sujetos pueden tener una presión sanguínea sistólica de al menos 130, 135, 140, 145, 150, 155 o 160 mmHg o una presión sanguínea diastólica de al menos 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110 mmHg. El sujeto puede ser susceptible de sensibilidad a sal, sobrepeso, obesidad, embarazo, o planificación de quedar embarazada. El sujeto puede tener diabetes tipo 2, diabetes tipo 1, o tener una función renal reducida.

El método además comprende la administración al sujeto de un agente terapéutico adicional para el tratamiento de hipertensión. Los agentes terapéuticos ejemplificativos para usar como una terapia combinada pueden incluir, a título enunciativo no taxativo, un diurético, un inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina (ACE), un antagonista del receptor de angiotensina II, un beta bloqueante, un vasodilatador, un bloqueante del canal de calcio, un antagonista de aldosterona, un agonista alfa 2, un inhibidor de la renina, un bloqueante alfa, un agente adrenérgico de acción periférica, un agonista parcial del receptor D1 selectivo, un antagonista alfa adrenérgico no selectivo, un sintético, un agente antimineralocorticoide esteroideo; una

combinación de cualquiera de los anteriores; y un agente terapéutico contra la hipertensión formulado como una combinación de agentes. En algunas formas de realización, el agente terapéutico adicional comprende un antagonista del receptor de angiotensina II, por ejemplo, losartán, valsartán, olmesartán, eprosartán y azilsartán.

La administración del ARNi de acuerdo con los métodos de la invención puede resultar en la prevención o tratamiento de un trastorno asociado con AGT, por ejemplo, presión sanguínea elevada, por ejemplo, hipertensión. Los criterios de diagnóstico de diferentes tipos de presión sanguínea elevada se proveen precedentemente.

I. Criterios de diagnóstico, factores de riesgo, y tratamientos de la hipertensión

Recientemente se han revisado las guías de prácticas para la prevención y tratamiento de la hipertensión. Se publicaron informes extensos en 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 en 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.). Algunos puntos destacados de las nuevas Guías se proveen a continuación. Sin embargo, las Guías se deben comprender como que proveen el conocimiento a aquellos con experiencia en la materia respecto a los criterios de diagnóstico y monitoreo para el tratamiento de hipertensión al momento de presentar esta solicitud y se incorporan a la presente a modo de referencia.

A. Criterios de diagnóstico

A pesar de que existe una asociación continua entre la mayor presión sanguínea y el riesgo aumentado de enfermedad cardiovascular, resulta útil para categorizar los niveles de presión sanguínea para tomar decisiones de salud clínica y pública. La presión sanguínea se puede categorizar en 4 niveles en base a la presión sanguínea promedio medida en el contexto de asistencia sanitaria (presiones de oficina): normal, elevada, y etapa 1 o 2 de hipertensión como se muestra en la tabla a continuación (de Whelton y col., 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*			
Etapa 1	130-139 mmHg	o	80-89 mmHg
Etapa 2	<u>></u> 140 mmHg	o	<u>></u> 90 mmHg

*Los individuos con presión sanguínea sistólica y presión sanguínea diastólica en 2 categorías se deben designar a la mayor categoría de presión sanguínea.

La presión sanguínea indica la presión sanguínea en base a un promedio de ≥ 2 lecturas cuidadosas obtenidas en ≥ 2 ocasiones. Las mejores prácticas para obtener lecturas de presión sanguínea cuidadosas se describen en Whelton y col., 2017 y son conocidas en la materia.

Esta categorización difiere de la recomendada previamente en el informe JNC 7 (Chobanian y col; the 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. Hipertension. 2003;42:1206-52) con la hipertensión en etapa 1 ahora definida como presión sanguínea sistólica (SBP) de entre 130 y 139 o una presión sanguínea diastólica (DBP) de entre 80 y 89 mmHg, y con hipertensión en etapa 2 en el presente documento correspondiente a las etapas 1 y 2 del informe JNC 7. La justificación de esta categorización se basa en los datos observacionales relacionados con la asociación entre SBP/DBP y el riesgo de enfermedad cardiovascular, ensayos clínicos randomizados de modificación del estilo de vida para disminuir la presión sanguínea, y ensayos clínicos randomizados de tratamiento con medicación antihipertensiva para prevenir enfermedades cardiovasculares.

El riesgo aumentado de enfermedad cardiovascular entre los adultos con hipertensión en etapa 2 está bien establecido. Un número creciente de estudios individuales y metaanálisis de datos observacionales han informado un gradiente de riesgo de enfermedad cardiovascular progresivamente en

aumento que va desde presión sanguínea normal a presión sanguínea elevada e hipertensión en etapa 1. En muchos de estos metaanálisis, los índices de riesgo de enfermedad de las arterias coronarias y accidente cerebrovascular resultaron entre 1,1 y 1,5 para la comparación de SBP/DBP de 120 a 129/80 a 84 mmHg respecto a <120/80 mmHg y entre 1,5 y 2,0 para la comparación de SBP/DBP de 130 a 139/85 a 89 mmHg respecto a <120/80 mmHg. El gradiente de riesgo fue consistente entre los subgrupos definidos por género y raza/etnicidad. El aumento relativo en el riesgo de enfermedad cardiovascular asociado con mayor presión sanguínea fue atenuado pero aún está presente entre los adultos mayores. Para los individuos con presión sanguínea elevada e hipertensión en etapas 1 y 2 se recomienda la modificación en el estilo de vida y tratamiento farmacológico con antihipertensivos. Se puede obtener un beneficio clínico por una reducción en la etapa de presión sanguínea elevada, incluso si la presión sanguínea no es normalizada por un tratamiento.

B. Factores de riesgo

La hipertensión es una enfermedad compleja que resulta de una combinación de factores que incluye, a título enunciativo no taxativo, genética, estilo de vida, dieta, y factores de riesgo secundario. La hipertensión también se puede asociar con el embarazo. Se comprende que debido a la naturaleza compleja de la hipertensión, se comprende que se pueden requerir múltiples intervenciones para el tratamiento de la hipertensión. Además, las intervenciones no farmacológicas, que incluyen la modificación de la dieta y estilo de vida, pueden ser útiles para la prevención y tratamiento de la hipertensión. Además, una intervención puede proveer un beneficio clínica sin normalizar por completo la presión sanguínea en un individuo.

1. Factores de riesgo genéticos

Se han identificado varias formas monogénicas de hipertensión, tales como aldosteronismo remediable con glucocorticoides, síndrome de Liddle, síndrome de Gordon, y otras en las cuales las mutaciones de gen único explican por completo la patofisiología de la hipertensión, estos trastornos son raros. La tabulación actual de variantes genéticas conocidas que contribuyen a la presión sanguínea e hipertensión incluye más de 25 mutaciones raras y 120 polimorfismos de nucleótido único. Sin embargo, a pesar de que en algunos individuos pueden contribuir factores genéticos a la hipertensión, se estima que la variación genética representa solo aproximadamente el 3,5% de la variabilidad en la presión sanguínea.

2. Dieta y consumo de alcohol

Los factores de riesgo comunes ambientales y de estilo de vida que llevan a la hipertensión incluyen dieta pobre, actividad física insuficiente, y exceso en el consumo de alcohol. Estos factores pueden llevar a la persona a sobrepeso u obesidad, aumentando aún más la probabilidad de desarrollar o exacerbar la hipertensión. La presión sanguínea elevada se encuentra incluso más fuertemente correlacionada con el aumento en la relación cintura-cadera u otras medidas de distribución de grasa central. La obesidad a edad temprana y la obesidad continua se correlaciona fuertemente con la hipertensión más adelante en la vida. El lograr un peso normal puede reducir el riesgo de desarrollar presión sanguínea elevada en esa 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

encuentra posiblemente correlacionada con la presión sanguínea y representa gran parte del aumento relacionado con la edad en la presión sanguínea. Ciertos grupos son más sensibles al consumo elevado de sodio que otros incluyendo raza negra y adultos mayores (≥ 65 años de edad), y aquellos con un nivel más alto de presión sanguínea o comorbilidades tales como enfermedad renal crónica, diabetes mellitus, o síndrome metabólico. En conjunto, estos grupos constituyen más de la mitad de todos los adultos de los EE.UU.. La sensibilidad a la sal puede ser un marcador de enfermedad cardiovascular aumentada y mortalidad por todas las causas, independientemente de la presión sanguínea. En la actualidad, las técnicas para el reconocimiento de la sensibilidad a la sal son poco prácticas en el contexto clínico. Por lo tanto, la sensibilidad a la sal es mejor considerada como un grupo característico.

La ingesta de potasio se relaciona de manera inversa con la presión sanguínea y los accidentes cerebrovasculares, y un mayor nivel de potasio parece anular el efecto del sodio sobre la presión sanguínea. Una menor relación de sodio a potasio se asocia con una menor presión sanguínea que lo observado para niveles correspondientes de sodio o potasio independientes. Se ha realizado una observación similar para el riesgo de cardiovascular enfermedad.

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

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

3. Actividad física

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

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

4. Factores de riesgo secundarios

La hipertensión secundaria puede contribuir a la elevación severa de la presión sanguínea, hipertensión farmacológicamente resistente, inicio repentino de hipertensión, presión sanguínea elevada en pacientes con hipertensión previamente controlada con terapia farmacológica, inicio de hipertensión diastólica en adultos mayores, y daño de órgano diana desproporcionado para la duración o severidad de la hipertensión. A pesar de que la hipertensión secundaria se debe sospechar en pacientes jóvenes (<30 años de edad) con presión sanguínea elevada, no es común que la hipertensión primaria se manifieste a una edad temprana, especialmente en raza negra, y algunas formas de hipertensión secundaria, tal como enfermedad renovascular, son más comunes a edades más grandes ($\geq$ 65 años de edad). Muchas de las causas de hipertensión secundaria están fuertemente asociadas con hallazgos clínicos o grupos de hallazgos que sugieren un trastorno específico. En dichos casos, el tratamiento de la condición subyacente puede resolver los hallazgos

de presión sanguínea elevada son la administración de agentes típicamente utilizados para el tratamiento de la hipertensión.

5. Embarazo

El embarazo es un factor de riesgo de presión sanguínea elevada, y la presión sanguínea elevada durante el embarazo es un factor de riesgo de enfermedad cardiovascular e hipertensión tardía en la vida. En 2013, el Colegio Americano de Obstetricia y Ginecología (ACOG) (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) publicó un informe de embarazo asociado con la hipertensión. A continuación se proveen algunos aspectos destacados del Informe. Sin embargo, se debe interpretar que el Informe provee el conocimiento a aquellos con experiencia en la materia respecto a los criterios de diagnóstico y monitoreo y el tratamiento para la hipertensión en embarazo al momento de la presentación de esta solicitud y se incorporan a la presente a modo de referencia.

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

Presión sanguínea	- ≥ 140 mmHg de sistólica o ≥ 90 mmHg de diastólica en dos ocasiones separadas por al menos 4 horas después de 20 semanas de gestación en una mujer con una presión sanguínea previamente normal - ≥ 160 mmHg de sistólica o ≥ 110 mmHg de diastólica, la hipertensión se puede confirmar en un intervalo corto
--------------------------	---

	(minutos) para facilitar una oportuna terapia antihipertensiva
y	
Proteinuria	- ≥ 300 mg en orina recolectada durante 24 horas (o esta cantidad extrapolada para una recolección durante cierto tiempo) - O - Relación proteína/creatinina $\geq 0,3$ (cada una medida como mg/dL)
O en ausencia de proteinuria, 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 $\geq 1,1$ mg/dL o una duplicación de la concentración de creatinina sérica en ausencia de otra enfermedad renal
Función hepática deteriorada	- Concentraciones en sangre elevadas de transaminasas hepáticas al doble de la concentración normal
Edema pulmonar	
Síntomas cerebrales o visuales	

El manejo de la presión sanguínea durante el embarazo es complicado por el hecho de que muchos agentes antihipertensivos habitualmente usados, que incluyen inhibidores de la ECA y ARB, están contraindicados durante el

embarazo por un potencial daño al feto. El objetivo del tratamiento antihipertensivo durante el embarazo incluye la prevención de hipertensión severa y la posibilidad de prolongar la gestación para brindarle más tiempo al feto para madurar antes del nacimiento. Una revisión del tratamiento para hipertensión severa asociada con el embarazo no encontró evidencia suficiente para recomendar agentes específicos; en su lugar, se recomendó 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 presión sanguínea elevada es complejo ya que frecuentemente está presente con otras comorbilidades, incluyendo con frecuencia función renal reducida, para las cuales el sujeto también puede estar bajo tratamiento. Los médicos que controlan adultos con presión sanguínea elevada deben enfocarse en la salud integral del paciente, con un énfasis particular en la reducción del riesgo de futuros efectos sobre enfermedades cardiovasculares adversas. Es necesario manejar todos los factores de riesgo del paciente de un modo integrado con un conjunto comprensivo de estrategias no farmacológicas y farmacológicas. A medida que aumenta la presión sanguínea del paciente y el riesgo de futuros eventos de enfermedades cardiovasculares, se debe intensificar el manejo de la presión sanguínea.

Si bien el tratamiento de la presión sanguínea elevada con medicaciones para disminuir la presión sanguínea en base al nivel de presión sanguínea solo es considerado económico, el uso de una combinación del riesgo de enfermedad cardiovascular absoluto y el nivel de presión sanguínea para guiar

dicho tratamiento es más eficaz y económico para reducir el riesgo de enfermedad cardiovascular que el uso del nivel de presión sanguínea solo. Muchos pacientes que comienzan con un agente solo posteriormente requerirán ≥ 2 fármacos de diferentes clases farmacológicas para alcanzar sus objetivos de presión sanguínea. El conocimiento de los mecanismos de acción farmacológica de cada agente es importante. Los regímenes de fármacos con actividad complementaria, en donde se usa un segundo agente antihipertensivo para bloquear las respuestas compensatorias al agente inicial o afectar un mecanismo presor diferente, puede resultar en una disminución aditiva de la presión sanguínea. Por ejemplo, los diuréticos del tipo tiazida pueden estimular el sistema renina-angiotensina-aldosterona. Mediante el agregado de un inhibidor de la ECA o ARB a la tiazida, se puede obtener un efecto aditivo para disminuir la presión sanguínea. El uso de una terapia combinada también puede mejorar la adherencia. Se encuentran disponibles varias combinaciones de 2 y 3 fármacos de dosis fijas de terapias con fármacos antihipertensivos, con mecanismos de acción complementarios entre los componentes.

La Tabla 18 de Whelton y col. 2017 que enumera fármacos antihipertensivos se provee a continuación. Se proveen clases de agentes terapéuticos para el tratamiento de presión sanguínea elevada y fármacos que caen dentro de esas clases. También se proveen rangos de dosis, frecuencias y comentarios.

Clase	Fármaco	Dosis habitual, Rango (mg/d)*	Frecuencia diaria	Comentarios
Agentes primarios				
Tiazida o diuréticos tipo tiazida	Clortalidona	12,5-25	1	• Se prefiere clortalidona en base a la vida media prolongada y reducción de CVD en ensayo probada. • Monitoreo de hiponatremia e hipocalcemia, niveles de ácido úrico y calcio. • Uso con cuidado en pacientes con historia de gota aguda a menos que el paciente esté bajo terapia para disminuir 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 o 2	• No usar en combinación con ARB o inhibidor directo de renina
	Captopril	12,5-150	2 o 3	
	Enalapril	5-40	1 o 2	

Clase	Fármaco	Dosis habitual, Rango (mg/d)*	Frecuencia diaria	Comentarios
	Fosinopril	10-40	1	• Existe un riesgo aumentado de hipercalemia, especialmente en pacientes con CKD o en aquellos con suplementos de K⁺ o fármacos ahorradores de K. • Existe un riesgo de insuficiencia renal aguda en pacientes con estenosis severa de la arteria renal bilateral. • No usar si el paciente tiene historia de angioedema con inhibidores de la ECA. • Evitar en embarazo.
	Lisinopril	10-40	1	
	Moexipril	7,5-30	1 o 2	
	Perindopril	4-16	1	
	Quinapril	10-80	1 o 2	
	Ramipril	2,5-10	1 o 2	
	Trandolapril	1-4	1	
ARB	Azilsartán	40-80	1	• No usar en combinación con inhibidores de la ECA
	Candesartán	8-32	1	

Clase	Fármaco	Dosis habitual, Rango (mg/d)*	Frecuencia diaria	Comentarios
	Eprosartán	600-800	1 o 2	o inhibidores directos de renina. • Existe un riesgo aumentado de hipercalemia en CKD o en aquellos con suplementos de K⁺ o fármacos ahorradores de K⁺. • Existe un riesgo de insuficiencia renal aguda en pacientes con estenosis severa de la arteria renal bilateral. • No usar si el paciente tiene una historia de angioedema con ARB. Los pacientes con una historia de angioedema con un Inhibidor de la ECA pueden recibir un
	Irbesartán	150-300	1	
	Losartán	50-100	1 o 2	
	Olmesartán	20-40	1	
	Telmisartán	20-80	1	
	Valsartán	80-320	1	

Clase	Fármaco	Dosis habitual, Rango (mg/d)*	Frecuencia diaria	Comentarios
				ARB comenzando 6 semanas después de que se discontinúa el inhibidor de la ECA. • Evitar en embarazo.
CCB- dihidropiridinas	Amlodipina	2,5-10	1	• Evitar el uso en pacientes con HFrEF; se puede usar amlodipina o felodipina si se requiere • Se asocian con edema en pies relacionado con la dosis, que es más común en mujeres que en hombres.
	Felodipina	5-10	1	
	Isradipina	5-10	2	
	Nicardipina SR	5-20	1	
	Nifedipina LA	60-120	1	
	Nisoldipina	30-90	1	
CCB- No dihidropiridinas	Diltiazem SR	180-360	2	• Evitar el uso rutinario con bloqueantes beta debido al riesgo aumentado de bradicardia y bloqueo cardiaco. • No usar en pacientes con HFrEF.
	Diltiazem ER	120-480	1	
	Verapamil IR	40-80	3	
	Verapamil SR	120-480	1 o 2	
	Inicio retrasado Verapamil-ER	100-480	1 (al atardecer)	

Clase	Fármaco	Dosis habitual, Rango (mg/d)*	Frecuencia diaria	Comentarios
	(diferentes formas)			Existen interacciones farmacológicas con diltiazem y verapamil (sustrato principal de CYP3A4 e inhibidor moderado).
Agentes secundarios				
Diuréticos de asa	Bumetanide	0,5-4	2	Existen diuréticos preferidos en pacientes con HF con síntomas. Son preferidos respecto a las tiazidas en pacientes con CKD moderada a severa (por ejemplo, GFR <30 mL/min).
	Furosemide	20-80	2	
	Torsemide	5-10	1	
Diuréticos ahorradores de potasio	Amiloride	5-10	1 o 2	- Estos son agentes de monoterapia y agentes antihipertensivos mínimamente eficaces. - En pacientes con
	Triamtereno	50-100	1 o 2	

Clase	Fármaco	Dosis habitual, Rango (mg/d)*	Frecuencia diaria	Comentarios
				hipocalemia con monoterapia con tiazida se puede considerar la terapia combinada de diuréticos ahorradores de potasio con una tiazida. • Evitar en pacientes con CKD significativa (por ejemplo GFR <45 mL/min).
Diuréticos-antagonistas de la aldosterona	Eplerenona	50-100	12	• Estos son agentes preferidos en aldosteronismo primario e hipertensión resistente. • Espironolactona se asocia con mayor riesgo de ginecomastia e impotencia en comparación con eplerenona.
	Spironolactona	25-100	1	

Clase	Fármaco	Dosis habitual, Rango (mg/d)*	Frecuencia diaria	Comentarios
				• Esta es una terapia adicional habitual en la hipertensión resistente. • Evitar el uso con suplementos de K⁺, otros diuréticos ahorradores de K⁺, o disfunción renal significativa. • La eplerenona con frecuencia requiere la dosificación dos veces por día para la disminución adecuada de la BP.
Bloqueantes beta-cardioselectivos	Atenolol	25-100	12	• Los bloqueantes beta no se recomiendan como agentes de primera línea a menos que el paciente tenga IHD o HF.
	Betaxolol	5-20	1	
	Bisoprolol	2,5-10	1	
	Metoprolol tartrato	100-400	2	

Clase	Fármaco	Dosis habitual, Rango (mg/d)*	Frecuencia diaria	Comentarios
	Metoprolol succinato	50-200	1	• Estos se prefieren en pacientes con enfermedad broncoespástica de las vías aéreas que requiere un bloqueante beta. • Bisoprolol y metoprolol succinato se prefieren en pacientes con HFrEF. • Evitar la interrupción abrupta.
Bloqueantes beta-cardioselectivos y vasodilatadores	Nebivolol	5-40	1	• El nebivolol induce vasodilatación inducida por óxido nítrico. • Evitar la interrupción abrupta.
Bloqueantes beta-no cardioselectivos	Nadolol	40-120	1	• Evitar en pacientes con enfermedad reactiva de las vías aéreas. • Evitar la interrupción abrupta.
	Propranolol IR	160-480	2	
	Propranolol LA	80-320	1	

Clase	Fármaco	Dosis habitual, Rango (mg/d)*	Frecuencia diaria	Comentarios
Bloqueantes beta-actividad simpatomimética intrínseca	Acebutolol	200-800	2	• En general evitar, especialmente en pacientes con IHD o HF. • Evitar la interrupción abrupta.
	Carteolol	2,5-10	1	
	Penbutolol	10-40	1	
	Pindolol	10-60	2	
Bloqueantes beta-combinado para receptores alfa y beta	Carvedilol	12,5-50	2	• En pacientes con HFrEF se prefiere carvedilol. • Evitar la interrupción abrupta.
	Carvedilol fosfato	20-80	1	
	Labetalol	200-800	2	
Inhibidor directo de renina	Aliskiren	150-300	1	• No usar en combinación con inhibidores de la ECA o ARB. • Aliskiren es la acción muy prolongada. • Existe un riesgo aumentado de hipercalemia en CKD o en aquellos con suplementos de K⁺ o fármacos ahorradores de

Clase	Fármaco	Dosis habitual, Rango (mg/d)*	Frecuencia diaria	Comentarios
				K⁺. • Aliskiren puede producir insuficiencia renal aguda en pacientes con estenosis severa de la arteria renal bilateral. • Evitar en embarazo.
Bloqueantes alfa 1	Doxazosin	1-8	1	• Estos están asociados con hipotensión ortostática, especialmente en adultos mayores. • Pueden ser considerados como agentes de segunda línea en pacientes con BPH concomitante.
	Prazosin	2-20	2 o 3	
	Terazosin	1-20	1 o 2	
Agonistas alfa ₁ centrales y otros fármacos de acción	Clonidina oral	0,1-0,8	2	• Estos se reservan en general como última línea debido a sus efectos adversos significativos en
	Parche de clonidina	0,1-0,3	1 por semana	
	Metildopa	250-1000	2	

Clase	Fármaco	Dosis habitual, Rango (mg/d)*	Frecuencia diaria	Comentarios
central	Guanfacina	0,5-2	1	el SNC, especialmente en adultos mayores. • Evitar la interrupción abrupta de clonidina, que puede inducir crisis hipertensiva; la clonidina se debe minimizar para evitar el rebote de hipertensión.
Vasodilatadores directos	Hidralazina	250-200	2 o 3	• Estos están asociados a la retención de sodio y agua y taquicardia refleja; usar con un diurético y beta bloqueante. • La hidralazina se asocia con el síndrome similar a lupus inducido por fármacos a dosis más altas. • El minoxidil se asocia con hirsutismo y requiere un
	Minoxidil	5-100	1-3	

Clase	Fármaco	Dosis habitual, Rango (mg/d)*	Frecuencia diaria	Comentarios
				diurético de asa. El minoxidil puede inducir efusión pericárdica.

*Las dosificaciones pueden variar de aquellas listadas en las etiquetas aprobadas por la FDA (disponible en <https://dailymed.nlm.nih.gov/dailymed/>).

ECA indica enzima convertidora de angiotensina; ARB, bloqueante del receptor de angiotensina; BP, presión sanguínea; BPH, hiperplasia prostática benigna; CCB, bloqueante del canal de calcio; CKD, enfermedad renal crónica; SNC, sistema nervioso central; CVD, enfermedad cardiovascular; ER, liberación prolongada; GFR, tasa de filtración glomerular; HF, insuficiencia cardíaca; HFrEF, insuficiencia cardíaca con fracción de eyección reducida; IHD, enfermedad cardíaca isquémica; IR, liberación inmediata; LA, de acción prolongada; y SR, liberación sostenida.

De, Chobanian y col. (2003) The JNC 7 Report. *JAMA* 289(19):2560.

II. Administración de un agente de ARNi para usar en los métodos de la invención

La administración de un agente de ARNi a una célula por ejemplo, una célula en un sujeto, tal como un sujeto humano (por ejemplo, un sujeto que lo requiere, tal como un sujeto que tiene un trastorno asociado con AGT, por ejemplo, hipertensión), para usar en los métodos de la invención, se puede lograr de varias maneras diferentes. Por ejemplo, la administración se puede realizar poniendo en contacto una célula con un ARNi de la invención *in vitro* o *in vivo*. La administración *in vivo* se puede realizar de manera directa por administración de una composición que comprende un ARNi, por ejemplo, un ARNh_d, a un sujeto. Como alternativa, la administración *in vivo* se puede realizar de manera indirecta por administración de uno o más vectores que codifican y dirigen la expresión del ARNi. Estas alternativas se describen con mayor detalle más adelante.

En general, cualquier método para administrar una molécula de ácido nucleico (*in vitro* o *in vivo*) se puede adaptar para usar con un ARNi de la invención (véase por ejemplo, Akhtar S. and Julian RL. (1992) *Trends Cell. Biol.* 2(5):139-144 y WO94/02595, que se incorporan a la presente en su totalidad a modo de referencia). Para la administración *in vivo*, los factores a considerar con el objetivo de administrar una molécula de ARNi incluyen, por ejemplo, estabilidad biológica de la molécula administrada, prevención de efectos no específicos, y acumulación de la molécula administrada en el tejido diana. Los efectos no específicos de un ARNi se pueden minimizar por la administración local, por ejemplo, por inyección directa o implante en un tejido o mediante la administración tópica de la preparación. La administración local en un sitio de tratamiento maximiza la concentración local del agente, limita la exposición del agente a tejidos sistémicos que de otra manera podrían resultar dañados por el

agente o que pueden degradar el agente, y permite una dosis total menor de la molécula de ARNi a administrar. Varios estudios han mostrado un silenciamiento exitoso de los productos génicos cuando se administra un ARNi de manera local. Por ejemplo, la administración intraocular de un ARNhd dirigido contra el VEGF por inyección intravítrea en monos cinomolgos (Tolentino, MJ., y col (2004) *Retina* 24:132-138) e inyecciones subretina en ratones (Reich, SJ., y col (2003) *Mol. Vis.* 9:210-216) mostraron que previenen la neovascularización en un modelo experimental de degeneración macular relacionada con la edad. Además, la inyección intratumoral directa de un ARNhd en ratones reduce el volumen del tumor (Pille, J., y col (2005) *Mol. Ther.* 11:267-274) y puede prolongar la supervivencia de los ratones que portan el tumor (Kim, WJ., y col (2006) *Mol. Ther.* 14:343-350; Li, S., y col (2007) *Mol. Ther.* 15:515-523). La interferencia con ARN también ha mostrado éxito con la administración local al SNC mediante inyección directa (Dorn, G., y col. (2004) *Nucleic Acids* 32:e49; Tan, PH., y col (2005) *Gene Ther.* 12:59-66; Makimura, H., y col (2002) *BMC Neurosci.* 3:18; Shishkina, GT., y col (2004) *Neuroscience* 129:521-528; Thakker, ER., y col (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101:17270-17275; Akaneya, Y., y col (2005) *J. Neurophysiol.* 93:594-602) y a los pulmones mediante administración intranasal (Howard, KA., y col (2006) *Mol. Ther.* 14:476-484; Zhang, X., y col (2004) *J. Biol. Chem.* 279:10677-10684; Bitko, V., y col (2005) *Nat. Med.* 11:50-55). Para la administración de un ARNi de manera sistémica para el tratamiento de una enfermedad, el ARN puede ser modificado o como alternativa administrado usando un sistema de administración de fármacos; ambos métodos actúan previniendo la degradación rápida del ARNhd por endo y exonucleasas *in vivo*. La

modificación del ARN o el vehículo farmacéutico también puede permitir el direccionamiento de la composición de ARNi al tejido diana y evitar los efectos fuera de diana no deseables. Las moléculas de ARNi se pueden modificar mediante conjugación química a grupos lipofílicos tales como colesterol para aumentar la incorporación celular y prevenir la degradación. Por ejemplo, se inyectó de manera sistémica un ARNi dirigido contra ApoB conjugado a una unidad lipofílica de colesterol en ratones y produjo el silenciamiento del ARNm de ApoB en el hígado y yeyuno (Soutschek, J., y col (2004) *Nature* 432:173-178). Se ha mostrado que la conjugación de un ARNi con un aptámero inhibe el crecimiento tumoral y media la regresión del tumor en un modelo de cáncer de próstata en ratón (McNamara, JO., y col (2006) *Nat. Biotechnol.* 24:1005-1015). En una forma de realización alternativa, se puede administrar el ARNi usando sistemas de administración de fármacos tales como nanopartículas, un dendrímero, un polímero, liposomas, o un sistema de administración catiónico. Los sistemas de administración catiónicos con carga positiva facilitan la unión de una molécula de ARNi (con carga negativa) y también potencial las interacciones en la membrana celular cargada negativamente para permitir la incorporación de un ARNi a la célula. Los lípidos catiónicos, dendrímeros, o polímeros se pueden unir a un ARNi, o inducir la formación de una vesícula o micela (véase por ejemplo, Kim SH., y col (2008) *Journal of Controlled Release* 129(2):107-116) que encierra un ARNi. La formación de vesículas o micelas además previene la degradación del ARNi cuando se administran de manera sistémica. Los métodos para elaborar y administrar complejos catiónicos de ARNi se encuentran dentro de las capacidades de una persona con experiencia en la materia (véase por ejemplo, Sorensen, DR., y col (2003) *J. Mol. Biol*

327:761-766; Verma, UN., y col (2003) *Clin. Cancer Res.* 9:1291-1300; Arnold, AS y col (2007) *J. Hypertens.* 25:197-205, que se incorporan a la presente a modo de referencia en su totalidad). Algunos ejemplos no limitantes de sistemas de administración de fármacos útiles para la administración sistémica de los ARNi incluyen DOTAP (Sorensen, DR., y col (2003), precedentemente; Verma, UN., y col (2003), precedentemente), Oligofectamina, "partículas sólidas de ácidos nucleicos lipídicos" (Zimmermann, TS., y col (2006) *Nature* 441:111-114), cardiolipina (Chien, PY., y col (2005) *Cancer Gene Ther.* 12:321-328; Pal, A., y col (2005) *Int J. Oncol.* 26:1087-1091), polietilenoimina (Bonnet ME., y col (2008) *Pharm. Res.* Aug 16 Epub ahead of print; 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 col (2007) *Biochem. Soc. Trans.* 35:61-67; Yoo, H., y col (1999) *Pharm. Res.* 16:1799-1804). En algunas formas de realización, un ARNi forma un complejo con ciclodextrina para la administración sistémica. Los métodos para la administración y composiciones farmacéuticas de los ARNi y ciclodextrinas se pueden encontrar en la Patente de los EE.UU. No. 7.427.605, que se incorpora a la presente a modo de referencia en su totalidad.

A. ARNi codificados por vectores para usar en los métodos de la invención

Los ARNi dirigidos contra el gen de AGT se pueden expresar a partir de unidades de transcripción insertadas en vectores de ADN o ARN (véase, por ejemplo, Couture, A, y col., *TIG.* (1996), 12:5-10; Skillern, A., y col., 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 (en el orden de horas a semanas) o sostenida (semanas a meses o más), dependiendo de la construcción específica usada y el tejido diana o tipo de célula. Estos transgenes se pueden introducir como una construcción lineal, un plásmido circular, o un vector viral, que puede ser un vector integrativo o no integrativo. El transgén también puede ser construido de manera que permita ser heredado como un plásmido extracromosómico (Gassmann, y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1995) 92:1292).

La hebra individual o las hebras de un ARNi se pueden transcribir a partir de un promotor en un vector de expresión. Cuando se van a expresar dos hebras separadas para generar, por ejemplo, un ARNhd, se pueden cointroducir vectores de expresión separados (por ejemplo, por transfección o infección) en una célula diana. Como alternativa cada hebra individual de un ARNhd puede ser transcripta por promotores localizados ambos en el mismo plásmido de expresión. En una forma de realización, se expresa un ARNhd como polinucleótidos repetidos invertidos unidos por una secuencia polinucleotídica conectora de manera que el ARNhd tenga una estructura de tallo y bucle.

Los vectores de expresión de ARNi en general son plásmidos de ADN o vectores virales. Los vectores de expresión compatibles con células eucarióticas, preferiblemente aquellas compatibles con células de vertebrados, se pueden usar para producir construcciones recombinantes para la expresión de un ARNi como se describe en la presente. Los vectores de expresión de células eucarióticas son bien conocidos en la materia y se encuentran disponibles de varias fuentes comerciales. Típicamente, dichos vectores se proveen conteniendo sitios de restricción convenientes para la inserción del

segmento de ácido nucleico deseado. La administración de vectores de expresión de ARNi puede ser sistémica, tal como por administración intravenosa o intramuscular, por administración a células diana extraídas del paciente seguido por la reintroducción en el paciente, o por cualquier otro medio que permita la introducción en una célula diana deseada.

Los plásmidos de expresión de ARNi se pueden transfectar en células diana como un complejo con vehículos lipídicos catiónicos (por ejemplo, Oligofectamina) o vehículos basados en lípidos no catiónicos (por ejemplo, Transit-TKO™). En la invención también se contemplan transfecciones lipídicas múltiples para silenciamientos mediados por ARNi dirigidos contra diferentes regiones de un ARN durante un periodo de una semana o más. La introducción exitosa de vectores en células huéspedes se puede monitorear utilizando diferentes métodos conocidos. Por ejemplo, la transfección transitoria puede ser marcada con un reportero, tal como un marcador fluorescente, tal como la Proteína Fluorescente Verde (GFP). La transfección estable de células *ex vivo* se puede asegurar utilizando marcadores que proveen resistencia a la célula transfectada contra factores del entorno específicos (por ejemplo, antibióticos y fármacos), tal como resistencia a higromicina B.

Los sistemas de vectores virales que se pueden utilizar con los métodos y composiciones descritos en la presente incluyen, a título enunciativo no taxativo, (a) vectores de adenovirus; (b) vectores de retrovirus, que incluyen a título enunciativo no taxativo vectores lentivirales, virus de leucemia murina de moloney, *etc.*; (c) vectores de virus adenoasociados; (d) vectores de virus de herpes simple; (e) vectores de SV 40; (f) vectores de poliomavirus; (g) vectores de virus de papiloma; (h) vectores de picornavirus; (i) vectores de virus de la

viruela tal como un orthopox, por ejemplo, vectores de virus vacuna o de viruela de aves, por ejemplo viruela de canario o viruela de gallina; y (j) un adenovirus dependiente de colaborador o *gutless*. Los virus con replicación defectuosa también pueden ser ventajosos. Los diferentes vectores se incorporarán o no al genoma de las células. Las construcciones pueden incluir secuencias virales para la transfección, si se desea. Como alternativa, la construcción se puede incorporar en vectores con capacidad de replicación episómica, por ejemplo vectores de EPV y EBV. Las construcciones para la expresión recombinante de un ARNi en general requerirán elementos reguladores, por ejemplo, promotores, potenciadores, etc., para asegurar la expresión del ARNi en las células diana. Otros aspectos a considerar para los vectores y construcciones se describen con mayor detalle más adelante.

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

La expresión del ARNi se puede regular de manera precisa, por ejemplo, mediante el uso de una secuencia reguladora inducible que es sensible a ciertos reguladores fisiológicos, por ejemplo, niveles de glucosa circulante, o hormonas (Docherty y col., 1994, *FASEB J.* 8:20-24). Dichos sistemas de expresión inducibles, adecuados para el control de la expresión de ARNhd en células o en mamíferos incluyen, por ejemplo, regulación por ecdisona, por estrógenos, progesterona, tetraciclina, inductores químicos de dimerización, e isopropil-beta-D1 -tiogalactopiránosido (IPTG). Una persona con experiencia en

la materia tendrá la capacidad de elegir la secuencia apropiada reguladora/promotora en base al uso pretendido del transgén de ARNi.

Se pueden usar vectores virales que contienen secuencias de ácido nucleico que codifican para un ARNi. Por ejemplo, se puede usar un vector retroviral (véase Miller y col., *Meth. Enzymol.* 217:581-599 (1993)). Estos vectores retrovirales contienen los componentes necesarios para el correcto empaquetamiento del genoma viral e integración en el ADN de la célula huésped. Las secuencias de ácido nucleico que codifican para un ARNi se clonan en uno o más vectores, que facilitan la administración del ácido nucleico en un paciente. Otros detalles respecto a los vectores retrovirales se pueden encontrar, por ejemplo, en Boesen y col., *Biotherapy* 6:291-302 (1994), en donde se describe el uso de un vector retroviral para administrar el gen *mdr1* a células madre hematopoyéticas con el objetivo de hacer más resistentes a las células madre contra la quimioterapia. Otras referencias que ilustran el uso de vectores retrovirales en la terapia génica son: Clowes y col., *J. Clin. Invest.* 93:644-651 (1994); Kiem y col., *Blood* 83:1467-1473 (1994); Salmons and Gunzberg, *Human Gene Therapy* 4:129-141 (1993); y Grossman and Wilson, *Curr. Opin. in Genetics and Devel.* 3:110-114 (1993). Los vectores lentivirales contemplados para usar incluyen, por ejemplo, los vectores basados en VIH descritos en las Patentes de los EE.UU. Nos. 6.143.520; 5.665.557; y 5.981.276, que se incorporan a la presente a modo de referencia.

Los adenovirus también están contemplados para usar en la administración de los ARNi de la invención. Los adenovirus son vehículos especialmente atractivos, por ejemplo, para la administración de genes al epitelio respiratorio. Los adenovirus infectan de manera natural el epitelio

respiratorio en donde provocan una enfermedad leve. Otras dianas de los sistemas de administración basados en adenovirus son el hígado, el sistema nervioso central, las células endoteliales, y músculo. Los adenovirus tienen la ventaja de ser capaces de infectar células que no se encuentran en división. En Kozarsky y Wilson, *Current Opinion in Genetics and Development* 3:499-503 (1993) se presenta una revisión de terapia genética basada en adenovirus. En Bout y col., *Human Gene Therapy* 5:3-10 (1994) se demuestra el uso de vectores de adenovirus para transferir genes al epitelio respiratorio de monos rhesus. Otras instancias del uso de adenovirus en la terapia génica se pueden encontrar en Rosenfeld y col., *Science* 252:431-434 (1991); Rosenfeld y col., *Cell* 68:143-155 (1992); Mastrangeli y col., *J. Clin. Invest.* 91:225-234 (1993); Publicación PCT WO94/12649; y Wang, y col., *Gene Therapy* 2:775-783 (1995). En Xia H y col. (2002), *Nat. Biotech.* 20: 1006-1010 se describe un vector AV adecuado para expresar un ARNi descrito en la invención, un método para construir el vector AV recombinante, y un método para administrar el vector en células diana.

Los vectores de virus adenoasociados (AAV) se pueden usar para administrar un ARNi de la invención (Walsh y col., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 204:289-300 (1993); Patente de los EE.UU. No. 5.436.146). En una forma de realización, el ARNi se puede expresar como dos moléculas de ARN de hebra simple separadas complementarias a partir de un vector de AAV recombinante que tiene, por ejemplo, los promotores de ARN U6 o H1, o el promotor de citomegalovirus (CMV). Los vectores de AAV adecuados para expresar el ARNhd descrito en la invención, métodos para construir el vector de AV recombinante, y los métodos para administrar los vectores en células diana se

describen en Samulski R y col. (1987), *J. Virol.* 61: 3096-3101; Fisher K J y col. (1996), *J. Virol.* 70: 520-532; Samulski R y col. (1989), *J. Virol.* 63: 3822-3826; Patente de los EE.UU. No. 5.252.479; Patente de los EE.UU. No. 5.139.941; Solicitud de Patente Internacional No. WO 94/13788; y Solicitud de Patente Internacional No. WO 93/24641, cuyos contenidos se incorporan en su totalidad a la presente a modo de referencia.

Otro vector viral adecuado para la administración de un ARNi de la invención es un virus de viruela tal como el virus vacuna, por ejemplo un vacuna atenuado tal como el Virus Ankara modificado (MVA) o NYVAC, uno de viruela de ave tal como viruela de gallina o viruela de canario.

El tropismo de los vectores virales se puede modificar mediante seudotipificación de los vectores con proteínas de la envoltura u otros antígenos de superficie de otros virus, o mediante la sustitución de diferentes proteínas de la cápside viral, según sea apropiado. Por ejemplo, los vectores lentivirales se pueden seudotipificar con proteínas de superficie de virus de estomatitis vesicular (VSV), rabia, Ébola, Mokola, y similares. Se puede hacer que los vectores de AAV estén dirigidos a diferentes células mediante modificación de los vectores para que expresen diferentes serotipos de proteínas de la cápside; véase, por ejemplo, Rabinowitz J E y col. (2002), *J Virol* 76:791-801, cuya divulgación se incorpora a la presente a modo de referencia.

La preparación farmacéutica de un vector puede incluir el vector en un diluyente aceptable, o puede incluir una matriz de liberación lenta en la cual se embebe el vehículo de administración del gen. Como alternativa, cuando el vector de administración del gen se puede producir de manera intacta a partir

de células recombinantes, por ejemplo, vectores retrovirales, la preparación farmacéutica puede incluir una o más células que producen el sistema de administración de genes.

III. Agentes de ARNi de hebra doble para usar en los métodos de la invención

Los agentes de ARNi de hebra doble para usar en los métodos de la invención incluyen una hebra antisentido que tiene una región de complementariedad 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 al menos 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 de la Solicitud PCT No. PCT/US2019/032150 con el ARNi 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 de la Solicitud PCT No. PCT/US2019/032150.

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 complementariedad 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 una 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. En ciertas formas de realización, la región dúplex tiene entre 19 y 21 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.

Las sobreextensiones pueden ser el resultado de que una hebra sea más larga que la otra, o el resultado de que dos hebras de la misma longitud estén escalonadas. La sobreextensión puede formar una no coincidencia con el ARNm diana o puede ser complementaria con las secuencias del gen contra las que está dirigido o puede ser otra secuencia. La primera y la segunda de las hebras también pueden estar unidas, por ejemplo, mediante bases adicionales para formar una horquilla, o mediante otros conectores que no son bases.

En una forma de realización, los nucleótidos en la región de sobreextensión del agente de ARNi pueden ser cada uno de manera independiente un nucleótido modificado o sin modificar que incluye, a título enunciativo no taxativo una modificación 2'-azúcar, 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 cualquier extremo en cualquier hebra. La sobreextensión puede formar una no coincidencia con el ARNm diana o puede ser complementaria con las secuencias del gen contra las que está dirigido o puede ser otra secuencia.

Las sobreextensiones en 5' o 3' en la hebra sentido, hebra antisentido o ambas hebras del agente de ARNi 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 los mismos o diferentes. En una forma de realización, la sobreextensión está presente en el extremo 3' de la hebra sentido, hebra antisentido, o ambas hebras. En una forma de realización, esta sobreextensión en 3' está presente en la hebra antisentido. En una forma de realización, esta sobreextensión en 3' está presente en la hebra sentido.

El agente de ARNi puede contener solo una sobreextensión individual, que puede fortalecer la actividad de interferencia del ARNi, sin afectar su estabilidad completa. Por ejemplo, la sobreextensión de hebra simple puede estar localizada 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 el extremo 3' de la

hebra sentido) o viceversa. En general, la hebra antisentido del ARNi tiene una sobreextensión de nucleótidos en el extremo 3', y el extremo 5' es romo. Si bien no se desea estar ligado a la teoría, el extremo romo asimétrico en el extremo 5' de la hebra antisentido y la sobreextensión en el extremo 3' de la hebra antisentido favorece la carga de la hebra guía en el proceso de RISC.

En algunas formas de realización, los agentes de ARNi de hebra doble para usar en los métodos de la presente invención no están modificados. En otras formas de realización, los agentes de ARNi de hebra doble para usar en los métodos de la presente invención están modificados, por ejemplo, comprenden modificaciones químicas capaces de inhibir la expresión de un gen diana (es decir, un gen de AGT) *in vivo*, o potenciar la estabilidad u otras características beneficiosas de los agentes. En algunas formas de realización, los agentes de ARNi de hebra doble comprenden una modificación de nucleótido térmicamente desestabilizable.

Como se describe con mayor detalle más adelante, en ciertos aspectos 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 de la invención están modificados. Los ARNi de la invención en los cuales "sustancialmente todos los nucleótidos están modificados" están muy pero no completamente modificados y pueden incluir no más de 5, 4, 3, 2, o 1 nucleótidos sin modificar.

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 ARNip 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.

IV. ARNi modificados de la invención

En ciertas 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 ciertas 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, por ejemplo sales de sodio, 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 CH₂.

Las Patentes de los EE.UU. representativas que poseen contenidos acerca de la preparación de los 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 --CH₂--NH--CH₂--, --CH₂--N(CH₃)--O--CH₂-- [conocido como esqueleto de metileno (metilimino) o MMI], --CH₂--O--N(CH₃)--CH₂--, --CH₂--N(CH₃)--N(CH₃)--CH₂-- y --N(CH₃)--CH₂--CH₂--[en donde el esqueleto de fosfodiéster nativo está representado como --O--P--O--CH₂--] 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 C₁ a C₁₀ alquilo o C₂ a C₁₀ alquenilo y alquinilo sustituidos o no sustituidos. Los ejemplos de modificaciones adecuadas incluyen a O[(CH₂)_nO]_mCH₃, O(CH₂)_nOCH₃, O(CH₂)_nNH₂, O(CH₂)_nCH₃, O(CH₂)_nONH₂, y O(CH₂)_nON[(CH₂)_nCH₃]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': C₁ a C₁₀ alquilo inferior, alquilo inferior sustituido, alcarilo, aralquilo,

O-alcarilo o O-aralquilo, SH, SCH₃, OCN, Cl, Br, CN, CF₃, OCF₃, SOCH₃, SO₂CH₃, ONO₂, NO₂, N₃, NH₂, 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--CH₂CH₂OCH₃, 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(CH₂)₂ON(CH₃)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--CH₂--O--CH₂--N(CH₂)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'-OCH₃), 2'-aminopropoxilo (2'-OCH₂CH₂CH₂NH₂) 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.

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-sustituídas, 6-azapirimidinas y purinas N-2, N-6 y O-6 sustituídas, 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

ARNip incrementa la estabilidad del ARNip 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).

Las Patentes de los EE.UU. representativas que divulgan la preparación de nucleótidos de ácidos nucleicos bloqueados incluyen, a título enunciativo no taxativo, las siguientes: Patentes de los EE.UU. Nos. 6.268.490; 6.670.461; 6.794.499; 6.998.484; 7.053.207; 7.084.125; y 7.399.845, en donde el contenido de cada una se incorpora a la presente a modo de referencia.

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 ciertas 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'-CH₂-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 ARNip incrementa la estabilidad de los ARNip

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 ciertas 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'-(CH₂)—O-2' (LNA); 4'-(CH₂)—S-2'; 4'-(CH₂)₂—O-2' (ENA); 4'-CH(CH₃)—O-2' (también llamado “etilo constreñido” o “cEt”) y 4'-CH(CH₂OCH₃)—O-2' (y análogos del mismo; véase, por ejemplo, la Patente de los EE.UU. No. 7.399.845); 4'-C(CH₃)(CH₃)—O-2' (y análogos del mismo; véase por ejemplo, la Patente de los EE.UU. No. 8.278.283); 4'-CH₂—N(OCH₃)-2' (y análogos del mismo; véase por ejemplo, la Patente de los EE.UU. No. 8.278.425); 4'-CH₂—O—N(CH₃)-2' (véase, por ejemplo, la Publicación de Patente de los EE.UU. No. 2004/0171570); 4'-CH₂—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'-CH₂—C(H)(CH₃)-2' (véase, por ejemplo, Chattopadhyaya y col., *J. Org. Chem.*, 2009, 74, 118-134); y 4'-CH₂—C(=CH₂)-2' (y análogos del mismo; véase, por ejemplo, la Patente de los EE.UU. No. 8.278.426).

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(CH₃)-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.

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 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'-O-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 ARNi_{hd}, 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 ARNi_{hd}

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 ARNi_{hd} 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 ARNi_{hd}, se observó actividad de silenciamiento del gen del agente de ARNi_{hd}.

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 (“ARN_{hd}”), también denominado en la presente como “agente de ARNi_{hd}.” La región dúplex de un agente de ARNi_{hd} 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 ciertas 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 ciertas 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 ciertas 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'-azúcar, 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 ciertas 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 ciertas 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 ciertas 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 ciertas 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 GalNAc₃).

En ciertas 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 complementariedad, 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 ciertas 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 ARNip 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 ciertas 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 ciertas 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 ARNi_{hd} 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 ARNi_{hd} desde el extremo 5'.

La hebra sentido del agente de ARNi_{hd} 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 ARNi_{hd} 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 adyacentes entre sí entonces la química de los motivos son diferentes entre sí, y cuando los motivos están separados por uno o más nucleótidos 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 ciertas 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 alternantes de una hebra. El nucleótido alternante 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 ARNhd 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 internucleotídica 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 ciertas 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 ciertas 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 ciertas formas de realización, la secuencia de la hebra sentido puede estar representada por la fórmula (I):

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

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 N_b e Y no tienen la misma modificación; y

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

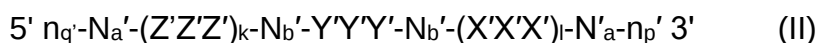
Cada uno de X, Y y Z pueden ser iguales o diferentes entre sí.

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



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):



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.

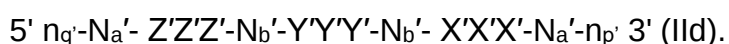
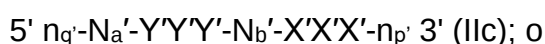
En algunas formas de realización, el N_a' o N_b' comprende modificaciones de patrón alternante.

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

En ciertas 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:



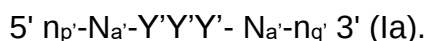
Cuando la hebra antisentido está representada por la fórmula (IIb), Nb' representa una secuencia de oligonucleótidos que comprende entre 0 y 10, entre 0 y 7, entre 0 y 10, entre 0 y 7, entre 0 y 5, entre 0 y 4, entre 0 y 2, o 0 nucleótidos modificados. Cada Na' representa independientemente una secuencia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



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

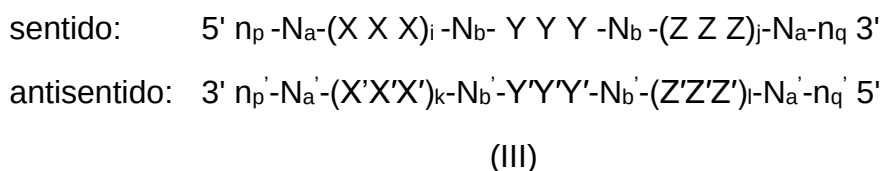
particular, puede representar una modificación 2'-O-metilo o una modificación 2'-flúor.

En algunas formas de realización, la hebra sentido del agente de ARNi_{hd} 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):



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

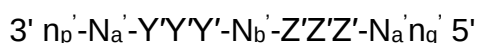
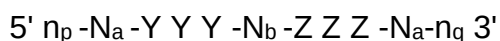
XXX, YYY, ZZZ, X'X'X', Y'Y'Y', y Z'Z'Z' representan cada uno independientemente un motivo de tres modificaciones idénticas en tres nucleótidos consecutivos.

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.

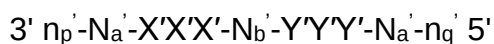
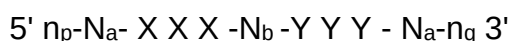
Los ejemplos de combinaciones de la hebra sentido y hebra antisentido que forman un ARNi dúplex incluyen las fórmulas a continuación:



(IIIa)



(IIIb)



(IIIc)



(IIId)

Cuando el agente de ARNi_{hd} 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 ARNi_{hd} 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 ARNi_{hd} 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 ARNi_{hd} 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 ARNi_{hd} 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 ARNi_{hd} 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 ciertas 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 ciertas 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 ciertas 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 ARNi 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

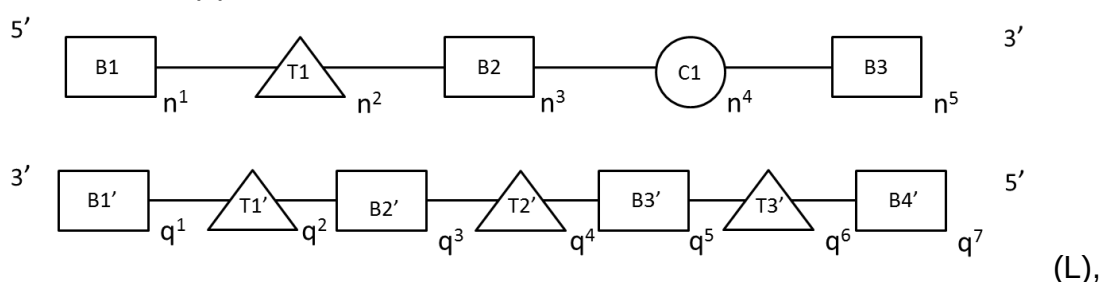
ejemplo anillos fusionados. El vehículo cíclico puede ser un sistema de anillo completamente saturado, o puede contener uno o más enlaces dobles.

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.

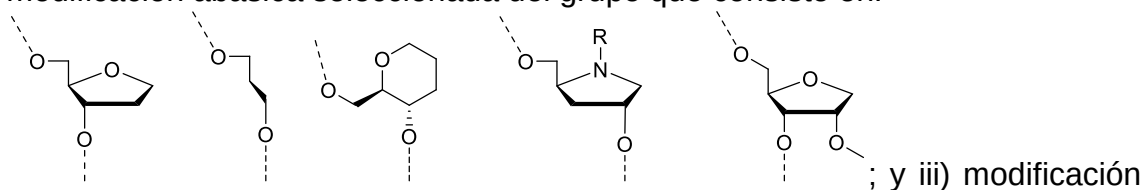
En otra forma de realización de la invención, un agente de ARNi comprende una hebra sentido y una hebra antisentido, en donde cada hebra tiene entre 14 y 40 nucleótidos. El agente de ARNi puede estar representado por la fórmula (L):



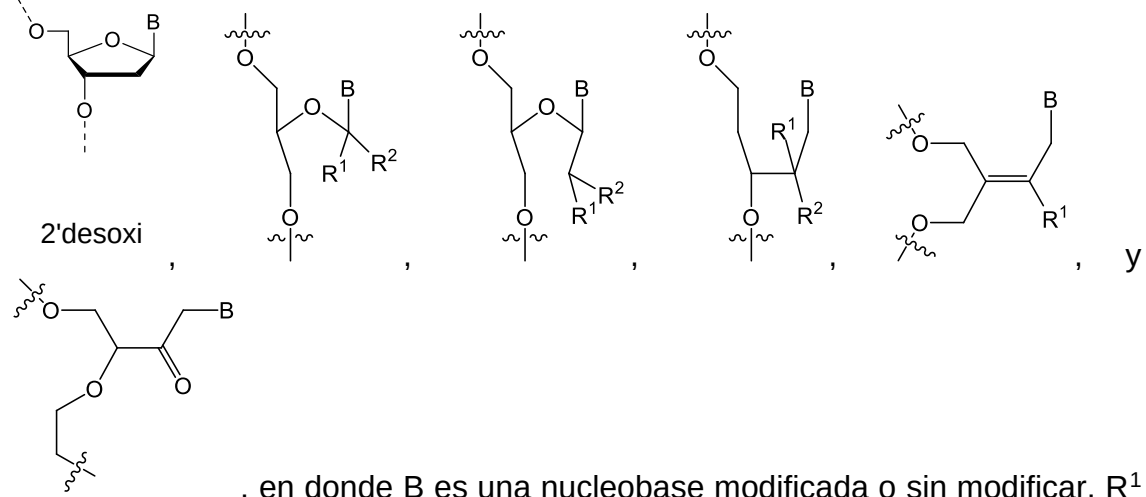
En la fórmula (L), B1, B2, B3, B1', B2', B3', y B4' son cada uno independientemente un nucleótido que contiene una modificación seleccionada del grupo que consiste en 2'-O-alquilo, alcoxilo con sustitución 2', alquilo con sustitución 2', 2'-halo, ENA, y BNA/LNA. En una forma de realización, B1, B2, B3,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

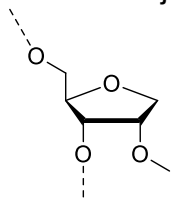
encuentra en la posición 15 desde el extremo 5' de la hebra sentido. El nucleótido C1 porta la modificación de desestabilización térmica que puede incluir una modificación abásica; no coincidencia con el nucleótido opuesto en el dúplex; y modificación de azúcar tal como una modificación 2'-desoxi o nucleótido 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:



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, q¹ es 9, T1' es 2'-F, q² es 1, B2' es 2'-OMe o 2'-F, q³ es 4, q⁴ es 0, B3' es 2'-OMe o 2'-F, q⁵ es 7, T3' es 2'-F, q⁶ es 1, B4' es 2'-OMe, y q⁷ es 1.

En una forma de realización, B1 es 2'-OMe o 2'-F, n¹ es 8, T1 es 2'F, n² es 3, B2 es 2'-OMe, n³ es 7, n⁴ es 0, B3 es 2'-OMe, n⁵ es 3, B1' es 2'-OMe o 2'-F, q¹ es 9, T1' es 2'-F, q² es 1, B2' es 2'-OMe o 2'-F, q³ es 4, q⁴ es 0, B3' es 2'-OMe o 2'-F, q⁵ es 7, T3' es 2'-F, q⁶ es 1, B4' es 2'-OMe, y q⁷ 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').

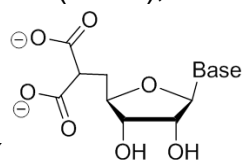
En una forma de realización, B1 es 2'-OMe o 2'-F, n¹ es 8, T1 es 2'F, n² es 3, B2 es 2'-OMe, n³ es 7, n⁴ es 0, B3 es 2'OMe, n⁵ es 3, B1' es 2'-OMe o 2'-F, q¹ es 9, T1' es 2'-F, q² es 1, B2' es 2'-OMe o 2'-F, q³ es 4, T2' es 2'-F, q⁴ es 2, B3' es 2'-OMe o 2'-F, q⁵ es 5, T3' es 2'-F, q⁶ es 1, B4' es 2'-F, y q⁷ es 1.

En una forma de realización, B1 es 2'-OMe o 2'-F, n¹ es 8, T1 es 2'F, n² es 3, B2 es 2'-OMe, n³ es 7, n⁴ es 0, B3 es 2'-OMe, n⁵ es 3, B1' es 2'-OMe o 2'-F, q¹ es 9, T1' es 2'-F, q² es 1, B2' es 2'-OMe o 2'-F, q³ es 4, T2' es 2'-F, q⁴ es 2, B3' es 2'-OMe o 2'-F, q⁵ es 5, T3' es 2'-F, q⁶ es 1, B4' es 2'-F, y q⁷ 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).

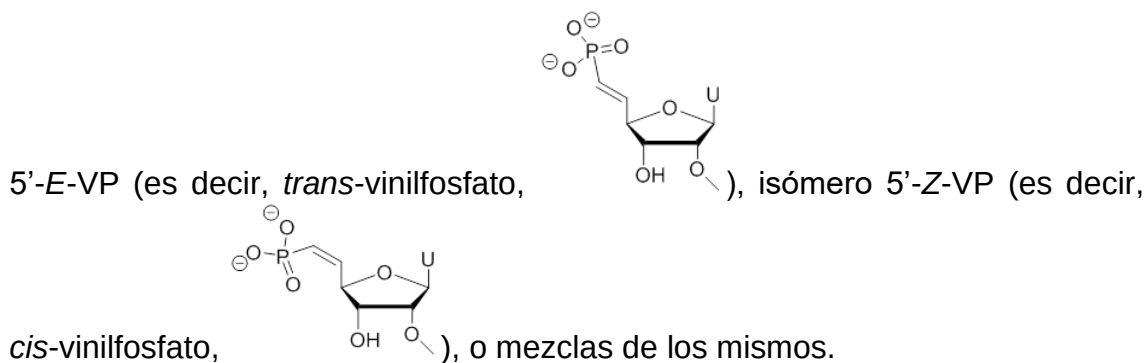
En una forma de realización, B1 es 2'-OMe o 2'-F, n^1 es 8, T1 es 2'-F, n^2 es 3, B2 es 2'-OMe, n^3 es 7, n^4 es 0, B3 es 2'-OMe, n^5 es 3, B1' es 2'-OMe o 2'-F, q^1 es 9, T1' es 2'-F, q^2 es 1, B2' es 2'-OMe o 2'-F, q^3 es 4, q^4 es 0, B3' es 2'-OMe o 2'-F, q^5 es 7, T3' es 2'-F, q^6 es 1, B4' es 2'-F, 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'-PS₂), 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



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'-PS₂. En una forma de realización, el agente de ARNi comprende un 5'-PS₂ en la hebra antisentido.

En una forma de realización, el agente de ARNi comprende un 5'-PS₂.
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, B1 es 2'-OMe o 2'-F, n¹ es 8, T1 es 2'F, n² es 3, B2 es 2'-OMe, n³ es 7, n⁴ es 0, B3 es 2'OMe, n⁵ es 3, B1' es 2'-OMe o 2'-F, q¹ es 9, T1' es 2'-F, q² es 1, B2' es 2'-OMe o 2'-F, q³ es 4, T2' es 2'-F, q⁴ es 2, B3' es 2'-OMe o 2'-F, q⁵ es 5, T3' es 2'-F, q⁶ es 1, B4' es 2'-OMe, y q⁷ es 1. El agente de ARNi también comprende un 5'-PS.

En una forma de realización, B1 es 2'-OMe o 2'-F, n¹ es 8, T1 es 2'F, n² es 3, B2 es 2'-OMe, n³ es 7, n⁴ es 0, B3 es 2'OMe, n⁵ es 3, B1' es 2'-OMe o 2'-F, q¹ es 9, T1' es 2'-F, q² es 1, B2' es 2'-OMe o 2'-F, q³ es 4, T2' es 2'-F, q⁴ es 2, B3' es 2'-OMe o 2'-F, q⁵ es 5, T3' es 2'-F, q⁶ es 1, B4' es 2'-OMe, y q⁷ es 1. El agente de ARNi también comprende un 5'-P.

En una forma de realización, B1 es 2'-OMe o 2'-F, n¹ es 8, T1 es 2'F, n² es 3, B2 es 2'-OMe, n³ es 7, n⁴ es 0, B3 es 2'OMe, n⁵ es 3, B1' es 2'-OMe o 2'-F, q¹ es 9, T1' es 2'-F, q² es 1, B2' es 2'-OMe o 2'-F, q³ es 4, T2' es 2'-F, q⁴ es 2, B3' es 2'-OMe o 2'-F, q⁵ es 5, T3' es 2'-F, q⁶ es 1, B4' es 2'-OMe, y q⁷ 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, n¹ es 8, T1 es 2'F, n² es 3, B2 es 2'-OMe, n³ es 7, n⁴ es 0, B3 es 2'OMe, n⁵ es 3, B1' es 2'-OMe o 2'-F, q¹ es 9, T1' es 2'-F, q² es 1, B2' es 2'-OMe o 2'-F, q³ es 4, T2' es 2'-F, q⁴ es 2, B3' es 2'-OMe o 2'-F, q⁵ es 5, T3' es 2'-F, q⁶ es 1, B4' es 2'-OMe, y q⁷ es 1. El agente de ARNi también comprende un 5'-PS₂.

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'-PS₂.

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 ARNh_d 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'-PS₂.

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'-PS₂.

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, q¹ es 9, T1' es 2'-F, q² es 1, B2' es 2'-OMe o 2'-F, q³ es 4, q⁴ es 0, B3' es 2'-OMe o 2'-F, q⁵ es 7, T3' es 2'-F, q⁶ es 1, B4' es 2'-OMe, y q⁷ 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, n¹ es 8, T1 es 2'F, n² es 3, B2 es 2'-OMe, n³ es 7, n⁴ es 0, B3 es 2'OMe, n⁵ es 3, B1' es 2'-OMe o 2'-F, q¹ es 9, T1' es 2'-F, q² es 1, B2' es 2'-OMe o 2'-F, q³ es 4, T2' es 2'-F, q⁴ es 2, B3' es 2'-OMe o 2'-F, q⁵ es 5, T3' es 2'-F, q⁶ es 1, B4' es 2'-F, y q⁷ es 1. El agente de ARNi también comprende un 5'- P.

En una forma de realización, B1 es 2'-OMe o 2'-F, n¹ es 8, T1 es 2'F, n² es 3, B2 es 2'-OMe, n³ es 7, n⁴ es 0, B3 es 2'OMe, n⁵ es 3, B1' es 2'-OMe o 2'-F, q¹ es 9, T1' es 2'-F, q² es 1, B2' es 2'-OMe o 2'-F, q³ es 4, T2' es 2'-F, q⁴ es 2, B3' es 2'-OMe o 2'-F, q⁵ es 5, T3' es 2'-F, q⁶ es 1, B4' es 2'-F, y q⁷ es 1. El agente de ARNi también comprende un 5'-PS.

En una forma de realización, B1 es 2'-OMe o 2'-F, n¹ es 8, T1 es 2'F, n² es 3, B2 es 2'-OMe, n³ es 7, n⁴ es 0, B3 es 2'OMe, n⁵ es 3, B1' es 2'-OMe o 2'-F, q¹ es 9, T1' es 2'-F, q² es 1, B2' es 2'-OMe o 2'-F, q³ es 4, T2' es 2'-F, q⁴ es 2, B3' es 2'-OMe o 2'-F, q⁵ es 5, T3' es 2'-F, q⁶ es 1, B4' es 2'-F, y q⁷ 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 ARNi_{hd} también comprende un 5'-PS₂.

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'-PS₂.

En una forma de realización, B1 es 2'-OMe o 2'-F, n¹ es 8, T1 es 2'F, n² es 3, B2 es 2'-OMe, n³ es 7, n⁴ es 0, B3 es 2'-OMe, n⁵ es 3, B1' es 2'-OMe o 2'-F, q¹ es 9, T1' es 2'-F, q² es 1, B2' es 2'-OMe o 2'-F, q³ es 4, T2' es 2'-F, q⁴ es 2, B3' es 2'-OMe o 2'-F, q⁵ es 5, T3' es 2'-F, q⁶ es 1, B4' es 2'-F, y q⁷ 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, n¹ es 8, T1 es 2'F, n² es 3, B2 es 2'-OMe, n³ es 7, n⁴ es 0, B3 es 2'-OMe, n⁵ es 3, B1' es 2'-OMe o 2'-F, q¹ es 9, T1' es 2'-F, q² es 1, B2' es 2'-OMe o 2'-F, q³ es 4, q⁴ es 0, B3' es 2'-OMe o 2'-F, q⁵ es 7, T3' es 2'-F, q⁶ es 1, B4' es 2'-F, y q⁷ es 1. El agente de ARNi también comprende un 5'-P.

En una forma de realización, B1 es 2'-OMe o 2'-F, n¹ es 8, T1 es 2'F, n² es 3, B2 es 2'-OMe, n³ es 7, n⁴ es 0, B3 es 2'-OMe, n⁵ es 3, B1' es 2'-OMe o 2'-F, q¹ es 9, T1' es 2'-F, q² es 1, B2' es 2'-OMe o 2'-F, q³ es 4, q⁴ es 0, B3' es 2'-OMe o 2'-F, q⁵ es 7, T3' es 2'-F, q⁶ es 1, B4' es 2'-F, y q⁷ es 1. El agente de ARNi también comprende un 5'-PS.

En una forma de realización, B1 es 2'-OMe o 2'-F, n¹ es 8, T1 es 2'F, n² es 3, B2 es 2'-OMe, n³ es 7, n⁴ es 0, B3 es 2'-OMe, n⁵ es 3, B1' es 2'-OMe o 2'-F, q¹ es 9, T1' es 2'-F, q² es 1, B2' es 2'-OMe o 2'-F, q³ es 4, q⁴ es 0, B3' es 2'-

OMe o 2'-F, q⁵ es 7, T3' es 2'-F, q⁶ es 1, B4' es 2'-F, y q⁷ 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, n¹ es 8, T1 es 2'F, n² es 3, B2 es 2'-OMe, n³ es 7, n⁴ es 0, B3 es 2'-OMe, n⁵ es 3, B1' es 2'-OMe o 2'-F, q¹ es 9, T1' es 2'-F, q² es 1, B2' es 2'-OMe o 2'-F, q³ es 4, q⁴ es 0, B3' es 2'-OMe o 2'-F, q⁵ es 7, T3' es 2'-F, q⁶ es 1, B4' es 2'-F, y q⁷ es 1. El agente de ARNi también comprende un 5'-PS₂.

En una forma de realización, B1 es 2'-OMe o 2'-F, n¹ es 8, T1 es 2'F, n² es 3, B2 es 2'-OMe, n³ es 7, n⁴ es 0, B3 es 2'-OMe, n⁵ es 3, B1' es 2'-OMe o 2'-F, q¹ es 9, T1' es 2'-F, q² es 1, B2' es 2'-OMe o 2'-F, q³ es 4, q⁴ es 0, B3' es 2'-OMe o 2'-F, q⁵ es 7, T3' es 2'-F, q⁶ es 1, B4' es 2'-F, y q⁷ 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, n¹ es 8, T1 es 2'F, n² es 3, B2 es 2'-OMe, n³ es 7, n⁴ es 0, B3 es 2'-OMe, n⁵ es 3, B1' es 2'-OMe o 2'-F, q¹ es 9, T1' es 2'-F, q² es 1, B2' es 2'-OMe o 2'-F, q³ es 4, q⁴ es 0, B3' es 2'-OMe o 2'-F, q⁵ es 7, T3' es 2'-F, q⁶ es 1, B4' es 2'-F, y q⁷ 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, n¹ es 8, T1 es 2'F, n² es 3, B2 es 2'-OMe, n³ es 7, n⁴ es 0, B3 es 2'-OMe, n⁵ es 3, B1' es 2'-OMe o 2'-

F, q¹ es 9, T1' es 2'-F, q² es 1, B2' es 2'-OMe o 2'-F, q³ es 4, q⁴ es 0, B3' es 2'-OMe o 2'-F, q⁵ es 7, T3' es 2'-F, q⁶ es 1, B4' es 2'-F, y q⁷ 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, n¹ es 8, T1 es 2'F, n² es 3, B2 es 2'-OMe, n³ es 7, n⁴ es 0, B3 es 2'-OMe, n⁵ es 3, B1' es 2'-OMe o 2'-F, q¹ es 9, T1' es 2'-F, q² es 1, B2' es 2'-OMe o 2'-F, q³ es 4, q⁴ es 0, B3' es 2'-OMe o 2'-F, q⁵ es 7, T3' es 2'-F, q⁶ es 1, B4' es 2'-F, y q⁷ 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, n¹ es 8, T1 es 2'F, n² es 3, B2 es 2'-OMe, n³ es 7, n⁴ es 0, B3 es 2'-OMe, n⁵ es 3, B1' es 2'-OMe o 2'-F, q¹ es 9, T1' es 2'-F, q² es 1, B2' es 2'-OMe o 2'-F, q³ es 4, q⁴ es 0, B3' es 2'-OMe o 2'-F, q⁵ es 7, T3' es 2'-F, q⁶ es 1, B4' es 2'-F, y q⁷ 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'-PS₂.

En una forma de realización, B1 es 2'-OMe o 2'-F, n¹ es 8, T1 es 2'F, n² es 3, B2 es 2'-OMe, n³ es 7, n⁴ es 0, B3 es 2'-OMe, n⁵ es 3, B1' es 2'-OMe o 2'-F, q¹ es 9, T1' es 2'-F, q² es 1, B2' es 2'-OMe o 2'-F, q³ es 4, q⁴ es 0, B3' es 2'-OMe o 2'-F, q⁵ es 7, T3' es 2'-F, q⁶ es 1, B4' es 2'-F, y q⁷ 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, n¹ es 8, T1 es 2'F, n² es 3, B2 es 2'-OMe, n³ es 7, n⁴ es 0, B3 es 2'-OMe, n⁵ es 3, B1' es 2'-OMe o 2'-F, q¹ es 9, T1' es 2'-F, q² es 1, B2' es 2'-OMe o 2'-F, q³ es 4, T2' es 2'-F, q⁴ es 2, B3' es 2'-OMe o 2'-F, q⁵ es 5, T3' es 2'-F, q⁶ es 1, B4' es 2'-OMe, y q⁷ 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'-PS₂ y un ligando de direccionamiento. En una forma de realización, el 5'-PS₂ 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'-PS₂ y un ligando de direccionamiento. En una forma de realización, el 5'-PS₂ 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, n¹ es 8, T1 es 2'F, n² es 3, B2 es 2'-OMe, n³ es 7, n⁴ es 0, B3 es 2'-OMe, n⁵ es 3, B1' es 2'-OMe o 2'-F, q¹ es 9, T1' es 2'-F, q² es 1, B2' es 2'-OMe o 2'-F, q³ es 4, q⁴ es 0, B3' es 2'-OMe o 2'-F, q⁵ es 7, T3' es 2'-F, q⁶ es 1, B4' es 2'-OMe, y q⁷ 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, n¹ es 8, T1 es 2'F, n² es 3, B2 es 2'-OMe, n³ es 7, n⁴ es 0, B3 es 2'-OMe, n⁵ es 3, B1' es 2'-OMe o 2'-F, q¹ es 9, T1' es 2'-F, q² es 1, B2' es 2'-OMe o 2'-F, q³ es 4, T2' es 2'-F, q⁴ es 2, B3' es 2'-OMe o 2'-F, q⁵ es 5, T3' es 2'-F, q⁶ es 1, B4' es 2'-F, y q⁷ 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'-PS₂ y un ligando de direccionamiento. En una forma de realización, el 5'-PS₂ 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'-PS₂ y un ligando de direccionamiento. En una forma de realización, el 5'-PS₂ 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');

(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 desoxinucleótidos (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 ciertas 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.

V. Ligandos

Los agentes de ARNi de hebra doble para usar en los métodos de la invención se pueden conjugar de manera opcional con uno o más ligandos, unidades o conjugados para potenciar la actividad, distribución celular o incorporación celular del ARNi por ejemplo, en una célula. El ligando se puede unir a la hebra sentido, hebra antisentido o a ambas hebras, en el extremo 3', extremo 5' o ambos extremos. Por ejemplo, el ligando se puede conjugar a la hebra sentido. En algunas formas de realización, el ligando se conjuga al extremo 3' de la hebra sentido.

Dichas unidades incluyen a título enunciativo no taxativo unidades lipídicas tales como unidades colesterol (Letsinger y col., *Proc. Natl. Acad. 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-tritiliol (Manoharan y col., *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1992, 660:306-309; Manoharan y col., *Biorg. Med. Chem. Lett.*, 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 una forma de realización, el ligando es un ligando GalNAc. En algunas formas de realización particulares, el ligando es GalNAc3. Los ligandos están acoplados, preferiblemente de manera covalente, directa o indirectamente mediante un anclaje interviniente.

En ciertas 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 celular 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, pseudopéptido-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 direccionamiento, 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 tirotrófina, 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 ciertas 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), hidrocarburos 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 Eu³⁺ 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 lipófilos, 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.

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 ciertas 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 ciertas 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 antenapedia. Si el agente es un péptido, puede ser modificado, incluyendo un peptidomimético, invertómeros, uniones no peptídicas o pseudopeptídicas, 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: 13). Un análogo de RFGF (por ejemplo, secuencia de aminoácidos AALLPVLLAAP (SEQ ID NO: 14) 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: 15) y la proteína antennapedia de *Drosophila* (RQIKIWFQNRRMKWKK (SEQ ID NO: 16) 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).

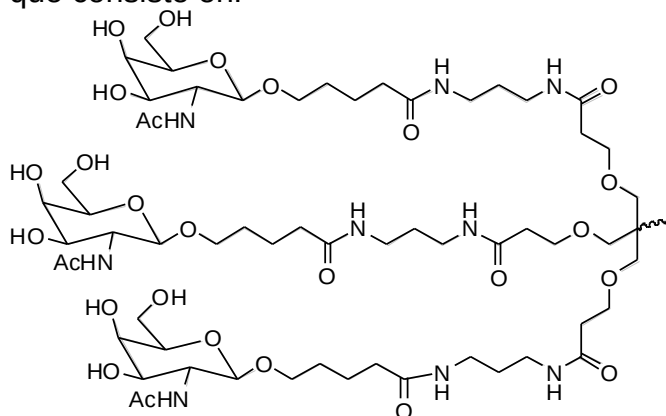
C. Conjugados de hidratos de carbono

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

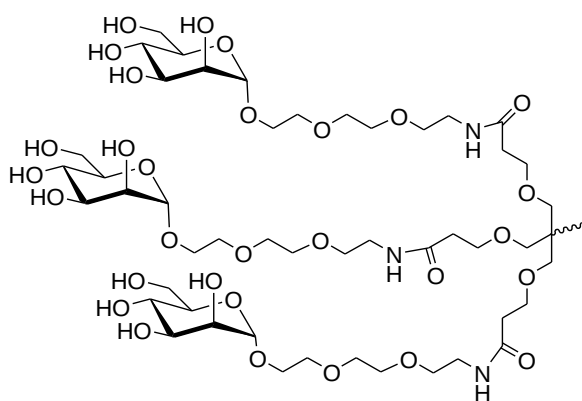
cíclico) con un átomo de oxígeno, nitrógeno o azufre unido al cada átomo de carbono; o un compuesto que tiene como parte del mismo una unidad de hidrato de carbono compuesta por una o más unidades de monosacárido en donde cada una tiene por lo menos seis átomos de carbono (el cual puede ser lineal, ramificado 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 ciertas formas de realización, un conjugado de hidrato de carbono para usar en las composiciones y métodos de la invención es un monosacárido.

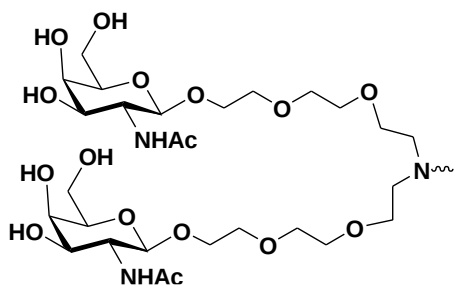
En una forma de realización, un conjugado de hidrato de carbono para usar en las composiciones y métodos de la invención se selecciona del grupo que consiste en:



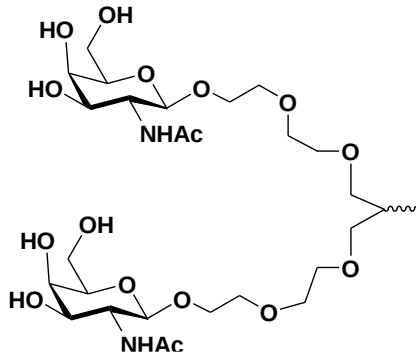
Fórmula II,



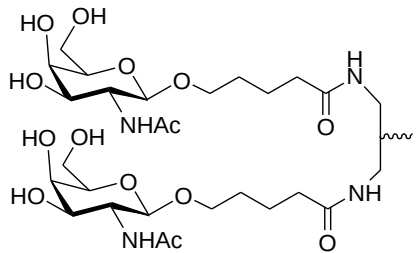
Fórmula III,



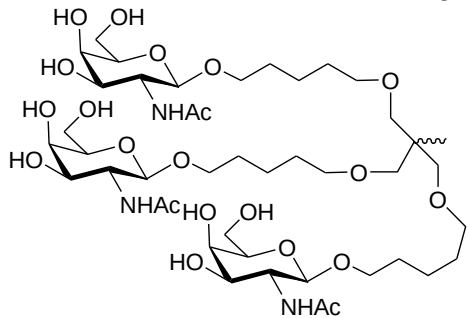
Fórmula IV,



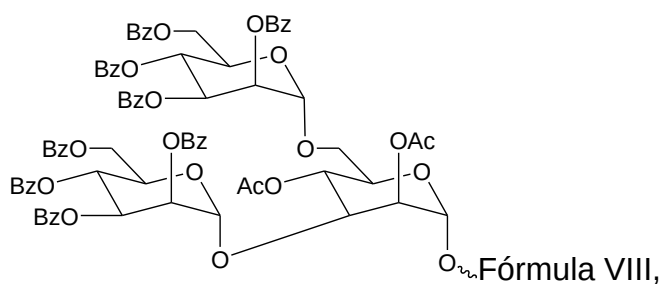
Fórmula V,



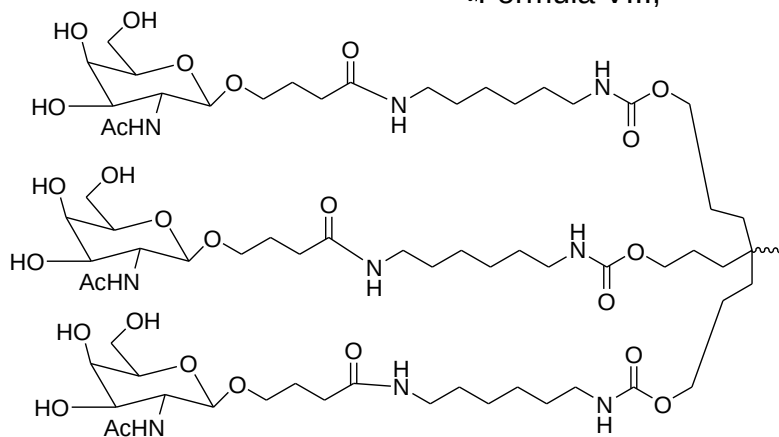
Fórmula VI,



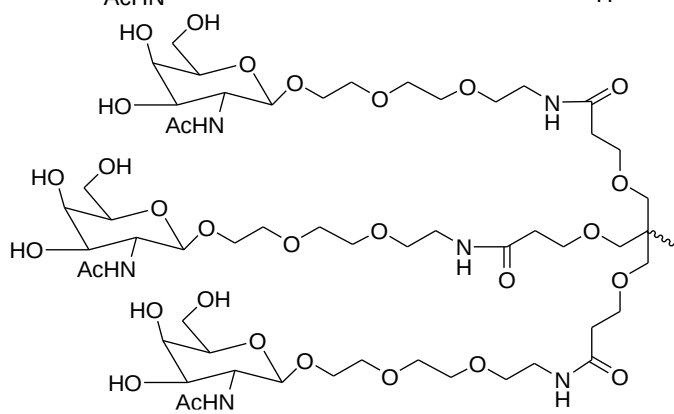
Fórmula VII,



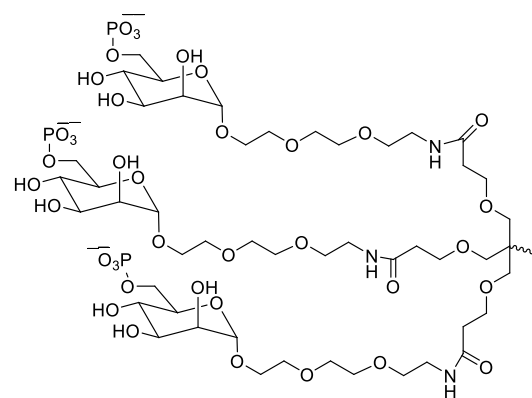
Fórmula VIII,



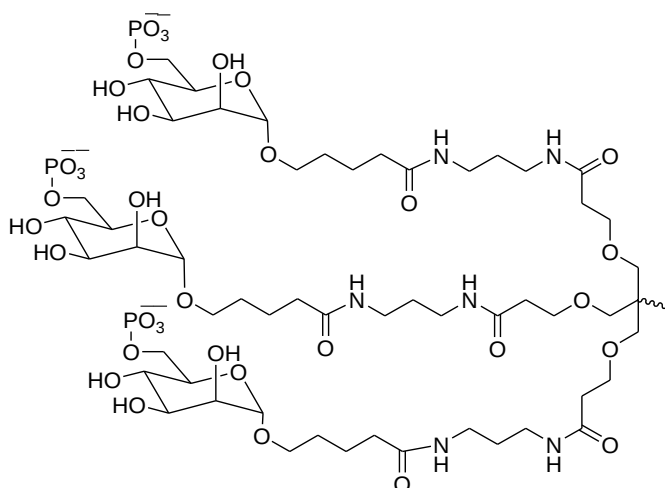
Fórmula IX,



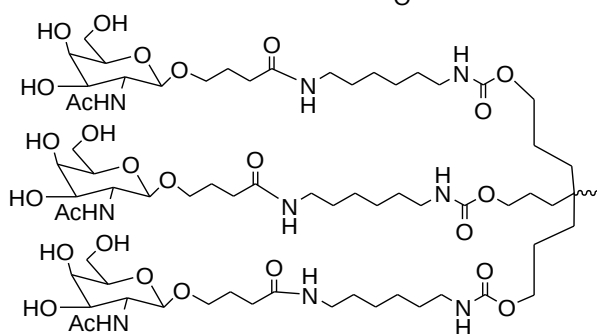
Fórmula X,



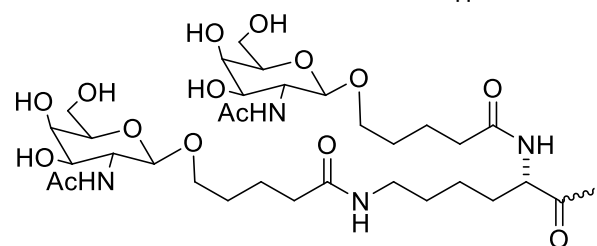
Fórmula XI,



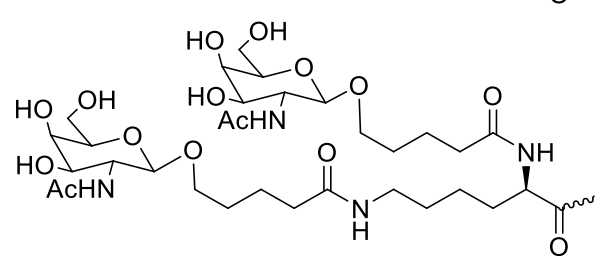
Fórmula XII,



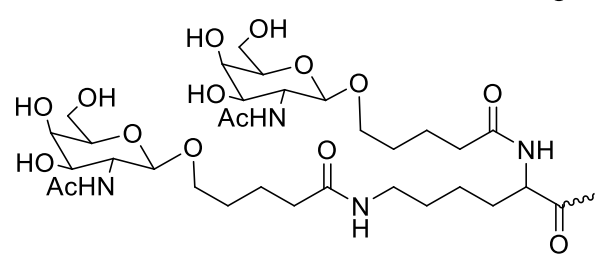
Fórmula XIII,



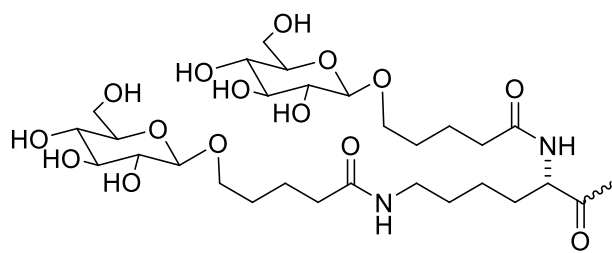
Fórmula XIV,



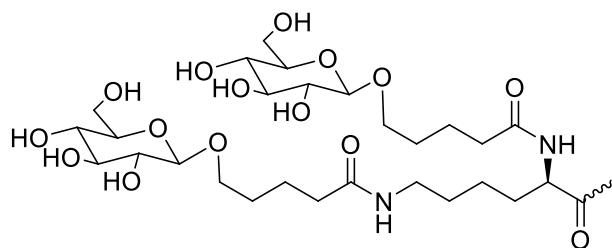
Fórmula XV,



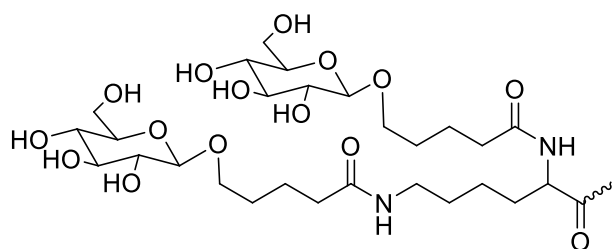
Fórmula XVI,



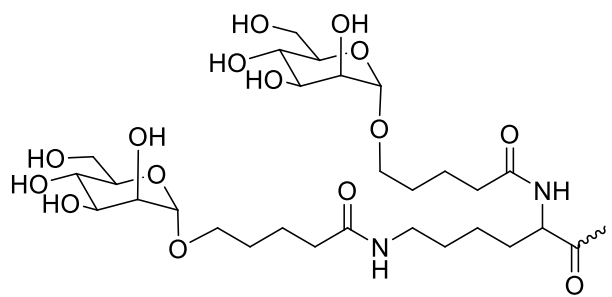
Fórmula XVII,



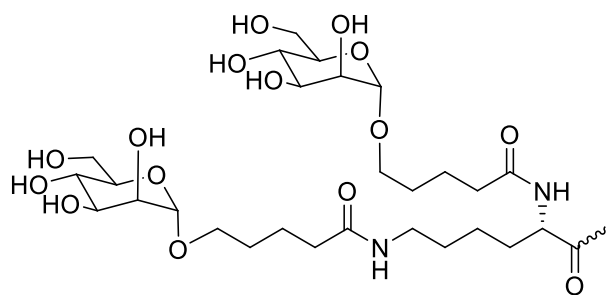
Fórmula XVIII,



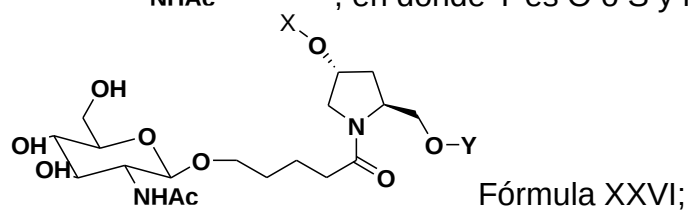
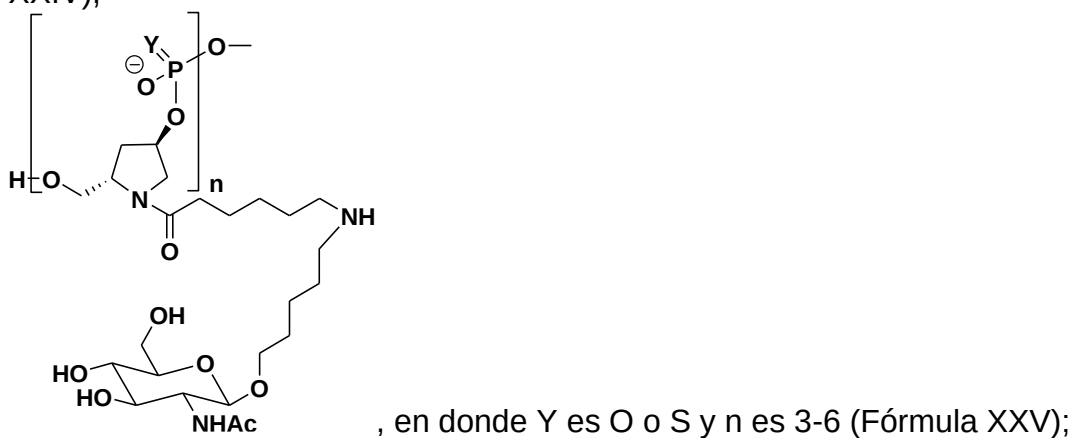
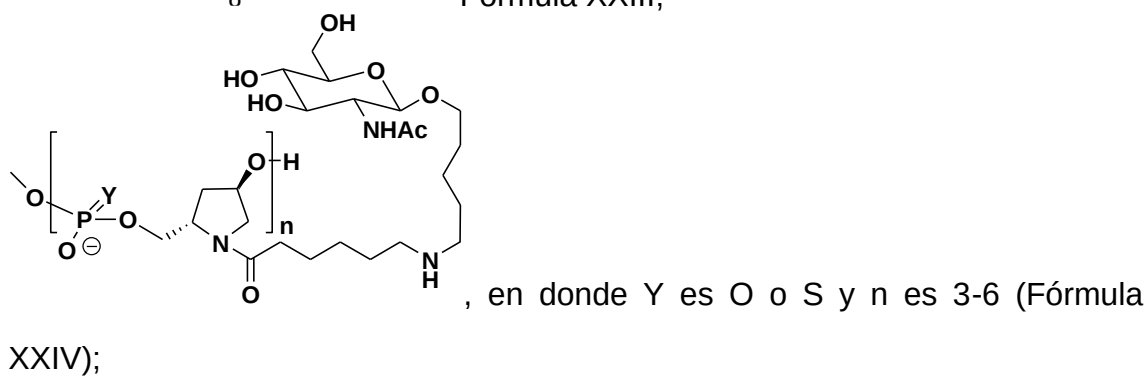
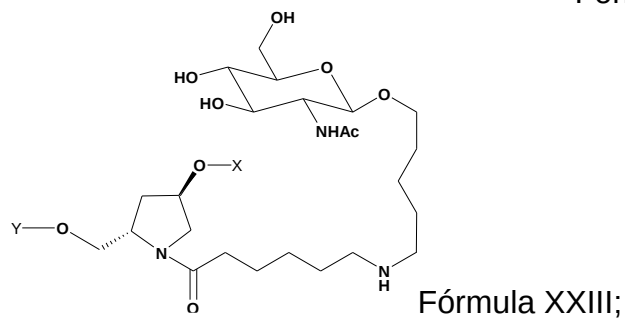
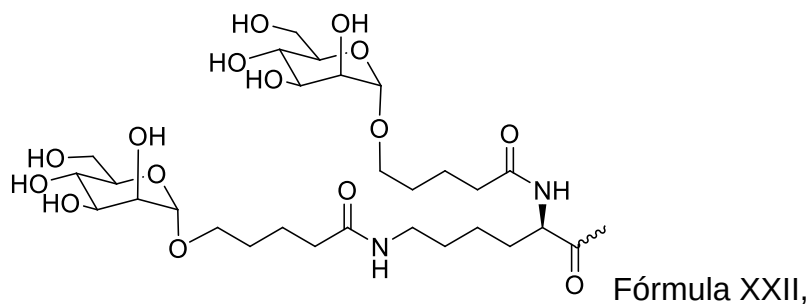
Fórmula XIX,

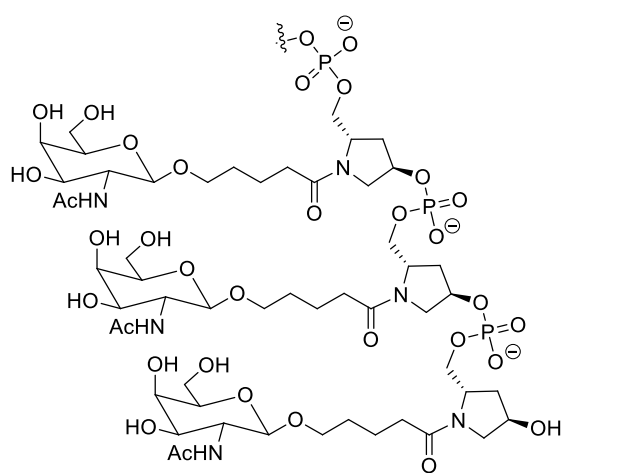
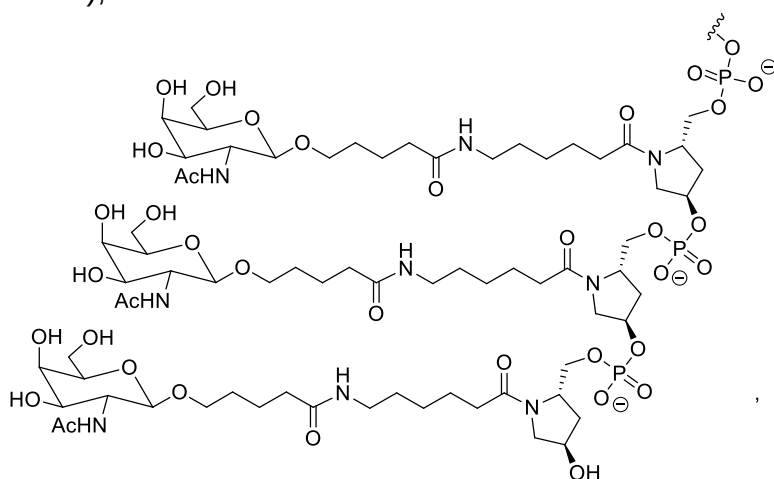
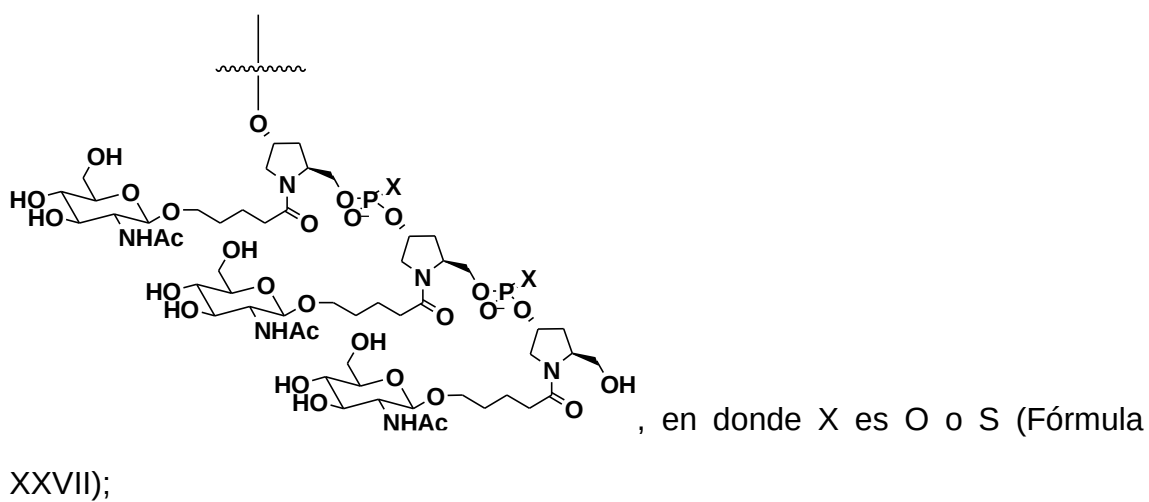


Fórmula XX,



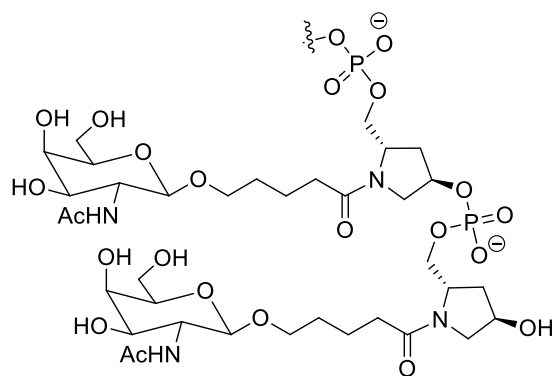
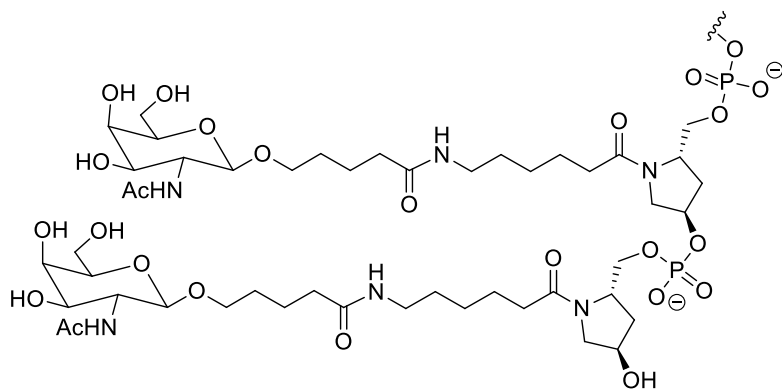
Fórmula XXI,





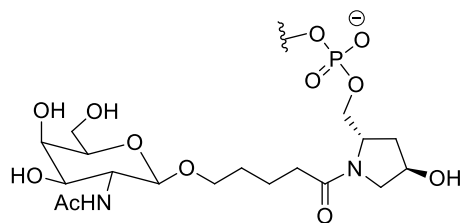
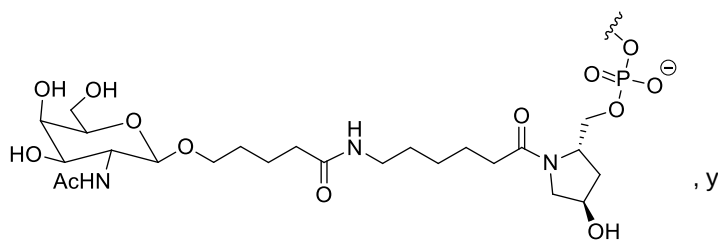
Fórmula XXVII; Fórmula

XXIX;



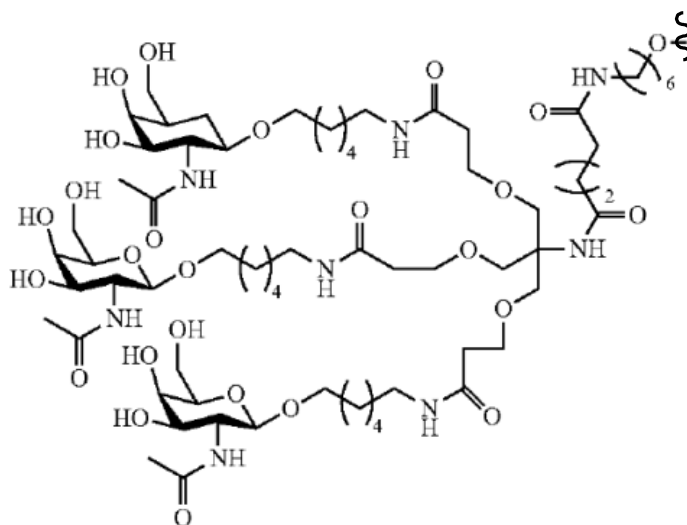
Fórmula XXX;

Fórmula XXXI;



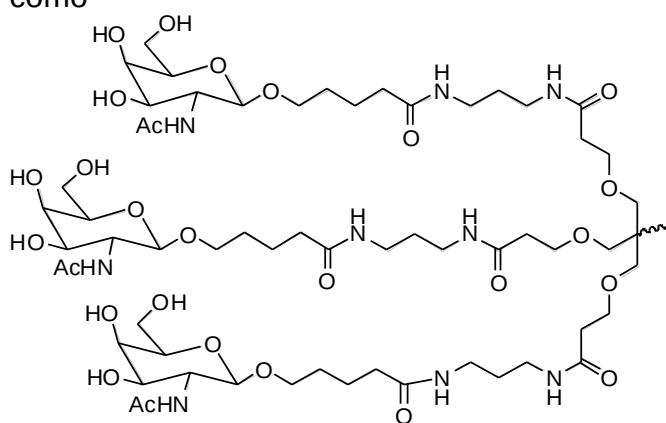
Fórmula XXXII;

Fórmula XXXIII.



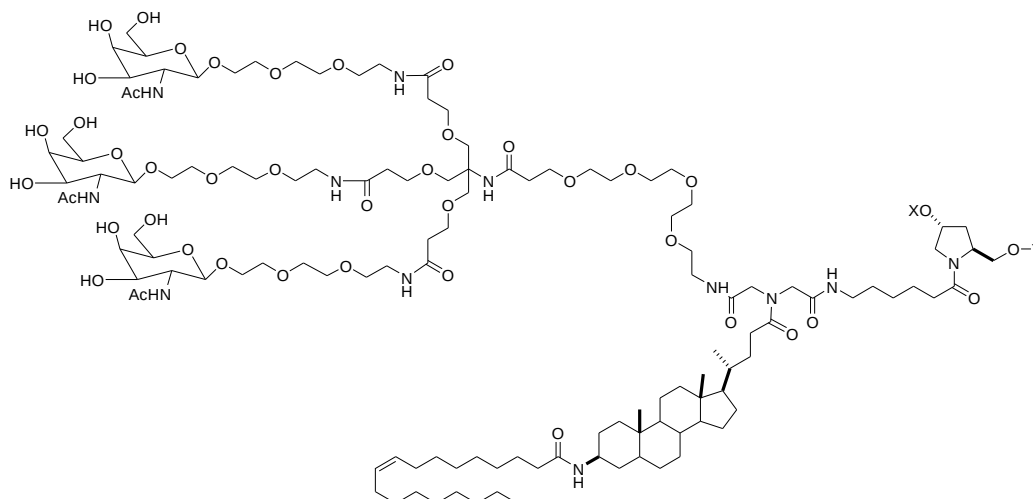
Fórmula XXXIV.

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.

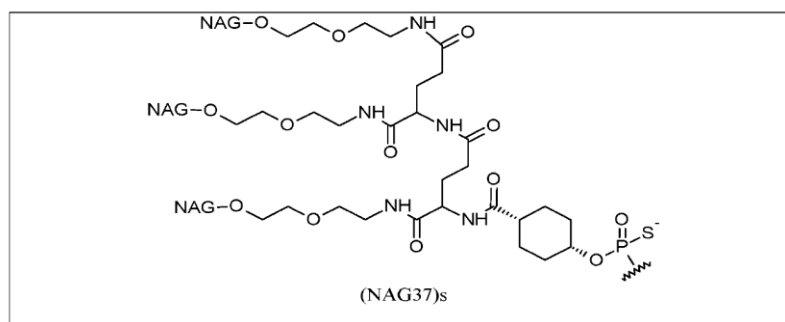
Otro conjugado de hidrato de carbono representativo para usar en las formas de realización descritas en la presente incluye, a título enunciativo no taxativo,



(Fórmula XXXVI),

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

En algunas formas de realización, un ligando adecuado es un ligando descrito en WO 2019/055633, cuyo contenido se incorpora en su totalidad a la presente a modo de referencia. En una forma de realización el ligando comprende la estructura a continuación:



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 N° 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, SO₂, SO₂NH 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, alquilheterociclilalquinilo, alquenilheterociclilalquilo, alquenilheterociclilalquenilo, alquenilheterociclilalquinilo, alquinilheterociclilalquilo, alquinilheterociclilalquenilo, alquinilheterociclilalquinilo, alquilarilo, alquenilarilo,

alquilarilo, alquilheteroarilo, alquencilheteroarilo, alquencilheteroarilo, donde dichos uno o más metilenos pueden estar interrumpidos o terminados en O, S, S(O), SO₂, 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. 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 ditioneitol (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. 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. 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. 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 alquilenos, 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.

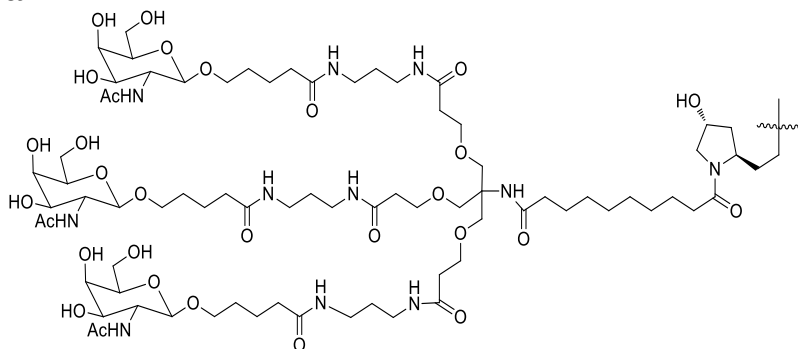
v. Grupos escindibles basados en péptidos

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 alquilenos,

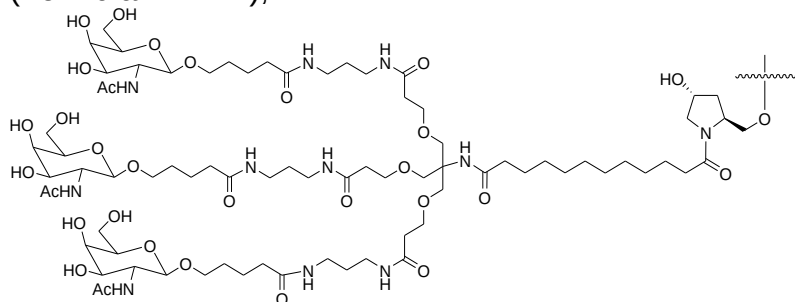
alquenileno o alquinileno. Un enlace peptídico es un tipo especial de enlace amida formado entre aminoácidos para producir péptidos y proteínas. El grupo conector escindible basado en péptidos se limita generalmente al enlace peptídico (es decir, al enlace amida) formado entre los aminoácidos que producen péptidos y proteínas y no incluye al grupo funcional amida completo. Los grupos conectores escindibles basados en péptidos tienen la fórmula general $\text{-NHCHRAC(O)NHCHRBC(O)-}$, 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,

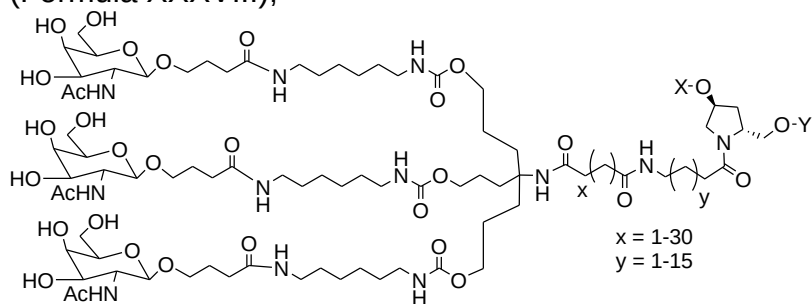
a:



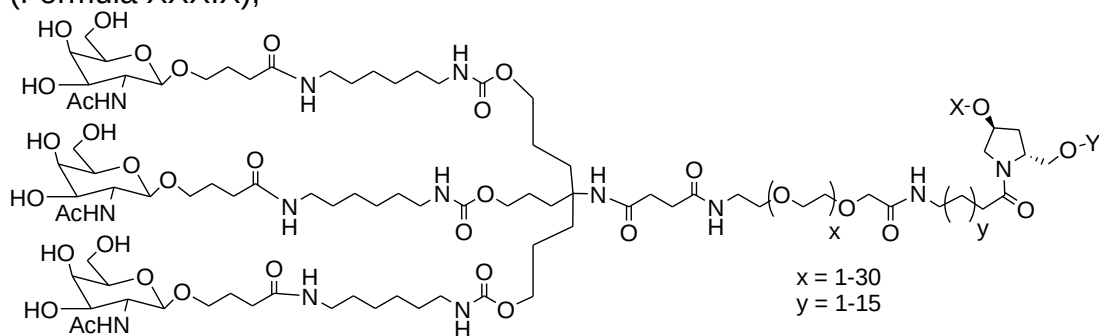
(Fórmula XXXVII),



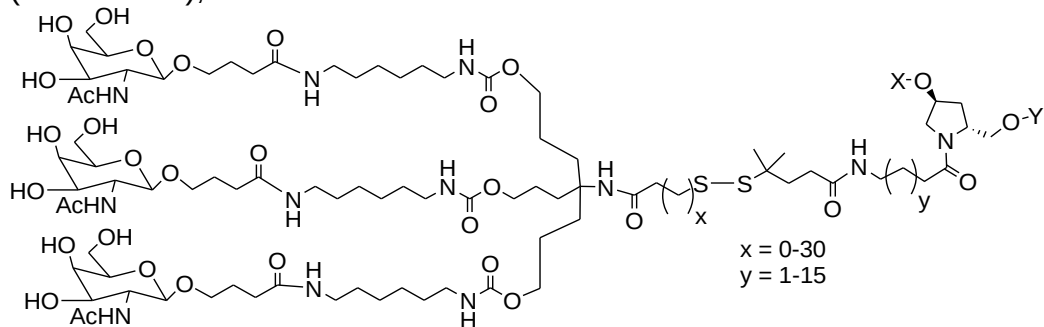
(Fórmula XXXVIII),



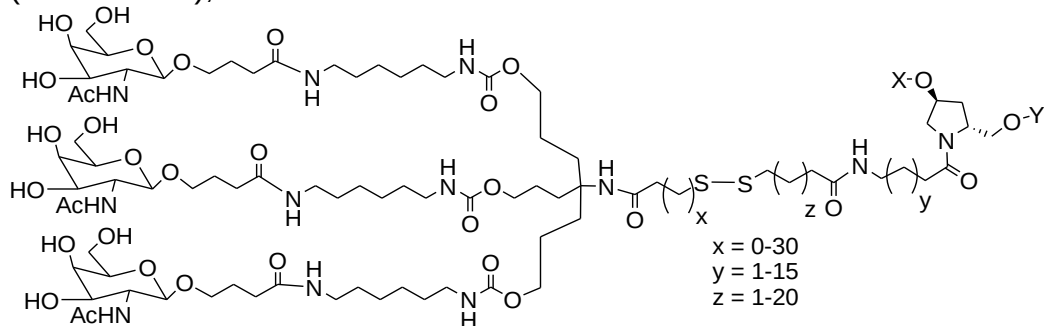
(Fórmula XXXIX),



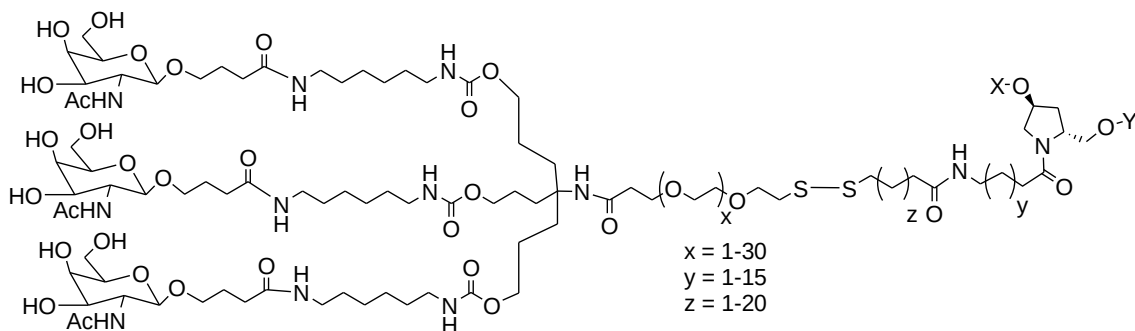
(Fórmula XL),



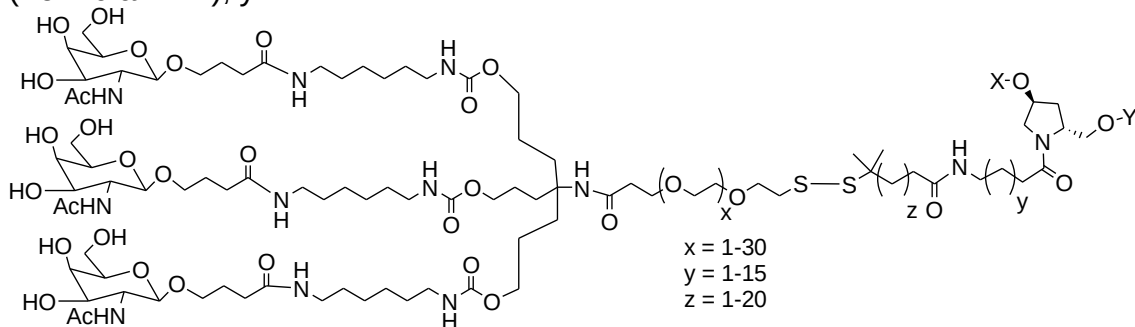
(Fórmula XLI),



(Fórmula XLII),



(Fórmula XLIII), y

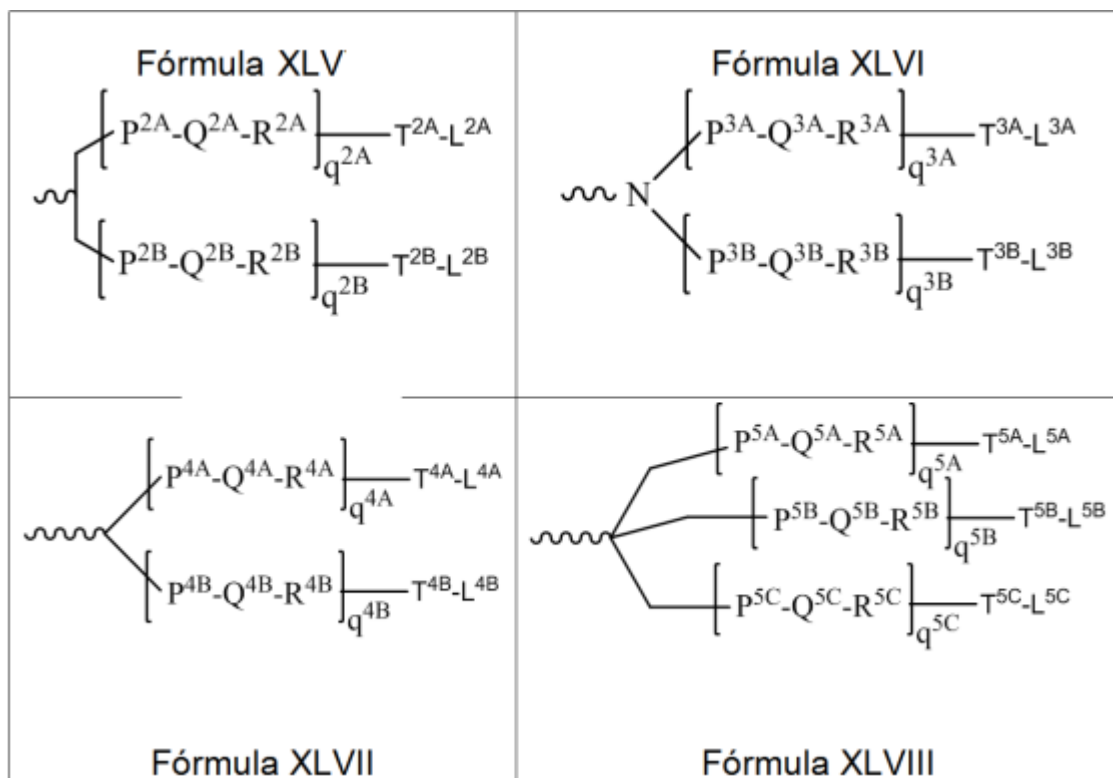


(Fórmula XLIV),

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):



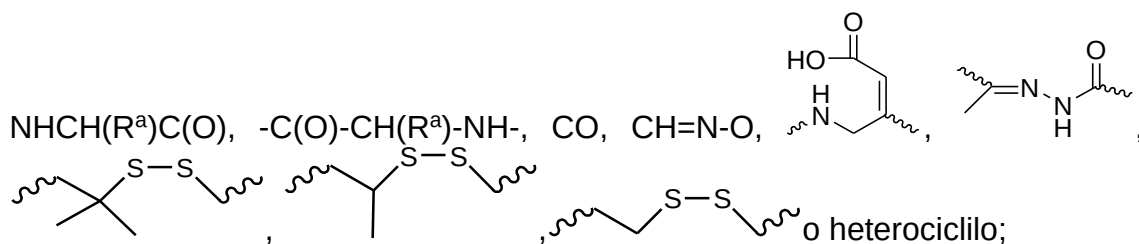
Donde:

cada vez que aparecen, q^{2A} , q^{2B} , q^{3A} , q^{3B} , q^{4A} , q^{4B} , q^{5A} , q^{5B} y q^{5C} , 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), CH₂, CH₂NH o CH₂O;

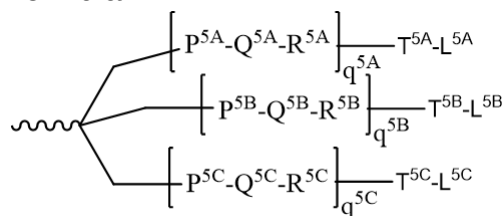
cada vez que aparecen, Q^{2A} , Q^{2B} , Q^{3A} , Q^{3B} , Q^{4A} , Q^{4B} , Q^{5A} , Q^{5B} , Q^{5C} son independientemente: un grupo ausente, alquileo, alquileo sustituido en el que uno o más metilenos pueden estar interrumpidos o pueden terminar en uno o más de: O, S, S(O), SO₂, N(R^N), C(R')=C(R''), 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, CH₂, C(O)O, C(O)NH,



$\text{L}^{2\text{A}}$, $\text{L}^{2\text{B}}$, $\text{L}^{3\text{A}}$, $\text{L}^{3\text{B}}$, $\text{L}^{4\text{A}}$, $\text{L}^{4\text{B}}$, $\text{L}^{5\text{A}}$, $\text{L}^{5\text{B}}$ y $\text{L}^{5\text{C}}$ 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 R^a 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



donde $\text{L}^{5\text{A}}$, $\text{L}^{5\text{B}}$ y $\text{L}^{5\text{C}}$ 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. N° 4.828.979; 4.948.882; 5.218.105; 5.525.465; 5.541.313; 5.545.730; 5.552.538; 5.578.717, 5.580.731; 5.591.584; 5.109.124; 5.118.802;

5.138.045; 5.414.077; 5.486.603; 5.512.439; 5.578.718; 5.608.046; 4.587.044; 4.605.735; 4.667.025; 4.762.779; 4.789.737; 4.824.941; 4.835.263; 4.876.335; 4.904.582; 4.958.013; 5.082.830; 5.112.963; 5.214.136; 5.082.830; 5.112.963; 5.214.136; 5.245.022; 5.254.469; 5.258.506; 5.262.536; 5.272.250; 5.292.873; 5.317.098; 5.371.241, 5.391.723; 5.416.203, 5.451.463; 5.510.475; 5.512.667; 5.514.785; 5.565.552; 5.567.810; 5.574.142; 5.585.481; 5.587.371; 5.595.726; 5.597.696; 5.599.923; 5.599.928; 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 ARNi_{hd}, 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 ARN_{hd}. 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 asociadas 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. Lett.*, 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.

VI. Composiciones farmacéuticas de la invención

La presente invención también incluye composiciones y formulaciones farmacéuticas que incluyen el ARNi para usar en los métodos 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.

Las composiciones farmacéuticas que comprenden agentes de ARNi de la invención pueden ser, por ejemplo, soluciones con o sin una solución amortiguadora, o composiciones que contienen vehículos farmacéuticamente aceptables. Dichas composiciones incluyen, por ejemplo, composiciones acuosas o cristalinas, formulaciones liposomales, formulaciones micelares, emulsiones, y vectores de terapia génica.

En los métodos de la invención, el agente de ARNi se puede administrar en una solución. Un agente de ARNi libre se puede administrar en una solución sin amortiguar, por ejemplo, en solución salina o en agua. Como alternativa, el ARNi libre también se puede administrar en una solución amortiguadora adecuada. La solución amortiguadora puede comprender acetato, citrato, prolamina, carbonato, o fosfato, o cualquier combinación de los mismos. En una forma de realización, la solución amortiguadora es solución salina amortiguada con fosfato (PBS). El pH y la osmolaridad de la solución amortiguadora que contiene el agente de ARNi se puede ajustar de manera que sea adecuada para la administración a un sujeto.

En algunas formas de realización, la solución amortiguadora además comprende un agente para controlar la osmolaridad de la solución, de manera que la osmolaridad se mantenga en un valor deseado, por ejemplo, en valores fisiológicos del plasma humano. Los solutos que se pueden agregar a la solución amortiguadora para controlar la osmolaridad incluyen, a título

enunciativo no taxativo, proteínas, péptidos, aminoácidos, polímeros no metabolizados, vitaminas, iones, azúcares, metabolitos, ácidos orgánicos, lípidos o sales. En algunas formas de realización, el agente para controlar la osmolaridad de la solución es una sal. En ciertas formas de realización, el agente para controlar la osmolaridad de la solución es cloruro de sodio o cloruro de potasio.

En algunas formas de realización, las composiciones farmacéuticas de la invención son libres de pirógenos o no pirogénicas.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden administrar de varias maneras dependiendo de si se desea tratamiento local o sistémico y del área a tratar. La administración puede ser tópica (por ejemplo, mediante un parche transdérmico), pulmonar, por ejemplo, mediante inhalación o insuflación de polvos o aerosoles, que incluyen mediante nebulizador; intratraqueal, intranasal, epidérmica y transdérmica, oral o parenteral. La administración parenteral incluye inyección o infusión intravenosa, intraarterial, subcutánea, intraperitoneal o intramuscular; subdérmica, por ejemplo, mediante un dispositivo implantado; o intracraneal, por ejemplo, mediante administración intraparénquima, intratecal o intraventricular.

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.

En algunas formas de realización, se administra al sujeto una dosis fija de entre aproximadamente 50 mg y aproximadamente 800 mg (por ejemplo,

entre aproximadamente 50 y aproximadamente 200 mg, entre aproximadamente 50 mg y aproximadamente 500 mg, entre aproximadamente 100 mg y aproximadamente 800 mg, entre aproximadamente 100 mg y aproximadamente 500 mg, entre aproximadamente 100 mg y aproximadamente 300 mg, entre aproximadamente 200 mg y aproximadamente 300 mg, entre aproximadamente 200 mg y aproximadamente 400 mg, entre aproximadamente 200 mg y aproximadamente 500 mg, entre aproximadamente 200 mg y aproximadamente 800 mg, entre aproximadamente 300 mg y aproximadamente 800 mg, entre aproximadamente 300 mg y aproximadamente 500 mg, entre aproximadamente 300 mg y aproximadamente 4000 mg, entre aproximadamente 400 mg y aproximadamente 800 mg, entre aproximadamente 400 mg y aproximadamente 500 mg, por ejemplo, aproximadamente 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, o aproximadamente 800 mg) de los agentes de ARNi.

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 dos meses, una vez cada 3 meses, una vez cada 4 meses, una vez cada 5 meses, una vez cada 6 meses, una vez cada 3 a 6 meses o una vez al año. En ciertas formas de realización, el ARNi se administra aproximadamente una vez al mes a aproximadamente una vez por trimestre 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, 4, 5 o 6 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.

VII. Kits

La presente invención también provee kits para realizar cualquiera de los métodos de la invención. Dichos kits incluyen uno o más agentes de ARNi de hebra doble y las instrucciones para su uso, por ejemplo, instrucciones para administrar una dosis fija de uno o más agentes de ARN de hebra doble. El agente de ARNi de hebra doble puede estar en un vial o una jeringa precargada. Los kits además pueden comprender de manera opcional medios para la administración del agente de ARNi de hebra doble (por ejemplo, un dispositivo de inyección, tal como una jeringa precargada), o medios para medir la inhibición de AGT (por ejemplo, medios para medir la inhibición del ARNm de AGT, proteína AGT, y/o actividad de AGT). Dichos medios para medir la inhibición de AGT pueden comprender un medio para obtener una muestra de un sujeto, tal como, por ejemplo, una muestra de plasma. Los kits de la invención además pueden comprender de manera opcional medios para determinar la cantidad terapéuticamente eficaz o profilácticamente eficaz.

A menos que se define a de otra manera, todos los términos técnicos y

científicos usados en la presente tienen el mismo significado que el habitualmente comprendido por una persona con experiencia en la materia a la cual pertenece esta invención. A pesar de que se pueden usar métodos y materiales similares o equivalentes a aquellos descritos en la presente para la práctica o ensayo de los ARNi y métodos descritos en la invención, más adelante se describen métodos y materiales adecuados. Todas las publicaciones, solicitudes de patente, patentes, y otras referencias mencionadas en la presente se incorporan en su totalidad a modo de referencia. En el caso de conflicto, prevalecerá la presente memoria descriptiva, incluyendo las definiciones. Además, los materiales, métodos y ejemplos son solo ilustrativos y no se pretende que sean limitantes.

Esta invención se ilustra de manera adicional mediante los siguientes ejemplos que no deben ser interpretados como limitantes. Los contenidos por completo de todas las referencias, patentes y solicitudes de patente publicadas que se citan a lo largo de esta solicitud, así como el Listado de Secuencias, se incorporan a la presente a modo de referencia.

EJEMPLOS

Abreviaturas de monómeros de nucleótidos usadas en la representación de secuencias de ácido nucleico. Se comprenderá que estos monómeros, cuando están presentes en un oligonucleótido, se encuentran unidos mutuamente por enlaces 5'-3'-fosfodiéster a menos que se indique de otra manera.

Abreviatura	Nucleótido(s)
A	Adenosina-3'-fosfato
Af	2'-fluoroadenosina-3'-fosfato
Afs	2'-fluoroadenosina-3'-fosforotioato
As	adenosina-3'-fosforotioato
C	citidina-3'-fosfato
Cf	2'-fluorocitidina-3'-fosfato
Cfs	2'-fluorocitidina-3'-fosforotioato
Cs	citidina-3'-fosforotioato
G	guanosina-3'-fosfato
Gf	2'-fluoroguanosina-3'-fosfato
Gfs	2'-fluoroguanosina-3'-fosforotioato
Gs	guanosina-3'-fosforotioato
T	5'-metiluridina-3'-fosfato
Tf	2'-fluoro-5-metiluridina-3'-fosfato
Tfs	2'-fluoro-5-metiluridina-3'-fosforotioato
Ts	5-metiluridina-3'-fosforotioato
U	Uridina-3'-fosfato

Abreviatura	Nucleótido(s)
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)
(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

Ejemplo 1. Ensayo clínico de fase 1 del ARNhd de AGT

Se diseñó un ensayo clínico multicéntrico, randomizado, doble ciego,

con comparador activo con dosis individual y dosis múltiple para evaluar los efectos sobre la seguridad, tolerabilidad, farmacocinética (PK), y farmacodinámica (PD) de la administración subcutánea de (SC) AD-85481 a pacientes con hipertensión.

Este estudio incluye 4 partes:

Parte A: fase de dosis creciente individual (SAD) en pacientes hipertensos;

Parte B: Dosis individual (SD) en pacientes hipertensos con ingesta de sal controlada;

Parte C: Fase de dosis múltiple (MD) en pacientes hipertensos; y

Parte D: Fase de dosis múltiple (MD) en pacientes hipertensos que eran obesos.

En todas las partes del estudio se recolectaron revisiones en curso sobre seguridad, tolerabilidad, y PD y PK disponibles.

Diagnóstico y criterios principales de elegibilidad

Este estudio incluyó adultos de entre 18 y 65 años de edad con hipertensión (presión sanguínea sistólica [SBP] en reposo promedio >130 y ≤ 159 mmHg). Se excluyeron los pacientes con hipertensión secundaria o presión sanguínea diastólica en reposo promedio [DBP] ≥ 100 mmHg. También se excluyeron pacientes con condiciones o comorbilidades médicas significativas clínicamente que podrían interferir en el cumplimiento e interpretación de los datos (incluyendo diabetes mellitus o historia de cualquier evento cardiovascular) o que estuviesen actualmente tomando o anticipado el uso de medicamentos que se sabe que afectan a la presión sanguínea.

Fármaco del estudio, dosis y modo de administración

El fármaco del estudio, AD-85481, un ARN de interferencia pequeño (ARNip) conjugado con N-acetilgalactosamina (GalNAc) con modificación química diseñado para suprimir la producción del angiotensinógeno (AGT) como estrategia para disminuir la presión sanguínea en individuos con hipertensión, se administró como una inyección subcutánea individual (Partes A y B) o 2 inyecciones subcutáneas administradas una vez en la Semana 1 and y una vez en la Semana 12 (Partes C y D).

Secuencia nucleotídica de AD-85481 sin modificar y modificada

Hebra	Sin modificar (5' a 3')	SEQ ID	Modificada (5' a 3')	SEQ ID
Antisentido	UGUACUCUCAUUGUGGAU GACGA	9	usGfsuac(Tgn)cucauugUfg Gfaugacsgsa	11
Sentido	GUCAUCCACAAUGAGAGU ACA	10	gsuscauCfAcfAfAfugagagu aca	12

Las modificaciones químicas se definen como a continuación: a es 2'-O-metiladenosina-3'-fosfato, c es 2'-O-metilcitidina-3'-fosfato, g es 2'-O-metilguanosina-3'-fosfato, u es 2'-O-metiluridina-3'-fosfato, Af es 2'-fluoroadenosina-3'-fosfato, Cf es 2'-fluorocitidina-3'-fosfato, Gf es 2'-fluoroguanosina-3'-fosfato, Uf es 2'-fluorouridina-3'-fosfato, (Ggn) es ácido nucleico guanosina-glicólico (GNA), y s es unión fosforotioato. El extremo 3' de la hebra sentido está unido de manera covalente a un ligando N-[tris(GalNAc-

alquil)-amidodecanoil)]-4-hidroxiprolinol (también referido a Hyp-(GalNAc-alquil)₃ o L96).

Control con placebo, dosis y modo de administración

En las Partes A y B, el fármaco control para AD-85481 fue un placebo (solución salina normal 0,9% para la administración subcutánea).

En las Partes C y D, el tratamiento simulado para AD-85481 es solución salina normal 0,9% para la administración subcutánea. El tratamiento simulado para irbesartán es un comprimido simulado inerte que coincide con la aparición de irbesartán.

Control comparador activo, dosis y modo de administración

En las Partes C y D de este estudio, se usó como comparador activo dosis una vez por día por vía oral (PO) de 150 mg de irbesartán.

Duración del tratamiento y participación en el estudio

Se administró una dosis individual subcutánea de AD-85481 en las Partes A y B. En las Partes C y D, se administraron 2 dosis subcutáneas del fármaco del estudio durante 12 semanas.

Métodos estadísticos

El tamaño de la muestra se basó en consideraciones prácticas y es consistente con este tipo de estudio de fase temprana.

El conjunto de análisis completo (FAS) incluyó todos los pacientes que recibieron cualquier cantidad del fármaco del estudio agrupados de acuerdo con el tratamiento al cual fueron randomizados. El conjunto de análisis PK incluyó todos los pacientes que recibieron al menos 1 dosis del fármaco del estudio y de los que se obtuvo por lo menos 1 muestra de sangre posterior a la dosis para la determinación de las concentraciones de AD-85481 y que tenían

datos PK evaluables. El conjunto de análisis PD incluyó todos los pacientes que recibieron por lo menos 1 dosis del fármaco del estudio de los que se obtuvo por lo menos 1 muestra de sangre posterior a la dosis para la determinación de AGT sérico.

Se analizó la actividad AD-85481 usando el FAS. Los conjuntos de análisis PK y PD se usaron para realizar los análisis de PK y PD, respectivamente.

Los análisis estadísticos son principalmente de naturaleza descriptiva. La estadística descriptiva (por ejemplo, media, desviación estándar, mediana, mínimo, y máximo) se presentan para las variables continuas. Las frecuencias y porcentajes se presentan para las variables categóricas y ordinales. Los estadísticos descriptivos se proveen para los datos de laboratorio clínico, electrocardiograma (ECG), y signos vitales.

Fundamento del diseño del estudio

Se realizó un estudio de Fase 1, multicéntrico, randomizado, doble ciego de AD-85481 administrado de manera subcutánea (SC) a pacientes con hipertensión. El objetivo principal para el estudio fue evaluar la seguridad y tolerabilidad de dosis individuales o múltiples de AD-85481 en pacientes con hipertensión. El estudio se realizó en 4 partes: una fase de dosis individual creciente (SAD) (Parte A), una fase de dosis individual (SD) en pacientes con ingesta controlada de sal (Parte B), una fase de dosis múltiple (MD) (Parte C), y una fase de MD en pacientes obesos (Parte D).

El estudio se diseñó para proveer primera estimación sobre la seguridad y tolerabilidad del AD-85481. En base al perfil de seguridad conocido de antihipertensivos aprobados, este estudio se diseñó para monitorear de manera

cuidadosa la presión sanguínea, electrolitos séricos, y creatinina, con recolección frecuente de datos durante el mínimo anticipado de AGT (que se lo estima a entre 4 y 6 semanas después de la dosis de AD-85481). Las evaluaciones de laboratorio clínico y los datos de presión sanguínea se recolectaron de manera periódica después de la administración del fármaco del estudio para que se corresponda con el mínimo de AGT.

Además de la seguridad del AD-85481, este estudio se diseñó para obtener una perspectiva para las preguntas científicas secundarias o exploratorias.

Farmacodinámica (PD) de AD-85481: El efecto de PD se demostró de manera directa mediante medidas seriales de AGT sérico para determinar el cambio respecto al basal en el nivel de AGT en plasma. Los efectores corriente debajo de AGT (concentración de renina en plasma, actividad de renina en plasma, angiotensina I, angiotensina II, aldosterona) también se pueden medir en muestras de sangre y orina como biomarcadores de exploración.

Farmacocinética (PK) de AD-85481: Los parámetros PK de AD-85481 se evaluaron por determinación de los niveles en plasma y orina de AD-85481 y metabolitos potenciales, por ejemplo, por qPCR.

Reducción de la presión sanguínea: Este estudio enroló pacientes con hipertensión (inicialmente correspondientes al Grado 1 de acuerdo con los criterios ESC/ESH) para permitir la evaluación de la reducción terapéutica de la presión sanguínea. Las fases de dosis individuales (Partes A y B) son de corta duración y usan un grupo con placebo inerte. Con el objetivo de adherirse de mejor manera a los estándares éticos, las fases de MD más largas (Partes C y D) utilizan un bloqueante establecido del receptor de angiotensina II (ARB)

(irbesartán) como comparador activo del tratamiento con AD-85481. Las evaluaciones exploratorias de AD-85481 incluyen el cambio respecto al basal en la SBP y DBP evaluadas mediante el monitoreo de la presión sanguínea ambulatoria durante 24 horas (ABPM) y el cambio respecto al basal en la SBP y DBP evaluadas mediante presión sanguínea en consultorio automatizado por oscilometría (AOBP) y por monitoreo domiciliario de la presión sanguínea por oscilometría (HBPM).

Tal como lo recomiendan las guías actuales, los pacientes suspenden la medicación antihipertensiva previa durante aproximadamente entre 3 y 4 semanas antes de la administración del fármaco del estudio y se monitoreó la presión sanguínea con medidas de presión sanguínea en consultorio automatizadas (AOBP) y en pacientes ambulatorios mediante el monitoreo durante 24 horas de la presión sanguínea ambulatoria (ABPM). Además de tener mayor precisión, el último método evalúa la relación de presión sanguínea pico a mínimo y los ritmos circadianos (incluyendo restauración potencial de la disminución normal de la presión sanguínea nocturna que se pierde en un 24 a 35% de los pacientes hipertensos). Mediante un tercer método se recolectan medidas más frecuentes (diarias), el monitoreo domiciliario de la presión sanguínea por oscilometría (HBPM), para caracterizar los efectos PD graduales y para proveer monitoreo preciso de seguridad de potencial hipotensión fuera de la clínica.

Impacto de la ingesta baja en sal sobre la respuesta de la presión sanguínea a AD-85481: Debido a que la hipertensión es sensible a la sal en algunos pacientes, todos los pacientes del estudio recibieron materiales educativos sobre la dieta con instrucciones para limitar el consumo de sodio a

aproximadamente 2,0 g por día desde el cribado hasta el final del tratamiento (EOT). Para destacar, esta es la ingesta de sodio recomendada en las Guías 2018 de ESC/ESH para pacientes hipertensos y para la población general.

Además, la cohorte del estudio 1 parte B de pacientes con ingesta controlada de sal se estudian para evaluar el potencial aumento de farmacología y seguridad en un estado de baja sal (1,15 g de sodio por día), que se ha demostrado previamente con otros fármacos inhibidores del RAAS. Los pacientes de la Parte B completan un subprotocolo de dieta de 2 semanas que varía el consumo de sodio para evaluar de manera directa las respuestas de la presión sanguínea sensibles a la sal. Durante la Parte B, se preparan alimentos en cocinas de investigación/metabólicas de acuerdo con un protocolo común y se proveen a los pacientes. Los pacientes son paciente internados durante la primera semana del subprotocolo de 2 semanas para promover la adherencia a la dieta baja en sal y para mejorar el monitoreo del potencial aumento en la farmacología de AD-85481 al ingresar en la deprivación de sal. Después de disminuir el AGT y la deprivación de sal, se caracteriza la respuesta de la presión sanguínea a la alta ingesta de sal sola. Los puntos de valoración exploratorios sobre los efectos de AD-85481 incluyen la determinación del cambio respecto al basal en la SBP y DBP evaluadas por ABPM y AOBP en condiciones de baja y alta sal.

Obesidad: Se espera que la mayor parte de los pacientes con hipertensión tengan sobrepeso o que sean obesos. Además, la adiposidad aumentada es probable que está asociada de manera causal con la hipertensión. La Parte D estudia 1 cohorte de pacientes con índice de masa corporal (BMI) en el rango de obesidad de Clase I a III para evaluar el impacto

del peso sobre los parámetros PK y PD.

Debido a que los estudios preclínicos han implicado al AGT como un contribuyente a la obesidad inducida por la dieta y esteatosis hepática mediante mecanismos que pueden ser diferentes de las vías clásicas del RAAS, se evalúa la pérdida de peso como un punto de valoración exploratorio. Se recolectan los datos antropométricos (circunferencia de cintura, relación cintura a cadera) y una evaluación radiográfica de la composición corporal (absorciometría por rayos X de energía dual; DEXA) para determinar si los cambios en el peso son debidos a la pérdida de grasa corporal. Los parámetros bioquímicos del metabolismo de lípidos y glucosa (perfil lipídico, HbA1c, glucosa en ayunas) que mejoran con la reducción en el peso se miden aproximadamente cada 3 meses. Para destacar, las Partes A, B, y C enrolan pacientes en el rango de obesidad normal a sobrepeso, y leve (Clase I) ($\text{BMI} \geq 18 \text{ kg/m}^2$ y $\leq 35 \text{ kg/m}^2$). La cohorte individual en la Parte D se restringe a pacientes obesos ($\text{BMI} > 30 \text{ kg/m}^2$ y $\leq 50 \text{ kg/m}^2$). Los puntos de valoración exploratorios sobre los efectos de AD-85481 incluyen la determinación del cambio respecto al basal en el peso corporal, circunferencia de la cintura, relación cintura a cadera, y composición corporal (evaluado mediante absorciometría por rayos X de energía dual (DEXA)) en pacientes obesos.

Otros objetivos exploratorios del estudio completo incluyen la evaluación del efecto de ALN-AD-85481 sobre los parámetros del síndrome metabólico mediante la determinación del cambio respecto al basal en HbA1c, glucosa plasmática en ayunas, y perfil de lípidos en suero; y la evaluación del efecto de AD-85481 sobre los biomarcadores exploratorios del RAAS mediante la determinación del cambio respecto al basal en la concentración de renina en

plasma, actividad de renina en plasma, angiotensina I, angiotensina II, y aldosterona.

Dosificación del fármaco del estudio y progresión.

Las dosis de la Parte A son 10 mg, 25 mg, 50 mg, 100 mg, 200 mg, y $\leq$ 400 mg. Hubo 12 pacientes en cada una de las 6 cohortes (con 3 cohortes opcionales para la evaluación de los niveles intermedios de dosis, niveles menores de dosis, o las expansiones de cohortes previas se pueden enrolar en la Parte A para caracterizar mejor la respuesta a la dosis o seguridad y tolerabilidad) con una randomización 2:1 de AD-85481:placebo. Se espera que la menor dosis no tenga un efecto en la disminución de la presión sanguínea. La actividad de disminución de la presión sanguínea se espera que se observe primero con la dosis de 50 mg con una disminución del AGT sérico de al menos 80%.

Fase I – Parte A

Disminución del AGT sérico respecto al basal en la Parte A. Los sujetos que cumplen los criterios de inclusión y exclusión fueron administrados con una dosis individual de AD-85481 o placebo en el Día 1. Se recolectaron muestras de sangre antes de la administración del AD-85481 o placebo, semanalmente durante 6 semanas después de la administración, en la semana 8 y semana 12 luego del tratamiento, y luego cada 3 meses durante el periodo de seguimiento. Se determinó el nivel de AGT sérico mediante ELISA en sandwich en fase sólida y la disminución del AGT respecto al basal se determinó en cada uno de los puntos de tiempo.

Un total de 60 pacientes con hipertensión completó el tratamiento en la

Parte A del estudio. Los pacientes recibieron placebo (n=4 por cohorte) o AD-85481 (n=8 por cohorte). La demografía y las características basal de los sujetos que participaron en la Parte A se presentan en la tabla a continuación.

		Placebo (N=20)	10 mg (N=8)	25 mg (N=8)	50 mg (N=8)	100 mg (N=8)	200 mg (N=8)
Edad, años; mediana (rango)		52 (36-64)	53 (37-60)	56 (47-63)	41 (35-64)	56 (35-65)	56 (43-64)
Género	Masculino	9	7	2	7	3	5
	Femenino	11	1	6	1	5	3
Raza	Blanca	14	6	4	3	4	6
	Negra	5	1	4	4	2	2
	Asiática	0	1	0	0	2	0
	Otra	1	0	0	1	0	0
Presión sanguínea	mediana de SBP ABPM de 24h (rango)	141 (126,153)	139 (130, 147)	141 (132, 157)	135 (113, 144)	136 (131, 152)	139 (129, 154)
	mediana de DBP ABPM de 24h (rango)	87 (72-102)	84 (76, 93)	91 (75, 103)	84 (74, 91)	86 (80, 90)	83 (75, 95)

Perfil de seguridad en la Parte A. El objetivo primario de este estudio fue evaluar la seguridad y tolerabilidad de las dosis individuales de AD-85481

en pacientes con hipertensión. Tal como se demuestra en la table a continuación, el perfil de seguridad de AD-85481 fue aceptable son problemas de seguridad. Los eventos más adversos fueron leves o moderados en severidad y se resolvieron sin intervención. No hubo muertes ni eventos adversos que llevaran a la discontinuación en el estudio, ni eventos adversos serios relacionados con el tratamiento (SAE). Se informó un SAE severo de cáncer de próstata en 1 paciente que recibió 200 mg, en base a una biopsia que se realizó en el periodo de cribado y se informó como positivo después de la dosificación. Ningún paciente requirió intervención para una baja presión sanguínea, y no se observaron elevaciones clínicamente significativas en la alanina aminotransferasa (ALT) sérica, creatinina sérica, o potasio sérico durante el curso del estudio. Cinco pacientes informaron reacciones leves en el sitio de inyección.

Pacientes que informan un evento adverso (AE), N	Placebo (N=20)	10 mg (N=8)	25 mg (N=8)	50 mg (N=8)	100 mg (N=8)	200 mg (N=8)
Por lo menos 1 evento adverso	17	5	7	6	7	7
Por lo menos 1 evento adverso serio	1	0	0	0	0	1
Por lo menos 1 evento adverso	1	0	0	0	0	1

severo						
--------	--	--	--	--	--	--

Los efectos de la administración de una dosis individual de AD-85481 sobre el nivel de AGT sérico se presentan en la Figura 1.

Se observó una disminución promedio del máximo de AGT de 54% para la dosis de 10 mg con una disminución promedio a las 4 semanas de 52% para la dosis individual de 10 mg.

Se observó una disminución promedio del máximo de AGT de 69% para la dosis de 25 mg con una disminución promedio a las 4 semanas de 69% para la dosis individual de 25 mg.

Se observó una disminución promedio del máximo de AGT de 74% para la dosis de 50 mg con una disminución promedio a las 4 semanas de 68% para la dosis individual de 50 mg.

Se observó una disminución promedio del máximo de AGT de 94% para la dosis de 100 mg con una disminución promedio a las 4 semanas de 92% para la dosis individual de 100 mg.

Se observó una disminución promedio del máximo de AGT de 96% para la dosis de 200 mg con una disminución promedio a las 4 semanas de 95% para la dosis individual de 200 mg.

Estos datos demuestran una reducción perdurable de AGT sérico dependiente de la dosis después del tratamiento con una dosis individual de AD-85481. Además, se observó una reducción mayor que el 90% en los niveles séricos de AGT en sujetos que recibieron dosis individuales mayores de AD-85481, y la reducción en AGT persistió por más de 3 meses, por ejemplo, demostrando que un intervalo de administración de dosificación crónica de al

menos una vez por trimestre podría ser eficaz.

Modulación de la presión sanguínea respecto al basal en la Parte A.

Las evaluaciones de AD-85481 incluyeron el cambio respecto al basal en la SBP y DBP evaluado mediante el monitoreo de la presión sanguínea ambulatoria durante 24 horas (ABPM) y el cambio respecto al basal en SBP y DBP evaluado por presión sanguínea en consultorio automatizado por oscilometría (AOBP) y por el monitoreo domiciliario de la presión sanguínea por oscilometría (HBPM).

Tal como se describe en la Figura 2, una dosis individual de 100 mg de AD-85481, redujo la presión sanguínea sistólica y la diastólica en aproximadamente 10,1 mmHg y aproximadamente 5,5 mmHg, respectivamente, en la Semana 8 en comparación con el placebo determinado por medidas de presión sanguínea ambulatoria durante 24 horas (ABPM). Después de una dosis individual de 200 mg de AD-85481, se observaron reducciones en la presión sanguínea sistólica y en la diastólica de aproximadamente 11 mmHg y aproximadamente 7,7 mmHg, respectivamente, en la Semana 8 en comparación con el placebo, determinado mediante medidas de presión sanguínea ambulatoria durante 24 horas (ABPM).

Estos datos demuestran una reducción dependiente de la dosis en la SBP y DBP en sujetos que reciben dosis individuales de AD-85481. Específicamente, se observó una reducción mayor a 10 mmHg en SBP de 24 horas en la Semana 8 después de una dosis individual de AD-85481 (por ejemplo, 100 mg o 200 mg).

Síntesis

En resumen, este estudio de dosis en aumento individual caracterizó el efecto máximo de AD-85481 y demostró la durabilidad del tratamiento AD-85481 durante un periodo de más de 3 meses. Estos datos demuestran que las dosis subcutáneas individuales de AD-85481 (también referido como ALN-AGT01) fueron bien toleradas en pacientes con hipertensión leve a moderada, sin eventos adversos serios relacionados al tratamiento. La administración de AD-85481 lleva a una reducción dependiente de la dosis y perdurable en la AGT sérico. Se observaron reducciones en AGT mayores que 90% después de las dosis individuales mayores de AD-85481 que persistieron durante 3 meses o más, demostrando que se requiere un intervalo de dosificación no frecuente.

Las reducciones de la presión sanguínea se comportaron como espejo del silenciamiento de AGT siguiendo la administración de una dosis individual fija de AD-85481, con >10 mmHg de reducción en la SBP de 24 horas observado a las 8 semanas después de las dosis individuales de 100 mg o mayores.

En comparación con los métodos y terapias actuales para tratar la hipertensión, muchos de los cuales están asociados con efectos negativos sobre la función renal, estos datos demuestran que el silenciamiento del AGT específico en el hígado es eficaz y, por lo tanto, provee una seguridad renal mejorada. La duración prolongada de la acción del AD-85481 es además superior a las terapias actuales en el sentido en que puede proveer una respuesta consistente y durable de la presión sanguínea, anulando la variación diurna de la BP, y mejorando la adherencia ya que se requiere dosificación poco frecuente y que existe una reducción en la carga total de píldoras.

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.