

COMPOSICIONES DE ARNi DE TRANSTIRETINA (TTR) Y SUS MÉTODOS DE USO

SOLICITUD RELACIONADA

Esta solicitud reivindica el beneficio de prioridad de la solicitud provisional de los Estados Unidos núm. 63/228,830, presentada el 3 de agosto de 2021, cuyos contenidos se incorporan en su totalidad en la presente descripción como referencia.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La transtiretina (TTR) (también conocida como prealbúmina) se encuentra en el suero y el líquido cefalorraquídeo (CSF). La TTR transporta la proteína de unión al retinol (RBP) y la tiroxina (T4), y también actúa como transportador del retinol (vitamina A) a través de su asociación con la RBP en la sangre y el CSF. La transtiretina recibe su nombre por su **transporte de tiroxina y retinol**. La TTR también funciona como una proteasa y puede escindir proteínas que incluyen apoA-I (la principal apolipoproteína HDL), péptido β amiloide, y neuropéptido Y. Véase Liz, M.A. *et al.* (2010) *IUBMB Life*, 62(6):429-435.

La TTR es un tetrámero de cuatro subunidades (monómeros) idénticas de 127 aminoácidos que son ricas en estructura de lámina beta. Cada monómero tiene dos láminas beta de 4 cadenas y la forma de un elipsoide prolato. Las interacciones antiparalelas de la lámina beta unen los monómeros a los dímeros. Un bucle corto de cada monómero forma la interacción dímero-dímero principal. Estos dos pares de lazos separan las láminas beta convexas opuestas de los dímeros para formar un canal interno.

El hígado es el sitio principal de la expresión de la TTR. Otros sitios de expresión significativos incluyen el plexo coroideo, la retina (particularmente el epitelio pigmentario de la retina) y el páncreas.

La transtiretina es uno de al menos 27 tipos distintos de proteínas que es una proteína precursora en la formación de fibrillas amiloides. Véase Guan, J. *et al.* (4 de noviembre de 2011) Current perspectives on cardiac amyloidosis, *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, doi:10.1152/ajpheart.00815.2011. El depósito extracelular de fibrillas amiloides en

órganos y tejidos es el sello distintivo de la amiloidosis. Las fibrillas amiloides están compuestas por agregados de proteínas mal plegados, que pueden ser el resultado de la producción excesiva o de mutaciones específicas en proteínas precursoras. El potencial amiloidógeno de la TTR puede estar relacionado con su extensa estructura de lámina beta;

5 los estudios cristalográficos de rayos X indican que ciertas mutaciones amiloidógenas desestabilizan la estructura tetramérica de la proteína. Véase, *p. ej.*, Saraiva M.J.M. (2002) *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 4(12):1-11.

Amiloidosis es un término general para el grupo de enfermedades amiloides que se caracterizan por depósitos amiloides. Las enfermedades amiloides se clasifican en función
10 de su proteína precursora; por ejemplo, el nombre comienza con “A” para amiloide y se sigue por una abreviatura de la proteína precursora, *p. ej.*, ATTR para transtiretina amiloidogénica. *Ibid.*

Existen numerosas enfermedades asociadas con la TTR, la mayoría de las cuales son enfermedades amiloides. La TTR de secuencia normal se asocia con la amiloidosis
15 cardíaca en personas de edad avanzada y se denomina amiloidosis sistémica senil (SSA) (también llamada amiloidosis cardíaca senil (SCA) o amiloidosis cardíaca). La SSA a menudo está acompañada de depósitos microscópicos en muchos otros órganos. La amiloidosis por TTR se manifiesta en varias formas. Cuando el sistema nervioso periférico se ve afectado de manera más prominente, la enfermedad se denomina polineuropatía
20 amiloidótica familiar (FAP). Cuando el corazón está involucrado principalmente, pero el sistema nervioso no, la enfermedad se denomina miocardiopatía amiloidótica familiar (FAC). Un tercer tipo importante de amiloidosis por TTR es la amiloidosis leptomeníngea, también conocida como amiloidosis leptomeníngea o meningocerebrovascular, amiloidosis del sistema nervioso central (CNS) o forma VII de amiloidosis. Las mutaciones en la TTR
25 también pueden causar opacidades vítreas amiloides, síndrome del túnel carpiano y hipertiroidea eutiroidea, que es una enfermedad no amiloide que se considera secundaria a una mayor asociación de la tiroxina con la TTR debido a una molécula de TTR mutante

con mayor afinidad por la tiroxina. Véase, *p. ej.*, Moses *et al.* (1982) *J. Clin. Invest.*, 86, 2025-2033.

Los alelos anómalos de la TTR se pueden heredar o adquirir mediante mutaciones somáticas. Guan, J. *et al.* (4 de noviembre de 2011) Current perspectives on cardiac amyloidosis, *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, doi:10.1152/ajpheart.00815.2011. La ATTR asociada con la transtiretina es la forma más frecuente de amiloidosis sistémica hereditaria. Lobato, L. (2003) *J. Nephrol.*, 16:438-442. Las mutaciones de la TTR aceleran el proceso de formación de amiloides en la TTR y son el factor de riesgo más importante para el desarrollo de la ATTR. Se sabe que más de 85 variantes amiloidógenas de la TTR causan amiloidosis familiar sistémica. Las mutaciones de la TTR generalmente dan lugar a la deposición amiloide sistémica, con afectación particular del sistema nervioso periférico, aunque algunas mutaciones se asocian con miocardiopatía u opacidades vítreas. *Ibid.*

La mutación V30M es la mutación de TTR más prevalente. Véase, *p. ej.*, Lobato, L. (2003) *J Nephrol*, 16:438-442. La mutación V122I es portada por el 3,9 % de la población afroamericana y es la causa más frecuente de FAC. Jacobson, D.R. *et al.* (1997) *N. Engl. J. Med.* 336 (7): 466–73. Se estima que la SSA afecta a más del 25 % de la población mayor de 80 años. Westermarck, P. *et al.* (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87 (7): 2843–5.

Las enfermedades adicionales asociadas con la TTR incluyen enfermedades oculares, *p. ej.*, enfermedad de Stargardt, retinopatía diabética, degeneración macular relacionada con la edad (AMD), *p. ej.*, AMD seca y AMD húmeda; trastornos metabólicos, *p. ej.*, trastornos de la homeostasis de la glucosa y los lípidos, *p. ej.*, resistencia a la insulina asociada con la diabetes tipo II, y enfermedad cardiovascular.

Por ejemplo, un defecto patológico primario en el trastorno ocular hereditario, la enfermedad de Stargardt, es la acumulación excesiva de bisretinoides citotóxicos de lipofusina en la retina. La acumulación dependiente de la edad de la lipofusina en el epitelio pigmentario retiniano (RPE) coincide con el aumento dependiente de la edad en la incidencia de la forma atrófica (seca) de la degeneración macular relacionada con la edad (AMD) y, por lo tanto, es un factor patogénico clave que contribuye a la progresión de la

AMD. La síntesis de lipofusina bisretinoide en la retina depende del influjo de retinol sérico de la circulación en el RPE y la formación del complejo de proteína 4 de unión al retinol terciario (RBP4)-transtiretina-retinol en el suero es necesaria para este influjo. Se ha demostrado que la disminución de la expresión de la TTR, que regula la RBP4, provoca una

5 disminución significativa tanto en el nivel de RBP4 como en la cantidad de retinol que se administra al tejido diana, lo que inhibe la formación de bisretinoides de lipofusina.

Además, hace muchos años se informó sobre RBP4 elevado en la circulación de pacientes diabéticos tipo 2 (Basualdo C, *et al.*, (1997). *J. Am. Coll. Nutr.* 16, 39–45; Abahusain *et al.*, (1999). *Eur. J. Clin. Nutr.* 53, 630–635) y se demostró que la

10 sobreexpresión transgénica de RBP4 o la inyección de RBP4 humana en ratones normales causan resistencia a la insulina. Por el contrario, la delección genética de RBP4 o la disminución de los niveles de RBP4 en circulación tuvo el efecto opuesto y protegió a los ratones de desarrollar resistencia a la insulina (Yang, Q., *et al.* (2005). *Nature* 436, 356–362). Además, se documentaron asociaciones positivas para los niveles de expresión de

15 RBP4 o RBP4 circulantes con factores de riesgo de enfermedad cardiovascular (CVD) establecidos, incluidos el síndrome metabólico, la obesidad general/central, la dislipidemia, los marcadores inflamatorios y la hipertensión (Qi Q, *et al.*, *J Clin Endocrinol Metab.* 2007; 92:4827–4834; Ingelsson E, *et al.*, *Atherosclerosis.* 2009; 206:239–244). Como se indicó anteriormente, la TTR regula la RBP4 y, por lo tanto, la disminución de la TTR provoca una

20 disminución de la RBP4.

Cualquier tratamiento actual disponible para enfermedades asociadas con la TTR, como enfermedades oculares. *p. ej.*, la enfermedad de Stargardt, retinopatía diabética, degeneración macular asociada a la edad (AMD), *p. ej.*, AMD seca y AMD húmeda; un trastorno metabólico, *p. ej.*, un trastorno de la homeostasis de la glucosa y los lípidos, *p. ej.*,

25 resistencia a la insulina asociada con la diabetes tipo II, y una enfermedad cardiovascular, no son completamente eficaces y pueden provocar efectos secundarios graves, como hemorragia conjuntival, aumento de la presión ocular, infección, desprendimiento de retina e inflamación ocular. Del mismo modo, los tratamientos actuales para enfermedades

metabólicas, que incluyen dieta, ejercicio y medicamentos para ayudar a controlar la presión arterial, el colesterol y los niveles de azúcar en sangre, no siempre son eficaces.

En consecuencia, existe una necesidad en la técnica de tratamientos eficaces para las enfermedades asociadas con la TTR.

5

COMPENDIO DE LA INVENCION

La presente invención proporciona composiciones de ARNi que efectúan la escisión mediada por el complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC, por sus siglas en inglés) de los transcritos de ARN de un gen que codifica transtiretina (TTR). El gen TTR

10 puede estar dentro de una célula, por ejemplo, una célula dentro de un sujeto, tal como un sujeto humano. La presente invención también proporciona métodos para usar las composiciones de ARNi de la invención para inhibir la expresión de un gen de TTR y/o para tratar a un sujeto que se beneficiaría de inhibir o reducir la expresión de un gen de TTR, *p. ej.*, un sujeto que sufre o es propenso a sufrir de un trastorno asociado a la TTR, *p. ej.*,

15 amiloidosis sistémica senil (SSA), amiloidosis familiar sistémica, polineuropatía amiloidótica familiar (FAP), miocardiopatía amiloidótica familiar (FAC), amiloidosis leptomeningea/del sistema nervioso central (CNS), hipertiroidismo, una enfermedad ocular, *p. ej.*, la enfermedad de Stargardt, retinopatía diabética, degeneración macular asociada a la edad (AMD), *p. ej.*, AMD seca y AMD húmeda; un trastorno metabólico, *p. ej.*, un trastorno de la

20 homeostasis de la glucosa y los lípidos, *p. ej.*, resistencia a la insulina asociada con la diabetes tipo II, y una enfermedad cardiovascular.

En consecuencia, en un aspecto, la invención proporciona un agente de ácido ribonucleico bicatenario (ARNbc) para inhibir la expresión de la transtiretina (TTR) en una célula, en donde el agente de ARNbc comprende una cadena sentido y una cadena

25 antisentido que forma una región de cadena doble, en donde la cadena sentido comprende al menos 15, *p. ej.*, 15, 16, 17, 18, 19, 20, o 21, nucleótidos contiguos que difieren en no más de 3, *p. ej.*, 3, 2, 1, o 0, nucleótidos de la secuencia de nucleótidos de 5'-AGAGTAUUC CAUUUUUACU -3' y la cadena antisentido comprende al menos 15, *p. ej.*, 15,

16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, o 23, nucleótidos contiguos que difieren en no más de 3, *p. ej.*, 3, 2, 1, o 0, nucleótidos de la secuencia de nucleótidos de 5'- AGUAAAAAUGGAAUACUCUUG -3', en donde todos los nucleótidos de la cadena sentido y todos los nucleótidos de la cadena antisentido comprenden una modificación de nucleótidos seleccionada del grupo

5 que consiste en una modificación 2'-O-metilo y una modificación 2'-fluoro; en donde la cadena sentido comprende al menos 2 2'-fluoro modificaciones; en donde la cadena antisentido comprende al menos 2 2'-fluoro modificaciones; en donde la cadena sentido comprende dos enlaces de fosforotioato; en donde la cadena antisentido comprende cuatro enlaces de fosforotioato; y en donde al menos una cadena se conjuga a un ligando.

10 En una modalidad, la cadena de sentido comprende 2-6 modificaciones de 2'-fluoro.

En una modalidad, la cadena de sentido comprende 4 modificaciones de 2'-fluoro.

En una modalidad, las 4 modificaciones de 2'-fluoro se ubican en las posiciones 7 y 9-11 del extremo 5' de la cadena de sentido.

En una modalidad, la cadena de sentido comprende 3 modificaciones de 2'-fluoro.

15 En una modalidad, las 3 modificaciones de 2'-fluoro se ubican en las posiciones 7-9 del extremo 5' de la cadena de sentido.

En una modalidad, la cadena antisentido comprende 2-6 modificaciones de 2'-fluoro.

En una modalidad, la cadena antisentido comprende 4 modificaciones de 2'-fluoro.

20 En una modalidad, las 4 modificaciones de 2'-fluoro se ubican en las posiciones 2, 6, 14 y 16 del extremo 5' de la cadena antisentido.

En una modalidad, la cadena antisentido comprende 2 modificaciones de 2'-fluoro.

En una modalidad, las 2 modificaciones de 2'-fluoro se ubican en las posiciones 14 y 16 del extremo 5' de la cadena antisentido.

25 En una modalidad, la cadena de sentido comprende dos enlaces de internucleótidos de fosforotioato entre los tres nucleótidos terminales del extremo 5'.

En una modalidad, la cadena antisentido comprende dos enlaces de internucleótidos de fosforotioato entre los tres nucleótidos terminales del extremo 3' y dos enlaces de internucleótidos de fosforotioato entre los tres nucleótidos terminales del extremo 5'.

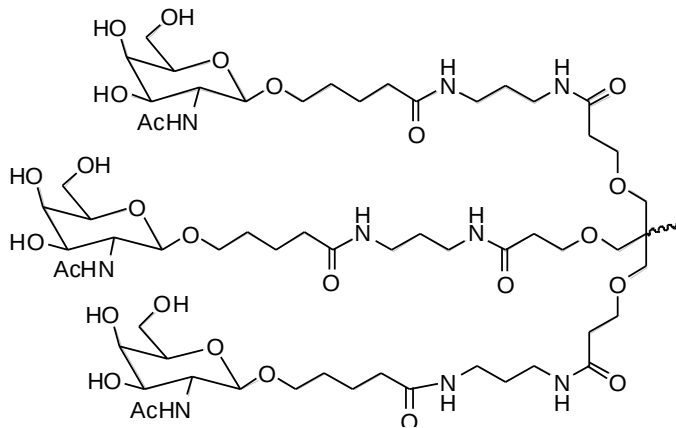
En una modalidad, el ligando se conjuga al extremo 3' de la cadena sentido del agente de ARNbc.

En una modalidad, el ligando es un derivado de N-acetilgalactosamina (GalNAc).

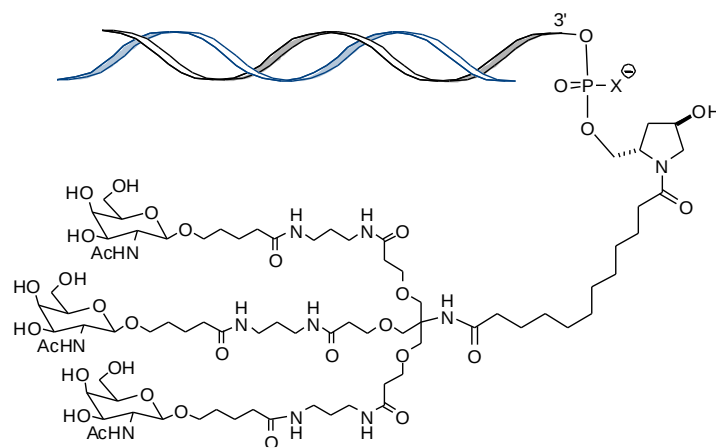
En una modalidad, el ligando es uno o más derivados de GalNAc unidos a través de

5 un enlazador ramificado monovalente, bivalente o trivalente.

En una modalidad, el ligando es



En una modalidad, el agente de ARNbc se conjuga al ligando como se muestra en el siguiente esquema



10

y, en donde X es O o S.

En una modalidad, la X es O.

En una modalidad, la región bicatenaria tiene 19-30 pares de nucleótidos de longitud.

15

En una modalidad, la región bicatenaria tiene 19-25 pares de nucleótidos de longitud.

En una modalidad, la región bicatenaria tiene 19-23 pares de nucleótidos de longitud.

En una modalidad, la región bicatenaria tiene 23-27 pares de nucleótidos de longitud.

5 En una modalidad, la región bicatenaria tiene 21-23 pares de nucleótidos de longitud.

En una modalidad, cada cadena no es independientemente más de 30 nucleótidos de longitud.

10 En una modalidad, la cadena de sentido es de 21 nucleótidos de longitud y la cadena antisentido es de 23 nucleótidos de longitud.

En una modalidad, al menos una cadena comprende un extremo saliente de 3' de al menos 1 nucleótido.

En una modalidad, al menos una cadena comprende un extremo saliente de 3' de al menos 2 nucleótidos.

15 En una modalidad, la cadena de sentido comprende la secuencia de nucleótidos 5'-CAAGAGUAUCCA UUUUUACU-3' y la cadena antisentido comprende la secuencia de nucleótidos 5'-AGUAAAAUGGAAUACUCUUGGU-3'.

20 En una modalidad, la cadena de sentido comprende la secuencia de nucleótidos 5'-CCAAGAGUAUCCA UUUUUUAU -3' y la cadena antisentido comprende la secuencia de nucleótidos 5'-AUAAAAUGGAAUACUCUUGGUU -3'

25 En una modalidad, la secuencia de nucleótidos de la cadena de sentido difiere en no más de 4 bases de la secuencia de nucleótidos de 5'-csasagagUfaUfUfCfcauuuuuacu-3' y la secuencia de nucleótidos de la cadena antisentido difiere en no más de 4 bases de la secuencia de nucleótidos de 5'-asGfsuaaAfaauggaaUfaCfucuugsgsu-3', en donde a, c, g y u son 2'-O-metilo (2'-OMe) A, C, G y U; Af, Cf, Gf y Uf son 2'-fluoro A, C, G y U; y s es un enlace fosforotioato.

En una modalidad, la secuencia de nucleótidos de la cadena de sentido difiere en no más de 3 bases de la secuencia de nucleótidos de 5'-csasagagUfaUfUfCfcauuuuuacu-3' y la

secuencia de nucleótidos de la cadena antisentido difiere en no más de 3 bases de la secuencia de nucleótidos de 5'-asGfsuaaAfaauggaaUfaCfucuugsgsu-3'.

En una modalidad, la secuencia de nucleótidos de la cadena de sentido difiere en no más de 2 bases de la secuencia de nucleótidos de 5'-csasagagUfaUfUfCfcauuuuuacu-3' y la
5 secuencia de nucleótidos de la cadena antisentido difiere en no más de 2 bases de la secuencia de nucleótidos de 5'-asGfsuaaAfaauggaaUfaCfucuugsgsu-3'.

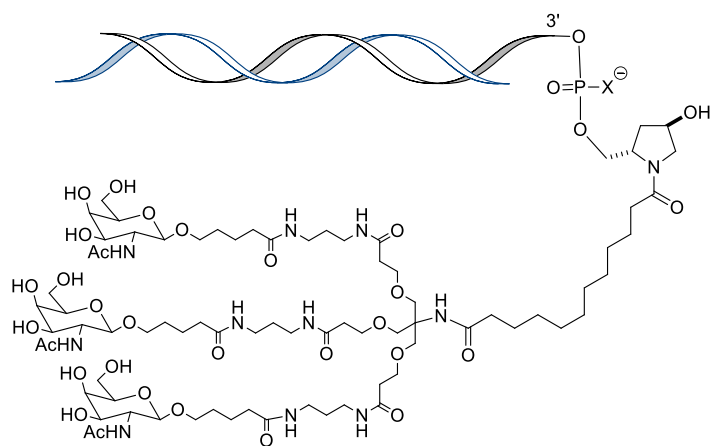
En una modalidad, la secuencia de nucleótidos de la cadena de sentido difiere en no más de 1 base de la secuencia de nucleótidos de 5'-csasagagUfaUfUfCfcauuuuuacu-3' y la
10 secuencia de nucleótidos de la cadena antisentido difiere en no más de 1 base de la secuencia de nucleótidos de 5'-asGfsuaaAfaauggaaUfaCfucuugsgsu-3'.

En una modalidad, la cadena sentido comprende la secuencia de nucleótidos de 5'-csasagagUfaUfUfCfcauuuuuacu-3' y la cadena antisentido comprende la secuencia de nucleótidos de 5'-asGfsuaaAfaauggaaUfaCfucuugsgsu-3'.

En una modalidad, la cadena sentido consiste en la secuencia de nucleótidos de 5'-
15 csasagagUfaUfUfCfcauuuuuacu-3' y la cadena antisentido consiste en la secuencia de nucleótidos de 5'-asGfsuaaAfaauggaaUfaCfucuugsgsu-3'.

En una modalidad, la cadena sentido comprende la secuencia de nucleótidos de 5'-csasagagUfaUfUfCfcauuuuuacuL96-3' y la cadena antisentido comprende la secuencia de nucleótidos de 5'-asGfsuaaAfaauggaaUfaCfucuugsgsu-3', en donde L96 es N-[tris(GalNAc-
20 alquil)-amidodecanoil)]-4-hidroxiprolinol.

En una modalidad, el agente de ARNbc se conjuga al ligando como se muestra en el siguiente esquema



, en donde X es O.

En una modalidad, la secuencia de nucleótidos de la cadena de sentido difiere en no más de 4 bases de la secuencia de nucleótidos de 5'-cscsaagaGfuAfUfUfccauuuuuau-3' y la secuencia de nucleótidos de la cadena antisentido difiere en no más de 4 bases de la secuencia de nucleótidos de 5'- asUfsaaaAfauggaauAfcUfcuuggsusu -3', en donde a, c, g y u son 2'-O-metilo (2'-OMe) A, C, G y U; Af, Cf, Gf y Uf son 2'-fluoro A, C, G y U; y s es un enlace fosforotioato.

En una modalidad, la secuencia de nucleótidos de la cadena de sentido difiere en no más de 3 bases de la secuencia de nucleótidos de 5'-cscsaagaGfuAfUfUfccauuuuuau-3' y la secuencia de nucleótidos de la cadena antisentido difiere en no más de 3 bases de la secuencia de nucleótidos de 5'- asUfsaaaAfauggaauAfcUfcuuggsusu -3'.

En una modalidad, la secuencia de nucleótidos de la cadena de sentido difiere en no más de 2 bases de la secuencia de nucleótidos de 5'-cscsaagaGfuAfUfUfccauuuuuau-3' y la secuencia de nucleótidos de la cadena antisentido difiere en no más de 2 bases de la secuencia de nucleótidos de 5'- asUfsaaaAfauggaauAfcUfcuuggsusu -3'.

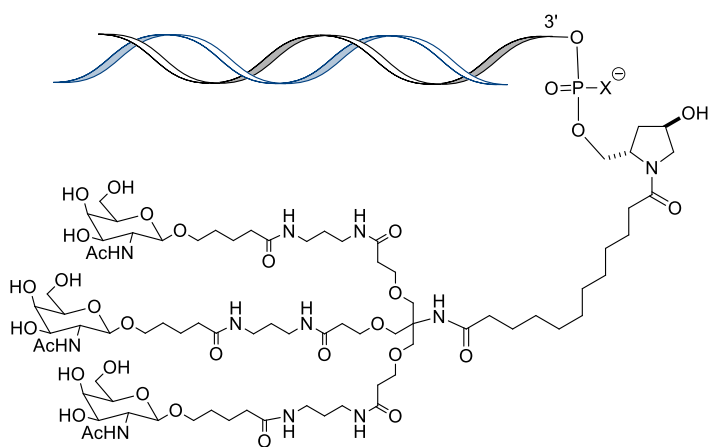
En una modalidad, la secuencia de nucleótidos de la cadena de sentido difiere en no más de 1 base de la secuencia de nucleótidos de 5'-cscsaagaGfuAfUfUfccauuuuuau-3' y la secuencia de nucleótidos de la cadena antisentido difiere en no más de 1 base de la secuencia de nucleótidos de 5'- asUfsaaaAfauggaauAfcUfcuuggsusu -3'.

En una modalidad, la cadena de sentido comprende la secuencia de nucleótidos de 5'-cscsaagaGfuAfUfUfccauuuuuau-3' y la cadena antisentido comprende la secuencia de nucleótidos de 5'- asUfsaaaAfauggaauAfcUfcuuggsusu -3'.

En una modalidad, la cadena de sentido consiste en la secuencia de nucleótidos de 5'-cscsaagaGfuAfUfUfccauuuuuau-3' y la cadena antisentido consiste en la secuencia de nucleótidos de 5'- asUfsaaaAfauggaauAfcUfcuuggsusu -3'.

En una modalidad, la cadena de sentido comprende la secuencia de nucleótidos de 5'-cscsaagaGfuAfUfUfccauuuuuau-3' y la cadena antisentido comprende la secuencia de nucleótidos de 5'- asUfsaaaAfauggaauAfcUfcuuggsusu -3', en donde L96 es N-[tris(GalNAc-
alquil)-amidodecanoil)]-4-hidroxiprolinol.

En una modalidad, el agente de ARNbc se conjuga al ligando como se muestra en el siguiente esquema



, en donde X es O.

En una modalidad, la secuencia de nucleótidos de la cadena de sentido difiere en no más de 4 bases de la secuencia de nucleótidos de 5'-asgsagdTaUfUfCfcauuuuuacu-3' y la secuencia de nucleótidos de la cadena de antisentido difiere en no más de 4 bases de la secuencia de nucleótidos de 5'- asdGsuaadAadAauggaaUfaCfucususg -3', en donde a, c, g y u son 2'-O-metil (2'-OMe) A, C, G y U; Af, Cf, Gf y Uf son 2'-fluoro A, C, G y U; dT es 2'-desoxitimidina -3'-fosfato; dG es 2'-desoxiguanosina-3'-fosfato; dA es 2'-desoxiadenosina-3'-fosfato; y s es un enlace fosforotioato.

En una modalidad, la secuencia de nucleótidos de la cadena de sentido difiere en no más de 3 bases de la secuencia de nucleótidos de 5'-asgsagdTaUfUfCfcauuuuuacu-3' y la secuencia de nucleótidos de la cadena antisentido difiere en no más de 3 bases de la secuencia de nucleótidos de 5'- asdGsuadAadAauggaaUfaCfucususg -3'.

5 En una modalidad, la secuencia de nucleótidos de la cadena de sentido difiere en no más de 2 bases de la secuencia de nucleótidos de 5'-asgsagdTaUfUfCfcauuuuuacu-3' y la secuencia de nucleótidos de la cadena antisentido difiere en no más de 2 bases de la secuencia de nucleótidos de 5'- asdGsuadAadAauggaaUfaCfucususg -3'.

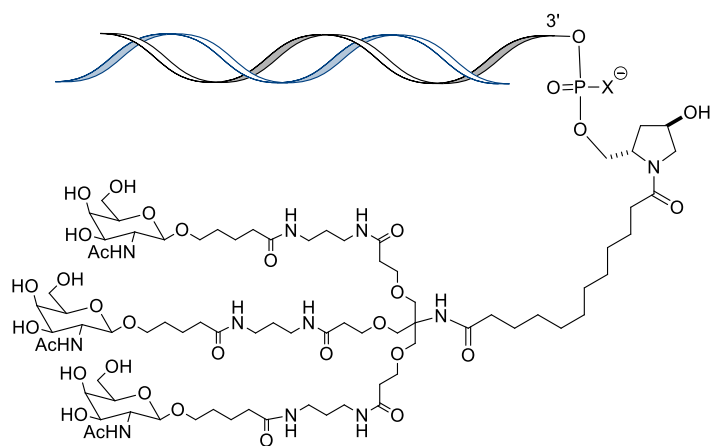
10 En una modalidad, la secuencia de nucleótidos de la cadena de sentido difiere en no más de 1 base de la secuencia de nucleótidos de 5'-asgsagdTaUfUfCfcauuuuuacu-3' y la secuencia de nucleótidos de la cadena antisentido difiere en no más de 1 base de la secuencia de nucleótidos de 5'- asdGsuadAadAauggaaUfaCfucususg -3'.

15 En una modalidad, la cadena sentido comprende la secuencia de nucleótidos de 5'- asgsagdTaUfUfCfcauuuuuacu-3' y la secuencia de nucleótidos de la cadena antisentido comprende la secuencia de nucleótidos de 5'- asdGsuadAadAauggaaUfaCfucususg -3'.

En una modalidad, la cadena sentido consiste en la secuencia de nucleótidos de 5'- asgsagdTaUfUfCfcauuuuuacu-3' y la secuencia de nucleótidos de la cadena antisentido consiste en la secuencia de nucleótidos de 5'- asdGsuadAadAauggaaUfaCfucususg -3'.

20 En una modalidad, la cadena sentido comprende la secuencia de nucleótidos de 5'- asgsagdTaUfUfCfcauuuuuacu-3' y la secuencia de nucleótidos de la cadena antisentido comprende la secuencia de nucleótidos de 5'- asdGsuadAadAauggaaUfaCfucususg -3', en donde L96 es N-[tris(GalNAc-alkyl)-amidodecanoil]-4-hidroxiprolinol.

En una modalidad, el agente de ARNbc se conjuga al ligando como se muestra en el siguiente esquema



La presente invención también proporciona células y composiciones farmacéuticas, *p. ej.*, que comprenden un portador farmacéuticamente aceptable, que comprende los agentes de ARNbc de la invención.

5 En una modalidad, las composiciones farmacéuticas de la invención comprenden una solución no amortiguada, *p. ej.*, solución salina o agua.

En una modalidad, las composiciones farmacéuticas de la invención comprenden una solución amortiguada, *p. ej.*, una solución que comprende acetato, citrato, prolamina, carbonato, o fosfato o cualquier combinación de estos. En una modalidad, la solución
10 amortiguadora es solución salina amortiguada con fosfato (PBS).

En un aspecto, la presente invención proporciona un método para inhibir la expresión de un gen de transtiretina (TTR) en una célula. El método incluye poner en contacto la célula con un agente de ARNbc de la invención, o una composición farmacéutica de la invención, de esta manera se inhibe la expresión del gen TTR en la
15 célula.

En una modalidad, la célula está dentro de un sujeto.

En una modalidad, el sujeto es un humano.

En una modalidad, el sujeto es un sujeto que padece de una enfermedad asociada a la TTR.

20 En una modalidad, el sujeto es un sujeto en riesgo de desarrollar una enfermedad asociada a la TTR.

En una modalidad, el sujeto es portador de una mutación del gen de la TTR que se asocia con el desarrollo de una enfermedad asociada a la TTR.

En una modalidad, la enfermedad asociada a la TTR se selecciona del grupo que consiste en amiloidosis sistémica senil (SSA), amiloidosis familiar sistémica, polineuropatía amiloidótica familiar (FAP), miocardiopatía amiloidótica familiar (FAC), amiloidosis leptomeníngea/del sistema nervioso central (CNS), hipertiroxinemia, una enfermedad ocular, *p. ej.*, la enfermedad de Stargardt, retinopatía diabética, degeneración macular asociada a la edad (AMD), *p. ej.*, AMD seca y AMD húmeda; un trastorno metabólico, *p. ej.*, un trastorno de la homeostasis de la glucosa y los lípidos, *p. ej.*, resistencia a la insulina asociada con la diabetes tipo II, y una enfermedad cardiovascular.

En una modalidad, el sujeto tiene una amiloidosis asociada a TTR y dicho método reduce un depósito de TTR amiloide en dicho sujeto.

En una modalidad, el contacto de la célula con el agente de ARNbc inhibe la expresión de la TTR en al menos un 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 95 %.

En una modalidad, inhibir la expresión de TTR disminuye el nivel de proteína TTR en el suero del sujeto en al menos un 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 95 %.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para tratar a un sujeto que padece de una enfermedad asociada a la TTR o que está en riesgo de desarrollar una enfermedad asociada a la TTR. El método incluye administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz o una cantidad profilácticamente eficaz de un agente de ARNi de doble cadena de la invención, o una composición farmacéutica de la invención, para tratar de esta manera a dicho sujeto.

En una modalidad, el sujeto es un humano.

En una modalidad, el sujeto es un sujeto que padece de una enfermedad asociada a la TTR.

En una modalidad, el sujeto es un sujeto en riesgo de desarrollar una enfermedad asociada a la TTR.

En una modalidad, el sujeto es portador de una mutación del gen de la TTR que se asocia con el desarrollo de una enfermedad asociada a la TTR.

En una modalidad, la enfermedad asociada a la TTR se selecciona del grupo que consiste en amiloidosis sistémica senil (SSA), amiloidosis familiar sistémica, polineuropatía amiloidótica familiar (FAP), miocardiopatía amiloidótica familiar (FAC), amiloidosis leptomeníngea/del sistema nervioso central (CNS), hipertiroxinemia, una enfermedad ocular, *p. ej.*, la enfermedad de Stargardt, retinopatía diabética, degeneración macular asociada a la edad (AMD), *p. ej.*, AMD seca y AMD húmeda; un trastorno metabólico, *p. ej.*, un trastorno de la homeostasis de la glucosa y los lípidos, *p. ej.*, resistencia a la insulina asociada con la diabetes tipo II, y una enfermedad cardiovascular.

En una modalidad, el sujeto tiene una amiloidosis mediada por transtiretina (amiloidosis ATTR) y dicho método reduce un depósito de TTR amiloide en dicho sujeto.

En una modalidad, la ATTR es ATTR hereditaria (h-ATTR).

En una modalidad, la ATTR es ATTR no hereditaria (wt ATTR).

En una modalidad, la administración del agente de ARNbc o la composición farmacéutica al sujeto mejora al menos una indicación de deterioro neurológico, calidad de vida, daño nervioso en curso, o deterioro cardiovascular en el sujeto.

En una modalidad, el agente de ARNi bicatenario se administra al sujeto humano mediante administración subcutánea o administración intravenosa.

En una modalidad, la administración subcutánea es la autoadministración.

En una modalidad, la autoadministración es *a través* de una jeringa precargada o una jeringa autoinyectora.

En una modalidad, el método comprende además evaluar el nivel de expresión del ARNm de la TTR o expresión de la proteína TTR en una muestra derivada del sujeto humano.

En un aspecto, la presente invención proporciona un kit que comprende un agente de ARNbc de la invención o una composición farmacéutica de la invención y, opcionalmente, instrucciones de uso.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un vial que comprende un agente de ARNbc de la invención o una composición farmacéutica de la invención.

En un aspecto, la presente invención proporciona una jeringa que comprende un agente de ARNbc de la invención o una composición farmacéutica de la invención.

5 En un aspecto, la presente invención proporciona un complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC) que comprende una cadena antisentido de un agente de ARNbc de la invención.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

10 La Figura 1 es un gráfico que muestra los niveles de ARNm de TTR humana en ratones (n = 3 por grupo) a los que se les administró por vía subcutánea una dosis única de 1 mg/kg de los dúplex de ARNbc indicados, el día 7. Los niveles de ARNm de TTR humana se muestran en relación con los niveles de control detectados con el tratamiento con PBS.

La Figura 2 es un gráfico que muestra el efecto de la administración de una dosis
15 única subcutánea de 0,5 mg/kg de AD-649263, AD-1134938, AD-649264, AD-1134966, o AD-65496 en los niveles de ARNm de TTR en primates no humanos.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención proporciona composiciones de ARNi que efectúan la escisión
20 mediada por el complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC, por sus siglas en inglés) de los transcritos de ARN de un gen de transtiretina (TTR). El gen puede estar dentro de una célula, por ejemplo, una célula dentro de un sujeto, tal como un humano. El uso de estos ARNi permite la degradación dirigida de los ARNm del gen correspondiente (TTR) en los mamíferos.

25 Los ARNi de la invención se diseñaron para dirigirse al gen de la transtiretina (TTR) humana, que incluye porciones del gen que se conserva en los ortólogos de TTR de otras especies de mamíferos. Sin pretender limitarse por la teoría, se cree que una combinación de los sitios diana específicos, las modificaciones específicas y la unión a un ligando en

estos ARNi confieren a los ARNi de la invención una eficacia, estabilidad, potencia, durabilidad y seguridad mejoradas. Otra característica inesperada y muy deseable de los ARNi de la invención es que exhiben actividad fuera del objetivo nula o muy baja. En los ejemplos presentados en la presente descripción, los inventores han identificado agentes de ARNbc de la invención que exhiben la actividad fuera del objetivo menos observada de cualquier agente de ARNbc dirigido a cualquier gen hasta la fecha.

La presente invención también proporciona métodos para tratar y prevenir un trastorno asociado a la transtiretina (TTR), *p. ej.*, amiloidosis sistémica senil (SSA), amiloidosis familiar sistémica, polineuropatía amiloidótica familiar (FAP), miocardiopatía amiloidótica familiar (FAC), amiloidosis leptomeníngea/del sistema nervioso central (CNS), hipertiroxinemia, una enfermedad ocular, *p. ej.*, la enfermedad de Stargardt, retinopatía diabética, degeneración macular asociada a la edad (AMD), *p. ej.*, AMD seca y AMD húmeda; un trastorno metabólico, *p. ej.*, un trastorno de la homeostasis de la glucosa y los lípidos, *p. ej.*, resistencia a la insulina asociada con la diabetes tipo II, o una enfermedad cardiovascular, mediante el uso de composiciones de ARNi que afectan la escisión mediada por el complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC) de transcripciones de ARN de un gen de TTR.

Los ARNi de la invención incluyen una cadena de ARN (la cadena antisentido) que tiene una región que es de hasta aproximadamente 30 nucleótidos o menos de longitud, *por ejemplo*, 19-30, 19-29, 19-28, 19-27, 19-26, 19-25, 19-24, 19-23, 19-22, 19-21, 19-20, 20-30, 20-29, 20-28, 20-27, 20-26, 20-25, 20-24, 20-23, 20-22, 20-21, 21-30, 21-29, 21-28, 21-27, 21-26, 21-25, 21-24, 21-23, o 21-22 nucleótidos de longitud, cuya región es sustancialmente complementaria a al menos parte de un transcrito de ARNm de un gen de TTR.

En determinadas modalidades, una o ambas de las cadenas de los agentes de ARNi bicatenarios de la invención son de hasta 66 nucleótidos de longitud, *por ejemplo*, 36-66, 26-36, 25-36, 31-60, 22-43, 27-53 nucleótidos de longitud, con una región de al menos 19 nucleótidos contiguos que es sustancialmente complementaria a al menos una parte de un transcrito de ARNm de un gen de TTR. En algunas modalidades, tales agentes de ARNi

que tienen cadenas antisentido de mayor longitud pueden incluir, por ejemplo, una segunda cadena de ARN (la cadena de sentido) de 20-60 nucleótidos de longitud en donde las cadenas de sentido y antisentido forman un dúplex de 18-30 nucleótidos contiguos.

El uso de los ARNi de la invención permite la degradación dirigida de los ARNm del gen correspondiente (gen de TTR) en los mamíferos. Mediante el uso de ensayos *in vitro*, los presentes inventores demostraron que los ARNi dirigidos al gen de la TTR pueden mediar potentemente en el ARNi, lo que resulta en una inhibición significativa de la expresión del gen de la TTR. Por lo tanto, métodos y composiciones que incluyen estos ARNi son útiles para tratar a un sujeto que tiene un trastorno asociado a la TTR, *p. ej.*, amiloidosis sistémica senil (SSA), amiloidosis familiar sistémica, polineuropatía amiloidótica familiar (FAP), miocardiopatía amiloidótica familiar (FAC), amiloidosis leptomeníngea/del sistema nervioso central (CNS), hipertiroxinemia, una enfermedad ocular, *p. ej.*, la enfermedad de Stargardt, retinopatía diabética, degeneración macular asociada a la edad (AMD), *p. ej.*, AMD seca y AMD húmeda; un trastorno metabólico, *p. ej.*, un trastorno de la homeostasis de la glucosa y los lípidos, *p. ej.*, resistencia a la insulina asociada con la diabetes tipo II, o una enfermedad cardiovascular.

En consecuencia, la presente invención proporciona métodos y terapias de combinación para tratar a un sujeto que tiene un trastorno que se beneficiaría de inhibir o reducir la expresión de un gen de TTR, *p. ej.*, un trastorno asociado con la transtiretina (TTR), tal como, amiloidosis sistémica senil (SSA), amiloidosis familiar sistémica, polineuropatía amiloidótica familiar (FAP), miocardiopatía amiloidótica familiar (FAC), amiloidosis leptomeníngea/del sistema nervioso central (CNS), hipertiroxinemia, una enfermedad ocular, *p. ej.*, la enfermedad de Stargardt, retinopatía diabética, degeneración macular asociada a la edad (AMD), *p. ej.*, AMD seca y AMD húmeda; un trastorno metabólico, *p. ej.*, un trastorno de la homeostasis de la glucosa y los lípidos, *p. ej.*, resistencia a la insulina asociada con la diabetes tipo II, y una enfermedad cardiovascular, mediante el uso de composiciones de ARNi que afectan la escisión mediada por el

complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC) de transcripciones de ARN de un gen de TTR.

La presente invención también proporciona métodos para prevenir al menos un síntoma en un sujeto que tiene un trastorno que se beneficiaría de inhibir o reducir la expresión de un gen de TTR, *p. ej.*, un trastorno asociado con la transtiretina (TTR), tal como amiloidosis sistémica senil (SSA), amiloidosis familiar sistémica, polineuropatía amiloidótica familiar (FAP), miocardiopatía amiloidótica familiar (FAC), amiloidosis leptomeníngea/del sistema nervioso central (CNS), hipertiroidismo, una enfermedad ocular, *p. ej.*, la enfermedad de Stargardt, retinopatía diabética, degeneración macular asociada a la edad (AMD), *p. ej.*, AMD seca y AMD húmeda; un trastorno metabólico, *p. ej.*, un trastorno de la homeostasis de la glucosa y los lípidos, *p. ej.*, resistencia a la insulina asociada con la diabetes tipo II, y una enfermedad cardiovascular.

La siguiente descripción detallada describe cómo fabricar y usar composiciones que contienen ARNi para inhibir la expresión de un gen de la TTR, así como también composiciones, usos y métodos para tratar a sujetos que se beneficiarían de la inhibición y/o reducción de la expresión de un gen de la TTR, *por ejemplo*, sujetos susceptibles o que se diagnosticaron con un trastorno asociado con la TTR.

I. Definiciones

Para que la presente invención pueda entenderse más fácilmente, primero se definen determinados términos. Además, debe notarse que cada vez que se menciona un valor o rango de valores de un parámetro, se pretende que los valores y rangos intermedios a los valores mencionados también se pretende que formen parte de esta invención.

Los artículos “un” y “uno/una” se usan en la presente descripción para referirse a uno o a más de uno (*es decir*, al menos uno) del objeto gramatical del artículo. A manera de ejemplo, “un elemento” significa un elemento o más de un elemento, *por ejemplo*, una pluralidad de elementos.

El término “incluido” se usa en la presente descripción para referirse a la frase “incluido pero no limitado a”, y se usa indistintamente con esta.

El término “o” se usa en la presente descripción para referirse al término “y/o”, y se usa indistintamente con este, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por ejemplo, “cadena de sentido o cadena antisentido” se entiende como “cadena de sentido o cadena antisentido o cadena de sentido y cadena antisentido”.

El término “aproximadamente” se usa en la presente descripción para referirse a los rangos típicos de tolerancias en la técnica. Por ejemplo, “aproximadamente” puede entenderse como aproximadamente 2 desviaciones estándar de la media. En determinadas modalidades, aproximadamente significa ± 10 %. En determinadas modalidades, aproximadamente significa ± 5 %. Cuando aproximadamente está presente antes de una serie de números o un rango, se entiende que “aproximadamente” puede modificar cada uno de los números en la serie o rango.

El término “al menos”, “no menos de”, u “o más” antes de un número o serie de números se entiende que incluye el número adyacente al término “al menos”, y todos los números o números enteros posteriores que pueden incluirse lógicamente, como queda claro a partir del contexto. Por ejemplo, la cantidad de nucleótidos en una molécula de ácido nucleico debe ser un número entero. Por ejemplo, “al menos 19 nucleótidos de una molécula de ácido nucleico de 21 nucleótidos” significa que 19, 20 o 21 nucleótidos tienen la propiedad indicada. Cuando al menos está presente antes de una serie de números o un rango, se entiende que “al menos” puede modificar cada uno de los números en la serie o rango.

Como se usa en la presente descripción, “no más de” u “o menos de” se entiende como el valor adyacente a la frase y valores o números enteros inferiores lógicos, como lógicos a partir del contexto, a cero. Por ejemplo, un dúplex con un extremo saliente de “no más de 2 nucleótidos” tiene un extremo saliente de 2, 1 o 0 nucleótidos. Cuando “no más de” está presente antes de una serie de números o un rango, se entiende que “no más de”

puede modificar cada uno de los números en la serie o rango. Como se usa en la presente descripción, los rangos incluyen tanto el límite superior como el inferior.

Como se usa en la presente descripción, los métodos de detección pueden incluir la determinación de que la cantidad de analito presente está por debajo del nivel de detección del método.

En caso de conflicto entre un sitio diana indicado y la secuencia de nucleótidos para una cadena de sentido o de antisentido, la secuencia indicada tiene prioridad.

En caso de conflicto entre una secuencia y su sitio indicado en un transcrito u otra secuencia, la secuencia de nucleótidos descrita en la descripción tiene prioridad.

Como se usa en la presente descripción, “transtiretina” (“TTR”) se refiere al gen y a la proteína bien conocidos. La TTR también se conoce como prealbúmina, HsT2651, PALB y TBPA. La TTR funciona como un transportador de la proteína de unión al retinol (RBP), la tiroxina (T4) y el retinol, y también actúa como proteasa. El hígado secreta TTR en la sangre, y el plexo coroideo secreta TTR en el líquido cefalorraquídeo. La TTR también se expresa en el páncreas y el epitelio pigmentario de la retina. La mayor relevancia clínica de la TTR es que la proteína TTR normal (de tipo silvestre) y mutante puede formar fibrillas amiloides que se acumulan en depósitos extracelulares, lo que provoca amiloidosis. Véase, *p. ej.*, Saraiva M.J.M. (2002) *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 4(12):1-11 para una revisión. La clonación molecular y la secuencia de nucleótidos de la transtiretina de rata, así como la distribución de la expresión del ARNm, fueron descritas por Dickson, P.W. *et al.* (1985) *J. Biol. Chem.* 260(13)8214-8219. La estructura cristalina de rayos X de la TTR humana se describió en Blake, C.C. *et al.* (1974) *J Mol Biol* 88, 1-12.

La secuencia de una transcripción del ARNm de la TTR humana puede encontrarse en el número de acceso de RefSeq del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) NM_000371.4 (SEQ ID NO:1; complemento inverso, SEQ ID NO:5). La secuencia de ARNm de TTR de ratón puede encontrarse en el número de acceso de RefSeq NM_013697.2 (SEQ ID NO:2; complemento inverso, SEQ ID NO:6). La secuencia de ARNm de TTR de rata puede encontrarse en el número de acceso de RefSeq NM_012681.1 (SEQ

ID NO:3; complemento inverso, SEQ ID NO:7). La secuencia de ARNm de la TTR de

Macaca fascicularis puede encontrarse en el número de acceso de RefSeq

NM_001283593.1 (SEQ ID NO:4; complemento inverso, SEQ ID NO:8). La secuencia de

ARNm de la TTR de *Macaca mulatta* puede encontrarse en el número de acceso de RefSeq

5 NM_001261679.1 (SEQ ID NO:9; complemento inverso, SEQ ID NO:10).

Ejemplos adicionales de secuencias de ARNm de TTR están fácilmente disponibles a través de bases de datos disponibles públicamente, por ejemplo, GenBank, UniProt, OMIM y el sitio web del proyecto del genoma de *Macaca*.

Puede encontrar más información sobre la TTR, por ejemplo, en

10 www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=TTR.

Todo el contenido de cada uno de los números de acceso de GenBank anteriores y los números de base de datos de Gen se incorporan en la presente por referencia a la fecha de presentación de esta solicitud.

El término TTR, como se usa en la presente descripción, también se refiere a

15 variaciones del gen de la TTR que incluyen variantes que se proporcionan en la base de datos SNP. Se han identificado numerosas variaciones de secuencia dentro del gen de la TTR y pueden encontrarse en, por ejemplo, NCBI dbSNP y UniProt (ver, *por ejemplo*, www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/?term=TTR, todo el contenido de las cuales se incorpora en la presente descripción como referencia a la fecha de presentación de esta solicitud.

20 Como se usa en la presente, “secuencia diana” se refiere a una porción contigua de la secuencia de nucleótidos de una molécula de ARNm que se formó durante la transcripción de un gen TTR, que incluye al ARNm que es un producto del procesamiento del ARN de un producto de transcripción primario. En una modalidad, la porción diana de la secuencia será al menos lo suficientemente larga como para servir como sustrato para la

25 escisión dirigida por ARNi en o cerca de esa porción de la secuencia de nucleótidos de una molécula de ARNm formada durante la transcripción de un gen TTR.

La secuencia diana puede ser de aproximadamente 19-36 nucleótidos de longitud, *por ejemplo*, aproximadamente 19-30 nucleótidos de longitud. Por ejemplo, la secuencia

diana puede ser de aproximadamente 19-30 nucleótidos, 19-30, 19-29, 19-28, 19-27, 19-26, 19-25, 19-24, 19-23, 19-22, 19-21, 19-20, 20-30, 20-29, 20-28, 20-27, 20-26, 20-25, 20-24, 20-23, 20-22, 20-21, 21-30, 21-29, 21-28, 21-27, 21-26, 21-25, 21-24, 21-23, o 21-22

nucleótidos de longitud. En determinadas modalidades, la secuencia diana es de 19-23

5 nucleótidos de longitud, opcionalmente 21-23 nucleótidos de longitud. Los rangos y longitudes intermedios a los rangos y longitudes mencionados anteriormente también se contemplan como parte de la descripción.

Como se usa en la presente descripción, el término “cadena que comprende una secuencia” se refiere a un oligonucleótido que comprende una cadena de nucleótidos que se describe por la secuencia a la que se hace referencia mediante el uso de la nomenclatura de nucleótidos estándar.

“G”, “C”, “A”, “T” y “U” por lo general representan un nucleótido que contiene guanina, citosina, adenina, timidina y uracilo como base, respectivamente. Sin embargo, se entenderá que el término “ribonucleótido” o “nucleótido” también puede referirse a un nucleótido modificado, como se detalla más adelante, o un resto sustituto de remplazo (ver, por ejemplo, Tabla 1). El experto en la técnica es consciente de que la guanina, la citosina, la adenina y el uracilo pueden remplazarse por otros restos sin alterar sustancialmente las propiedades de emparejamiento de bases de un oligonucleótido que comprende un nucleótido que porta tal resto de reemplazo. Por ejemplo, sin limitación, un nucleótido que comprende inosina como su base puede emparejarse de base con nucleótidos que contienen adenina, citosina o uracilo. Por lo tanto, los nucleótidos que contienen uracilo, guanina o adenina pueden reemplazarse en las secuencias de nucleótidos del ARNbc que se presentan en la invención por un nucleótido que contiene, por ejemplo, inosina. En otro ejemplo, la adenina y la citosina en cualquier lugar del oligonucleótido pueden reemplazarse con guanina y uracilo, respectivamente, para formar el emparejamiento de la base G-U Wobble con el ARNm diana. Las secuencias que contienen tales restos de remplazo son adecuadas para las composiciones y métodos que se presentan en la invención.

Los términos “ARNi”, “agente de ARNi”, “agente de ARN interferente” como se usa indistintamente en la presente descripción, se refieren a un agente que contiene ARN tal como se define ese término en la presente descripción, y que media la escisión dirigida de un transcrito de ARN a través de una vía del complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC). El ARNi dirige la degradación específica de la secuencia de ARNm a través de un proceso conocido como interferencia de ARN (ARNi). El ARNi modula, *por ejemplo*, inhibe, la expresión de un gen de la TTR en una célula, *por ejemplo*, una célula del hígado dentro de un sujeto, tal como un sujeto mamífero.

En una modalidad, un agente de ARNi de la invención incluye un ARN monocatenario que interactúa con una secuencia de ARN diana, *por ejemplo*, una secuencia de ARNm diana de la TTR, para dirigir la escisión del ARN diana. Sin ceñirse a la teoría, se cree que el ARN bicatenario largo introducido en las células se descompone en ARNip por una endonucleasa de tipo III conocida como Dicer (Sharp *et al.* (2001) *Genes Dev.* 15:485). Dicer, una enzima similar a la ribonucleasa III, procesa el ARNbc en los ARN de interferencia corto del par de bases 19-23 con dos extremos salientes de base 3' característicos (Bernstein, y otros, (2001) *Nature* 409:363). Los ARNpi luego se incorporan en un complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC) donde una o más helicasas desenrollan el dúplex de ARNpi, lo que permite que la cadena antisentido complementaria guíe el reconocimiento de la diana (Nykanen, *et al.*, (2001) *Cell* 107:309). Después de unirse al ARNm diana apropiado, una o más endonucleasas dentro del RISC escinden la diana para inducir el silenciamiento (Elbashir, *et al.*, (2001) *Genes Dev.* 15:188). Por lo tanto, en un aspecto la invención se refiere a un ARN monocatenario (ARNip) que se generó dentro de una célula y que promueve la formación de un complejo RISC para efectuar el silenciamiento del gen diana, *es decir*, un gen de la TTR. En consecuencia, el término “ARNip” también se usa en la presente descripción para referirse a un ARNi como se describió anteriormente.

En determinadas modalidades, el agente de ARNi puede ser un ARNip monocatenario (mcARNi) que se introduce en una célula u organismo para inhibir un ARNm

diana. Los agentes de ARNi monocatenarios se unen a la endonucleasa de RISC, Argonauta 2, que luego escinde el ARNm diana. Los ARNip monocatenarios son generalmente 15-30 nucleótidos y se modifican químicamente. El diseño y las pruebas de los ARNip monocatenarios se describen en la patente de EE. UU. núm. 8,101,348 y en Lima y otros, (2012) *Cell* 150:883-894, el contenido completo de cada uno de los cuales se incorpora en la presente descripción como referencia. Cualquiera de las secuencias de nucleótidos antisentido descritas en la presente descripción puede usarse como un ARNip monocatenario como se describe en la presente descripción o modificado químicamente por los métodos descritos en Lima y otros, (2012) *Cell* 150:883-894.

En determinadas modalidades, un “ARNi” para usar en las composiciones, usos y métodos de la invención es un ARN bicatenario y se denomina en la presente descripción como un “agente de ARN bicatenario”, “molécula de ARN bicatenario (ARNbc)”, “agente de ARNbc” o “ARNbc”. El término “ARNbc”, se refiere a un complejo de moléculas de ácido ribonucleico, que tiene una estructura dúplex que comprende dos cadenas de ácidos nucleicos antiparalelas y sustancialmente complementarias, denominadas con orientaciones de “sentido” y “antisentido” con respecto a un ARN diana, es decir, un gen de la TTR. En algunas modalidades de la invención, un ARN bicatenario (ARNbc) desencadena la degradación de un ARN diana, por ejemplo, un ARNm, a través de un mecanismo de silenciamiento génico postranscripcional denominado en la presente descripción como ARN de interferencia o ARNi.

En general, la mayoría de los nucleótidos de cada cadena de una molécula de ARNbc son ribonucleótidos, pero como se describe en detalle en la presente descripción, cada una o ambas cadenas pueden incluir además uno o más no ribonucleótidos, p. ej, un desoxirribonucleótido o un nucleótido modificado. Además, como se usa en esta descripción, un “ARNi” puede incluir ribonucleótidos con modificaciones químicas; un ARNi puede incluir modificaciones sustanciales en múltiples nucleótidos. Como se usa en la presente descripción, el término “nucleótido modificado” se refiere a un nucleótido que tiene, independientemente, un resto de azúcar modificado, un enlace internucleotídico modificado,

o nucleobase modificada, o cualquiera de sus combinaciones. Por lo tanto, el término nucleótido modificado abarca sustituciones, adiciones o eliminación de, por ejemplo, un grupo funcional o átomo, a enlaces internucleosídicos, restos de azúcar, o nucleobases.

Las modificaciones adecuadas para usar en los agentes de la invención incluyen todos los

5 tipos de modificaciones que se describen en la presente descripción o que se conocen en la técnica. Cualquiera de tales modificaciones, como se usa en una molécula de tipo ARNi, se abarcan por “ARNi” o “agente ARNi” para los propósitos de esta descripción y reivindicaciones.

En determinadas modalidades de la presente descripción, la inclusión de un

10 desoxinucleótido si está presente dentro de un agente de ARNi puede considerarse que constituye un nucleótido modificado.

La región dúplex puede ser de cualquier longitud que permita la degradación específica de un ARN diana deseado a través de una vía de RISC, y puede variar de aproximadamente 19 a 36 pares de bases de longitud, *por ejemplo*, aproximadamente 19-30

15 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 19-30, 19-29, 19-28, 19-27, 19-26, 19-25, 19-24, 19-23, 19-22, 19-21, 19-20, 20-30, 20-29, 20-28, 20-27, 20-26, 20-25, 20-24, 20-23, 20-22, 20-21, 21-30, 21-29, 21-28, 21-27, 21-26, 21-25, 21-24, 21-23, o 21-22 pares de bases de longitud.

20 En determinadas modalidades, la región dúplex es de 19-21 pares de bases de longitud, *por ejemplo*, 21 pares de bases de longitud. Los rangos y longitudes intermedios a los rangos y longitudes mencionados anteriormente también se contemplan como parte de la descripción.

Las dos cadenas que forman la estructura dúplex pueden ser porciones diferentes de una molécula de ARN más grande, o pueden ser moléculas de ARN separadas. Cuando las

25 dos cadenas son parte de una molécula más grande, y por lo tanto están conectadas por una cadena ininterrumpida de nucleótidos entre el extremo 3' de una cadena y el extremo 5' de la otra cadena respectiva que forma la estructura dúplex, la cadena de ARN de conexión se denomina “bucle en horquilla”. Un bucle en horquilla puede comprender al menos un

nucleótido sin emparejar. En algunas modalidades, el bucle en horquilla puede comprender al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 23 o más nucleótidos no emparejados. En algunas modalidades, el bucle en horquilla puede ser de 10 o menos nucleótidos. En algunas modalidades, el bucle en horquilla puede ser de 8 o menos nucleótidos no emparejados. En algunas modalidades, el bucle en horquilla puede ser de 4-10 nucleótidos no emparejados. En algunas modalidades, el bucle en horquilla puede ser de 4 a 8 nucleótidos.

Cuando las dos cadenas sustancialmente complementarias de un ARNbc están compuestas por moléculas de ARN separadas, esas moléculas pueden conectarse covalentemente pero no es necesario. Cuando las dos cadenas se conectan covalentemente por medios diferentes a una cadena ininterrumpida de nucleótidos entre el extremo 3' de una cadena y el extremo 5' de la otra cadena respectiva que forma la estructura dúplex, la estructura de conexión se denomina como "enlazador". Las cadenas de ARN pueden tener el mismo o un número diferente de nucleótidos. El número máximo de pares de bases es el número de nucleótidos en la cadena más corta del ARNbc menos los extremos salientes que están presentes en el dúplex. Además de la estructura dúplex, un ARNi puede comprender uno o más extremos salientes de nucleótidos. En una modalidad del agente de ARNi, al menos una cadena comprende un extremo saliente 3' de al menos 1 nucleótido. En otra modalidad, al menos una cadena comprende un extremo saliente de 3' de al menos 2 nucleótidos, *por ejemplo*, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14, o 15 nucleótidos. En otras modalidades, al menos una cadena del agente de ARNi comprende un extremo saliente 5' de al menos 1 nucleótido. En determinadas modalidades, al menos una cadena comprende un extremo saliente 5' de al menos 2 nucleótidos, *por ejemplo*, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14, o 15 nucleótidos. En incluso otras modalidades, tanto el extremo 3' como el extremo 5' de una cadena del agente de ARNi comprenden un extremo saliente de al menos 1 nucleótido.

En determinadas modalidades, un agente de ARNi de la invención es un ARNbc, cada cadena de los cuales comprende 19-23 nucleótidos, que interactúa con una secuencia de ARN diana, *por ejemplo*, un gen de la TTR, para dirigir la escisión del ARN diana.

En algunas modalidades, un ARNi de la invención es un ARNbc de 24-30 nucleótidos que interactúa con una secuencia de ARN diana, por ejemplo, una secuencia de ARNm diana de TTR, para dirigir la escisión del ARN diana.

Como se usa en la presente descripción, el término “extremo saliente de nucleótido” se refiere a al menos un nucleótido no emparejado que sobresale de la estructura dúplex de un ARNi bicatenario. Por ejemplo, cuando un extremo 3' de una cadena de un ARNbc se extiende más allá del extremo 5' de la otra cadena, o *viceversa*, hay un extremo saliente de nucleótido. Un ARNbc puede comprender un extremo saliente de al menos un nucleótido; alternativamente, el extremo saliente puede comprender al menos dos nucleótidos, al menos tres nucleótidos, al menos cuatro nucleótidos, al menos cinco nucleótidos o más. Un extremo saliente de nucleótidos puede comprender o consistir en un análogo de nucleótido/nucleósido, que incluye un desoxinucleótido/nucleósido. El extremo saliente puede estar en la cadena de sentido, la cadena antisentido, o cualquier combinación de estas. Además, los nucleótidos de un extremo saliente pueden estar presentes en el extremo 5', el extremo 3', o en ambos extremos de una cadena antisentido o de sentido de un ARNbc.

En una modalidad, la cadena antisentido de un ARNbc tiene de 1-10 nucleótidos, por ejemplo, un 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 nucleótidos, que sobresalen en el extremo 3' o en el extremo 5'. En una modalidad, la cadena de sentido de un ARNbc tiene de 1-10 nucleótidos, por ejemplo, un 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 nucleótidos, que sobresalen en el extremo 3' o en el extremo 5'. En otra modalidad, uno o más de los nucleótidos en el extremo saliente se reemplazan con un nucleósido tiofosfato.

En determinadas modalidades, la cadena antisentido de un ARNbc tiene de 1-10 nucleótidos, *por ejemplo*, 0-3, 1-3, 2-4, 2-5, 4-10, 5-10, *por ejemplo*, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10 nucleótidos, que sobresalen en el extremo 3' o en el extremo 5'. En una modalidad, la cadena de sentido de un ARNbc tiene de 1-10 nucleótidos, p. ej., un 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 nucleótidos, que sobresalen en el extremo 3' o en el extremo 5'. En otra modalidad, uno o más de los nucleótidos en el extremo saliente se reemplazan con un nucleósido tiofosfato.

En determinadas modalidades, la cadena antisentido de un ARN_{bc} tiene de 1-10 nucleótidos, por ejemplo, un 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 nucleótidos, que sobresalen en el extremo 3' o en el extremo 5'. En determinadas modalidades, el extremo saliente en la cadena de sentido o la cadena de antisentido, o ambas, puede incluir longitudes extendidas más largas que 10 nucleótidos, por ejemplo, 1-30 nucleótidos, 2-30 nucleótidos, 10-30 nucleótidos, 10-25 nucleótidos, 10-20 nucleótidos, o 10-15 nucleótidos de longitud. En determinadas modalidades, un extremo saliente extendido está en la cadena de sentido del dúplex. En determinadas modalidades, un extremo saliente extendido está presente en el extremo 3' de la cadena de sentido del dúplex. En determinadas modalidades, un extremo saliente extendido está presente en el extremo 5' de la cadena de sentido del dúplex. En determinadas modalidades, un extremo saliente extendido está en la cadena antisentido del dúplex. En determinadas modalidades, un extremo saliente extendido está presente en el extremo 3' de la cadena antisentido del dúplex. En determinadas modalidades, un extremo saliente extendido está presente en el extremo 5' de la cadena antisentido del dúplex. En determinadas modalidades, uno o más de los nucleótidos en el extremo saliente extendido se rempazan con un nucleósido tiofosfato. En determinadas modalidades, el extremo saliente incluye una porción autocomplementaria de manera que el extremo saliente es capaz de formar una estructura de horquilla que es estable en condiciones fisiológicas.

“Romo” o “extremo romo” significa que no hay nucleótidos no emparejados en ese extremo del agente de ARN bicatenario, es decir, no hay un extremo saliente de nucleótidos. Un agente de ARN bicatenario de “extremo romo” es bicatenario a lo largo de toda su longitud, es decir, no hay extremo saliente de nucleótidos en ninguno de los extremos de la molécula. Los agentes de ARN_i de la invención incluyen agentes de ARN_i sin extremo saliente de nucleótidos en un extremo (es decir, agentes con un extremo saliente y un extremo romo) o sin extremos salientes de nucleótidos en cada extremo. Con mayor frecuencia, tal molécula será bicatenaria a lo largo de toda su longitud.

El término “cadena de antisentido” o “cadena guía” se refiere a la cadena de un ARNi, por ejemplo, un ARNbc, que incluye una región que es sustancialmente complementaria a una secuencia diana, por ejemplo, un ARNm de TTR.

Como se usa en la presente descripción, el término “región de complementariedad” se refiere a la región en la cadena antisentido que es sustancialmente complementaria a una secuencia, por ejemplo una secuencia diana, *por ejemplo*, una secuencia de nucleótidos de TTR, como se define en la presente descripción. Cuando la región de complementariedad no es completamente complementaria a la secuencia diana, los errores de emparejamiento pueden estar en las regiones internas o terminales de la molécula. Generalmente, los errores de emparejamiento más tolerados están en las regiones terminales, por ejemplo, dentro de 5, 4 o 3 nucleótidos del extremo 5' o 3' del ARNi. En algunas modalidades, un agente de ARN bicatenario de la invención incluye un error de emparejamiento de nucleótidos en la cadena antisentido. En algunas modalidades, la cadena antisentido del agente de ARN bicatenario de la invención incluye no más de 4 errores de emparejamiento con el ARNm diana, por ejemplo, la cadena antisentido incluye 4, 3, 2, 1 o 0 errores de emparejamiento con el ARNm diana. En algunas modalidades, el agente de ARN bicatenario de la cadena de antisentido de la invención incluye no más de 4 errores de emparejamiento con la cadena de sentido, por ejemplo, la cadena de antisentido incluye 4, 3, 2, 1 o 0 errores de emparejamiento con la cadena de sentido. En algunas modalidades, un agente de ARN bicatenario de la invención incluye un error de emparejamiento de nucleótidos en la cadena de sentido. En algunas modalidades, la cadena de sentido del agente de ARN bicatenario de la invención incluye no más de 4 errores de emparejamiento con la cadena de antisentido, por ejemplo, la cadena de sentido incluye 4, 3, 2, 1 o 0 errores de emparejamiento con la cadena de antisentido. En algunas modalidades, el error de emparejamiento de nucleótidos está, por ejemplo, dentro de 5, 4, 3 nucleótidos del extremo 3' del ARNi. En otra modalidad, el error de emparejamiento de nucleótidos es, por ejemplo, en el nucleótido 3'-terminal del agente ARNi. En algunas modalidades, el error de emparejamiento no está en la región de la molécula inicial.

Por lo tanto, un agente de ARNi como se describe en la presente descripción puede contener uno o más errores de emparejamiento en la secuencia diana. En una modalidad, un agente de ARNi como se describe en la presente descripción no contiene más de 3 errores de emparejamiento (es decir, 3, 2, 1 o 0 errores de emparejamiento). En una 5 modalidad, un agente de ARNi como se describe en la presente descripción no contiene más de 2 errores de emparejamiento. En una modalidad, un agente de ARNi como se describe en la presente descripción no contiene más de 1 error de emparejamiento. En una modalidad, un agente de ARNi como se describe en la presente descripción contiene 0 errores de emparejamiento. En determinadas modalidades, si la cadena antisentido del 10 agente de ARNi contiene errores de emparejamiento en la secuencia diana, el error de emparejamiento puede restringirse opcionalmente para estar dentro de los últimos 5 nucleótidos del extremo 5' o 3' de la región de complementariedad. Por ejemplo, en tales modalidades, para un agente de ARNi de 23 nucleótidos, la cadena que es complementaria a una región de un gen TTR, generalmente no contiene ningún error de emparejamiento 15 dentro de los 13 nucleótidos centrales. Los métodos descritos en la presente descripción o los métodos conocidos en la técnica pueden usarse para determinar si un agente de ARNi que contiene un error de emparejamiento con una secuencia diana es efectivo para inhibir la expresión de un gen TTR. Es importante la consideración de la eficacia de los agentes de ARNi con errores de emparejamiento en la inhibición de la expresión de un gen TTR, 20 especialmente si se sabe que la región de complementariedad particular en un gen TTR tiene variación de secuencia polimórfica dentro de la población.

El término “cadena de sentido” o “cadena pasajera” como se usa en la presente descripción, se refiere a la cadena de un ARNi que incluye una región que es 25 sustancialmente complementaria a una región de la cadena antisentido como se define en la presente descripción.

Como se usa en la presente descripción, “sustancialmente todos los nucleótidos se modifican” se modifican en gran medida pero no completamente y pueden incluir no más de 5, 4, 3, 2 o 1 nucleótidos no modificados.

Como se usa en la presente descripción, el término “región de escisión” se refiere a una región que se ubica inmediatamente adyacente al sitio de escisión. El sitio de escisión es el sitio en la diana en el que se produce la escisión. En algunas modalidades, la región de escisión comprende tres bases en cada extremo del sitio de escisión, e inmediatamente adyacente a este. En algunas modalidades, la región de escisión comprende dos bases en cada extremo del sitio de escisión, e inmediatamente adyacente a este. En algunas modalidades, el sitio de escisión se produce específicamente en el sitio unido por los nucleótidos 10 y 11 de la cadena antisentido, y la región de escisión comprende los nucleótidos 11, 12 y 13.

Como se usa en la presente descripción, y a menos que se indique de otra manera, el término “complementario”, cuando se usa para describir una primera secuencia de nucleótidos en relación con una segunda secuencia de nucleótidos, se refiere a la capacidad de un oligonucleótido o polinucleótido que comprende la primera secuencia de nucleótidos para hibridarse y formar una estructura dúplex en determinadas condiciones con un oligonucleótido o polinucleótido que comprende la segunda secuencia de nucleótidos, como entenderá el experto en la técnica. Tales condiciones pueden ser, por ejemplo, condiciones estrictas, donde las condiciones estrictas pueden incluir: 400 mM de NaCl, 40 mM de PIPES pH 6,4, 1 mM de EDTA, 50 °C o 70 °C durante 12-16 horas seguido de lavado (ver, por ejemplo, “Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrook, et al. (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press). Pueden aplicarse otras afecciones, como afecciones fisiológicamente relevantes que se pueden encontrar dentro de un organismo. El experto en la técnica será capaz de determinar el conjunto de condiciones más apropiado para una prueba de complementariedad de dos secuencias de acuerdo con la aplicación final de los nucleótidos hibridados.

Las secuencias complementarias dentro de un ARNi, por ejemplo, dentro de un ARNbc como se describe en la presente descripción, incluyen el emparejamiento de bases del oligonucleótido o polinucleótido que comprende una primera secuencia de nucleótidos a un oligonucleótido o polinucleótido que comprende una segunda secuencia de nucleótidos a

lo largo de toda la longitud de una o ambas secuencias de nucleótidos. Tales secuencias pueden denominarse “totalmente complementarias” entre sí en la presente descripción. Sin embargo, cuando se hace referencia a una primera secuencia como “sustancialmente complementaria” con respecto a una segunda secuencia en la presente descripción, las dos

5 secuencias pueden ser completamente complementarias, o pueden formar uno o más, pero generalmente no más de 5, 4, 3, o 2 pares de bases con errores de emparejamiento tras la hibridación para un dúplex de hasta 30 pares de bases, mientras se mantiene la capacidad de hibridar en las condiciones más relevantes a su aplicación final, *p. ej.*, inhibición de la expresión génica, *in vitro* o *in vivo*. Sin embargo, cuando dos oligonucleótidos se diseñan

10 para formar, tras la hibridación, uno o más extremos salientes monocatenarios, tales extremos salientes no se considerarán como errores de emparejamiento con respecto a la determinación de la complementariedad. Por ejemplo, un ARNbc que comprende un oligonucleótido 21 nucleótidos de longitud y otro oligonucleótido 23 nucleótidos de longitud, en donde el oligonucleótido más largo comprende una secuencia de 21 nucleótidos que es

15 completamente complementario al oligonucleótido más corto, todavía puede denominarse “completamente complementario” para los propósitos descritos en la presente descripción.

Las secuencias “complementarias”, como se usan en la presente descripción, también pueden incluir, o formarse completamente a partir de, pares de bases que no son de Watson-Crick o pares de bases formados a partir de nucleótidos no naturales y

20 modificados, en la medida en que se cumplan los requisitos anteriores con respecto a su capacidad de hibridación. Tales pares de bases que no son Watson-Crick incluyen, de modo no taxativo, emparejamiento de bases G:U Wobble o Hoogsteen.

Los términos “complementaria”, “completamente complementaria” y “sustancialmente complementaria” en la presente descripción pueden usarse con respecto al emparejamiento

25 de bases entre la cadena de sentido y la cadena antisentido de un ARNbc, o entre dos oligonucleótidos o polinucleótidos, tal como la cadena antisentido de un agente de ARN bicatenario y una secuencia diana, como se entenderá a partir del contexto de su uso.

Como se usa en la presente descripción, un polinucleótido que es “sustancialmente complementario a al menos parte de” un ARN mensajero (ARNm) se refiere a un polinucleótido que es sustancialmente complementario a una porción contigua del ARNm de interés (por ejemplo, un ARNm que codifica un TTR). Por ejemplo, un polinucleótido es complementario a al menos una parte de un ARNm de TTR si la secuencia es sustancialmente complementaria a una porción no interrumpida de un ARNm que codifica un gen TTR.

En consecuencia, en algunas modalidades, los polinucleótidos antisentido que se describen en la presente descripción son completamente complementarios a la secuencia de la TTR diana. En otras modalidades, los polinucleótidos antisentido descritos en la presente descripción son sustancialmente complementarios a la secuencia diana de TTR y comprenden una secuencia de nucleótidos contigua que es al menos 80 % complementaria a lo largo de toda su longitud a la región equivalente de la secuencia de nucleótidos de una cualquiera de las SEQ ID NO:1, 3, 5, 7 o 9, o un fragmento de una cualquiera de las SEQ ID NO:1, 3, 5, 7, o 9, tal como aproximadamente 85 %, aproximadamente 90 %, aproximadamente 91 %, aproximadamente 92 %, aproximadamente 93 %, aproximadamente 94 %, aproximadamente 95 %, aproximadamente 96 %, aproximadamente 97 %, aproximadamente 98 %, o aproximadamente 99 % complementaria.

En otras modalidades, los polinucleótidos antisentido descritos en la presente descripción son sustancialmente complementarios a la secuencia diana de TTR y comprenden una secuencia de nucleótidos contigua que es al menos aproximadamente 80% complementaria a lo largo de toda su longitud a cualquiera de las secuencias de nucleótidos de la cadena de sentido en cualquiera de las Tablas 2, 3, 5, y 6, o un fragmento de cualquiera de las secuencias de nucleótidos de la cadena de sentido en cualquiera de las Tablas 2, 3, 5, y 6, tal como aproximadamente 85%, aproximadamente 90%, aproximadamente 91%, aproximadamente 92%, aproximadamente 93%, aproximadamente

94%, aproximadamente 95%, aproximadamente 96%, aproximadamente 97%,
aproximadamente 98%, aproximadamente 99%, o 100% complementaria.

En una modalidad, el agente de ARNi de la descripción incluye una cadena de sentido que es sustancialmente complementaria a un polinucleótido antisentido que, a su vez, es igual a una secuencia diana de TTR , y en donde el polinucleótido de cadena de sentido comprende una secuencia de nucleótidos contigua que es al menos aproximadamente 80 % complementaria a lo largo de toda su longitud a la región equivalente de la secuencia de nucleótidos de las SEQ ID NO:2, 4, 6, 8, o 10, o un fragmento de una cualquiera de las SEQ ID NO:2, 4, 6, 8, o 10, tal como aproximadamente 85 %, aproximadamente 90 %, aproximadamente 91 %, aproximadamente 92 %, aproximadamente 93 %, aproximadamente 94 %, aproximadamente 95 %, aproximadamente 96 %, aproximadamente 97 %, aproximadamente 98 %, aproximadamente 99 %, o aproximadamente 100 % complementaria.

En algunas modalidades, un ARNi de la invención incluye una cadena de sentido que es sustancialmente complementaria a un polinucleótido antisentido que, a su vez, es complementario a una secuencia diana de TTR , y en donde el polinucleótido de la cadena de sentido comprende una secuencia de nucleótidos contigua que es al menos aproximadamente 80% complementaria a lo largo de toda su longitud a cualquiera de las secuencias de nucleótidos de la cadena antisentido en cualquiera de las Tablas 2, 3, 5, y 6, o un fragmento de cualquiera de las secuencias de nucleótidos de la cadena antisentido en cualquiera de las Tablas 2, 3, 5, y 6, tal como aproximadamente 85%, aproximadamente 90%, aproximadamente 91%, aproximadamente 92%, aproximadamente 93%, aproximadamente 94%, aproximadamente 95%, aproximadamente 96%, aproximadamente 97%, aproximadamente 98%, aproximadamente 99%, o 100% complementaria.

En general, un “ARNi” incluye ribonucleótidos con modificaciones químicas. Tales modificaciones pueden incluir todos los tipos de modificaciones descritas en la presente descripción o conocidas en la técnica. Cualquiera de tales modificaciones, como se usa en

una molécula de ARNbc, se abarcan por “ARNi” para los fines de esta descripción y reivindicaciones.

En determinadas modalidades de la presente descripción, la inclusión de un desoxinucleótido si está presente dentro de un agente de ARNi puede considerarse que constituye un nucleótido modificado.

En un aspecto de la invención, un agente para usar en los métodos y composiciones de la invención es una molécula de oligonucleótido antisentido monocatenario que inhibe un ARNm diana a través de un mecanismo de inhibición antisentido. La molécula de oligonucleótido antisentido monocatenario es complementaria a una secuencia dentro del ARNm diana. Los oligonucleótidos antisentido monocatenarios pueden inhibir la traducción de manera estequiométrica mediante el emparejamiento de bases con el ARNm y obstruir físicamente la maquinaria de traducción, ver Dias, N. *et al.*, (2002) *Mol Cancer Ther* 1:347-355. La molécula de oligonucleótido antisentido monocatenario puede tener aproximadamente 14 a aproximadamente 30 nucleótidos de longitud y tener una secuencia que es complementaria a una secuencia diana. Por ejemplo, la molécula de oligonucleótido antisentido monocatenario puede comprender una secuencia que es al menos aproximadamente 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, o más nucleótidos contiguos de una cualquiera de las secuencias antisentido descritas en la presente descripción.

La frase “contactar una célula con un ARNi”, tal como un ARNbc, como se usa en la presente descripción, incluye contactar una célula por cualquier medio posible. Contactar una célula con un ARNi incluye contactar una célula *in vitro* con el ARNi o contactar una célula *in vivo* con el ARNi. El contacto puede realizarse directa o indirectamente. Por lo tanto, por ejemplo, el ARNi puede ponerse en contacto físico con la célula por el individuo que realiza el método, o alternativamente, el ARNi puede ponerse en una situación que permitirá o hará que posteriormente entre en contacto con la célula.

El contacto con una célula *in vitro* puede realizarse, por ejemplo, incubando la célula con el ARNi. El contacto con una célula *in vivo* puede realizarse, por ejemplo, mediante la inyección del ARNi en el tejido o cerca de este donde se encuentra la célula, o mediante la

inyección del ARNi en otra área, por ejemplo, el torrente sanguíneo o el espacio subcutáneo, de manera que el agente llegue subsecuentemente al tejido donde se encuentra la célula a la que se va a contactar. Por ejemplo, el ARNi puede contener o acoplarse a un ligando, por ejemplo, GalNAc, que dirige el ARNi a un sitio de interés, por ejemplo, el hígado. También
5 son posibles combinaciones de métodos de contacto *in vitro* e *in vivo*. Por ejemplo, una célula también puede ponerse en contacto *in vitro* con un ARNi y posteriormente trasplantarse a un sujeto.

En determinadas modalidades, contactar una célula con un ARNi incluye “introducir” o “administrar el ARNi en la célula” facilitando o efectuando la captación o absorción en la
10 célula. La absorción o captación de un ARNi puede ocurrir a través de la difusión sin ayuda o procesos celulares activos, o por agentes o dispositivos auxiliares. La introducción de un ARNi en una célula puede ser *in vitro* o *in vivo*. Por ejemplo, para la introducción *in vivo*, el ARNi puede inyectarse en un sitio de tejido o administrarse de forma sistémica. La introducción *in vitro* en una célula incluye métodos conocidos en la técnica tales como
15 electroporación y lipofección. Se describen enfoques adicionales en la presente descripción a continuación o se conocen en la técnica.

El término “nanopartícula lipídica” o “LNP” es una vesícula que comprende una capa lipídica que encapsula una molécula farmacéuticamente activa, tal como una molécula de ácido nucleico, por ejemplo, un ARNi o un plásmido a partir del cual se transcribe un ARNi.
20 Las LNP se describen en, por ejemplo, las patentes de EE. UU. núms. 6,858,225, 6,815,432, 8,158,601, y 8,058,069, cuyos contenidos totales se incorporan en la presente como referencia.

Como se usa en la presente descripción, un “sujeto” es un animal, tal como un mamífero, que incluye un primate (tal como un humano, un primate no humano, por ejemplo,
25 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 cobayo, un gato, un perro, una rata o un ratón), o un ave que expresa el gen diana de manera endógena o heteróloga.

En una modalidad, el sujeto es un humano, tal como un ser humano que se está tratando o evaluando por una enfermedad o trastorno que se beneficiaría de la reducción de la expresión de la TTR; un ser humano en riesgo por una enfermedad o trastorno que se beneficiaría de la reducción de la expresión de la TTR; un ser humano que tiene una enfermedad o trastorno que se beneficiaría de la reducción de la expresión de la TTR; o un ser humano que se trató por una enfermedad o trastorno que se beneficiaría de la reducción de la expresión de la TTR como se describe en la presente descripción. En algunas modalidades, el sujeto es un humano femenino. En algunas modalidades, el sujeto es un humano masculino. En una modalidad, el sujeto es un sujeto adulto. En otra modalidad, el sujeto es un sujeto pediátrico.

En algunas modalidades, el sujeto humano padece de una enfermedad asociada a la TTR. En otras modalidades, el sujeto es un sujeto en riesgo de desarrollar una enfermedad asociada a la TTR, *p. ej.*, un sujeto con una mutación del gen TTR que se asocia con el desarrollo de una enfermedad asociada a la TTR, un sujeto con antecedentes familiares de enfermedad asociada a la TTR, o un sujeto que tiene signos o síntomas que sugieren el desarrollo de una enfermedad asociada a la TTR sin cumplir con los criterios de diagnóstico para una enfermedad asociada a la TTR.

Como se usa en la presente descripción, los términos “tratar” o “tratamiento” se refieren a un resultado beneficioso o deseado, tal como reducir al menos un signo o síntoma de un trastorno asociado con TTR en un sujeto. El tratamiento también incluye una reducción de uno o más signos o síntomas asociados con la expresión de la TTR no deseada; la disminución del alcance de la activación o estabilización de la TTR no deseada; mejorar o paliar la activación o estabilización de la TTR no deseada. “Tratamiento” también puede significar prolongar la supervivencia en comparación con la supervivencia prevista en ausencia de tratamiento.

El término “inferior” en el contexto del nivel de TTR en un sujeto o un marcador o síntoma de enfermedad se refiere a una disminución estadísticamente significativa en dicho nivel. La disminución puede ser, por ejemplo, al menos 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, %,

40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o más. En determinadas modalidades, una disminución es al menos 20 %. En determinadas modalidades, la disminución es de al menos 50 % en un marcador de enfermedad, por ejemplo, el nivel de expresión génica o de proteína. “Inferior” en el contexto del nivel de la TTR en un sujeto es una disminución a un nivel aceptado como dentro del intervalo normal para un individuo sin tal trastorno. En determinadas modalidades, “inferior” es la disminución en la diferencia entre el nivel de un marcador o síntoma para un sujeto que padece de una enfermedad y un nivel aceptado dentro del intervalo de lo normal para un individuo. El término “inferior” también puede usarse en asociación con la normalización de un síntoma de una enfermedad o afección, es decir, disminuyendo la diferencia entre un nivel en un sujeto que padece un trastorno asociado a TTR hacia un nivel en un sujeto normal que no padece un trastorno asociado a TTR. Como se usa en la presente descripción, si una enfermedad se asocia con un valor elevado para un síntoma, “normal” se considera que es el límite superior de la normalidad. Si una enfermedad se asocia con una disminución del valor de un síntoma, se considera que “normal” es el límite inferior de la normalidad.

Como se usa en la presente descripción, “prevención” o “que previene”, cuando se usa en referencia a una enfermedad, trastorno o afección de este, pueden tratarse o mejorarse mediante una reducción en la expresión de un gen de la TTR, se refiere a una reducción en la probabilidad de que un sujeto desarrolle un síntoma asociado con dicha enfermedad, trastorno, o afección, *p. ej.*, un síntoma de un trastorno asociado con la TTR, *p. ej.*, amiloidosis sistémica senil (SSA), amiloidosis familiar sistémica, polineuropatía amiloidótica familiar (FAP), miocardiopatía amiloidótica familiar (FAC), amiloidosis leptomeníngea/del sistema nervioso central (CNS), e hipertiroxinemia. El no desarrollar una enfermedad, trastorno o afección, o la reducción en el desarrollo de un síntoma asociado con dicha enfermedad, trastorno o afección (*p. ej.*, en al menos aproximadamente 10 % en una escala clínicamente aceptada para esa enfermedad o trastorno), o la exhibición de síntomas tardíos (*p. ej.*, por días, semanas, meses o años) se considera una prevención eficaz.

Una “enfermedad asociada con la TTR”, tal como se usa en la presente descripción, pretende incluir cualquier enfermedad asociada con el gen o la proteína de la TTR. Dicha enfermedad puede ser causada, por ejemplo, por el exceso de producción de la proteína TTR, por mutaciones del gen de la TTR, por la escisión anormal de la proteína TTR, la inestabilidad de los tetrámeros de la TTR, por interacciones anormales entre la TTR y otras proteínas u otras sustancias endógenas o exógenas. Una “enfermedad asociada a la TTR” incluye cualquier tipo de amiloidosis mediada por transtiretina (amiloidosis por ATTR) en donde la TTR desempeña un papel en la formación de agregados extracelulares anormales o depósitos de amiloide, *p. ej.*, amiloidosis por ATTR hereditaria (h-ATTR) o amiloidosis por ATTR no hereditaria (ATTR). Las enfermedades asociadas con la TTR incluyen amiloidosis sistémica senil (SSA), amiloidosis familiar sistémica, polineuropatía amiloidótica familiar (FAP), miocardiopatía amiloidótica familiar (FAC), amiloidosis leptomeníngea/del sistema nervioso central (CNS), opacidades vítreas amiloidóticas, síndrome del túnel carpiano, hipertiroxinemia, una enfermedad ocular, *p. ej.*, la enfermedad de Stargardt, retinopatía diabética, degeneración macular asociada a la edad (AMD), *p. ej.*, AMD seca y AMD húmeda; un trastorno metabólico, *p. ej.*, un trastorno de la homeostasis de la glucosa y los lípidos, *p. ej.*, resistencia a la insulina asociada con la diabetes tipo II, y una enfermedad cardiovascular. Los síntomas de la amiloidosis por TTR incluyen neuropatía sensitiva (*p. ej.*, parestesia, hipoestesia en las extremidades distales), neuropatía autonómica (*p. ej.*, disfunción gastrointestinal, como úlcera gástrica, o hipotensión ortostática), neuropatía motora, convulsiones, demencia, mielopatía, polineuropatía, síndrome del túnel carpiano, insuficiencia autonómica, miocardiopatía, opacidades vítreas, insuficiencia renal, nefropatía, reducción sustancial del IMCm (índice de masa corporal modificado), disfunción del nervio craneal, y la distrofia de la red de la córnea.

La “cantidad terapéuticamente efectiva”, como se usa en la presente descripción, pretende incluir la cantidad de un agente de ARNi que, cuando se administra a un sujeto que tiene un trastorno asociado a TTR es suficiente para efectuar el tratamiento de la enfermedad (*por ejemplo*, al disminuir, mejorar o mantener la enfermedad existente o uno o

más síntomas de la enfermedad). La “cantidad terapéuticamente efectiva” puede variar en función del agente de ARNi, cómo se administra el agente, la enfermedad y su gravedad y la historia, edad, peso, antecedentes familiares, composición genética, los tipos de tratamientos previos o simultáneos, si los hubiera, y otras características individuales del sujeto a tratar.

La “cantidad profilácticamente efectiva”, como se usa en la presente descripción, pretende incluir la cantidad de un agente de ARNi que, cuando se administra a un sujeto que tiene un trastorno asociado con TTR, es suficiente para prevenir o mejorar el trastorno o uno o más síntomas del trastorno. Mejorar la enfermedad incluye enlentecer el curso de la enfermedad o reducir la gravedad de la enfermedad en el desarrollo posterior. La “cantidad profilácticamente efectiva” puede variar en función del agente de ARNi, cómo se administra el agente, el grado de riesgo de la enfermedad, y la historia, edad, peso, antecedentes familiares, composición genética, los tipos de tratamientos previos o simultáneos, si los hubiera, y otras características individuales del paciente a tratar.

Una “cantidad terapéuticamente efectiva” o “cantidad profilácticamente efectiva” también incluye una cantidad de un agente de ARNi que produce algún efecto deseado en una relación beneficio/riesgo razonable aplicable a cualquier tratamiento. El ARNi empleado en los métodos de la presente invención puede administrarse en una cantidad suficiente para producir una relación beneficio/riesgo razonable aplicable a dicho tratamiento.

La frase “farmacéuticamente aceptable” se emplea en la presente descripción para referirse a esos compuestos, materiales, composiciones o formas de dosificación que son, dentro del alcance de un buen juicio médico, adecuados para su uso en contacto con los tejidos de sujetos humanos y sujetos animales sin excesiva toxicidad, irritación, respuesta alérgica u otro problema o complicación, proporcional con una relación beneficio/riesgo razonable.

La frase “portador farmacéuticamente aceptable” como se usa en la presente descripción se refiere a un material, composición o vehículo farmacéuticamente aceptable, tal como un relleno líquido o sólido, diluyente, excipiente, auxiliar de fabricación (por

ejemplo, lubricante, magnesio de talco, estearato de calcio o zinc, o ácido estérico), o material de encapsulación de disolvente, involucrado en llevar o transportar el compuesto del sujeto desde un órgano, o parte del cuerpo, a otro órgano, o parte del cuerpo. Cada portador debe ser “aceptable” en el sentido de ser compatible con los otros ingredientes de la formulación y no ser perjudicial para el sujeto que se está tratando. Tales portadores se conocen en la técnica. Los portadores farmacéuticamente aceptables incluyen portadores para la administración por inyección.

El término “muestra”, como se usa en la presente descripción, incluye una recolección de fluidos, células o tejidos similares aislados de un sujeto, así como también fluidos, células o tejidos presentes dentro de un sujeto. Los ejemplos de fluidos biológicos incluyen sangre, suero y fluidos serosos, plasma, líquido cefalorraquídeo, 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 derivarse de órganos particulares, partes de órganos, o fluidos o células dentro de esos órganos. En determinadas modalidades, las muestras pueden derivarse del hígado (por ejemplo, hígado completo o determinados segmentos del hígado o determinados tipos de células en el hígado, tales como, por ejemplo, hepatocitos). En algunas modalidades, una “muestra derivada de un sujeto” se refiere a la orina obtenida del sujeto. Una “muestra derivada de un sujeto” puede referirse a sangre o suero derivado de la sangre o plasma del sujeto.

II. ARNi de la invención

La presente invención proporciona ARNi que inhibe la expresión de un gen de la TTR. En determinadas modalidades, el ARNi incluye moléculas de ácido ribonucleico bicatenario (ARNbc) para inhibir la expresión de un gen de TTR en una célula, como una célula dentro de un sujeto, *p. ej.*, un mamífero, como un ser humano susceptible a desarrollar un trastorno asociado con la TTR, *p. ej.*, amiloidosis sistémica senil (SSA), amiloidosis familiar sistémica, polineuropatía amiloidótica familiar (FAP), miocardiopatía amiloidótica familiar (FAC), amiloidosis leptomeníngea/del sistema nervioso central (CNS), e

hipertiroxinemia. El agente de ARN_{bc} incluye una cadena de antisentido que tiene una región de complementariedad que es complementaria a al menos una parte de un ARN_m formado en la expresión de un gen TTR. La región de complementariedad es de aproximadamente 19-30 nucleótidos de longitud (por ejemplo, aproximadamente 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, o 19 nucleótidos de longitud).

Al entrar en contacto con una célula que expresa el gen TTR, el ARN_i inhibe la expresión del gen TTR (por ejemplo, un gen TTR de humano, primate, no primate o rata) por al menos aproximadamente 50 % como se analiza, por ejemplo, mediante un método basado en PCR o ADN ramificado (ADN_r), o mediante un método basado en proteínas, tal como mediante el análisis inmunofluorescente, usando, por ejemplo, las técnicas de inmunofluorescencia o citometría de flujo. En algunas modalidades, la inhibición de la expresión se determina mediante el método de qPCR proporcionado en los ejemplos en la presente descripción con el ARN_{ip}, por ejemplo, a una concentración de 10 nM, en una estirpe celular del organismo adecuado proporcionada en este. En determinadas modalidades, la inhibición de la expresión *in vivo* se determina mediante la inactivación del gen humano en un roedor que expresa el gen humano, por ejemplo, un ratón o un ratón infectado con AAV que expresa el gen diana humano, por ejemplo, cuando se administra como dosis única, por ejemplo, a 3 mg/kg en el nadir de la expresión de ARN.

Un ARN_{bc} incluye dos cadenas de ARN que son complementarias y se hibridan para formar una estructura dúplex en condiciones en las que se usará el ARN_{bc}. Una cadena de un ARN_{bc} (la cadena antisentido) incluye una región de complementariedad que es sustancialmente complementaria, y generalmente totalmente complementaria, a una secuencia diana. La secuencia diana puede derivarse de la secuencia de un ARN_m que se forma durante la expresión de un gen de la TTR. La otra cadena (la cadena de sentido) incluye una región que es complementaria a la cadena antisentido, de manera que las dos cadenas se hibridan y forman una estructura dúplex cuando se combinan en condiciones adecuadas. Como se describe en la presente descripción y como se conoce en la técnica, las secuencias complementarias de un ARN_{bc} también pueden contenerse como regiones

autocomplementarias de una única molécula de ácido nucleico, en lugar de estar en oligonucleótidos separados.

Generalmente, la estructura dúplex es de 15 a 30 pares de bases de longitud, por ejemplo, 15-29, 15-28, 15-27, 15-26, 15-25, 15-24, 15-23, 15-22, 15-21, 15-20, 15-19, 15-18, 15-17, 18-30, 18-29, 18-28, 18-27, 18-26, 18-25, 18-24, 18-23, 18-22, 18-21, 18-20, 19-30, 19-29, 19-28, 19-27, 19-26, 19-25, 19-24, 19-23, 19-22, 19-21, 19-20, 20-30, 20-29, 20-28, 20-27, 20-26, 20-25, 20-24, 20-23, 20-22, 20-21, 21-30, 21-29, 21-28, 21-27, 21-26, 21-25, 21-24, 21-23, o 21-22 pares de bases de longitud. En determinadas modalidades, la estructura dúplex es de 18 a 25 pares de bases de longitud, por ejemplo, 18-25, 18-24, 18-23, 18-22, 18-21, 18-20, 19-25, 19-24, 19-23, 19-22, 19-21, 19-20, 20-25, 20-24, 20-23, 20-22, 20-21, 21-25, 21-24, 21-23, 21-22, 22-25, 22-24, 22-23, 23-25, 23-24 o 24-25 pares de bases de longitud, por ejemplo, 19-21 pares de bases de longitud. Los rangos y longitudes intermedios a los rangos y longitudes mencionados anteriormente también se contemplan como parte de la descripción.

De modo similar, la región de complementariedad a la secuencia diana tiene entre 15 y 30 nucleótidos de longitud, p. ej., 15-29, 15-28, 15-27, 15-26, 15-25, 15-24, 15-23, 15-22, 15-21, 15-20, 15-19, 15-18, 15-17, 18-30, 18-29, 18-28, 18-27, 18-26, 18-25, 18-24, 18-23, 18-22, 18-21, 18-20, 19-30, 19-29, 19-28, 19-27, 19-26, 19-25, 19-24, 19-23, 19-22, 19-21, 19-20, 20-30, 20-29, 20-28, 20-27, 20-26, 20-25, 20-24, 20-23, 20-22, 20-21, 21-30, 21-29, 21-28, 21-27, 21-26, 21-25, 21-24, 21-23, o 21-22 nucleótidos de longitud, por ejemplo 19-23 nucleótidos de longitud o 21-23 nucleótidos de longitud. Los rangos y longitudes intermedios a los rangos y longitudes mencionados anteriormente también se contemplan como parte de la descripción.

En algunas modalidades, la estructura dúplex es de 19 a 30 pares de bases de longitud. De manera similar, la región de complementariedad a la secuencia diana es de 19 a 30 nucleótidos de longitud.

En algunas modalidades, el ARNbc es de aproximadamente 19 a aproximadamente 23 nucleótidos de longitud, o de aproximadamente 25 a aproximadamente 30 nucleótidos de

longitud. En general, el ARNbc es lo suficientemente largo como para servir como sustrato para la enzima Dicer. Por ejemplo, es bien conocido en la técnica que los ARNbc más largos que aproximadamente 21-23 nucleótidos de longitud pueden servir como sustratos para Dicer. Como el experto en la práctica habitual también reconocerá, la región de un

5 ARN dirigido a la escisión con mayor frecuencia será parte de una molécula de ARN más grande, a menudo una molécula de ARNm. Donde sea relevante, una “parte” de una diana de ARNm es una secuencia contigua de una diana de ARNm de longitud suficiente para permitir que sea un sustrato para la escisión dirigida por ARNi (es decir, la escisión a través de una vía de RISC).

10 Un experto en la técnica también reconocerá que la región dúplex es una porción funcional primaria de un ARNbc, por ejemplo, una región dúplex de aproximadamente 19 a aproximadamente 30 pares de bases, por ejemplo, aproximadamente 19-30, 19-29, 19-28, 19-27, 19-26, 19-25, 19-24, 19-23, 19-22, 19-21, 19-20, 20-30, 20-29, 20-28, 20-27, 20-26, 20-25, 20-24, 20-23, 20-22, 20-21, 21-30, 21-29, 21-28, 21-27, 21-26, 21-25, 21-24, 21-23, o

15 21-22 pares de base. Por lo tanto, en una modalidad, en la medida en que se procesa a un dúplex funcional, de por ejemplo, 15-30 pares de bases, que se dirige a un ARN deseado para la escisión, una molécula de ARN o complejo de moléculas de ARN que tienen una región dúplex mayor que 30 pares de bases es un ARNbc. Por lo tanto, un experto en la técnica reconocerá que en una modalidad, un ARNmi es un ARNbc. En otra modalidad, un

20 ARNbc no es un ARNmi de origen natural. En otra modalidad, un agente de ARNi útil para dirigirse a la expresión génica de la TTR no se genera en la célula diana mediante la escisión de un ARNbc más grande.

Un ARNbc como se describe en la presente descripción puede incluir además uno o más extremos salientes de nucleótidos monocatenarios, por ejemplo, 1-4, 2-4, 1-3, 2-3, 1, 2,

25 3 o 4 nucleótidos. Los ARNbc que tienen al menos un extremo saliente de nucleótidos pueden tener propiedades inhibidoras superiores en relación con sus homólogos de extremo romo. Un extremo saliente de nucleótidos puede comprender o consistir en un análogo de nucleótido/nucleósido, que incluye un desoxinucleótido/nucleósido. El extremo saliente

puede estar en la cadena de sentido, la cadena antisentido, o cualquier combinación de estas. Además, los nucleótidos de un extremo saliente pueden estar presentes en el extremo 5', el extremo 3', o en ambos extremos de una cadena antisentido o de sentido de un ARNbc.

- 5 Un ARNbc puede sintetizarse mediante métodos estándar conocidos en la técnica. Los compuestos de ARNi bicatenario de la invención pueden prepararse usando un procedimiento de dos etapas. Primero, las cadenas individuales de la molécula de ARN bicatenario se preparan por separado. Luego, las cadenas de los componentes se asocian. Las cadenas individuales del compuesto de ARNpi pueden prepararse usando síntesis
- 10 orgánica en fase de solución o fase sólida o ambas. La síntesis orgánica ofrece la ventaja de que las cadenas de oligonucleótidos que comprenden nucleótidos no naturales o modificados pueden prepararse fácilmente. De manera similar, los oligonucleótidos monocatenarios de la invención pueden prepararse usando síntesis orgánica en fase de solución o en fase sólida o ambas.
- 15 En un aspecto, un ARNbc de la invención incluye al menos dos secuencias de nucleótidos, una secuencia de sentido y una secuencia de antisentido. La cadena de sentido se selecciona del grupo de secuencias que se proporciona en cualquiera de las Tablas 2, 3, 5 y 6, y la cadena antisentido correspondiente de la cadena de sentido se selecciona del grupo de secuencias de cualquiera de las Tablas 2, 3, 5 y 6. En este
- 20 aspecto, una de las dos secuencias es complementaria a la otra de las dos secuencias, con una de las secuencias sustancialmente complementaria a una secuencia de un ARNm generado en la expresión de un gen TTR. Como tal, en este aspecto, un ARNbc incluirá dos oligonucleótidos, donde un oligonucleótido se describe como la cadena de sentido en cualquiera de las Tablas 2, 3, 5, y 6, y el segundo oligonucleótido se describe como la
- 25 cadena de antisentido correspondiente de la cadena de sentido en cualquiera de las Tablas 2, 3, 5, y 6.

En determinadas modalidades, las secuencias sustancialmente complementarias del ARNbc están contenidas en oligonucleótidos separados. En otras modalidades, las

secuencias sustancialmente complementarias del ARNbc están contenidas en un solo oligonucleótido.

Se entenderá que, aunque las secuencias, por ejemplo, en la Tabla 2 no se describen como secuencias modificadas o conjugadas, el ARN del ARNi de la invención, por ejemplo, un ARNbc de la invención, puede comprender cualquiera de las secuencias establecidas en cualquiera de las Tablas 2, 3, 5, y 6 que no se modifican, no se conjugan, o se modifican o conjugan de manera diferente a las que se describen en estas. En otras palabras, la invención abarca el ARNbc de las Tablas 2, 3, 5, y 6 que no se modifican, no se conjugan, se modifican o conjugan, como se describe en la presente descripción.

El experto en la técnica es consciente de que los ARNbc que tienen una estructura dúplex de aproximadamente 20 a 23 pares de bases, por ejemplo, 21 pares de bases se han aclamado como particularmente efectivos para inducir interferencia de ARN (Elbashir *et al.*, *EMBO* 2001, 20:6877-6888). Sin embargo, otros han descubierto que estructuras dúplex de ARN más cortas o más largas también pueden ser efectivas (Chu y Rana (2007) *RNA* 14:1714-1719; Kim *et al.* (2005) *Nat Biotech* 23:222-226). En las modalidades que se describieron anteriormente, en virtud de la naturaleza de las secuencias de oligonucleótidos que se proporcionan en cualquiera de las Tablas 2, 3, 5, y 6, los ARNbc que se describen en la presente descripción pueden incluir al menos una cadena de una longitud mínima de 21 nucleótidos. Puede esperarse razonablemente que los dúplex más cortos que tienen una de las secuencias en cualquiera de las Tablas 2, 3, 5, y 6 menos solo unos pocos nucleótidos en uno o ambos extremos puedan ser de manera similar efectivos en comparación con los ARNbc que se describieron anteriormente. Por lo tanto, se contempla que los ARNbc que tienen una secuencia de al menos 19, 20, o más nucleótidos contiguos derivados de una cualquiera de las secuencias de una cualquiera de las Tablas 2, 3, 5, y 6, y que difieren en su capacidad para inhibir la expresión de un gen TTR por no más de aproximadamente 5, 10, 15, 20, 25 o 30 % de inhibición de un ARNbc que comprende la secuencia completa estén dentro del alcance de la presente invención.

Además, los ARN proporcionados en las Tablas 2, 3, 5, y 6 identifican uno o más sitios en un transcrito de TTR que es susceptible a la escisión mediada por RISC. Como tal, la presente invención presenta además los ARNi que se dirigen dentro de uno de estos sitios. Como se usa en la presente descripción, se dice que un ARNi se dirige dentro de un sitio particular de un transcrito de ARN si el ARNi promueve la escisión del transcrito en cualquier lugar dentro de ese sitio particular. Tal ARNi incluirá generalmente al menos aproximadamente 19 nucleótidos contiguos de cualquiera de las secuencias que se proporcionan en cualquiera de las Tablas 2, 3, 5, y 6 acopladas a secuencias de nucleótidos adicionales tomadas de la región contigua a la secuencia que se selecciona en un gen de la TTR.

III. ARNi modificados de la invención

En determinadas modalidades, el ARN del ARNi de la invención, por ejemplo, un ARNbc, no está modificado, y no comprende, por ejemplo, modificaciones químicas o conjugaciones conocidas en la técnica y descritas en la presente descripción. En otras modalidades, el ARN de un ARNi de la invención, por ejemplo, un ARNbc, se modifica químicamente para potenciar la estabilidad u otras características beneficiosas. En determinadas modalidades de la invención, se modifican sustancialmente todos los nucleótidos de un ARNi de la invención. En otras modalidades de la invención, todos los nucleótidos de un ARNi o sustancialmente todos los nucleótidos de un ARNi se modifican, *es decir*, no más de 5, 4, 3, 2 o 1 nucleótidos no modificados están presentes en una cadena del ARNi.

Los ácidos nucleicos que se presentan en la invención pueden sintetizarse o modificarse mediante métodos bien establecidos en la técnica, tales como los que se describen en "Current protocols in nucleic acid chemistry," Beaucage, S.L. y otros (Edrs.), John Wiley & Sons, Inc., Nueva York, NY, EE. UU., que se incorpora a la presente por referencia. Las modificaciones incluyen, por ejemplo, modificaciones de extremo, p. ej., modificaciones de extremo 5' (fosforilación, conjugación, enlaces invertidos) o

modificaciones de extremo 3' (conjugación, nucleótidos de ADN, enlaces invertidos, etc.); modificaciones de bases, p. ej., reemplazo con bases estabilizantes, bases desestabilizantes, o las bases que se emparejan con un repertorio ampliado de socios, eliminación de bases (nucleótidos abásicos), o bases conjugadas; modificaciones del azúcar (p. ej., en la posición 2' o la posición 4') o reemplazo del azúcar; o modificaciones de la estructura principal, incluida la modificación o reemplazo de los enlaces de fosfodiéster. Los ejemplos específicos de compuestos de ARNi útiles en las modalidades descritas en la presente descripción incluyen, pero no se limitan a los ARN que contienen estructuras principales modificadas o no hay enlaces internucleosídicos naturales. Los ARN que tienen estructuras principales modificadas incluyen, entre otros, los que no tienen un átomo de fósforo en la estructura principal. Para los fines de esta descripción, y como a veces se hace referencia en la técnica, los ARN modificados que no tienen un átomo de fósforo en su estructura principal internucleosídica también pueden considerarse oligonucleósidos. En algunas modalidades, un ARNi modificado tendrá un átomo de fósforo en su estructura principal internucleosídica.

Las estructuras principales de ARN modificado incluyen: por ejemplo, fosforotioatos, fosforotioatos quirales, fosforoditioatos, fosfotriésteres, aminoalquilfosfotriésteres, metilo y otros fosfonatos alquilo que incluyen fosfonatos de 3'-alquileo y fosfonatos quirales, fosfinatos, fosforamidatos que incluyen 3'-amino fosforamidato y aminoalquilfosforamidatos, tionofosforamidatos, tionoalquilfosfonatos, tionoalquifosfotriésteres, y boranofosfatos que tienen enlaces 3'-5' normales, análogos 2'-5'-enlazados de estos, y los que tienen polaridad invertida en donde los pares adyacentes de unidades de nucleósidos se enlazan 3'-5' a 5'-3' o 2'-5' a 5'-2'. También se incluyen diversas sales, sales mixtas y formas de ácido libre. En algunas modalidades de la invención, los agentes de ARNbc de la invención están en una forma de ácido libre. En otras modalidades de la invención, los agentes de ARNbc de la invención están en forma de sal. En una modalidad, los agentes de ARNbc de la invención están en una forma de sal de sodio. En determinadas modalidades, cuando los agentes de ARNbc de la invención están en la forma de sal de sodio, los iones sodio están presentes en

el agente como contraiones para sustancialmente todos los grupos fosfodiéster y/o fosforotiotato presentes en el agente. Los agentes en los que sustancialmente todos los enlaces de fosfodiéster y/o fosforotioato tienen un contraión de sodio incluyen no más de 5, 4, 3, 2, o 1 enlaces de fosfodiéster y/o fosforotioato sin un contraión de sodio. En algunas modalidades, cuando los agentes de ARNbc de la invención están en la forma de sal de sodio, los iones sodio están presentes en el agente como contraiones para todos los grupos fosfodiéster y/o fosforotiotato presentes en el agente.

Las patentes de EE. UU. representativas que enseñan la preparación de los enlaces que contienen fósforo anteriores incluyen, pero no se limitan a, las patentes de EE. UU.

10 núms. 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; 15 6,858,715; 6,867,294; 6,878,805; 7,015,315; 7,041,816; 7,273,933; 7,321,029; y la patente de EE. UU. RE39464, cuyos contenidos enteros se incorporan en la presente descripción mediante referencia.

Las estructuras principales de ARN modificado que no incluyen un átomo de fósforo en estas tienen estructuras principales que se forman por enlaces internucleosídicos de cicloalquilo o alquilo de cadena corta, heteroátomos mixtos y enlaces internucleosídicos de alquilo o cicloalquilo, o una o más enlaces internucleosídicos heterocíclicos o heteroatómicos de cadena corta. Estos incluyen los que tienen enlaces morfolino (formados en parte a partir de la porción de azúcar de un nucleósido); estructuras principales de siloxano; estructuras principales de sulfuro, sulfóxido y sulfona; estructuras principales de formacetil y tioformacetil; estructuras principales de metileno formacetilo y tioformacetilo; 20 estructuras principales con alqueno, estructuras principales de sulfamato; estructuras principales de metilenimino y metilenhidrazino; estructuras principales de sulfonato y

sulfonamida; estructuras principales de amida; y otras que tienen partes componentes de N, O, S y CH₂ mezcladas.

Las patentes estadounidenses representativas que enseñan la preparación de los oligonucleósidos anteriores incluyen, entre otras, las patentes estadounidenses núms.

5 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; and 5,677,439, cuyos contenidos se incorporan a la presente como referencia.

Los miméticos de ARN adecuados se contemplan para su uso en los ARNi que se
10 proporcionan en la presente descripción, en los que tanto el azúcar como el enlace internucleosídico, es decir, la cadena principal de las unidades de nucleótidos se reemplaza con nuevos grupos. Las unidades base se mantienen para la hibridación con un compuesto diana de ácido nucleico apropiado. Un compuesto oligomérico de este tipo en el que un mimético de ARN que se ha demostrado que tiene excelentes propiedades de hibridación se
15 denomina ácido nucleico peptídico (PNA). En los compuestos PNA, la estructura principal del azúcar de un ARN se reemplaza con una estructura principal que contiene amida, en particular una estructura principal de aminoetilglicina. Las nucleobases se retienen y se unen directa o indirectamente a los átomos de nitrógeno aza de la porción amida de la estructura principal. Las patentes estadounidenses representativas que enseñan la preparación de
20 compuestos de PNA incluyen, entre otras, las patentes estadounidenses núms. 5,539,082; 5,714,331; y 5,719,262, cuyos contenidos completos se incorporan en la presente como referencia. Los compuestos PNA adicionales adecuados para usar en los ARNi de la invención se describen, por ejemplo, en Nielsen *et al.*, *Science*, 1991, 254, 1497-1500.

Algunas modalidades que se presentan en la invención incluyen ARN con cadenas
25 principales de fosforotioato y oligonucleósidos con estructuras principales de heteroátomos, y en particular --CH₂--NH--CH₂--, --CH₂--N(CH₃)--O--CH₂--[conocido como metileno (metilimino) o estructura principal de MMI], --CH₂--O--N(CH₃)--CH₂--, --CH₂--N(CH₃)--N(CH₃)--CH₂-- y --N(CH₃)--CH₂--CH₂-- de la patente de EE. UU. núm. 5,489,677 mencionada

anteriormente, y las estructuras principales de amida de la patente de EE. UU. núm. 5,602,240 mencionada anteriormente. En algunas modalidades, los ARN que se presentan en la presente descripción tienen estructuras principales morfolino de la patente de EE. UU. núm. 5,034,506 mencionada anteriormente. La estructura principal de fosfodiéster nativo
5 puede representarse como O-P(O)(OH)-OCH₂-.

Los ARN modificados pueden contener además uno o más restos de azúcar sustituidos. Los ARNi, por ejemplo, los ARNbc, que se presentan en la presente descripción pueden incluir uno de los siguientes en la posición 2': OH; F; O-, S-, o N-alquilo; O-, S-, o N-alqueno; O-, S- o N-alquino; u O-alquil-O-alquilo, en donde el alquilo, alqueno y alquino pueden ser alquilo C₁ a C₁₀ o alqueno y alquino C₂ a C₁₀ sustituidos o no
10 sustituidos. Las modificaciones adecuadas ilustrativas incluyen O[(CH₂)_nO]_mCH₃, O(CH₂)_nOCH₃, O(CH₂)_nNH₂, O(CH₂)_nCH₃, O(CH₂)_nONH₂, and O(CH₂)_nON[(CH₂)_nCH₃]₂, donde n y m son de 1 a aproximadamente 10. En otras modalidades, los ARNbc incluyen uno de los siguientes en la posición 2': alquilo inferior C₁ a C₁₀, alquilo inferior sustituido,
15 alcarilo, aralquilo, O-alcarilo u O-aralquilo, SH, SCH₃, OCN, Cl, Br, CN, CF₃, OCF₃, SOCH₃, SO₂CH₃, ONO₂, NO₂, N₃, NH₂, heterocicloalquilo, heterocicloalcarilo, aminoalquilamino, polialquilamino, sililo sustituido, un grupo 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 con
20 propiedades similares. En algunas modalidades, la modificación incluye una 2'-metoxietoxi (2'-O--CH₂CH₂OCH₃, también conocido como 2'-O-(2-metoxietil) o 2'-MOE) (Martin *et al.*, *Helv. Chim. Acta*, 1995, 78:486-504) *i.e.*, un grupo alcoxi-alcoxi. Otra modificación ilustrativa es 2'-dimetilaminooxietoxi, es decir, un grupo O(CH₂)₂ON(CH₃)₂, también conocido como 2'-DMAOE, como se describe en los ejemplos a continuación, y 2'-dimetilaminoetoxietoxi
25 (también conocido en la técnica como 2'-O-dimetilaminoetoxietilo o 2'-DMAEOE), es decir, 2'-O--CH₂--O--CH₂--N(CH₃)₂. Otras modificaciones ilustrativas incluyen: nucleótidos 5'-Me-2'-F, nucleótidos 5'-Me-2'-OMe, 5'-Me-2'-desoxinucleótidos, (isómeros R y S en estas tres familias); 2'-alcoxialquilo; y 2'-NMA (N-metilacetamida).

Otras modificaciones incluyen 2'-metoxi (2'-OCH₃), 2'-aminopropoxi (2'-OCH₂CH₂CH₂NH₂) y 2'-fluoro (2'-F). Se pueden hacer modificaciones similares también en otras posiciones en el ARN de un ARNi, particularmente la posición 3' del azúcar en el nucleótido terminal 3' o en los ARNbc enlazados en 2'-5' y la posición 5' del nucleótido terminal 5'. Los ARNi también pueden tener miméticos de azúcar tales como restos de ciclobutilo en lugar del azúcar pentofuranosilo. Las patentes de EE. UU. representativas que enseñan la preparación de tales estructuras de azúcar modificadas incluyen, pero no se limitan a, las patentes de EE. UU. núms. 4,981,957; 5,118,800; 5,319,080; 5,359,044; 5,393,878; 5,446,137; 5,466,786; 5,514,785; 5,519,134; 5,567,811; 5,576,427; 5,591,722; 5,597,909; 5,610,300; 5,627,053; 5,639,873; 5,646,265; 5,658,873; 5,670,633; y 5,700,920, algunas de las cuales son de propiedad común con la presente solicitud. Todo el contenido de cada uno de los anteriores se incorpora en la presente como referencia.

Un ARNi puede incluir, además, modificaciones o sustituciones de nucleobases (con frecuencia denominadas en la técnica simplemente como "base"). Como se usa en la presente descripción, las nucleobases "no modificadas" o "naturales" incluyen 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 otras nucleobases sintéticas y naturales tales como desoxitimidina (dT), 5-metilcitosina (5-me-C), 5-hidroximetilcitosina, xantina, hipoxantina, 2-aminoadenina, 6-metilo y otros derivados de alquilo de adenina y guanina, 2-propilo y otros derivados de 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 anal, otras adeninas y guaninas 8-sustituidas, 5-halo, particularmente 5-bromo, 5-trifluorometilo y otros uracilos y citosinas 5-sustituidos, 7-metilguanina y 7-metiladenina, 8-azaguanina y 8-azaadenina, 7-deazaguanina y 7-daazaadenina y 3-deazaguanina y 3-deazaadenina. Otras nucleobases incluyen las descritas en la patente de EE. UU. núm. 3,687,808, los descritos en *Modified Nucleosides in Biochemistry, Biotechnology and Medicine*, Herdewijn, P. ed. Wiley-VCH, 2008; los descritos en *The Concise Encyclopedia Of*

Polymer Science And Engineering, páginas 858-859, Kroschwitz, J. L., ed. John Wiley & Sons, 1990, estos descritos en Englisch *et al.*, Angewandte Chemie, Edición Internacional, 1991, 30, 613, y aquellos descritos por Sanghvi, Y S., capítulo 15, dsRNA Research and Applications, páginas 289-302, Crooke, S. T. y Lebleu, B., Ed., CRC Press, 1993. Algunos

5 de estos nucleobases son particularmente útiles para aumentar la afinidad de unión de los compuestos oligoméricos que se presentan en la invención. Estos incluyen pirimidinas 5-sustituidas, 6-azapirimidinas y N-2, N-6 y O-6 purinas sustituidas, incluyendo 2-aminopropiladenina, 5-propiniluracilo y 5-propinilcitosina. Se ha demostrado que las sustituciones de 5-metilcitosina aumentan la estabilidad del dúplex de ácido nucleico en 0,6-

10 1,2 °C (Sanghvi, Y. S., Crooke, S. T. y Lebleu, B., Ed., ARNbc Research and Applications, CRC Press, Boca Ratón, 1993, páginas. 276-278) y son sustituciones de base ilustrativas, aún más particularmente cuando se combina con modificaciones de azúcar 2'-O-metoxietilo.

Las patentes de EE. UU. representativas que enseñan la preparación de ciertas de las nucleobases modificadas mencionadas anteriormente, así como otras nucleobases

15 modificadas incluyen, pero no se limitan a, las patentes de EE. UU. núms. 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 mencionadas

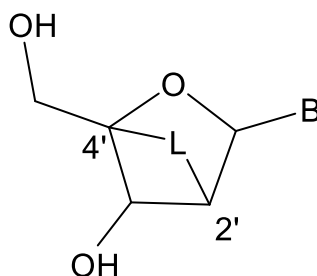
20 anteriormente, cuyos contenidos enteros se incorporan en la presente descripción como referencia.

En algunas modalidades, un agente de ARNi de la descripción también puede modificarse para incluir uno o más restos de azúcar bicíclico. Un "azúcar bicíclico" es un anillo de furanosilo modificado por un anillo formado por el puenteo de dos carbonos, ya

25 sean adyacentes o no adyacentes. Un "nucleósido bicíclico" ("BNA") es un nucleósido que tiene un resto de azúcar que comprende un anillo formado al puenteo de dos carbonos, ya sea adyacentes o no adyacentes, del anillo de azúcar, formando así un sistema de anillo bicíclico. En determinadas modalidades, el puente conecta el 4'-carbono y el 2'-carbono del

anillo de azúcar, opcionalmente, a través del átomo de oxígeno 2'-acíclico. Por lo tanto, en algunas modalidades un agente de la invención puede incluir uno o más ácidos nucleicos bloqueados (LNA). Un ácido nucleico bloqueado es un nucleótido que tiene un resto de ribosa modificado en el que el resto de ribosa comprende un puente adicional que conecta los carbonos 2' y 4'. En otras palabras, un LNA es un nucleótido que comprende un resto de azúcar bicíclico que comprende un puente 4'-CH₂-O-2'. Esta estructura "bloquea" efectivamente la ribosa en la conformación endoestructural 3'. Se ha demostrado que la adición de ácidos nucleicos bloqueados a los ARNip aumenta la estabilidad del ARNip en el suero y reduce los efectos fuera de la diana (Elmen, J. *et al.*, (2005) *Nucleic Acids Research* 33(1):439-447; Mook, OR. *et al.*, (2007) *Mol Canc Ther* 6(3):833-843; Grunweller, A. *et al.*, (2003) *Nucleic Acids Research* 31(12):3185-3193). Los ejemplos de nucleósidos bicíclicos para su uso en los polinucleótidos de la invención incluyen sin limitación nucleósidos que comprenden un puente entre los átomos de anillo de ribosilo de 4' y 2'. En determinadas modalidades, los agentes polinucleótidos antisentido de la invención incluyen uno o más nucleósidos bicíclicos que comprenden un puente de 4' a 2'.

Un nucleósido bloqueado puede estar representado por la estructura (estereoquímica omitida),



en donde B es una nucleobase o nucleobase modificada y L es el grupo enlazador que une el 2'-carbono al 4'-carbono del anillo de ribosa. Ejemplos de tales nucleósidos bicíclicos puenteados de 4' a 2', incluyen entre otros, 4'-(CH₂)—O-2' (LNA); 4'-(CH₂)—S-2'; 4'-(CH₂)₂—O-2' (ENA); 4'-CH(CH₃)-O-2' (también denominado "etil restringido" o "cEt") y 4'-CH(CH₂OCH₃)-O-2' (y sus análogos; ver, p. ej., patente de EE. UU. núm. 7,399,845); 4'-C(CH₃)(CH₃)—O-2' (y sus análogos; ver, p. ej., patente de EE. UU. núm. 8,278,283); 4'-

CH₂—N(OCH₃)-2' (y sus análogos; ver, p. ej, Patente de EE. UU. núm. 8,278,425); 4'-CH₂—O—N(CH₃)-2' (ver, p. ej., publicación de patentes de EE. UU. núm. 2004/0171570); 4'-CH₂—N(R)—O-2', en donde R es H, alquilo C₁-C₁₂, o un grupo protector de nitrógeno (ver, p. ej., patente de EE. UU. núm. 7,427,672); 4'-CH₂—C(H)(CH₃)-2' (ver, p. ej., Chattopadhyaya y otros, *J. Org. Chem.*, 2009, 74, 118-134); y 4'-CH₂—C(=CH₂)-2' (y sus análogos, ver, p. ej., patente de EE. UU. núm. 8,278,426). Todo el contenido de cada uno de los anteriores se incorpora en la presente como referencia.

Las patentes de EE. UU. y las publicaciones de patentes de EE. UU. adicionales representativas que enseñan la preparación de nucleótidos de ácido nucleico bloqueados incluyen, entre otras, las siguientes: Patentes de EE. UU. núms. 6,268,490; 6,525,191; 6,670,461; 6,770,748; 6,794,499; 6,998,484; 7,053,207; 7,034,133; 7,084,125; 7,399,845; 7,427,672; 7,569,686; 7,741,457; 8,022,193; 8,030,467; 8,278,425; 8,278,426; 8,278,283; US 2008/0039618; y US 2009/0012281, cuyos contenidos enteros se incorporan en la presente descripción como referencia.

Cualquiera de los nucleósidos bicíclicos anteriores puede prepararse con una o más configuraciones de azúcar estereoquímicas que incluyen, por ejemplo, α-L-ribofuranosa y β-D-ribofuranosa (ver WO 99/14226).

El ARN de un ARNi también puede modificarse para incluir uno o más nucleótidos etílicos restringidos. Como se usa en la presente descripción, un "nucleótido de etilo restringido" o "cEt" es un ácido nucleico bloqueado que comprende un resto de azúcar bicíclico que comprende un puente 4'-CH(CH₃)-O-2' (es decir, la estructura anterior en L). En una modalidad, un nucleótido de etilo restringido está en la conformación S denominada en la presente descripción como "S-cEt".

Un ARNi de la invención también puede incluir uno o más "nucleótidos conformacionalmente restringidos" ("CRN"). CRN son análogos de nucleótidos con un enlazador que conecta los carbonos de ribosa de C2' y C4' o los carbonos de ribosa de C3 y -C5'. CRN bloquea el anillo de ribosa en una conformación estable y aumenta la afinidad de hibridación al ARNm. El enlazador tiene la longitud suficiente para colocar el oxígeno en

una posición óptima para la estabilidad y la afinidad, lo que resulta en menos pliegues del anillo de ribosa.

Las publicaciones representativas que enseñan la preparación de algunos de los CRN mencionadas anteriormente incluyen, entre otras, la publicación de patente de EE. UU. núm. 2013/0190383; y la publicación PCT WO 2013/036868, cuyos contenidos completos se incorporan en la presente como referencia.

En algunas modalidades, un ARNi de la invención comprende uno o más monómeros que son nucleótidos UNA (ácido nucleico desbloqueado). UNA es ácido nucleico acíclico desbloqueado, en donde cualquiera de los enlaces del azúcar se ha eliminado, formando un residuo de "azúcar" desbloqueado. En un ejemplo, UNA también abarca un monómero con enlaces entre C1'-C4' se han eliminado (es decir, el enlace covalente carbono-oxígeno-carbono entre los carbonos C1' y C4'). En otro ejemplo, el enlace C2'-C3' (es decir, el enlace covalente carbono-carbono entre los carbonos C2' y C3') del azúcar se ha eliminado (ver *Nuc. Acids Symp. Series*, 52, 133-134 (2008) and Fluiters y otros, *Mol. Biosyst.*, 2009, 10, 1039 que se incorporan en la presente por referencia).

Las publicaciones de EE. UU. representativas que enseñan la preparación de UNA incluyen, entre otras, la patente de EE. UU. núm. 8,314,227; y las publicaciones de patente de EE. UU. núms. 2013/0096289; 2013/0011922; y 2011/0313020, cuyos contenidos completos se incorporan en la presente descripción como referencia.

Las modificaciones potencialmente estabilizantes de 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 invertida dT(idT) y otras. La descripción de esta modificación se puede encontrar en la publicación PCT núm. WO 2011/005861.

Otras modificaciones de los nucleótidos de un ARNi de la invención incluyen un 5' fosfato o un mimético 5' fosfato, por ejemplo, un fosfato terminal 5' o mimético de fosfato en la cadena antisentido de un ARNi. Los miméticos de fosfato adecuados se describen, por

ejemplo, en la publicación de patente de EE. UU. núm. 2012/0157511, cuyo contenido completo se incorpora en la presente como referencia.

A. ARNi modificados que comprenden motivos de la invención

5 En determinados aspectos de la invención, los agentes de ARN bicatenario de la invención incluyen agentes con modificaciones químicas como se describe, por ejemplo, en WO2013/075035, cuyo contenido se incorpora en la presente como referencia. Como se muestra en la presente descripción y en WO2013/075035, uno o más motivos de tres modificaciones idénticas en tres nucleótidos consecutivos pueden introducirse en una
10 cadena de sentido o una cadena antisentido de un agente de ARN_{ibc}, particularmente en el sitio de escisión o cerca de este. En algunas modalidades, la cadena de sentido y la cadena antisentido del agente ARN_{ibc} pueden modificarse completamente de cualquier otra manera. La introducción de estos motivos interrumpe el patrón de modificación, si está presente, de la cadena de sentido o de antisentido. El agente ARN_{ibc} puede conjugarse
15 opcionalmente con un ligando derivado de GalNAc, por ejemplo en la cadena de sentido.

Más específicamente, cuando la cadena de sentido y la cadena antisentido del agente de ARN bicatenario se modifican completamente para tener uno o más motivos de tres modificaciones idénticas en tres nucleótidos consecutivos en el sitio de escisión o cerca de este de al menos una cadena de un agente de ARN_{ibc}, se observó la actividad de
20 silenciamiento génico del agente ARN_{ibc}.

En consecuencia, la invención proporciona agentes de ARN bicatenarios capaces de inhibir la expresión de un gen diana (*es decir*, el gen de la TTR) *in vivo*. El agente de ARNi comprende una cadena de sentido y una cadena antisentido. Cada cadena del agente de ARNi puede ser, por ejemplo, de 17-30 nucleótidos de longitud, 25-30 nucleótidos de
25 longitud, 27-30 nucleótidos de longitud, 19-25 nucleótidos de longitud, 19-23 nucleótidos de longitud, 19-21 nucleótidos de longitud, 21-25 nucleótidos de longitud, o 21-23 nucleótidos de longitud.

La cadena de sentido y la cadena antisentido típicamente forman un ARN bicatenario dúplex (“ARNbc”), también denominado en la presente descripción como “agente de ARNbc”. La región dúplex de un agente ARNbc puede ser, por ejemplo, la región dúplex puede ser de 27-30 pares de nucleótidos de longitud, 19-25 pares de nucleótidos de longitud, 19-23 pares de nucleótidos de longitud, 19-21 pares de nucleótidos de longitud, 21-25 pares de nucleótidos de longitud, o 21-23 pares de nucleótidos de longitud. En otro ejemplo, la región dúplex se selecciona de 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26 y 27 nucleótidos de longitud.

En determinadas modalidades, el agente de ARNbc puede contener una o más regiones de extremo saliente o grupos de encapsulación en el extremo 3', el extremo 5' o ambos extremos de una o ambas cadenas. El extremo saliente puede ser, independientemente, de 1-6 nucleótidos de longitud, por ejemplo, 2-6 nucleótidos de longitud, 1-5 nucleótidos de longitud, 2-5 nucleótidos de longitud, 1-4 nucleótidos de longitud, 2-4 nucleótidos de longitud, 1-3 nucleótidos de longitud, 2-3 nucleótidos de longitud, o 1-2 nucleótidos de longitud. En determinadas modalidades, las regiones de extremo saliente pueden incluir regiones de extremo saliente extendidas como se proporcionó anteriormente. Los extremos salientes pueden ser el resultado de que una cadena es más larga que la otra, o el resultado de que dos cadenas de la misma longitud se escalonan. El extremo saliente puede formar un error de emparejamiento con el ARNm diana o puede ser complementario a las secuencias génicas a las que se dirigen o puede ser otra secuencia. La primera y segunda cadenas también pueden unirse, por ejemplo, por bases adicionales para formar una horquilla, o por otros enlazadores que no son bases.

En determinadas modalidades, los nucleótidos en la región de extremos saliente del agente de ARNbc pueden ser cada uno de forma independiente un nucleótido modificado o no modificado que incluye, de modo no taxativo, 2'-azúcar modificado, tal como, 2'-F, 2'-O-metil, timidina (T), 2'-O-metoxietil-5-metiluridina (Teo), 2'-O-metoxietiladenosina (Aeo), 2'-O-metoxietil-5-metilcitidina (m5Ceo), y cualquiera de sus combinaciones.

Por ejemplo, TT puede ser una secuencia de extremo saliente para cualquiera de los extremos en cualquiera de las cadenas. El extremo saliente puede formar un error de emparejamiento con el ARNm diana o puede ser complementario a las secuencias génicas a las que se dirigen o puede ser otra secuencia.

5 Los extremos salientes 5'- o 3'- en la cadena de sentido, la cadena antisentido, o ambas cadenas del agente de ARN_{ibc} pueden fosforilarse. En algunas modalidades, la región de extremo saliente contiene dos nucleótidos que tienen un fosforotioato entre los dos nucleótidos, donde los dos nucleótidos pueden ser iguales o diferentes. En algunas modalidades, el extremo saliente está presente en el extremo 3' de la cadena de sentido, la
10 cadena antisentido, o ambas cadenas. En algunas modalidades, este extremo saliente de 3' está presente en la cadena antisentido. En algunas modalidades, este extremo saliente de 3' está presente en la cadena de sentido.

El agente de ARN_{ibc} puede contener solo un único extremo saliente, que puede fortalecer la actividad de interferencia del ARNi, sin afectar su estabilidad general. Por
15 ejemplo, el extremo saliente monocatenario puede localizarse en el extremo 3'- de la cadena de sentido o, alternativamente, en el extremo 3'- de la cadena antisentido. El ARNi también puede tener un extremo romo, ubicado en el extremo 5' de la cadena antisentido (es decir, el extremo 3' de la cadena de sentido) o *viceversa*. Generalmente, la cadena antisentido del agente de ARN_{ibc} tiene un extremo saliente de nucleótidos en el extremo 3', y el extremo 5' es romo. Sin ceñirse a la teoría, el extremo romo asimétrico en el extremo 5' de la cadena
20 antisentido y el extremo saliente del extremo 3' de la cadena antisentido favorecen la carga de la cadena guía en el proceso de RISC.

En determinadas modalidades, el agente de ARN_{ibc} tiene dos extremos romos de 19 nucleótidos de longitud, en donde la cadena de sentido contiene al menos un motivo de tres
25 modificaciones 2'-F en tres nucleótidos consecutivos en las posiciones 7, 8, 9 desde el extremo 5'. La cadena antisentido contiene al 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 modalidades, el agente de ARN_{ibc} tiene dos extremos romos de 20 nucleótidos de longitud, en donde la cadena de sentido contiene al menos un motivo de tres modificaciones 2'-F en tres nucleótidos consecutivos en las posiciones 8, 9, 10 desde el extremo 5'. La cadena antisentido contiene al menos un motivo de tres modificaciones 2'-O-

5 metilo en tres nucleótidos consecutivos en las posiciones 11, 12, 13 desde el extremo 5'.

En incluso otras modalidades, el agente de ARN_{ibc} tiene dos extremos romos de 21 nucleótidos de longitud, en donde la cadena de sentido contiene al menos un motivo de tres modificaciones 2'-F en tres nucleótidos consecutivos en las posiciones 9, 10, y 11 desde el extremo 5'. La cadena antisentido contiene al menos un motivo de tres modificaciones 2'-O-

10 metilo en tres nucleótidos consecutivos en las posiciones 11, 12, 13 desde el extremo 5'.

En determinadas modalidades, el agente de ARN_{ibc} comprende una cadena de sentido de 21 nucleótidos y una cadena antisentido de 23 nucleótidos, en donde la cadena de sentido contiene al menos un motivo de tres modificaciones 2'-F en tres nucleótidos consecutivos en las posiciones 9, 10, y 11 desde el extremo 5'; la cadena antisentido

15 contiene al menos un motivo de tres modificaciones 2'-O-metilo en tres nucleótidos consecutivos en las posiciones 11, 12, y 13 desde el extremo 5', en donde un extremo del agente de ARN_i es romo, mientras que el otro extremo comprende un extremo saliente de 2 nucleótidos. En una modalidad, el extremo saliente de 2 nucleótidos está en el extremo 3' de la cadena antisentido.

20 Cuando el extremo saliente de 2 nucleótidos está en el extremo 3' de la cadena antisentido, puede haber dos enlaces intranucleotídicos de fosforotioato entre los tres nucleótidos terminales, en donde dos de los tres nucleótidos son los nucleótidos de extremo saliente, y el tercer nucleótido es un nucleótido emparejado junto al nucleótido de extremo saliente. En una modalidad, el agente de ARN_i tiene adicionalmente dos enlaces

25 internucleotídicos de fosforotioato entre los tres nucleótidos terminales tanto en el extremo 5' de la cadena de sentido como en el extremo 5' de la cadena antisentido. En determinadas modalidades, cada nucleótido en la cadena de sentido y la cadena antisentido del agente ARN_{ibc}, incluidos los nucleótidos que son parte de los motivos, son nucleótidos modificados.

En determinadas modalidades cada residuo se modifica independientemente con un 2'-O-metilo o 3'-fluoro, por ejemplo, en un motivo alternativo. Opcionalmente, el agente de ARN_{ibc} comprende además un ligando (tal como, GalNAc₃).

En determinadas modalidades, el agente de ARN_{ibc} comprende una cadena de
5 sentido y una de antisentido, en donde la cadena de sentido es de 25-30 residuos de nucleótidos de longitud, en donde a partir del nucleótido terminal 5' (posición 1) las posiciones 1 a 23 de la primera cadena comprenden al menos 8 ribonucleótidos; la cadena antisentido es de 36-66 residuos de nucleótidos de longitud y, a partir del nucleótido terminal 3', comprende al menos 8 ribonucleótidos en las posiciones emparejadas con las posiciones
10 1- 23 de la cadena de sentido para formar un dúplex; en donde al menos el nucleótido terminal 3' de la cadena antisentido no está emparejado con la cadena de sentido, y hasta 6 nucleótidos terminales 3' consecutivos no están emparejados con la cadena de sentido, formando de esta manera un extremo saliente monocatenario 3' de 1-6 nucleótidos; en donde el extremo 5' de la cadena antisentido comprende de 10-30 nucleótidos consecutivos
15 que no están emparejados con la cadena de sentido, formando de esta manera un extremo saliente monocatenario 5' de 10-30 nucleótidos; en donde al menos la cadena de sentido 5' terminal y nucleótidos terminales 3' están emparejados con nucleótidos de la cadena antisentido cuando las cadenas de sentido y antisentido están alineadas para máxima complementariedad, formando de esta manera una región sustancialmente dúplex entre las
20 cadenas de sentido y de antisentido; y la cadena antisentido es lo suficientemente complementaria a un ARN diana a lo largo de al menos 19 ribonucleótidos de longitud de la cadena antisentido para reducir la expresión génica diana cuando el ácido nucleico bicatearario se introduce en una célula de mamífero; y en donde la cadena de sentido contiene al menos un motivo de tres modificaciones 2'-F en tres nucleótidos consecutivos,
25 donde al menos uno de los motivos se produce en el sitio de escisión o cerca de este. La cadena antisentido contiene al menos un motivo de tres modificaciones 2'-O-metilo en tres nucleótidos consecutivos en el sitio de escisión o cerca de este.

En determinadas modalidades, el agente de ARN_{ibc} comprende cadenas de sentido y antisentido, en donde el agente de ARN_{ibc} comprende una primera cadena que tiene una longitud que es de al menos 25 y como máximo 29 nucleótidos y una segunda cadena que tiene una longitud que es como máximo de 30 nucleótidos con al 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 cadena y el extremo 5' de la segunda cadena forman un extremo romo y la segunda cadena es 1-4 nucleótidos más larga en su extremo 3' que la primera cadena, en donde la región dúplex que tiene al menos 25 nucleótidos de longitud, y la segunda cadena es lo suficientemente complementaria a un ARNm diana a lo largo de al menos 19 nucleótidos de la longitud de la segunda cadena para reducir la expresión génica en la diana cuando el agente de ARNi se introduce en una célula de mamífero, y en donde la escisión Dicer del agente de ARN_{ibc} da como resultado un ARN_{ip} que comprende el extremo 3' de la segunda cadena, reduciendo así la expresión del gen diana en el mamífero. Opcionalmente, el agente de ARN_{ibc} comprende además un ligando.

En determinadas modalidades, la cadena de sentido del agente de ARN_{ibc} contiene al menos un motivo de tres modificaciones idénticas en tres nucleótidos consecutivos, donde uno de los motivos ocurre en el sitio de escisión en la cadena de sentido.

En determinadas modalidades, la cadena antisentido del agente de ARN_{ibc} puede contener además al menos un motivo de tres modificaciones idénticas en tres nucleótidos consecutivos, donde uno de los motivos ocurre en el sitio de escisión o cerca de este en la cadena antisentido.

Para un agente de ARN_{ibc} que tiene una región dúplex de 19-23 nucleótidos de longitud, el sitio de escisión de la cadena antisentido está típicamente alrededor de las posiciones 10, 11 y 12 del extremo 5'. Por lo tanto, los motivos de tres modificaciones idénticas pueden ocurrir 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 cadena antisentido, el conteo que comienza desde el primer nucleótido desde el extremo 5' de la cadena

antisentido, o, el conteo que comienza desde el primer nucleótido emparejado dentro de la región dúplex del extremo 5' de la cadena antisentido. El sitio de escisión en la cadena antisentido también puede cambiar de acuerdo con la longitud de la región dúplex del agente de ARN_{ibc} desde el extremo 5'.

5 La cadena de sentido del agente de ARN_{ibc} puede contener al menos un motivo de tres modificaciones idénticas en tres nucleótidos consecutivos en el sitio de escisión de la cadena; y la cadena antisentido puede tener al menos un motivo de tres modificaciones idénticas en tres nucleótidos consecutivos en el sitio de escisión o cerca de este de la cadena. Cuando la cadena de sentido y la cadena de antisentido forman un dúplex de
10 ARN_{bc}, la cadena de sentido y la cadena de antisentido pueden alinearse de manera que un motivo de los tres nucleótidos en la cadena de sentido y un motivo de los tres nucleótidos en la cadena de antisentido tienen al menos un nucleótido que se solapa, es decir, al menos uno de los tres nucleótidos del motivo en la cadena de sentido forma un par de bases con al menos uno de los tres nucleótidos del motivo en la cadena de antisentido. Alternativamente,
15 al menos dos nucleótidos pueden solaparse, o los tres nucleótidos pueden solaparse.

 En algunas modalidades, la cadena de sentido del agente de ARN_{ibc} puede contener más de un motivo de tres modificaciones idénticas en tres nucleótidos consecutivos. El primer motivo puede ocurrir en el sitio de escisión o cerca de este de la cadena y los otros motivos pueden ser una modificación de ala. El término “modificación de
20 ala” en la presente descripción se refiere a un motivo que ocurre en otra porción de la cadena que se separa del motivo en el sitio de escisión o cerca de este de la misma cadena. La modificación de ala es adyacente al primer motivo o está separada por al menos uno o más nucleótidos. Cuando los motivos son inmediatamente adyacentes entre sí, las características químicas de los motivos son distintas entre sí, y cuando los motivos están
25 separados por uno o más nucleótidos, entonces las características químicas pueden ser iguales o diferentes. Pueden estar presentes dos o más modificaciones de ala. Por ejemplo, cuando hay dos modificaciones de ala presentes, cada modificación de ala puede

ocurrir en un extremo con relación al primer motivo que está en el sitio de escisión o cerca de este en cualquier lado del motivo principal.

Al igual que la cadena de sentido, la cadena antisentido del agente de ARNibc puede contener más de un motivo de tres modificaciones idénticas en tres nucleótidos

5 consecutivos, con al menos uno de los motivos que se producen en o cerca del sitio de escisión de la cadena. Esta cadena antisentido puede contener además una o más modificaciones de ala en una alineación similar a las modificaciones de ala que pueden estar presentes en la cadena de sentido.

En algunas modalidades, la modificación de ala en la cadena de sentido o la cadena
10 antisentido del agente ARNibc típicamente no incluye el primer nucleótido terminal o dos en el extremo 3', el extremo 5', o ambos extremos de la cadena.

En otras modalidades, la modificación de ala en la cadena de sentido o la cadena
antisentido del agente de ARNibc típicamente no incluye el primero o dos nucleótidos
emparejados dentro de la región dúplex en el extremo 3', el extremo 5', o ambos extremos
15 de la cadena.

Cuando la cadena de sentido y la cadena antisentido del agente de ARNibc contienen cada una al menos una modificación de ala, las modificaciones de ala pueden caer en el mismo extremo de la región dúplex, y tener un solapamiento de uno, dos o tres nucleótidos.

20 Cuando la cadena de sentido y la cadena antisentido del agente de ARNibc contienen cada una al menos dos modificaciones de ala, la cadena de sentido y la cadena antisentido pueden estar tan alineadas que dos modificaciones cada una de una cadena caen en un extremo de la región dúplex, con un solapamiento de uno, dos, o tres nucleótidos; dos modificaciones cada una de una cadena caen en el otro extremo de la
25 región dúplex, con un solapamiento de uno, dos o tres nucleótidos; dos modificaciones una cadena caen a cada lado del motivo principal, con un solapamiento de uno, dos o tres nucleótidos en la región dúplex.

En algunas modalidades, cada nucleótido en la cadena de sentido y la cadena antisentido del agente de ARN_{ibc}, incluidos los nucleótidos que son parte de los motivos, puede modificarse. Cada nucleótido puede modificarse con la misma o diferente modificación que puede incluir una o más alteraciones de uno o ambos de los oxígenos del fosfato no enlazantes o de uno o más de los oxígenos del fosfato enlazantes; alteración de un constituyente del azúcar ribosa, *por ejemplo*, del 2'-hidroxilo en el azúcar ribosa; remplazo completo del resto de fosfato con enlazadores “defosfo”; modificación o remplazo de una base natural; y remplazo o modificación de la cadena principal ribosa-fosfato.

Como los ácidos nucleicos son polímeros de subunidades, muchas de las modificaciones ocurren en una posición que se repite dentro de un ácido nucleico, *por ejemplo*, una modificación de una base, o un resto de fosfato, o un O no enlazante de un resto de fosfato. En algunos casos, la modificación se producirá en todas las posiciones del sujeto en el ácido nucleico, pero en muchos casos no. A modo de ejemplo, una modificación puede ocurrir solamente en una posición terminal 3' o 5', puede ocurrir solamente 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 cadena. Una modificación puede ocurrir en una región bicatenaria, una región monocatenaria, o en ambas. Una modificación se puede producir solo en la región bicatenaria de un ARN o solo se puede producir en una región monocatenaria de un ARN. *Por ejemplo*, una modificación de fosforotioato en una posición de O no enlazante solo se puede producir en uno o ambos extremos, solo se puede producir 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 cadena, o se puede producir en regiones bicatenarias y monocatenarias, particularmente en extremos. Los extremos 5' pueden fosforilarse.

Puede ser posible, *por ejemplo*, para potenciar la estabilidad, incluir bases particulares en extremos salientes, o incluir nucleótidos modificados o sustitutos de nucleótidos, en extremos salientes monocatenarios, *por ejemplo*, en un extremo saliente 5' o 3', o en ambos. *Por ejemplo*, puede ser conveniente incluir nucleótidos de purina en los

extremos salientes. En algunas modalidades, todas o algunas de las bases en un extremo saliente 3' o 5' pueden modificarse, *por ejemplo*, con una modificación que se describe en la presente descripción. Las modificaciones pueden incluir, *por ejemplo*, el uso de modificaciones en la posición 2' del azúcar ribosa con modificaciones que se conocen en la técnica, *por ejemplo*, el uso de desoxirribonucleótidos, 2'-desoxi-2'-fluoro (2'-F) o 2'-O-metilo modificado en lugar del riboazúcar de la nucleobase, y modificaciones en el grupo fosfato, *por ejemplo*, modificaciones de fosforotioato. Los extremos salientes no necesitan ser homólogos con la secuencia diana.

En algunas modalidades, cada residuo de la cadena de sentido y la cadena antisentido se modifica independientemente con LNA, CRN, cET, UNA, HNA, CeNA, 2'-metoxietilo, 2'-O-metilo, 2'-O-alilo, 2'-C-alilo, 2'-desoxi, 2'-hidroxilo, o 2'-fluoro. Las cadenas pueden contener más de una modificación. En una modalidad, cada residuo de la cadena de sentido y la cadena antisentido se modifica independientemente con 2'-O-metilo o 2'-fluoro.

Al menos dos modificaciones diferentes están típicamente presentes en la cadena de sentido y la cadena antisentido. Esas dos modificaciones pueden ser las modificaciones 2'-O-metilo o 2'-fluoro, u otras.

En determinadas modalidades, el N_a o N_b comprenden modificaciones de un patrón alternativo. El término “motivo alternativo” como se usa en la presente descripción se refiere a un motivo que tiene una o más modificaciones, cada modificación se produce en nucleótidos alternos de una cadena. El nucleótido alternativo puede referirse a uno por cada otro nucleótido o uno por cada tres nucleótidos, o un patrón similar. Por ejemplo, si A, B y C representan cada uno un tipo de modificación al nucleótido, el motivo alternativo puede ser “ABABABABABAB...”, “AABBAABBAABB...”, “AABAABAABAAB...”, “AAABAAABAAAB...”, “AAABBBAAABBB...”, o “ABCABCABCABC...”, etc.

El tipo de modificaciones contenidas en el motivo alternativo puede ser el mismo o diferente. Por ejemplo, si A, B, C, D representan cada uno un tipo de modificación en el nucleótido, el patrón alternante, es decir, las modificaciones en nucleótido por medio,

pueden ser iguales, pero cada una de la cadena de sentido o la cadena antisentido puede seleccionarse de varias posibilidades de modificaciones dentro del motivo alternante, como “ABABAB...”, “ACACAC...” “BDBDBD...” o “CDCDCD...,” etc.

En algunas modalidades, el agente de ARN_{ibc} de la invención comprende el patrón de modificación para el motivo alternante en la cadena de sentido con relación al patrón de modificación para el motivo alternante en la cadena antisentido se cambia. El cambio puede ser tal que el grupo modificado de nucleótidos de la cadena de sentido corresponde a un grupo de nucleótidos modificado de manera diferente de la cadena antisentido y *viceversa*. Por ejemplo, la cadena de sentido cuando se empareja con la cadena antisentido en el ARN_{bc} dúplex, el motivo alternante en la cadena de sentido puede comenzar con “ABABAB” de 5’ a 3’ de la cadena y el motivo alternante en la cadena antisentido puede comenzar con “BABABA” de 5’ a 3’ de la cadena dentro de la región dúplex. Como otro ejemplo, el motivo alternante en la cadena de sentido puede empezar con “AABBAABB” de 5’ a 3’ de la cadena y el motivo alternante en la cadena de antisentido puede empezar con “BBAABBAA” de 5’ a 3’ de la cadena dentro de la región dúplex, de modo que haya un cambio completo o parcial de los patrones de modificación entre la cadena de sentido y la cadena de antisentido.

En algunas modalidades, el agente de ARN_{ibc} comprende el patrón del motivo alternante de la modificación 2’-O-metilo y la modificación 2’-F en la cadena de sentido inicialmente tiene un cambio con relación al patrón del motivo alternante de la modificación 2’-O-metilo y la modificación 2’-F en la cadena de antisentido inicialmente, es decir, el nucleótido modificado 2’-O-metilo en los pares de bases de la cadena de sentido con un nucleótido modificado 2’-F en la cadena de antisentido y *viceversa*. La posición 1 de la cadena de sentido puede comenzar con la modificación 2’-F, y la posición 1 de la cadena antisentido puede comenzar con la modificación 2’-O-metilo.

La introducción de uno o más motivos de tres modificaciones idénticas en tres nucleótidos consecutivos a la cadena de sentido o cadena antisentido interrumpe el patrón de modificación inicial presente en la cadena de sentido o cadena antisentido. Esta interrupción del patrón de modificación de la cadena de sentido o de antisentido al introducir

uno o más motivos de tres modificaciones idénticas en tres nucleótidos consecutivos a la cadena de sentido o de antisentido puede potenciar la actividad de silenciamiento génico contra el gen diana.

En algunas modalidades, cuando el motivo de tres modificaciones idénticas en tres nucleótidos consecutivos se introduce en cualquiera de las cadenas, la modificación del nucleótido junto al motivo es una modificación diferente que la modificación del motivo. Por ejemplo, la porción de la secuencia que contiene el motivo es "...N_aYYN_b...", 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 nucleótido junto al motivo "YYY" que es diferente de la modificación de Y, y donde N_a y N_b pueden ser iguales o diferentes modificaciones. Alternativamente, N_a o N_b pueden estar presentes o ausentes cuando hay una modificación de ala presente.

El ARNi puede comprender además al menos un enlace internucleotídico de fosforotioato o metilfosfonato. La modificación del enlace internucleotídico de fosforotioato o metilfosfonato se puede producir en cualquier nucleótido de la cadena de sentido, la cadena antisentido, o ambas cadenas en cualquier posición de la cadena. Por ejemplo, la modificación del enlace internucleotídico se puede producir en cada nucleótido en la cadena de sentido o cadena antisentido; cada modificación del enlace internucleotídico se puede producir en un patrón alternante en la cadena de sentido o cadena antisentido; o la cadena de sentido o cadena antisentido puede contener ambas modificaciones del enlace internucleotídico en un patrón alternante. El patrón alternante de la modificación del enlace internucleotídico en la cadena de sentido puede ser el mismo o diferente de la cadena antisentido, y el patrón alternante de la modificación del enlace internucleotídico en la cadena de sentido puede tener un cambio con relación al patrón alternante de la modificación del enlace internucleotídico en la cadena antisentido. En una modalidad, un agente de ARNi bicatenario comprende 6-8 enlaces internucleotídicos de fosforotioato. En algunas modalidades, la cadena antisentido comprende dos enlaces internucleotídicos de fosforotioato en el extremo 5' y dos enlaces internucleotídicos de fosforotioato en el extremo

3', y la cadena de sentido comprende al menos dos enlaces internucleotídicos de fosforotioato en el extremo 5' o en el extremo 3'.

En algunas modalidades, el agente de ARN_{ibc} comprende una modificación del enlace internucleotídico de fosforotioato o metilfosfonato en la región de extremo saliente.

5 Por ejemplo, la región de extremo saliente puede contener dos nucleótidos que tienen un enlace internucleotídico de fosforotioato o metilfosfonato entre los dos nucleótidos. Las modificaciones del enlace internucleotídico también pueden realizarse para vincular los nucleótidos de extremo saliente con los nucleótidos emparejados terminales dentro de la región dúplex. Por ejemplo, al menos 2, 3, 4, o todos los nucleótidos de extremo saliente
10 pueden enlazarse a través del enlace internucleotídico de fosforotioato o metilfosfonato, y opcionalmente, puede haber enlaces internucleotídicos de fosforotioato o metilfosfonato adicionales que enlazan el nucleótido de extremo saliente con un nucleótido emparejado que está junto al nucleótido de extremo saliente. Por ejemplo, puede haber al menos dos enlaces intranucleotídicos de fosforotioato entre los tres nucleótidos terminales, en los que
15 dos de los tres nucleótidos son nucleótidos de extremo saliente, y el tercero es un nucleótido emparejado junto al nucleótido de extremo saliente. Estos tres nucleótidos terminales pueden estar en el extremo 3' de la cadena antisentido, el extremo 3' de la cadena de sentido, el extremo 5' de la cadena antisentido, o el extremo 5' de la cadena antisentido.

En algunas modalidades, el extremo saliente de 2 nucleótidos está en el extremo 3'
20 de la cadena antisentido, y hay dos enlaces internucleotídicos de fosforotioato entre los tres nucleótidos terminales, en donde dos de los tres nucleótidos son los nucleótidos de extremo saliente, y el tercer nucleótido es un nucleótido emparejado junto al nucleótido de extremo saliente. Opcionalmente, el agente de ARN_{ibc} puede tener adicionalmente dos enlaces internucleotídicos de fosforotioato entre los tres nucleótidos terminales tanto en el extremo 5'
25 de la cadena de sentido como en el extremo 5' de la cadena antisentido.

En una modalidad, el agente de ARN_{ibc} comprende errores de emparejamiento con la diana, dentro del dúplex, o sus combinaciones. El error de emparejamiento puede ocurrir en la región de extremo saliente o en la región dúplex. El par de bases puede clasificarse

en la base de su propensión a promover la disociación o fusión (*por ejemplo*, en la energía libre de asociación o disociación de un par particular, el enfoque más simple es examinar los pares sobre una base de par individual, aunque también se puede usar el siguiente vecino o análisis similar). En términos de promoción de la disociación: A:U se prefiere sobre G:C;

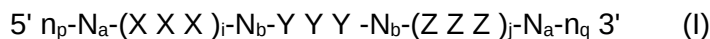
- 5 G:U se prefiere sobre G:C; e I:C se prefiere sobre G:C (I=inosina). Los errores de emparejamiento, *por ejemplo*, los emparejamientos no canónicos o distintos de los canónicos (como se describe en otra parte en la presente descripción) se prefieren sobre los emparejamientos canónicos (A:T, A:U, G:C); y los emparejamientos que incluyen una base universal se prefieren sobre los emparejamientos canónicos.

- 10 En determinadas modalidades, el agente de ARN_{ibc} comprende al menos uno de los primeros 1, 2, 3, 4 o 5 pares de bases dentro de las regiones dúplex a partir del extremo 5' de la cadena antisentido seleccionada independientemente del grupo de: A:U, G:U, I:C, y pares con errores de emparejamiento, *por ejemplo*, no canónicos o distintos de los pares canónicos o pares que incluyen una base universal, para promover la disociación de la
- 15 cadena antisentido en el extremo 5' del dúplex.

- En determinadas modalidades, el nucleótido en la posición 1 dentro de la región dúplex del extremo 5' en la cadena antisentido se selecciona de A, dA, dU, U y dT. Alternativamente, al menos uno del primer par de bases 1, 2 o 3 dentro de la región dúplex desde el extremo 5'- de la cadena antisentido es un par de bases AU. Por ejemplo, el
- 20 primer par de bases dentro de la región dúplex del extremo 5' de la cadena antisentido es un par de bases AU.

- En otras modalidades, el nucleótido en el extremo 3' de la cadena de sentido es desoxitimidina (dT) o el nucleótido en el extremo 3' de la cadena antisentido es desoxitimidina (dT). Por ejemplo, hay una secuencia corta de nucleótidos de desoxitimidina,
- 25 por ejemplo, dos nucleótidos dT en el extremo 3' de la cadena de sentido, de antisentido o ambas cadenas.

En determinadas modalidades, la secuencia de cadena de sentido puede representarse por la fórmula (I):



en donde:

5 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 0-25 nucleótidos modificados, cada secuencia comprende al menos dos nucleótidos modificados de manera diferente;

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

cada n_p y n_q representan independientemente un nucleótido de extremo saliente;

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

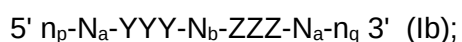
XXX, YYY y ZZZ cada uno representan independientemente un motivo de tres

15 modificaciones idénticas en tres nucleótidos consecutivos. En algunas modalidades, YYY son todos los nucleótidos modificados con 2'-F.

En algunas modalidades, el N_a o N_b comprende modificaciones de patrón alternante.

En algunas modalidades, el motivo YYY se produce en el sitio de escisión o cerca de este de la cadena de sentido. Por ejemplo, cuando el agente de ARN_{ibc} tiene una región dúplex de 17-23 nucleótidos de longitud, el motivo YYY puede ocurrir en el sitio de escisión o cerca de este (por ejemplo: puede ocurrir en las posiciones 6, 7, 8; 7, 8, 9; 8, 9, 10; 9, 10, 11; 10, 11, 12; u 11, 12, 13) de la cadena de sentido, el conteo empieza a partir del primer nucleótido, a partir del extremo 5'; u opcionalmente, el conteo empieza en el primer nucleótido emparejado dentro de la región dúplex, a partir del extremo 5'.

25 En una modalidad, i es 1 y j es 0, o i es 0 y j es 1, o tanto i como j son 1. Por lo tanto, la cadena de sentido puede representarse mediante las siguientes fórmulas:



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

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

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

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

Cada una de X, Y y Z puede ser igual o diferente entre sí.

En otras modalidades, i es 0 y j es 0, y la cadena de sentido puede representarse mediante la fórmula:

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

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

En una modalidad, la secuencia de cadena antisentido del ARNi puede representarse por la fórmula (II):

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

en donde:

k y l son cada uno independientemente 0 o 1;

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

cada N_a' representa independientemente una secuencia de oligonucleótidos que comprende 0-25 nucleótidos modificados, cada secuencia comprende al menos dos nucleótidos modificados de manera diferente;

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

cada n_p' y n_q' representan independientemente un nucleótido de extremo saliente;

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

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

10 En algunas modalidades, el N_a' o N_b' comprende modificaciones de patrón alternante.

El motivo $Y'Y'Y'$ se produce en el sitio de escisión o cerca de este de la cadena antisentido. Por ejemplo, cuando el agente de ARN_{ibc} tiene una región dúplex de 17-23 nucleótidos de longitud, el motivo $Y'Y'Y'$ puede ocurrir en las posiciones 9, 10, 11; 10, 11, 12; 11, 12, 13; 12, 13, 14; o 13, 14, 15 de la cadena antisentido, con el conteo que comienza a 15 partir del primer nucleótido, a partir del extremo 5'; u opcionalmente, el conteo que comienza en el primer nucleótido emparejado dentro de la región dúplex, a partir del extremo 5'. En una modalidad, el motivo $Y'Y'Y'$ se produce en las posiciones 11, 12, 13.

En determinadas modalidades, el motivo $Y'Y'Y'$ es todos los nucleótidos 2'-OMe modificados.

20 En determinadas modalidades, k es 1 y l es 0, o k es 0 y l es 1, o tanto k como l son 1.

Por lo tanto, la cadena antisentido puede representarse mediante las siguientes fórmulas:

$5' n_q'-N_a'-Z'Z'Z'-N_b'-Y'Y'Y'-N_a'-n_p' 3' \quad (\text{IIb});$

25 $5' n_q'-N_a'-Y'Y'Y'-N_b'-X'X'X'-n_p' 3' \quad (\text{IIc});$ o

$5' n_q'-N_a'-Z'Z'Z'-N_b'-Y'Y'Y'-N_b'-X'X'X'-N_a'-n_p' 3' \quad (\text{IIId}).$

Cuando la cadena antisentido se representa por fórmula (IIb), N_b' representa una secuencia de oligonucleótidos que comprende 0-10, 0-7, 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 o 0

nucleótidos modificados. Cada N_a' representa independientemente una secuencia de oligonucleótidos que comprende 2-20, 2-15 o 2-10 nucleótidos modificados.

Cuando la cadena antisentido se representa como fórmula (IIc), N_b' representa una secuencia de oligonucleótidos que comprende 0-10, 0-7, 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 o 0

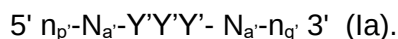
5 nucleótidos modificados. Cada N_a' representa independientemente una secuencia de oligonucleótidos que comprende 2-20, 2-15 o 2-10 nucleótidos modificados.

Cuando la cadena antisentido se representa como fórmula (IId), cada N_b' representa independientemente una secuencia de oligonucleótidos que comprende 0-10, 0-7, 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 o 0 nucleótidos modificados. Cada N_a' representa independientemente una

10 secuencia de oligonucleótidos que comprende 2-20, 2-15 o 2-10 nucleótidos modificados.

En una modalidad, N_b es 0, 1, 2, 3, 4, 5 o 6.

En otras modalidades, k es 0 y l es 0 y la cadena antisentido puede representarse mediante la fórmula:



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

Cada una de X' , Y' y Z' puede ser igual o diferente entre sí.

Cada nucleótido de la cadena de sentido y la cadena antisentido puede modificarse

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

25 En algunas modalidades, la cadena de sentido del agente de ARN_{ibc} puede contener el motivo YYY que se produce en las posiciones 9, 10 y 11 de la cadena cuando la región dúplex es de 21 nt, el conteo comienza a partir del primer nucleótido del extremo 5', u opcionalmente, el conteo comienza en el primer nucleótido emparejado dentro de la región

dúplex, a partir del extremo 5'-; e Y representa la modificación 2'-F. La cadena de sentido puede contener adicionalmente el motivo XXX o los motivos ZZZ como modificaciones de ala en el extremo opuesto de la región dúplex; y XXX y ZZZ cada uno representa independientemente una modificación 2'-OMe o una modificación 2'-F.

5 En algunas modalidades, la cadena antisentido puede contener el motivo Y'Y'Y' que se produce en las posiciones 11, 12, 13 de la cadena, el conteo comienza a partir del primer nucleótido del extremo 5', u opcionalmente, el conteo comienza en el primer nucleótido emparejado dentro de la región dúplex, desde el extremo 5'; e Y' representa una modificación 2'-O-metilo. La cadena antisentido puede contener adicionalmente el motivo
 10 X'X'X' o los motivos Z'Z'Z' como modificaciones de ala en el extremo opuesto de la región dúplex; y X'X'X' y Z'Z'Z' cada uno representa independientemente una modificación 2'-OMe o una modificación 2'-F.

La cadena de sentido representada por cualquiera de las fórmulas anteriores (Ia), (Ib), (Ic), e (Id) forma un dúplex con una cadena antisentido representada por cualquiera de
 15 las fórmulas (IIa), (IIb), (IIc), e (IId), respectivamente.

En consecuencia, los agentes de ARNi_{bc} para su uso en los métodos de la invención pueden comprender una cadena de sentido y una cadena antisentido, cada cadena tiene de 14 a 30 nucleótidos, el dúplex de ARNi representado por la fórmula (III):

sentido: $5' n_p - N_a - (X X X)_i - N_b - Y Y Y - N_b - (Z Z Z)_j - N_a - n_q 3'$
 20 antisentido: $3' n_{p'} - N_{a'} - (X'X'X')_k - N_{b'} - Y'Y'Y' - N_{b'} - (Z'Z'Z')_l - N_{a'} - n_{q'} 5'$

(III)

en donde:

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

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

25 cada N_a y $N_{a'}$ representa independientemente una secuencia de oligonucleótidos que comprende 0-25 nucleótidos modificados, cada secuencia comprende al menos dos nucleótidos modificados de manera diferente;

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

en donde cada n_p' , n_p , n_q' y n_q , cada uno de los cuales puede estar presente o no, representa independientemente un nucleótido de extremo saliente; y

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

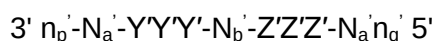
En una modalidad, i es 0 y j es 0; o i es 1 y j es 0; o i es 0 y j es 1; o tanto i como j son 0; o tanto i como j son 1. En otra modalidad, k es 0 y l es 0; o k es 1 y l es 0; k es 0 y l es 1; o tanto k como l son 0; o tanto k como l son 1.

10 Las combinaciones ilustrativas de la cadena de sentido y la cadena antisentido que forman un dúplex de ARNi incluyen las siguientes fórmulas:

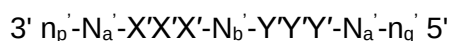
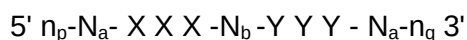


(IIIa)

15 $5' n_p - N_a - Y Y Y - N_b - Z Z Z - N_a - n_q 3'$



(IIIb)



20 (IIIc)



(IIIId)

25 Cuando el agente de ARNibc se representa por fórmula (IIIa), cada N_a representa independientemente una secuencia de oligonucleótidos que comprende 2-20, 2-15 o 2-10 nucleótidos modificados.

Cuando el agente de ARNibc se representa por fórmula (IIIb), cada N_b representa independientemente una secuencia de oligonucleótidos que comprende 1-10, 1-7, 1-5 o 1-4

nucleótidos modificados. Cada N_a representa independientemente una secuencia de oligonucleótidos que comprende 2-20, 2-15 o 2-10 nucleótidos modificados.

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

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

Cada una de las fórmulas X, Y y Z (III), (IIIa), (IIIb), (IIIc) y (IIId) puede ser igual o diferente entre sí.

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

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

Cuando el agente de ARNibc se representa como fórmula (IIIc) o (IIId), al menos uno de los nucleótidos X puede formar un par de bases con uno de los nucleótidos X'. Alternativamente, al menos dos de los nucleótidos forman pares de bases con los

nucleótidos correspondientes X'; o los tres de los nucleótidos X todos forman pares de bases con los nucleótidos correspondientes X'.

En determinadas modalidades, la modificación en el nucleótido Y es diferente a la modificación en el nucleótido Y', la modificación en el nucleótido Z es diferente a la modificación en el nucleótido Z', o la modificación en el nucleótido X es diferente a la modificación en el nucleótido X'.

En determinadas modalidades, cuando el agente de ARN_{ibc} se representa por fórmula (IIId), las modificaciones de N_a son 2'-O-metil o modificaciones 2'-fluoro. En otras modalidades, cuando el agente de ARN_i se representa por la fórmula (IIId), las

modificaciones de N_a son modificaciones de 2'-O-metilo o 2'-fluoro y $n_p' > 0$ y al menos un n_p' se enlaza a un nucleótido vecino mediante enlace fosforotioato. Aún en otras modalidades, cuando el agente de ARN_i se representa por la fórmula (IIId), las modificaciones de N_a son modificaciones de 2'-O-metilo o 2'-fluoro, $n_p' > 0$ y al menos un n_p' se enlaza a un nucleótido vecino mediante enlace fosforotioato, y la cadena de sentido se conjuga con uno o más derivados de GalNAc unidos a través de un enlazador ramificado bivalente o trivalente (descrito a continuación). En otras modalidades, cuando el agente de ARN_i se representa por la fórmula (IIId), las modificaciones de N_a son 2'-O-metilo o modificaciones 2'-fluoro, $n_p' > 0$ y al menos un n_p' se enlaza a un nucleótido vecino mediante enlace fosforotioato, la cadena de sentido comprende al menos un enlace fosforotioato, y la cadena de sentido se conjuga a uno o más derivados de GalNAc unidos a través de un enlazador ramificado bivalente o trivalente.

En algunas modalidades, cuando el agente de ARN_{ibc} se representa por la fórmula (IIIa), las modificaciones de N_a son modificaciones 2'-O-metilo o 2'-fluoro, $n_p' > 0$ y al menos un n_p' se enlaza a un nucleótido vecino mediante enlace fosforotioato, la cadena de sentido comprende al menos un enlace fosforotioato, y la cadena de sentido se conjuga a uno o más derivados de GalNAc unidos a través de un enlazador ramificado bivalente o trivalente.

En algunas modalidades, el agente de ARN_{ibc} es un multímero que contiene al menos dos dúplex representados por la fórmula (III), (IIIa), (IIIb), (IIIc), y (IIId), en donde los dúplex están conectados por un enlazador. El enlazador puede ser escindible o no escindible. Opcionalmente, el multímero comprende además un ligando. Cada uno de los dúplex puede dirigirse al mismo gen o a dos genes diferentes; o cada uno de los dúplex puede dirigirse al mismo gen en dos sitios diana diferentes.

En algunas modalidades, el agente de ARN_{ibc} es un multímero que contiene tres, cuatro, cinco, seis o más dúplex representados por la fórmula (III), (IIIa), (IIIb), (IIIc), y (IIId), en donde los dúplex están conectados por un enlazador. El enlazador puede ser escindible o no escindible. Opcionalmente, el multímero comprende además un ligando. Cada uno de los dúplex puede dirigirse al mismo gen o a dos genes diferentes; o cada uno de los dúplex puede dirigirse al mismo gen en dos sitios diana diferentes.

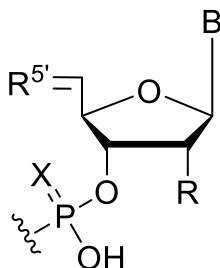
En una modalidad, dos agentes de ARN_{ibc} representados por al menos una de las fórmulas (III), (IIIa), (IIIb), (IIIc) y (IIId) se enlazan entre sí en el extremo 5', y uno o ambos de los extremos 3', y se conjugan opcionalmente a un ligando. Cada uno de los agentes puede dirigirse al mismo gen o a dos genes diferentes; o cada uno de los agentes puede dirigirse al mismo gen en dos sitios diana diferentes.

En determinadas modalidades, un agente de ARN_i de la invención puede contener un número bajo de nucleótidos que contienen una modificación 2'-fluoro, *por ejemplo*, 10 o menos nucleótidos con modificación 2'-fluoro. Por ejemplo, el agente de ARN_i puede contener 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 o 0 nucleótidos con una modificación 2'-fluoro. En una modalidad específica, el agente de ARN_i de la invención contiene 10 nucleótidos con una modificación 2'-fluoro, *por ejemplo*, 4 nucleótidos con una modificación 2'-fluoro en la cadena de sentido y 6 nucleótidos con una modificación 2'-fluoro en la cadena de antisentido. En otra modalidad específica, el agente de ARN_i de la invención contiene 6 nucleótidos con una modificación 2'-fluoro, *por ejemplo*, 4 nucleótidos con una modificación 2'-fluoro en la cadena de sentido y 2 nucleótidos con una modificación 2'-fluoro en la cadena de antisentido.

En otras modalidades, un agente de ARNi de la invención puede contener un número ultra bajo de nucleótidos que contienen una modificación 2'-fluoro, *por ejemplo*, 2 o menos nucleótidos que contienen una modificación 2'-fluoro. Por ejemplo, el agente de ARNi puede contener 2, 1 de 0 nucleótidos con una modificación 2'-fluoro. En una modalidad específica, el agente de ARNi puede contener 2 nucleótidos con una modificación 2'-fluoro, *por ejemplo*, 0 nucleótidos con una modificación 2'-fluoro en la cadena de sentido y 2 nucleótidos con una modificación 2'-fluoro en la cadena de antisentido.

Varias publicaciones describen los ARNi multiméricos que pueden usarse en los métodos de la invención. Tales publicaciones incluyen WO2007/091269, la patente de los Estados Unidos núm. 7,858,769, WO2010/141511, WO2007/117686, WO2009/014887, y WO2011/031520, cuyos contenidos se incorporan en la presente como referencia.

En determinadas modalidades, las composiciones y métodos de la descripción incluyen una modificación de fosfonato de vinilo (VP) de un agente de ARNi como se describe en la presente descripción. En modalidades ilustrativas, un nucleótido modificado con 5'-fosfonato de vinilo de la descripción tiene la estructura:



en donde X es O o S;

R es hidrógeno, hidroxilo, fluoro o alcoxi C_{1-20} (*por ejemplo*, metoxi o n-hexadeciloxi);

$R^{5'}$ es $=C(H)-P(O)(OH)_2$ y el doble enlace entre el carbono $C5'$ y $R^{5'}$ está en la orientación *E* o *Z* (*por ejemplo*, orientación *E*); y

B es una nucleobase o una nucleobase modificada, opcionalmente donde B es adenina, guanina, citosina, timina o uracilo.

Un fosfonato de vinilo de esta descripción puede unirse a la cadena antisentido o de sentido de un ARNbc de la descripción. En determinadas modalidades, un fosfonato de

vinilo de esta descripción se une a la cadena de antisentido de un ARN_{bc}, opcionalmente en el extremo 5' de la cadena de antisentido del ARN_{bc}.

Las modificaciones de fosfonato de vinilo también se contemplan para las composiciones y métodos de esta descripción. Una estructura de fosfonato de vinilo

- 5 ilustrativa incluye la estructura anterior, donde R5' es =C(H)-OP(O)(OH)₂ y el doble enlace entre el carbono C5' y R5' está en la orientación E o Z (*por ejemplo*, orientación E).

- Como se describe en más detalle a continuación, el ARN_i que contiene conjugaciones de uno o más restos de carbohidratos a un ARN_i puede optimizar una o más propiedades del ARN_i. En muchos casos, el resto de carbohidrato se unirá a una subunidad
- 10 modificada del ARN_i. Por ejemplo, el azúcar ribosa de una o más subunidades de ribonucleótidos de un ARN_i puede reemplazarse con otro resto, *por ejemplo*, un portador no carbohidrato (tal como, cíclico) al que se une un ligando de carbohidrato. Una subunidad de ribonucleótido en la que el azúcar ribosa de la subunidad se ha reemplazado de esta manera se denomina en la presente descripción como una subunidad de modificación de remplazo
- 15 de ribosa (RRMS). Un portador cíclico puede ser un sistema de anillo carbocíclico, *es decir*, todos los átomos de anillo son átomos de carbono, o un sistema de anillo heterocíclico, *es decir*, uno o más átomos de anillo pueden ser un heteroátomo, *por ejemplo*, nitrógeno, oxígeno, azufre. El portador cíclico puede ser un sistema de anillos monocíclicos, o puede contener dos o más anillos, *por ejemplo*, anillos fusionados. El portador cíclico puede ser un
- 20 sistema de anillo totalmente saturado, o puede contener uno o más enlaces dobles.

- El ligando puede unirse al polinucleótido mediante un portador. Los portadores incluyen (i) al menos un “punto de unión de la estructura principal”, tal como dos “puntos de unión de la estructura principal” y (ii) al menos un “punto de unión fijado”. Un “punto de acoplamiento de la cadena principal” como se usa en la presente descripción se refiere a un
- 25 grupo funcional, *por ejemplo*, un grupo hidroxilo, o generalmente, un enlace disponible para, y que es adecuado para la incorporación del portador en la cadena principal, *por ejemplo*, el fosfato, o fosfato modificado, *por ejemplo*, que contiene azufre, la cadena principal, de un

ácido ribonucleico. Un “punto de acoplamiento fijado” (TAP) en algunas modalidades se refiere a un átomo de anillo constituyente del portador cíclico, *por ejemplo*, un átomo de carbono o un heteroátomo (distinto de un átomo que proporciona un punto de unión de la cadena principal), que conecta un resto seleccionado. El resto puede ser, *por ejemplo*, un

5 carbohidrato, *por ejemplo*, un monosacárido, disacárido, trisacárido, tetrasacárido, oligosacárido o polisacárido. Opcionalmente, el resto seleccionado se conecta mediante una fijación intermedia al portador cíclico. Por lo tanto, el portador cíclico frecuentemente incluirá un grupo funcional, *por ejemplo*, un grupo amino, o generalmente, proporciona un enlace, que es adecuado para la incorporación o la fijación de otra entidad química, *por*

10 *ejemplo*, un ligando al anillo constituyente.

El ARNi puede conjugarse a un ligando a través de un portador, en donde el portador puede ser un grupo cíclico o un grupo acíclico. En una modalidad, el grupo cíclico se selecciona de pirrolidinilo, pirazolinilo, pirazolidinilo, imidazolinilo, imidazolidinilo, piperidinilo, piperazinilo, [1,3]dioxolano, oxazolidinilo, isoxazolidinilo, morfolinilo, tiazolidinilo,

15 isotiazolidinilo, quinoxalinilo, piridazinonilo, tetrahidrofurilo, y decalin. En una modalidad, el grupo acíclico es una estructura principal de serinol o estructura principal de dietanolamina.

i. Modificaciones desestabilizantes térmicamente

En determinadas modalidades, una molécula de ARNbc puede optimizarse para la

20 interferencia del ARN incorporando modificaciones térmicamente desestabilizantes en la región de semilla de la cadena antisentido. Como se usa en la presente descripción, “región de semilla” significa en las posiciones 2-9 del extremo 5' de la cadena a la que se hace referencia. Por ejemplo, las modificaciones térmicamente desestabilizantes pueden incorporarse en la región de semilla de la cadena antisentido para reducir o inhibir el

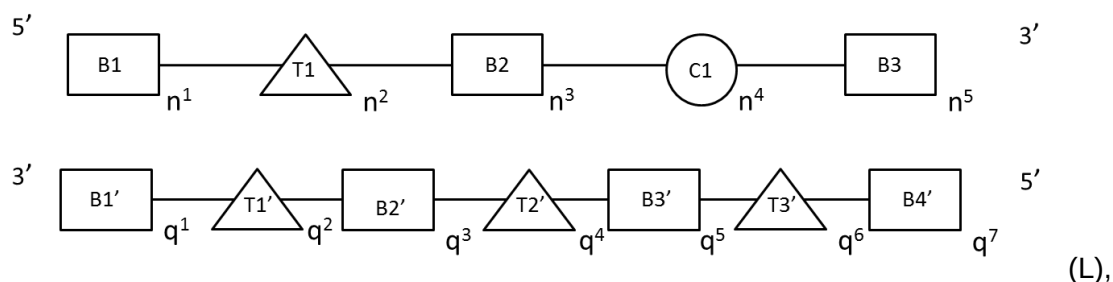
25 silenciamiento génico fuera de la diana.

El término “modificación térmicamente desestabilizante” incluye modificaciones que resultarían en un ARNbc con una temperatura de fusión general más baja (T_m) que la T_m del ARNbc sin dichas modificaciones. Por ejemplo, las modificaciones térmicamente

desestabilizantes pueden disminuir la T_m del ARNbc en 1 – 4 °C, tal como uno, dos, tres o cuatro grados Celsius. Y, el término “nucleótido desestabilizante térmicamente” se refiere a un nucleótido que contiene una o más modificaciones térmicamente desestabilizantes.

Se ha descubierto que los ARNbc con una cadena antisentido que comprende al menos una modificación térmicamente desestabilizante del dúplex dentro de las primeras 9 posiciones de nucleótidos, contando desde el extremo 5', de la cadena antisentido han reducido la actividad de silenciamiento génico inespecífica. En consecuencia, en algunas modalidades, la cadena antisentido comprende al menos una (p. ej., una, dos, tres, cuatro, cinco o más) modificación térmicamente desestabilizante del dúplex dentro de las primeras 9 posiciones de nucleótidos de la región 5' de la cadena antisentido. En algunas modalidades, una o más modificaciones térmicamente desestabilizantes del dúplex se localizan en las posiciones 2-9, tales como las posiciones 4-8, desde el extremo 5' de la cadena antisentido. En algunas modalidades adicionales, las modificaciones térmicamente desestabilizantes del dúplex se localizan en la posición 6, 7 u 8 desde el extremo 5' de la cadena antisentido. Aún en algunas modalidades adicionales, la modificación térmicamente desestabilizante del dúplex se localiza en la posición 7 del extremo 5' de la cadena antisentido. En algunas modalidades, la modificación térmicamente desestabilizante del dúplex se localiza en la posición 2, 3, 4, 5 o 9 del extremo 5' de la cadena antisentido.

Un agente de ARNi comprende una cadena de sentido y una cadena antisentido, cada cadena tiene de 14 a 40 nucleótidos. El agente de ARNi puede representarse por fórmula (L):



En la fórmula (L), B1, B2, B3, B1', B2', B3' y B4' cada uno son independientemente un nucleótido que contiene una modificación seleccionada del grupo que consiste en 2'-O-

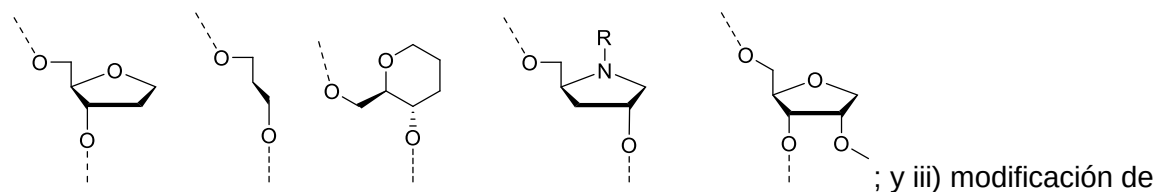
alquilo, 2'-alcoxi sustituido, 2'-alquilo sustituido, 2'-halo, ENA y BNA/LNA. En una modalidad, B1, B2, B3, B1', B2', B3' y B4' cada uno contiene modificaciones 2'-OMe. En una modalidad, B1, B2, B3, B1', B2', B3' y B4' cada uno contiene modificaciones 2'-OMe o 2'-F. En una modalidad, al menos uno de B1, B2, B3, B1', B2', B3', y B4' contienen

5 modificación de 2'-O-N-metilacetamido (2'-O-NMA, 2'-O-CH₂C(O)N(Me)H).

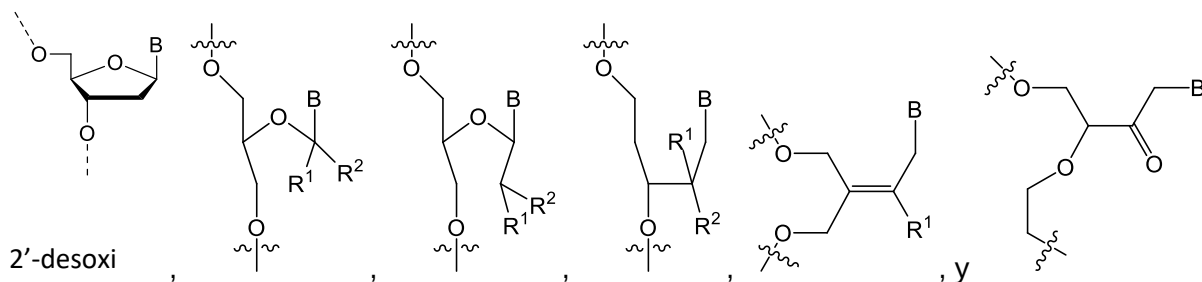
C1 es un nucleótido térmicamente desestabilizante ubicado en un sitio opuesto a la región de semilla de la cadena antisentido (es decir, en las posiciones 2-8 del extremo 5' de la cadena antisentido). Por ejemplo, C1 está en una posición de la cadena de sentido que se empareja con un nucleótido en las posiciones 2-8 del extremo 5' de la cadena

10 antisentido. En un ejemplo, C1 está en la posición 15 del extremo 5' de la cadena de sentido. El nucleótido de C1 soporta la modificación térmicamente desestabilizante que puede incluir la modificación abásica; error de emparejamiento con el nucleótido opuesto en el dúplex; y modificación de azúcar tal como la modificación 2'-desoxi o nucleótido acíclico, por ejemplo, ácidos nucleicos desbloqueados (UNA) o ácido nucleico de glicerol (GNA). En

15 una modalidad, C1 tiene una modificación térmicamente desestabilizante seleccionada del grupo que consiste en: i) error de emparejamiento con el nucleótido opuesto en la cadena de antisentido; ii) modificación abásica seleccionada del grupo que consiste en:



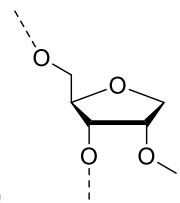
azúcar seleccionada del grupo que consiste en:



, en donde B es una nucleobase modificada o no modificada, R¹ y R² son

independientemente H, halógeno, OR₃ o alquilo; y R₃ es H, alquilo, cicloalquilo, arilo,

aralquilo, heteroarilo o azúcar. En una modalidad, la modificación térmicamente desestabilizante en C1 es un error de emparejamiento seleccionado del grupo que consiste en G:G, G:A, G:U, G:T, A:A, A:C, C:C, C:U, C:T, U:U, T:T y U:T; y opcionalmente, al menos una nucleobase en el par de error de emparejamiento es una nucleobase 2'-desoxi. En un



- 5 ejemplo, la modificación térmicamente desestabilizante en C1 es GNA o T1, T1', T2' y T3' cada uno representa independientemente un nucleótido que comprende una modificación que proporciona al nucleótido una masa estérica que es menor o igual a la masa estérica de una modificación 2'-OMe. Una masa estérica se refiere a la suma de los efectos estéricos de una modificación. Los métodos para determinar los efectos estéricos de una modificación de un nucleótido son conocidos por un experto en la técnica. La modificación puede estar en la posición 2' de un azúcar ribosa del nucleótido, o una modificación a un nucleótido no ribosa, nucleótido acíclico, o la estructura principal del nucleótido que es similar o equivalente a la posición 2' del azúcar ribosa, y proporciona al nucleótido una masa estérica que es menor o igual a la masa estérica de una modificación 2'-OMe. Por ejemplo, T1, T1', T2' y T3' se seleccionan independientemente de ADN, ARN, LNA, 2'-F y 2'-F-5'-metilo. En una modalidad, T1 es ADN. En una modalidad, T1' es ADN, ARN o LNA. En una modalidad, T2' es ADN o ARN. En una modalidad, T3' es ADN o ARN.
- 15 n^1 , n^3 y q^1 son independientemente de 4 a 15 nucleótidos de longitud.
- n^5 , q^3 y q^7 son independientemente de 1-6 nucleótidos de longitud.
- 20 n^4 , q^2 y q^6 son independientemente 1-3 nucleótidos de longitud; alternatively, n^4 es 0. q^5 es independientemente de 0-10 nucleótidos de longitud.
- n^2 y q^4 son independientemente de 0-3 nucleótidos de longitud.

Alternativamente, n^4 es de 0-3 nucleótidos de longitud.

- En una modalidad, 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 enlace internucleotídico de
- 25

fosforotioato dentro de la posición 1-5 de la cadena de sentido (contando desde el extremo 5' de la cadena de sentido), y dos modificaciones de enlace internucleotídico de fosforotioato en las posiciones 1 y 2 y dos modificaciones de enlace internucleotídico de fosforotioato dentro de las posiciones 18-23 de la cadena antisentido (contando desde el extremo 5' de la

5 cadena antisentido).

En una modalidad, n^4 , q^2 y q^6 son cada uno 1.

En una modalidad, n^2 , n^4 , q^2 , q^4 y q^6 son cada uno 1.

En una modalidad, C1 está en la posición 14-17 del extremo 5' de la cadena de sentido, cuando la cadena de sentido es de 19-22 nucleótidos de longitud, y n^4 es 1. En una

10 modalidad, C1 está en la posición 15 del extremo 5' de la cadena de sentido

En una modalidad, T3' comienza en la posición 2 desde el extremo 5' de la cadena antisentido. En un ejemplo, T3' está en la posición 2 desde el extremo 5' de la cadena antisentido y q^6 es igual a 1.

En una modalidad, T1' comienza en la posición 14 desde el extremo 5' de la cadena

15 antisentido. En un ejemplo, T1' está en la posición 14 desde el extremo 5' de la cadena antisentido y q^2 es igual a 1.

En una modalidad ilustrativa, T3' comienza desde la posición 2 desde el extremo 5' de la cadena antisentido y T1' comienza desde la posición 14 desde el extremo 5' de la cadena antisentido. En un ejemplo, T3' comienza desde la posición 2 desde el extremo 5'

20 de la cadena antisentido y q^6 es igual a 1 y T1' comienza desde la posición 14 desde el extremo 5' de la cadena antisentido y q^2 es igual a 1.

En una modalidad, T1' y T3' se separan por 11 nucleótidos de longitud (es decir, sin contar los nucleótidos T1' y T3').

En una modalidad, T1' está en la posición 14 desde el extremo 5' de la cadena

25 antisentido. En un ejemplo, T1' está en la posición 14 desde el extremo 5' de la cadena antisentido y q^2 es igual a 1, y la modificación en la posición 2' o posiciones en una no ribosa, acíclica o de estructura principal que proporcionan menos masa estérica que una ribosa 2'-OMe.

En una modalidad, T3' está en la posición 2 desde el extremo 5' de la cadena antisentido. En un ejemplo, T3' está en la posición 2 desde el extremo 5' de la cadena antisentido y q^6 es igual a 1, y la modificación en la posición 2' o posiciones en una ribosa no rígida, acíclica o de estructura principal que proporcionan menos de o igual a una masa

5 estérica que una ribosa 2'-OMe.

En una modalidad, T1 está en el sitio de escisión de la cadena de sentido. En un ejemplo, T1 está en la posición 11 desde el extremo 5' de la cadena de sentido, cuando la cadena de sentido es de 19-22 nucleótidos de longitud, y n^2 es 1. En una modalidad ilustrativa, T1 está en el sitio de escisión de la cadena de sentido en la posición 11 desde el

10 extremo 5' de la cadena de sentido, cuando la cadena de sentido tiene 19-22 nucleótidos de longitud, y n^2 es 1,

En una modalidad, T2' comienza en la posición 6 desde el extremo 5' de la cadena antisentido. En un ejemplo, T2' está en las posiciones 6-10 desde el extremo 5' de la cadena antisentido, y q^4 es 1.

15 En una modalidad ilustrativa, T1 está en el sitio de escisión de la cadena de sentido, por ejemplo, en la posición 11 desde el extremo 5' de la cadena de sentido, cuando la cadena de sentido tiene 19-22 nucleótidos de longitud, y n^2 es 1; T1' está en la posición 14 desde el extremo 5' de la cadena antisentido, y q^2 es igual a 1, y la modificación a T1' está en la posición 2' de un azúcar ribosa o en posiciones en una no ribosa, acíclica o estructura

20 principal que proporcionan menos masa estérica que una ribosa 2'-OMe; T2' está en las posiciones 6-10 del extremo 5' de la cadena antisentido, y q^4 es 1; y T3' está en la posición 2 desde el extremo 5' de la cadena antisentido, y q^6 es igual a 1, y la modificación a T3' está en la posición 2' o en posiciones en una no ribosa, acíclica o estructura principal que proporcionan una masa estérica menor o igual que una ribosa 2'-OMe.

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

En una modalidad, T2' comienza en la posición 9 desde el extremo 5' de la cadena antisentido. En un ejemplo, T2' está en la posición 9 desde el extremo 5' de la cadena antisentido, y q^4 es 1.

En una modalidad, 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 enlace internucleotídico de fosforotioato dentro de las posiciones 1-5 de la cadena de sentido (contando desde el extremo 5' de la cadena de sentido), y dos modificaciones de enlace internucleotídico de fosforotioato en las posiciones 1 y 2 y dos modificaciones de enlace internucleotídico de fosforotioato dentro de las posiciones 18-23 de la cadena antisentido (contando desde el extremo 5' de la cadena antisentido).

En una modalidad, 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 enlace internucleotídico de fosforotioato dentro de las posiciones 1-5 de la cadena de sentido (contando desde el extremo 5' de la cadena de sentido), y dos modificaciones de enlace internucleotídico de fosforotioato en las posiciones 1 y 2 y dos modificaciones de enlace internucleotídico de fosforotioato dentro de las posiciones 18-23 de la cadena antisentido (contando desde el extremo 5' de la cadena antisentido).

En una modalidad, 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 modalidad, 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 del enlace internucleotídico de fosforotioato dentro de las posiciones 1-5 de la cadena de sentido (contando desde el

extremo 5' de la cadena de sentido), y dos modificaciones del enlace internucleotídico de fosforotioato en las posiciones 1 y 2 y dos modificaciones del enlace internucleotídico de fosforotioato dentro de las posiciones 18-23 de la cadena antisentido (contando desde el extremo 5' de la cadena antisentido).

5 En una modalidad, 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 modalidad, 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 del enlace internucleotídico de fosforotioato dentro de las posiciones 1-5 de la cadena de sentido (contando desde el extremo 5' de la cadena de sentido), y dos modificaciones del enlace internucleotídico de fosforotioato en las posiciones 1 y 2 y dos modificaciones del enlace internucleotídico de fosforotioato dentro de las posiciones 18-23 de la cadena antisentido (contando desde el extremo 5' de la cadena antisentido).

En una modalidad, 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 modalidad, 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 del enlace internucleotídico de fosforotioato dentro de las posiciones 1-5 de la cadena de sentido (contando desde el extremo 5' de la cadena de sentido), y dos modificaciones del enlace internucleotídico de fosforotioato en las posiciones 1 y 2 y dos modificaciones del enlace internucleotídico de

fosforotioato dentro de las posiciones 18-23 de la cadena antisentido (contando desde el extremo 5' de la cadena antisentido).

En una modalidad, 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 al menos 2 TT adicionales en el extremo 3' de la cadena antisentido.

En una modalidad, 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 al menos 2 TT adicionales en el extremo 3' de la cadena antisentido; con dos modificaciones del enlace internucleotídico de fosforotioato dentro de las posiciones 1-5 de la cadena de sentido (contando desde el extremo 5' de la cadena de sentido), y dos modificaciones del enlace internucleotídico de fosforotioato en las posiciones 1 y 2 y dos modificaciones del enlace internucleotídico de fosforotioato dentro de las posiciones 18-23 de la cadena antisentido (contando desde el extremo 5' de la cadena antisentido).

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

En una modalidad, 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 del enlace internucleotídico de fosforotioato dentro de las posiciones 1-5 de la cadena de sentido (contando desde el extremo 5'), y dos modificaciones del enlace internucleotídico de fosforotioato en las posiciones 1 y 2 y dos

modificaciones del enlace internucleotídico de fosforotioato dentro de las posiciones 18-23 de la cadena antisentido (contando desde el extremo 5').

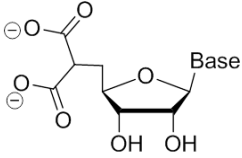
En una modalidad, B1 es 2'-OMe o 2'-F, n^1 es 8, T1 es 2'F, n^2 es 3, B2 es 2'-OMe, n^3 es 7, n^4 es 0, B3 es 2'-OMe, n^5 es 3, B1' es 2'-OMe o 2'-F, q^1 es 9, T1' es 2'-F, q^2 es 1, B2' es 2'-OMe o 2'-F, q^3 es 4, T2' es 2'-F, q^4 es 2, B3' es 2'-OMe o 2'-F, q^5 es 5, T3' es 2'-F, q^6 es 1, B4' es 2'-F,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

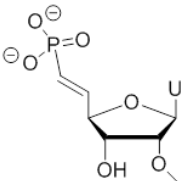
En una modalidad, B1 es 2'-OMe o 2'-F, n^1 es 8, T1 es 2'F, n^2 es 3, B2 es 2'-OMe, n^3 es 7, n^4 es 0, B3 es 2'-OMe, n^5 es 3, B1' es 2'-OMe o 2'-F, q^1 es 9, T1' es 2'-F, q^2 es 1, B2' es 2'-OMe o 2'-F, q^3 es 4, T2' es 2'-F, q^4 es 2, B3' es 2'-OMe o 2'-F, q^5 es 5, T3' es 2'-F, q^6 es 1, B4' es 2'-F,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

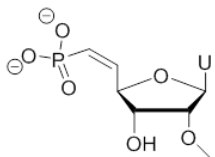
En una modalidad, B1 es 2'-OMe o 2'-F, n^1 es 8, T1 es 2'F, n^2 es 3, B2 es 2'-OMe, n^3 es 7, n^4 es 0, B3 es 2'-OMe, n^5 es 3, B1' es 2'-OMe o 2'-F, q^1 es 9, T1' es 2'-F, q^2 es 1, B2' es 2'-OMe o 2'-F, q^3 es 4, q^4 es 0, B3' es 2'-OMe o 2'-F, q^5 es 7, T3' es 2'-F, q^6 es 1, B4' es 2'-F, y q^7 es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

En una modalidad, 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 del enlace internucleotídico de fosforotioato dentro de las posiciones 1-5 de la cadena sentido (contando desde el extremo 5' de la cadena sentido), y dos modificaciones del enlace internucleotídico de fosforotioato en las posiciones 1 y 2 y dos modificaciones del enlace internucleotídico de fosforotioato dentro de las posiciones 18-23 de la cadena antisentido (contando desde el extremo 5' de la cadena antisentido).

El agente de ARNi puede comprender un grupo que contiene fósforo en el extremo 5' de la cadena sentido o cadena antisentido. El grupo que contiene fósforo de extremo 5' puede ser fosfato de extremo 5' (5'-P), fosforotioato de extremo 5' (5'-PS), fosforoditioato de extremo 5' (5'-PS₂), vinilfosfonato de extremo 5' (5'-VP), metilfosfonato de extremo 5'

5 (MePhos), o 5'-desoxi-5'-C-malonilo (). Cuando el grupo que contiene fósforo de extremo 5' es vinilfosfonato de extremo 5' (5'-VP), el 5'-VP puede ser isómero 5'-

E-VP (es decir, *trans*-vinilfosfonato, , isómero 5'-*Z*-VP (es decir, *cis*-

vinilfosfonato, ) o mezclas de estos.

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

En una modalidad, el agente de ARNi comprende un 5'-P. En una modalidad, el agente de ARNi comprende un 5'-P en la cadena antisentido.

En una modalidad, el agente de ARNi comprende un 5'-PS. En una modalidad, el agente de ARNi comprende un 5'-PS en la cadena antisentido.

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

En una modalidad, el agente de ARNi comprende un 5'-PS₂. En una modalidad, el agente de ARNi comprende un 5'-PS₂ en la cadena antisentido.

En una modalidad, el agente de ARNi comprende un 5'-PS₂. En una modalidad, el agente de ARNi comprende un 5'-desoxi-5'-C-malonil en la cadena antisentido.

En una modalidad, 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 comprende además un 5'-PS.

En una modalidad, 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 comprende además un 5'-P.

En una modalidad, 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 comprende además un 5'-VP. El 5'-VP puede ser 5'-E-VP, 5'-Z-VP, o su combinación.

En una modalidad, 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 comprende además un 5'-PS₂.

En una modalidad, 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 comprende además un 5'-desoxi-5'-C-malonil.

En una modalidad, 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 del enlace internucleotídico de fosforotioato dentro de la posición 1-5 de la cadena de sentido (contando desde el extremo

5' de la cadena de sentido), y dos modificaciones del enlace internucleotídico de fosforotioato en las posiciones 1 y 2 y dos modificaciones del enlace internucleotídico de fosforotioato dentro de las posiciones 18-23 de la cadena antisentido (contando desde el extremo 5' de la cadena antisentido). El agente de ARNi comprende además un 5'-P.

5 En una modalidad, 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 del enlace internucleotídico de fosforotioato dentro de la posición 1-5 de la cadena de sentido (contando desde el extremo
10 5' de la cadena de sentido), y dos modificaciones del enlace internucleotídico de fosforotioato en las posiciones 1 y 2 y dos modificaciones del enlace internucleotídico de fosforotioato dentro de las posiciones 18-23 de la cadena antisentido (contando desde el extremo 5' de la cadena antisentido). El agente de ARNi comprende además un 5'-PS.

En una modalidad, 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
15 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 del enlace internucleotídico de fosforotioato dentro de la posición 1-5 de la cadena de sentido (contando desde el extremo 5' de la cadena de sentido), y dos modificaciones del enlace internucleotídico de
20 fosforotioato en las posiciones 1 y 2 y dos modificaciones del enlace internucleotídico de fosforotioato dentro de las posiciones 18-23 de la cadena antisentido (contando desde el extremo 5' de la cadena antisentido). El agente de ARNi comprende además un 5'-VP. El 5'-VP puede ser 5'-E-VP, 5'-Z-VP, o su combinación.

En una modalidad, 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,
25 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 del enlace internucleotídico de fosforotioato dentro de la posición 1-5 de la cadena de sentido (contando desde el extremo

5' de la cadena de sentido), y dos modificaciones del enlace internucleotídico de fosforotioato en las posiciones 1 y 2 y dos modificaciones del enlace internucleotídico de fosforotioato dentro de las posiciones 18-23 de la cadena antisentido (contando desde el extremo 5' de la cadena antisentido). El agente de ARNi comprende además un 5'-PS₂.

5 En una modalidad, 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 del enlace internucleotídico de fosforotioato dentro de la posición 1-5 de la cadena de sentido (contando desde el extremo
10 5' de la cadena de sentido), y dos modificaciones del enlace internucleotídico de fosforotioato en las posiciones 1 y 2 y dos modificaciones del enlace internucleotídico de fosforotioato dentro de las posiciones 18-23 de la cadena antisentido (contando desde el extremo 5' de la cadena antisentido). El agente de ARNi comprende además un 5'-desoxi-5'-C-malonil.

15 En una modalidad, 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. El agente de ARNi comprende además un 5'-P.

20 En una modalidad, 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. El agente de ARNbc comprende además un 5'-PS.

25 En una modalidad, 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. El agente de ARNi comprende además un 5'-VP. El 5'-VP puede ser 5'-E-VP, 5'-Z-VP, o su combinación.

En una modalidad, 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 comprende además un 5'-PS₂.

- 5 En una modalidad, 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 comprende además un 5'-desoxi-5'-C-malonil.

- 10 En una modalidad, 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 del enlace internucleotídico de fosforotioato dentro de la posición 1-5 de la cadena de sentido (contando desde el extremo 5'), y dos modificaciones del enlace internucleotídico de fosforotioato en las posiciones 1 y 2 y dos modificaciones del enlace internucleotídico de fosforotioato dentro de las posiciones 18-23 de la cadena antisentido (contando desde el extremo 5'). El agente de ARNi comprende además un 5'-P.

- 20 En una modalidad, 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 del enlace internucleotídico de fosforotioato dentro de la posición 1-5 de la cadena de sentido (contando desde el extremo 5'), y dos modificaciones del enlace internucleotídico de fosforotioato en las posiciones 1 y 2 y dos modificaciones del enlace internucleotídico de fosforotioato dentro de las posiciones 18-23 de la cadena antisentido (contando desde el extremo 5'). El agente de ARNi comprende además un 5'-PS.

- 25 En una modalidad, 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 del enlace internucleotídico de fosforotioato dentro de la posición 1-5 de la cadena de sentido (contando desde el extremo 5'), y dos modificaciones del enlace internucleotídico de fosforotioato en las posiciones 1 y 2 y dos modificaciones del enlace internucleotídico de fosforotioato dentro de las posiciones 18-23 de la cadena antisentido (contando desde el extremo 5'). El agente de ARNi comprende además un 5'-VP. El 5'-VP puede ser 5'-E-VP, 5'-Z-VP, o su combinación.

En una modalidad, 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 del enlace internucleotídico de fosforotioato dentro de la posición 1-5 de la cadena de sentido (contando desde el extremo 5'), y dos modificaciones del enlace internucleotídico de fosforotioato en las posiciones 1 y 2 y dos modificaciones del enlace internucleotídico de fosforotioato dentro de las posiciones 18-23 de la cadena antisentido (contando desde el extremo 5'). El agente de ARNi comprende además un 5'-PS₂.

En una modalidad, 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 del enlace internucleotídico de fosforotioato dentro de la posición 1-5 de la cadena de sentido (contando desde el extremo 5'), y dos modificaciones del enlace internucleotídico de fosforotioato en las posiciones 1 y 2 y dos modificaciones del enlace internucleotídico de fosforotioato dentro de las posiciones 18-23 de la cadena antisentido (contando desde el extremo 5'). El agente de ARNi comprende además un 5'-desoxi-5'-C-malonil.

En una modalidad, 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 comprende además un 5'-P.

En una modalidad, 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 comprende además un 5'- PS.

En una modalidad, 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 comprende además un 5'- VP. El 5'-VP puede ser 5'-E-VP, 5'-Z-VP, o su combinación.

En una modalidad, 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 de ARNibc comprende además un 5'-PS₂.

En una modalidad, 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 comprende además un 5'-desoxi-5'-C-malonil.

En una modalidad, 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 del enlace internucleotídico de fosforotioato dentro de la posición 1-5 de la cadena de sentido (contando desde el extremo 5' de la cadena de sentido), y dos modificaciones del enlace internucleotídico de fosforotioato en las posiciones 1 y 2 y dos modificaciones del enlace internucleotídico de fosforotioato dentro de las posiciones 18-23 de la cadena antisentido (contando desde el extremo 5' de la cadena antisentido). El agente de ARNi comprende además un 5'-P.

En una modalidad, 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 del enlace internucleotídico de fosforotioato dentro de la posición 1-5 de la cadena de sentido (contando desde el extremo 5' de la cadena de sentido), y dos modificaciones del enlace internucleotídico de fosforotioato en las posiciones 1 y 2 y dos modificaciones del enlace internucleotídico de fosforotioato dentro de las posiciones 18-23 de la cadena antisentido (contando desde el extremo 5' de la cadena antisentido). El agente de ARNi comprende además un 5'- PS.

En una modalidad, 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 del enlace internucleotídico de fosforotioato dentro de la posición 1-5 de la cadena de sentido (contando desde el extremo 5' de la cadena de sentido), y dos modificaciones del enlace internucleotídico de fosforotioato en las posiciones 1 y 2 y dos modificaciones del enlace internucleotídico de fosforotioato dentro de las posiciones 18-23 de la cadena antisentido (contando desde el extremo 5' de la cadena antisentido). El agente de ARNi comprende además un 5'- VP. El 5'-VP puede ser 5'-E-VP, 5'-Z-VP, o su combinación.

En una modalidad, 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 del enlace internucleotídico de fosforotioato dentro de la posición 1-5 de la cadena de sentido (contando desde el extremo 5' de la cadena de sentido), y dos modificaciones del enlace internucleotídico de fosforotioato en las posiciones 1 y 2 y dos modificaciones del enlace internucleotídico de fosforotioato dentro de las posiciones 18-23 de la cadena antisentido (contando desde el extremo 5' de la cadena antisentido). El agente de ARNi comprende además un 5'-PS₂.

En una modalidad, 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 del enlace internucleotídico de

- 5 fosforotioato dentro de la posición 1-5 de la cadena de sentido (contando desde el extremo 5' de la cadena de sentido), y dos modificaciones del enlace internucleotídico de fosforotioato en las posiciones 1 y 2 y dos modificaciones del enlace internucleotídico de fosforotioato dentro de las posiciones 18-23 de la cadena antisentido (contando desde el extremo 5' de la cadena antisentido). El agente de ARNi comprende además un 5'-desoxi-
10 5'-C-malonil.

En una modalidad, 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 comprende además un 5'-P.

- 15 En una modalidad, 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 comprende además un 5'- PS.

- 20 En una modalidad, 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 comprende además un 5'- VP. El 5'-VP puede ser 5'-E-VP, 5'-Z-VP, o su combinación.

- 25 En una modalidad, 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 comprende además un 5'-PS₂.

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

5 En una modalidad, 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 del enlace internucleotídico de fosforotioato dentro de la posición 1-5 de la cadena de sentido (contando desde el extremo 5' de la cadena de
10 sentido), y dos modificaciones del enlace internucleotídico de fosforotioato en las posiciones 1 y 2 y dos modificaciones del enlace internucleotídico de fosforotioato dentro de las posiciones 18-23 de la cadena antisentido (contando desde el extremo 5' de la cadena antisentido). El agente de ARNi comprende además un 5'-P.

En una modalidad, 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
15 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 del enlace internucleotídico de fosforotioato dentro de la posición 1-5 de la cadena de sentido (contando desde el extremo 5' de la cadena de sentido), y dos modificaciones del enlace internucleotídico de fosforotioato en las posiciones
20 1 y 2 y dos modificaciones del enlace internucleotídico de fosforotioato dentro de las posiciones 18-23 de la cadena antisentido (contando desde el extremo 5' de la cadena antisentido). El agente de ARNi comprende además un 5'- PS.

En una modalidad, 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
25 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 del enlace internucleotídico de fosforotioato dentro de la posición 1-5 de la cadena de sentido (contando desde el extremo 5' de la cadena de sentido), y dos modificaciones del enlace internucleotídico de fosforotioato en las posiciones

1 y 2 y dos modificaciones del enlace internucleotídico de fosforotioato dentro de las posiciones 18-23 de la cadena antisentido (contando desde el extremo 5' de la cadena antisentido). El agente de ARNi comprende además un 5'-VP. El 5'-VP puede ser 5'-E-VP, 5'-Z-VP, o su combinación.

5 En una modalidad, 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 del enlace internucleotídico de fosforotioato dentro de la posición 1-5 de la cadena de sentido (contando desde el extremo 5' de la cadena de
10 sentido), y dos modificaciones del enlace internucleotídico de fosforotioato en las posiciones 1 y 2 y dos modificaciones del enlace internucleotídico de fosforotioato dentro de las posiciones 18-23 de la cadena antisentido (contando desde el extremo 5' de la cadena antisentido). El agente de ARNi comprende además un 5'-PS₂.

 En una modalidad, 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
15 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 del enlace internucleotídico de fosforotioato dentro de la posición 1-5 de la cadena de sentido (contando desde el extremo 5' de la cadena de
 sentido), y dos modificaciones del enlace internucleotídico de fosforotioato en las posiciones
20 1 y 2 y dos modificaciones del enlace internucleotídico de fosforotioato dentro de las posiciones 18-23 de la cadena antisentido (contando desde el extremo 5' de la cadena antisentido). El agente de ARNi comprende además un 5'-desoxi-5'-C-malonil.

 En una modalidad, 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'
25 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 del enlace internucleotídico de fosforotioato dentro de la posición 1-5 de la cadena de sentido (contando desde el extremo 5' de la cadena de sentido), y dos modificaciones del enlace internucleotídico de

fosforotioato en las posiciones 1 y 2 y dos modificaciones del enlace internucleotídico de fosforotioato dentro de las posiciones 18-23 de la cadena antisentido (contando desde el extremo 5' de la cadena antisentido). El agente de ARNi comprende además un 5'-P y un ligando de direccionamiento. En una modalidad, el 5'-P está en el extremo 5' de la cadena antisentido, y el ligando de direccionamiento está en el extremo 3' de la cadena de sentido.

En una modalidad, 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 del enlace internucleotídico de

fosforotioato dentro de la posición 1-5 de la cadena de sentido (contando desde el extremo 5' de la cadena de sentido), y dos modificaciones del enlace internucleotídico de

fosforotioato en las posiciones 1 y 2 y dos modificaciones del enlace internucleotídico de

fosforotioato dentro de las posiciones 18-23 de la cadena antisentido (contando desde el

extremo 5' de la cadena antisentido). El agente de ARNi comprende además un 5'-PS y un

ligando de direccionamiento. En una modalidad, el 5'-PS está en el extremo 5' de la cadena antisentido, y el ligando de transformación está en el extremo 3' de la cadena de sentido.

En una modalidad, 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 del enlace internucleotídico de

fosforotioato dentro de la posición 1-5 de la cadena de sentido (contando desde el extremo 5' de la cadena de sentido), y dos modificaciones del enlace internucleotídico de

fosforotioato en las posiciones 1 y 2 y dos modificaciones del enlace internucleotídico de

fosforotioato dentro de las posiciones 18-23 de la cadena antisentido (contando desde el

extremo 5' de la cadena antisentido). El agente de ARNi comprende además un 5'-VP (*por ejemplo*, un 5'-E-VP, 5'-Z-VP, o sus combinaciones), y un ligando de direccionamiento.

En una modalidad, el 5'-VP está en el extremo 5' de la cadena antisentido, y el ligando de direccionamiento está en el extremo 3' de la cadena de sentido.

En una modalidad, 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 del enlace internucleotídico de fosforotioato dentro de la posición 1-5 de la cadena de sentido (contando desde el extremo 5' de la cadena de sentido), y dos modificaciones del enlace internucleotídico de fosforotioato en las posiciones 1 y 2 y dos modificaciones del enlace internucleotídico de fosforotioato dentro de las posiciones 18-23 de la cadena antisentido (contando desde el extremo 5' de la cadena antisentido). El agente de ARNi comprende además un 5'-PS₂ y un ligando de direccionamiento. En una modalidad, el 5'-PS₂ está en el extremo 5' de la cadena antisentido, y el ligando de direccionamiento está en el extremo 3' de la cadena de sentido.

En una modalidad, 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 del enlace internucleotídico de fosforotioato dentro de la posición 1-5 de la cadena de sentido (contando desde el extremo 5' de la cadena de sentido), y dos modificaciones del enlace internucleotídico de fosforotioato en las posiciones 1 y 2 y dos modificaciones del enlace internucleotídico de fosforotioato dentro de las posiciones 18-23 de la cadena antisentido (contando desde el extremo 5' de la cadena antisentido). El agente de ARNi comprende además un 5'-desoxi-5'-C-malonil y un ligando de direccionamiento. En una modalidad, el 5'-desoxi-5'-C-malonil está en el extremo 5' de la cadena antisentido, y el ligando de direccionamiento está en el extremo 3' de la cadena de sentido.

En una modalidad, 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 del enlace internucleotídico de fosforotioato

dentro de la posición 1-5 de la cadena de sentido (contando desde el extremo 5'), y dos modificaciones del enlace internucleotídico de fosforotioato en las posiciones 1 y 2 y dos modificaciones del enlace internucleotídico de fosforotioato dentro de las posiciones 18-23 de la cadena antisentido (contando desde el extremo 5'). El agente de ARNi comprende
 5 además un 5'-P y un ligando de direccionamiento. En una modalidad, el 5'-P está en el extremo 5' de la cadena antisentido, y el ligando de direccionamiento está en el extremo 3' de la cadena de sentido.

En una modalidad, 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'
 10 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 del enlace internucleotídico de fosforotioato dentro de la posición 1-5 de la cadena de sentido (contando desde el extremo 5'), y dos modificaciones del enlace internucleotídico de fosforotioato en las posiciones 1 y 2 y dos modificaciones del enlace internucleotídico de fosforotioato dentro de las posiciones 18-23
 15 de la cadena antisentido (contando desde el extremo 5'). El agente de ARNi comprende además un 5'-PS y un ligando de direccionamiento. En una modalidad, el 5'-PS está en el extremo 5' de la cadena antisentido, y el ligando de transformación está en el extremo 3' de la cadena de sentido.

En una modalidad, 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
 20 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 del enlace internucleotídico de fosforotioato dentro de la posición 1-5 de la cadena de sentido (contando desde el extremo 5'), y dos modificaciones del enlace internucleotídico de fosforotioato en las posiciones 1 y 2 y dos
 25 modificaciones del enlace internucleotídico de fosforotioato dentro de las posiciones 18-23 de la cadena antisentido (contando desde el extremo 5'). El agente de ARNi comprende además un 5'-VP (*por ejemplo*, un 5'-E-VP, 5'-Z-VP, o sus combinaciones) y un ligando de

direccionamiento. En una modalidad, el 5'-VP está en el extremo 5' de la cadena antisentido, y el ligando de direccionamiento está en el extremo 3' de la cadena de sentido.

En una modalidad, 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 del enlace internucleotídico de fosforotioato dentro de la posición 1-5 de la cadena de sentido (contando desde el extremo 5'), y dos modificaciones del enlace internucleotídico de fosforotioato en las posiciones 1 y 2 y dos modificaciones del enlace internucleotídico de fosforotioato dentro de las posiciones 18-23 de la cadena antisentido (contando desde el extremo 5'). El agente de ARNi comprende además un 5'-PS₂ y un ligando de direccionamiento. En una modalidad, el 5'-PS₂ está en el extremo 5' de la cadena antisentido, y el ligando de direccionamiento está en el extremo 3' de la cadena de sentido.

En una modalidad, 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 del enlace internucleotídico de fosforotioato dentro de la posición 1-5 de la cadena de sentido (contando desde el extremo 5'), y dos modificaciones del enlace internucleotídico de fosforotioato en las posiciones 1 y 2 y dos modificaciones del enlace internucleotídico de fosforotioato dentro de las posiciones 18-23 de la cadena antisentido (contando desde el extremo 5'). El agente de ARNi comprende además un 5'-desoxi-5'-C-malonil y un ligando de direccionamiento. En una modalidad, el 5'-desoxi-5'-C-malonil está en el extremo 5' de la cadena antisentido, y el ligando de direccionamiento está en el extremo 3' de la cadena de sentido.

En una modalidad, 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 del enlace internucleotídico de

fosforotioato dentro de la posición 1-5 de la cadena de sentido (contando desde el extremo 5' de la cadena de sentido), y dos modificaciones del enlace internucleotídico de fosforotioato en las posiciones 1 y 2 y dos modificaciones del enlace internucleotídico de fosforotioato dentro de las posiciones 18-23 de la cadena antisentido (contando desde el extremo 5' de la cadena antisentido). El agente de ARNi comprende además un 5'-P y un ligando de direccionamiento. En una modalidad, el 5'-P está en el extremo 5' de la cadena antisentido, y el ligando de direccionamiento está en el extremo 3' de la cadena de sentido.

En una modalidad, 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 del enlace internucleotídico de fosforotioato dentro de la posición 1-5 de la cadena de sentido (contando desde el extremo 5' de la cadena de sentido), y dos modificaciones del enlace internucleotídico de fosforotioato en las posiciones 1 y 2 y dos modificaciones del enlace internucleotídico de fosforotioato dentro de las posiciones 18-23 de la cadena antisentido (contando desde el extremo 5' de la cadena antisentido). El agente de ARNi comprende además un 5'-PS y un ligando de direccionamiento. En una modalidad, el 5'-PS está en el extremo 5' de la cadena antisentido, y el ligando de transformación está en el extremo 3' de la cadena de sentido.

En una modalidad, 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 del enlace internucleotídico de fosforotioato dentro de la posición 1-5 de la cadena de sentido (contando desde el extremo 5' de la cadena de sentido), y dos modificaciones del enlace internucleotídico de fosforotioato en las posiciones 1 y 2 y dos modificaciones del enlace internucleotídico de fosforotioato dentro de las posiciones 18-23 de la cadena antisentido (contando desde el extremo 5' de la cadena antisentido). El agente de ARNi comprende además un 5'-VP (*por ejemplo*, un 5'-E-VP, 5'-Z-VP, o sus combinaciones) y un ligando de direccionamiento. En

una modalidad, el 5'-VP está en el extremo 5' de la cadena antisentido, y el ligando de direccionamiento está en el extremo 3' de la cadena de sentido.

En una modalidad, 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 del enlace internucleotídico de fosforotioato dentro de la posición 1-5 de la cadena de sentido (contando desde el extremo 5' de la cadena de sentido), y dos modificaciones del enlace internucleotídico de fosforotioato en las posiciones 1 y 2 y dos modificaciones del enlace internucleotídico de fosforotioato dentro de las posiciones 18-23 de la cadena antisentido (contando desde el extremo 5' de la cadena antisentido). El agente de ARNi comprende además un 5'-PS₂ y un ligando de direccionamiento. En una modalidad, el 5'-PS₂ está en el extremo 5' de la cadena antisentido, y el ligando de direccionamiento está en el extremo 3' de la cadena de sentido.

En una modalidad, 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 del enlace internucleotídico de fosforotioato dentro de la posición 1-5 de la cadena de sentido (contando desde el extremo 5' de la cadena de sentido), y dos modificaciones del enlace internucleotídico de fosforotioato en las posiciones 1 y 2 y dos modificaciones del enlace internucleotídico de fosforotioato dentro de las posiciones 18-23 de la cadena antisentido (contando desde el extremo 5' de la cadena antisentido). El agente de ARNi comprende además un 5'-desoxi-5'-C-malonil y un ligando de direccionamiento. En una modalidad, el 5'-desoxi-5'-C-malonil está en el extremo 5' de la cadena antisentido, y el ligando de direccionamiento está en el extremo 3' de la cadena de sentido.

En una modalidad, 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 del enlace internucleotídico de fosforotioato dentro de la posición 1-5 de la cadena de sentido (contando desde el extremo 5' de la cadena de sentido), y dos modificaciones del enlace internucleotídico de fosforotioato en las posiciones 1 y 2 y dos modificaciones del enlace internucleotídico de fosforotioato dentro de las posiciones 18-23 de la cadena antisentido (contando desde el extremo 5' de la cadena antisentido). El agente de ARNi comprende además un 5'-P y un ligando de direccionamiento. En una modalidad, el 5'-P está en el extremo 5' de la cadena antisentido, y el ligando de direccionamiento está en el extremo 3' de la cadena de sentido.

En una modalidad, 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 del enlace internucleotídico de fosforotioato dentro de la posición 1-5 de la cadena de sentido (contando desde el extremo 5' de la cadena de sentido), y dos modificaciones del enlace internucleotídico de fosforotioato en las posiciones 1 y 2 y dos modificaciones del enlace internucleotídico de fosforotioato dentro de las posiciones 18-23 de la cadena antisentido (contando desde el extremo 5' de la cadena antisentido). El agente de ARNi comprende además un 5'-PS y un ligando de direccionamiento. En una modalidad, el 5'-PS está en el extremo 5' de la cadena antisentido, y el ligando de transformación está en el extremo 3' de la cadena de sentido.

En una modalidad, 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 del enlace internucleotídico de fosforotioato dentro de la posición 1-5 de la cadena de sentido (contando desde el extremo 5' de la cadena de sentido), y dos modificaciones del enlace internucleotídico de fosforotioato en las posiciones 1 y 2 y dos modificaciones del enlace internucleotídico de fosforotioato dentro de las posiciones 18-23 de la cadena antisentido (contando desde el extremo 5' de la cadena

antisentido). El agente de ARNi comprende además un 5'-VP (*por ejemplo*, un 5'-E-VP, 5'-Z-VP o sus combinaciones) y un ligando de direccionamiento. En una modalidad, el 5'-VP está en el extremo 5' de la cadena antisentido, y el ligando de direccionamiento está en el extremo 3' de la cadena de sentido.

5 En una modalidad, 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 del enlace internucleotídico de fosforotioato dentro de la posición 1-5 de la cadena de sentido (contando desde el extremo 5' de la cadena de
10 sentido), y dos modificaciones del enlace internucleotídico de fosforotioato en las posiciones 1 y 2 y dos modificaciones del enlace internucleotídico de fosforotioato dentro de las posiciones 18-23 de la cadena antisentido (contando desde el extremo 5' de la cadena antisentido). El agente de ARNi comprende además un 5'-PS₂ y un ligando de direccionamiento. En una modalidad, el 5'-PS₂ está en el extremo 5' de la cadena
15 antisentido, y el ligando de direccionamiento está en el extremo 3' de la cadena de sentido.

En una modalidad, 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 del enlace internucleotídico de fosforotioato dentro de
20 la posición 1-5 de la cadena de sentido (contando desde el extremo 5' de la cadena de sentido), y dos modificaciones del enlace internucleotídico de fosforotioato en las posiciones 1 y 2 y dos modificaciones del enlace internucleotídico de fosforotioato dentro de las posiciones 18-23 de la cadena antisentido (contando desde el extremo 5' de la cadena antisentido). El agente de ARNi comprende además un 5'-desoxi-5'-C-malonil y un ligando
25 de direccionamiento. En una modalidad, el 5'-desoxi-5'-C-malonil está en el extremo 5' de la cadena antisentido, y el ligando de direccionamiento está en el extremo 3' de la cadena de sentido.

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

(a) una cadena de 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 a través de un enlazador 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 cadena 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) enlaces internucleotídicos de fosforotioato entre las posiciones de nucleótidos 21 y 22, y entre las posiciones de nucleótidos 22 y 23 (contando desde el extremo 5');

en donde los agentes de ARNbc tienen un extremo saliente de dos nucleótidos en el extremo 3' de la cadena antisentido, y un extremo romo en el extremo 5' de la cadena antisentido.

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

(a) una cadena de 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 a través de un enlazador 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) enlaces internucleotídicos de fosforotioato entre las posiciones de nucleótidos 1 y 2, y entre las posiciones de nucleótidos 2 y 3 (contando desde el extremo 5');

y

(b) una cadena 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) enlaces internucleotídicos de fosforotioato entre las posiciones de nucleótidos 1 y 2, entre las posiciones de nucleótidos 2 y 3, entre las posiciones de nucleótidos 21 y 22, y entre las posiciones de nucleótidos 22 y 23 (contando desde el extremo 5');

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

En otra modalidad particular, un agente de ARNi de la presente invención

comprende:

(a) una cadena de 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 a través de un enlazador 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) enlaces internucleotídicos de fosforotioato entre las posiciones de nucleótidos 1 y 2, y entre las posiciones de nucleótidos 2 y 3 (contando desde el extremo 5');
y

5 (b) una cadena 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

10 (iii) enlaces internucleotídicos de fosforotioato entre las posiciones de nucleótidos 1 y 2, entre las posiciones de nucleótidos 2 y 3, entre las posiciones de nucleótidos 21 y 22, y entre las posiciones de nucleótidos 22 y 23 (contando desde el extremo 5');

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

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

(a) una cadena de sentido que tiene:

(i) una longitud de 21 nucleótidos;

20 (ii) un ligando ASGPR unido al extremo 3', en donde dicho ligando ASGPR comprende tres derivados de GalNAc unidos a través de un enlazador 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

25 (iv) enlaces internucleotídicos de fosforotioato entre las posiciones de nucleótidos 1 y 2, y entre las posiciones de nucleótidos 2 y 3 (contando desde el extremo 5');

y

(b) una cadena 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

5 (contando desde el extremo 5'); y

(iii) enlaces internucleotídicos de fosforotioato entre las posiciones de nucleótidos 1 y 2, entre las posiciones de nucleótidos 2 y 3, entre las posiciones de nucleótidos 21 y 22, y entre las posiciones de nucleótidos 22 y 23 (contando desde el extremo 5');

10 en donde los agentes de ARNi tienen un extremo saliente de dos nucleótidos en el extremo 3' de la cadena antisentido, y un extremo romo en el extremo 5' de la cadena antisentido.

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

(a) una cadena de sentido que tiene:

15 (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 a través de un enlazador ramificado trivalente;

20 (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) enlaces internucleotídicos de fosforotioato entre las posiciones de nucleótidos 1 y 2, y entre las posiciones de nucleótidos 2 y 3 (contando desde el extremo 5');

y

25 (b) una cadena 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) enlaces internucleotídicos de fosforotioato entre las posiciones de nucleótidos 1 y 2, entre las posiciones de nucleótidos 2 y 3, entre las posiciones de nucleótidos 21 y 22, y entre las posiciones de nucleótidos 22 y 23 (contando desde el extremo 5');

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

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

(a) una cadena de 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 a través de un enlazador 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) enlaces internucleotídicos de fosforotioato entre las posiciones de

nucleótidos 1 y 2, y entre las posiciones de nucleótidos 2 y 3 (contando desde el extremo 5');

y

(b) una cadena 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) enlaces internucleotídicos de fosforotioato entre las posiciones de nucleótidos 1 y 2, entre las posiciones de nucleótidos 2 y 3, entre las posiciones de nucleótidos 21 y 22, y entre las posiciones de nucleótidos 22 y 23 (contando desde el extremo 5');;

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

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

(a) una cadena de sentido que tiene:

- 10 (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 a través de un enlazador ramificado trivalente;
- 15 (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) enlaces internucleotídicos de fosforotioato entre las posiciones de nucleótidos 1 y 2, y entre las posiciones de nucleótidos 2 y 3 (contando desde el extremo 5');

y

20 (b) una cadena antisentido que tiene:

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

25 y

(iii) enlaces internucleotídicos de fosforotioato entre las posiciones de nucleótidos 1 y 2, entre las posiciones de nucleótidos 2 y 3, entre las posiciones

de nucleótidos 21 y 22, y entre las posiciones de nucleótidos 22 y 23 (contando desde el extremo 5');
 5 antisentido.

en donde los agentes de ARNi tienen un extremo saliente de cuatro nucleótidos en el extremo 3' de la cadena antisentido, y un extremo romo en el extremo 5' de la cadena

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

(a) una cadena de sentido que tiene:

(i) una longitud de 21 nucleótidos;

10 (ii) un ligando ASGPR unido al extremo 3', en donde dicho ligando ASGPR comprende tres derivados de GalNAc unidos a través de un enlazador 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

15 (iv) enlaces internucleotídicos de fosforotioato entre las posiciones de nucleótidos 1 y 2, y entre las posiciones de nucleótidos 2 y 3 (contando desde el extremo 5');

y

(b) una cadena antisentido que tiene:

20 (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

25 (iii) enlaces internucleotídicos de fosforotioato entre las posiciones de nucleótidos 1 y 2, entre las posiciones de nucleótidos 2 y 3, entre las posiciones de nucleótidos 21 y 22, y entre las posiciones de nucleótidos 22 y 23 (contando desde el extremo 5');

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

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

- 5 (a) una cadena de 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 a través de un enlazador ramificado trivalente;
 - 10 (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) enlaces internucleotídicos de fosforotioato entre las posiciones de nucleótidos 1 y 2, y entre las posiciones de nucleótidos 2 y 3 (contando desde el extremo 5');
 - 15 y
 - (b) una cadena 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
 - 20 (iii) enlaces internucleotídicos de fosforotioato entre las posiciones de nucleótidos 1 y 2, entre las posiciones de nucleótidos 2 y 3, entre las posiciones de nucleótidos 21 y 22, y entre las posiciones de nucleótidos 22 y 23 (contando desde el extremo 5');

25 en donde los agentes de ARNi tienen un extremo saliente de dos nucleótidos en el extremo 3' de la cadena antisentido, y un extremo romo en el extremo 5' de la cadena antisentido.

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

- (a) una cadena de 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 a través de un enlazador 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) enlaces internucleotídicos de fosforotioato entre las posiciones de nucleótidos 1 y 2, y entre las posiciones de nucleótidos 2 y 3 (contando desde el extremo 5');

y

- (b) una cadena 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) enlaces internucleotídicos de fosforotioato entre las posiciones de nucleótidos 1 y 2, entre las posiciones de nucleótidos 2 y 3, entre las posiciones de nucleótidos 19 y 20, y entre las posiciones de nucleótidos 20 y 21 (contando desde el extremo 5');

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

En determinadas modalidades, el ARNi para usar en los métodos de la invención es un agente que se selecciona de los agentes enumerados en cualquiera de las Tablas 2, 3, 5, y 6. Estos agentes pueden comprender además un ligando.

III. ARNi conjugados a ligandos

Otra modificación del ARN de un ARNi de la invención implica enlazar químicamente al ARNi uno o más ligandos, restos o conjugados que potencian la actividad, distribución celular o captación celular del ARNi *por ejemplo*, en una célula. Tales restos incluyen, de modo no taxativo, restos de lípidos tales como un resto de colesterol (Letsinger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, 86: 6553-6556). En otras modalidades, el ligando es ácido cólico (Manoharan *et al.*, *Biorg. Med. Chem. Lett.*, 1994, 4:1053-1060), un tioéter, p. ej., beril-S-tritiltiol (Manoharan *et al.*, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1992, 660:306-309; Manoharan *et al.*, *Biorg. Med. Chem. Lett.*, 1993, 3:2765-2770), un tiocolesterol (Oberhauser *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 1992, 20:533-538), una cadena alifática, p. ej., residuos de dodecandiol o undecilo (Saison-Behmoaras *et al.*, *EMBO J*, 1991, 10:1111-1118; Kabanov *et al.*, *FEBS Lett.*, 1990, 259:327-330; Svinarchuk *et al.*, *Biochimie*, 1993, 75:49-54), un fosfolípido, p. ej., di-hexadecil-rac-glicerol o 1,2-di-O-hexadecil-rac-glicero-3-fosfonato de trietil-amonio (Manoharan *et al.*, *Tetrahedron Lett.*, 1995, 36:3651-3654; Shea *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 1990, 18:3777-3783), una cadena de poliamina o polietilenglicol (Manoharan *et al.*, *Nucleosides & Nucleotides*, 1995, 14:969-973), o ácido adamantanacético (Manoharan *et al.*, *Tetrahedron Lett.*, 1995, 36:3651-3654), un resto de palmitilo (Mishra *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta*, 1995, 1264:229-237), o un resto de octadecilamina o hexilamino-carboniloxicolesterol (Crooke *et al.*, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1996, 277:923-937).

En determinadas modalidades, un ligando altera la distribución, el direccionamiento o la vida útil de un agente de ARNi en el que se incorpora. En algunas modalidades un ligando proporciona una afinidad potenciada para una diana seleccionada, *por ejemplo*, molécula, célula o tipo de célula, compartimiento, *por ejemplo*, un compartimiento celular o de un órgano, tejido, órgano o región del cuerpo, como, *por ejemplo*, en comparación con una especie sin dicho ligando. En algunas modalidades, los ligandos no participan en el emparejamiento 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); un carbohidrato (*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 poliaminoácido es una polilisina (PLL), ácido poli L-aspartico, ácido poli L-

5 glutámico, copolímero de ácido estireno-maleico anhídrido, copolímero poli(L-lactida-coglucolada). copolímero de divinil éter-maleico anhídrido, copolímero N-(2-

hidroxipropil)metacrilamida (HMPA), polietilenglicol (PEG), alcohol polivinílico (PVA)

poliuretano, poli(ácido 2-etilacrílico), polímeros N-isopropilacrilamida, o polifosfazina. El

ejemplo de poliaminas incluye: polietilenimina, polilisina (PLL), espermina, espermidina,

10 poliamina, pseudopéptido-poliamina, poliamina peptidomimética, dendrímero poliamina, arginina, amidina, protamina, lípido catiónico, porfirina catiónica, sal cuaternaria de una poliamina o un péptido alfa helicoidal.

Los ligandos pueden incluir, además, grupos de direccionamiento, *por ejemplo*, un agente de direccionamiento a célula o tejido, *por ejemplo*, una lectina, glicoproteína, lípido o

15 proteína, *por ejemplo*, un anticuerpo, que se une a un tipo de célula especificada tal como una célula renal. Un grupo de direccionamiento puede ser una tirotopina, melanotropina,

lectina, glucoproteína, proteína tensioactiva A, carbohidrato de mucina, lactosa multivalente, galactosa multivalente, N-acetil-galactosamina, N-acetil-glucosamina manosa multivalente, fucosa multivalente, poliaminoácidos glucosilados, galactosa multivalente, transferina,

20 bifosfonato, poliglutamato, poliaspartato, un lípido, colesterol, un esteroide, ácido biliar, folato, vitamina B12, vitamina A, biotina, o un péptido RGD o mimético de péptido RGD. En determinadas modalidades, el ligando es una galactosa multivalente, *por ejemplo*, una N-acetil-galactosamina.

Otros ejemplos de ligandos incluyen tintes, agentes intercalantes (*por ejemplo*,

25 acridinas), reticulantes (*por ejemplo*, psoraleno, mitomicina C), porfirinas (TPPC4, texafirina, Safirina), hidrocarburos aromáticos policíclicos (*por ejemplo*, fenazina, dihidrofenazina),

endonucleasas artificiales (*por ejemplo*, EDTA), moléculas lipófilas, *por ejemplo*, colesterol,

ácido cólico, ácido acético adamantano, ácido 1-pireno butírico, dihidrotestosterona, 1,3-Bis-

O(hexadecil)glicerol, grupo geraniloxihexilo, hexadecilglicerol, borneol, mentol, 1,3-propanodiol, grupo heptadecilo, ácido palmítico, ácido mirístico, ácido O3-(oleoil)litocólico, ácido O3-(oleoil)colénico, dimetoxitritilo, o fenoxazina) y conjugados peptídicos (*por ejemplo*, péptido de antenapedia, péptido Tat), agentes alquilantes, fosfato, amino, mercapto, PEG
 5 (*por ejemplo*, PEG-40K), MPEG, [MPEG]₂, poliamino, alquilo, alquilo sustituido, marcadores radiomarcados, enzimas, haptenos (*por ejemplo*, biotina), facilitadores del transporte/absorción (*por ejemplo*, aspirina, vitamina E, ácido fólico), ribonucleasas sintéticas (*por ejemplo*, imidazol, bisimidazol, histamina, conglomerados de imidazol, conjugados de acridina-imidazol, complejos de Eu³⁺ de tetraazamacrociclos), dinitrofenilo,
 10 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 une a un tipo de célula especificada tal como una célula hepática. Los ligandos también pueden incluir hormonas y receptores hormonales.
 15 También pueden incluir especies no peptídicas, tales como lípidos, lectinas, carbohidratos, vitaminas, cofactores, lactosa multivalente, galactosa multivalente, N-acetil-galactosamina, N-acetil-glucosamina multivalente manosa o fucosa multivalente. El ligando puede ser, *por ejemplo*, un lipopolisacárido, un activador de p38 MAP cinasa o un activador de NF-κB.

El ligando puede ser una sustancia, *por ejemplo*, un fármaco, que puede aumentar la
 20 captación del agente de ARNi en la célula, *por ejemplo*, al alterar el citoesqueleto celular, *por ejemplo*, al alterar los microtúbulos, los microfilamentos o los filamentos intermedios de la célula. El fármaco puede ser, *por ejemplo*, taxol, vincristina, vinblastina, citocalasina, nocodazol, japlakinolida, latrunculina A, faloidina, swinholida A, indanocina o mioservina.

En algunas modalidades, un ligando unido a un ARNi como se describe en la
 25 presente descripción actúa como un modulador farmacocinético (modulador de PK). Los moduladores de PK incluyen lipófilos, ácidos biliares, esteroides, análogos fosfolípidos, péptidos, agentes de unión a proteínas, PEG, vitaminas, etc. Los moduladores de PK ilustrativos incluyen, de modo 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 enlaces de fosforotioato también se conocen para unirse a la proteína sérica, por lo tanto oligonucleótidos cortos, *por ejemplo*, oligonucleótidos de aproximadamente 5 bases, 10 bases, 15 bases, o 20 bases, que comprenden múltiples enlaces de fosforotioatos en la cadena principal también son susceptibles a la presente invención como ligandos (*por ejemplo*, como ligandos moduladores de PK). Además, los aptámeros que se unen a los componentes séricos (por ejemplo, proteínas séricas) también son adecuados para su uso como ligandos moduladores de PK en las modalidades descritas en la presente descripción.

10 Los ARNi conjugados con ligando de la invención pueden sintetizarse mediante el uso de un oligonucleótido que tiene una funcionalidad reactiva colgante, tal como la derivada de la unión de una molécula de enlace al oligonucleótido (descrito a continuación). Este oligonucleótido reactivo puede reaccionar directamente con ligandos disponibles comercialmente, ligandos que se sintetizan y que llevan cualquiera de una variedad de grupos de protección, o ligandos que tienen un resto de enlace unido al mismo.

15 Los oligonucleótidos usados en los conjugados de la presente invención pueden fabricarse conveniente y rutinariamente a través de la técnica bien conocida de síntesis en fase sólida. Varios proveedores venden el equipo para dicha síntesis, incluido, por ejemplo, Applied Biosystems® (Foster City, California). Cualquier otro método para dicha síntesis conocido en la técnica puede emplearse adicional o alternativamente. También se conoce el uso de técnicas similares para preparar otros oligonucleótidos, tales como los fosforotioatos y derivados alquilados.

25 En los ARNi conjugados con ligando y la molécula ligando que porta nucleósidos enlazados específicos de la secuencia de la presente invención, los oligonucleótidos y oligonucleósidos pueden ensamblarse en un sintetizador de ADN adecuado que utiliza precursores estándar de nucleótidos o nucleósidos o precursores de conjugado de nucleótidos o nucleósidos que ya portan el resto enlazante, precursores de conjugado de

nucleótido-ligando o nucleósido que ya portan la molécula ligando, o bloques de construcción que portan ligando no nucleósido.

Cuando se usan precursores de conjugado de nucleótidos que ya portan un resto enlazante, la síntesis de los nucleósidos enlazados específicos de la secuencia se completa típicamente, y la molécula ligando luego reacciona con el resto enlazante para formar el oligonucleótido conjugado con ligando. En algunas modalidades, los oligonucleótidos o nucleósidos enlazados de la presente invención se sintetizan mediante un sintetizador automatizado usando fosforamiditas derivadas de conjugados ligando-nucleósido además de las fosforamiditas estándar y fosforamiditas no estándar que están disponibles comercialmente y se usan rutinariamente en la síntesis de oligonucleótidos.

A. Conjugados lipídicos

En determinadas modalidades, el ligando o conjugado es una molécula lipídica o basada en lípidos. En una modalidad, tal molécula lipídica o basada en lípidos puede unirse a una proteína sérica, por ejemplo, albúmina sérica humana (HSA). Un ligando de unión a HSA permite la distribución del conjugado a un tejido diana, *por ejemplo*, un tejido diana no renal del cuerpo. Por ejemplo, el tejido diana puede ser el hígado, incluidas las células parenquimatosas del hígado. Otras moléculas que pueden unirse a HSA también pueden usarse como ligandos. Por ejemplo, se puede usar naproxeno o aspirina. Un ligando lipídico o basado en lípidos puede (a) aumentar la resistencia a la degradación del conjugado, (b) aumentar el direccionamiento o el transporte hacia una célula o membrana celular diana, o (c) puede usarse para ajustar la unión a una proteína sérica, *por ejemplo*, HSA.

Un ligando basado en lípidos puede usarse para inhibir, *por ejemplo*, controlar la unión del conjugado a un tejido diana. Por ejemplo, un ligando lipídico o basado en lípidos que se une a la HSA con mayor intensidad será menos probable que se dirija al riñón y, por lo tanto, menos probable que se elimine del cuerpo. Un ligando lipídico o basado en lípidos que se une a la HSA con menos intensidad puede usarse para dirigir el conjugado al riñón.

En determinadas modalidades, el ligando basado en lípidos se une a la HSA. En una modalidad, se une a la HSA con una afinidad suficiente de manera que el conjugado se distribuirá a un tejido no renal. Sin embargo, se prefiere que la afinidad no sea tan fuerte que la unión del ligando y HSA no se pueda revertir.

5 En otras modalidades, el ligando basado en lípidos se une débilmente a la HSA o no se une en absoluto. En una modalidad, el conjugado se distribuirá al riñón. Otros restos que se dirigen a las células renales también pueden usarse en lugar del ligando basado en lípidos, o además de este.

10 En otro aspecto, el ligando es un resto, *por ejemplo*, una vitamina, que es absorbida por una célula diana, *por ejemplo*, una célula proliferante. Estos son particularmente útiles para tratar trastornos que se caracterizan por la proliferación celular no deseada, *por ejemplo*, del tipo maligno o no maligno, *por ejemplo*, células cancerosas. Las vitaminas ilustrativas incluyen vitamina A, E y K. Otras vitaminas ilustrativas incluyen vitamina B, *por ejemplo*, ácido fólico, B12, riboflavina, biotina, piridoxal u otras vitaminas o nutrientes
15 absorbidas por las células diana, como las células hepáticas. También se incluyen HSA y lipoproteína de baja densidad (LDL).

B. Agentes de penetración celular

En otro aspecto, el ligando es un agente de penetración celular, tal como un agente
20 de penetración celular helicoidal. En una modalidad, el agente es anfipático. Un agente ilustrativo es un péptido tal como tat o antennopodia. Si el agente es un péptido, puede modificarse, lo que incluye un peptidilimético, invertómeros, enlaces no peptídicos o pseudopéptidos, y el uso de D-aminoácidos. En una modalidad, el agente helicoidal es un agente alfa-helicoidal, que tiene una fase lipófila y lipófoba.

25 El ligando puede ser un péptido o peptidomimético. Un peptidomimético (también denominado en la presente descripción como un oligopeptidomimético) es una molécula capaz de doblarse en una estructura tridimensional definida similar a un péptido natural. La unión de péptidos y peptidomiméticos a agentes de ARNi puede afectar la distribución

farmacocinética del ARNi, tal como mediante la potenciación del reconocimiento y absorción celular. El resto peptídico o peptidomimético puede tener aproximadamente 5-50 aminoácidos de largo, *por ejemplo*, aproximadamente 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50 aminoácidos de largo.

5 Un péptido o peptidomimético puede ser, por ejemplo, un péptido de penetración celular, péptido catiónico, péptido anfipático o péptido hidrófobo (*por ejemplo*, que consiste principalmente en Tyr, Trp o Phe). El resto peptídico puede ser un péptido dendrímero, péptido restringido o péptido reticulado. En otra alternativa, el resto peptídico puede incluir una secuencia de translocación de membrana hidrófoba (MTS). Un péptido hidrófobo

10 ilustrativo que contiene MTS es RFGF que tiene la secuencia de aminoácidos AAVALLPAVLLALLAP (SEQ ID NO: 14). Un análogo de RFGF (por ejemplo, la secuencia de aminoácidos AALLPVLLAAP (SEQ ID NO:15) que contiene un MTS hidrófobo también puede ser un resto de direccionamiento. El resto peptídico puede ser un péptido “de administración”, que puede transportar moléculas polares grandes que incluyen péptidos,

15 oligonucleótidos y proteína a través de membranas celulares. Por ejemplo, se ha descubierto que las secuencias de la proteína Tat del VIH (GRKKRRQRRPPQ (SEQ ID NO:16) y la proteína Drosophila Antennapedia (RQIKIWFQNRRMKWKK (SEQ ID NO:17) son capaces de funcionar como péptidos de administración. Un péptido o peptidomimético puede codificarse mediante una secuencia aleatoria de ADN, tal como un péptido

20 identificado a partir de una biblioteca de visualización de fagos, o una biblioteca combinatoria de una-microesfera-un-compuesto (OBOC, por sus siglas en inglés) (Lam et al., Nature, 354:82-84, 1991). Los ejemplos de un péptido o peptidomimético fijado a un agente de ARNbc a través de una unidad de monómero incorporada para propósitos de direccionamiento celular son un péptido de arginina-glicina-ácido aspártico (RGD), o

25 mimético de RGD. Un resto de péptido puede variar en longitud de aproximadamente 5 aminoácidos a aproximadamente 40 aminoácidos. Los restos de péptidos pueden tener una modificación estructural, tal como para aumentar la estabilidad o propiedades

conformacionales directas. Puede utilizarse cualquiera de las modificaciones estructurales descritas a continuación.

Un péptido RGD para usar en las composiciones y métodos de la invención puede ser lineal o cíclico, y puede modificarse, por ejemplo, glucosilado o metilado, para facilitar el direccionamiento en un tejido específico. Los péptidos que contienen RGD y los peptidiomiméticos pueden incluir D-aminoácidos, así como también miméticos de RGD sintéticos. Además de RGD, se pueden usar otros restos que se dirigen al ligando de integrina, *por ejemplo*, PECAM-1 o VEGF.

Un “péptido de penetración celular” es capaz de penetrar una célula, por ejemplo, una célula microbiana, tal como una célula bacteriana o fúngica, o una célula de mamífero, tal como una célula humana. Un péptido de penetración de una célula microbiana puede ser, por ejemplo, un péptido lineal α -helicoidal (*por ejemplo*, LL-37 o Ceropin P1), un péptido que contiene 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 indolicina). Un péptido de penetración celular puede incluir además una señal de localización nuclear (NLS). Por ejemplo, un péptido de penetración celular puede ser un péptido anfipático bipartito, tal como MPG, que se deriva del dominio del péptido de fusión del VIH-1 gp41 y la NLS del antígeno T grande de SV40 (Simeoni *et al.*, Nucl. Acids Res. 31:2717-2724, 2003).

C. Conjugados de carbohidratos

En algunas modalidades de las composiciones y métodos de la invención, un ARNi comprende además un carbohidrato. El ARNi conjugado con carbohidrato es ventajoso para la administración *in vivo* de ácidos nucleicos, así como también composiciones adecuadas para el uso terapéutico *in vivo*, como se describe en la presente descripción. Como se usa en la presente descripción, “carbohidrato” se refiere a un compuesto que es o bien un carbohidrato *per se* formado por una o más unidades de monosacáridos que tienen al menos 6 átomos de carbono (que pueden ser lineales, ramificados o cíclicos) con un

oxígeno, nitrógeno o átomo de azufre unidos a cada átomo de carbono; o un compuesto que tiene como parte de este un resto de carbohidrato compuesto por una o más unidades de monosacáridos que tienen cada una al menos seis átomos de carbono (que pueden ser lineales, ramificados o cíclicos), con oxígeno, nitrógeno o átomo de azufre unidos a cada

5 átomo de carbono. Los carbohidratos representativos incluyen los azúcares (mono-, di-, tri- y oligosacáridos que contienen aproximadamente 4, 5, 6, 7, 8, o 9 unidades de monosacáridos), y polisacáridos tales como almidones, glucógeno, celulosa y gomas polisacáridas. 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

10 unidades de monosacáridos (por ejemplo, C5, C6, C7 o C8).

En determinadas modalidades, un conjugado de carbohidratos para usar en las composiciones y métodos de la invención es un monosacárido.

En determinadas modalidades, el monosacárido es una N-acetilgalactosamina (GalNAc). Los conjugados de GalNAc, que comprenden uno o más derivados de N-

15 acetilgalactosamina (GalNAc), se describen, por ejemplo, en US 8,106,022, cuyo contenido completo se incorpora en la presente descripción como referencia. En algunas modalidades, el conjugado GalNAc sirve como un ligando que dirige el ARNi a células particulares. En algunas modalidades, el conjugado GalNAc dirige el ARNi a las células hepáticas, *por ejemplo*, que sirve como un ligando para el receptor de asialoglicoproteína de

20 las células hepáticas (*por ejemplo*, hepatocitos).

En algunas modalidades, el conjugado de carbohidratos comprende uno o más derivados de GalNAc. Los derivados de GalNAc pueden unirse mediante un enlazador, p. ej., un enlazador ramificado bivalente o trivalente. En algunas modalidades, el conjugado GalNAc se conjuga al extremo 3' de la cadena de sentido. En algunas modalidades, el

25 conjugado GalNAc se conjuga al agente de ARNi (por ejemplo, al extremo 3' de la cadena de sentido) mediante un enlazador, por ejemplo, un enlazador como se describe en la presente descripción. En algunas modalidades, el conjugado GalNAc se conjuga al extremo 5' de la cadena de sentido. En algunas modalidades, el conjugado GalNAc se conjuga al

agente de ARNi (por ejemplo, al extremo 5' de la cadena de sentido) mediante un enlazador, por ejemplo, un enlazador como se describe en la presente descripción.

En determinadas modalidades de la invención, el derivado de GalNAc o GalNAc se une a un agente de ARNi de la invención a través de un enlazador monovalente. En

5 algunas modalidades, de la invención, el derivado de GalNAc o GalNAc se une a un agente de ARNi de la invención *mediante* un enlazador bivalente. En otras modalidades de la invención, el derivado de GalNAc o GalNAc se une a un agente de ARNi de la invención a través de un enlazador trivalente. En otras modalidades de la invención, el derivado de GalNAc o GalNAc se une a un agente de ARNi de la invención mediante un enlazador
10 tetraivalente.

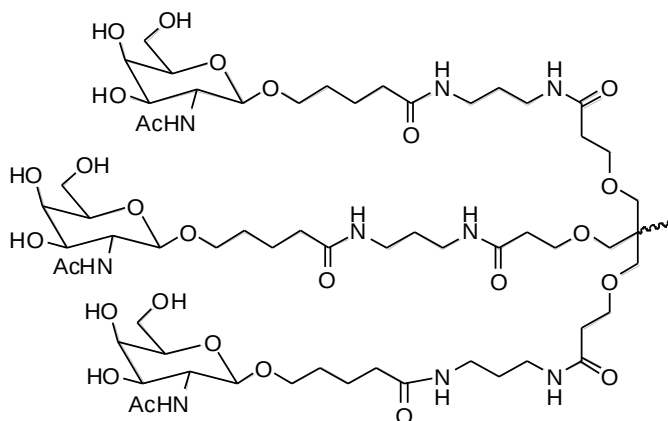
En determinadas modalidades, los agentes de ARNi bicatenario de la invención comprenden un derivado de GalNAc o GalNAc unidos al agente de ARNi. En determinadas modalidades, los agentes de ARNi bicatenario de la invención comprenden una pluralidad de (*por ejemplo*, 2, 3, 4, 5, o 6) derivados de GalNAc o GalNAc, cada uno se une
15 independientemente a una pluralidad de nucleótidos del agente de ARNi bicatenario a través de una pluralidad de enlazadores monovalentes.

En algunas modalidades, por ejemplo, cuando las dos cadenas 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
20 cadena respectiva que forma un bucle en horquilla que comprende, una pluralidad de nucleótidos no emparejados, cada uno de los nucleótidos no emparejados dentro del bucle en horquilla puede comprender independientemente un derivado de GalNAc o GalNAc unido a través de un enlazador monovalente. El bucle en horquilla también puede formarse por un extremo saliente extendido en una cadena del dúplex.

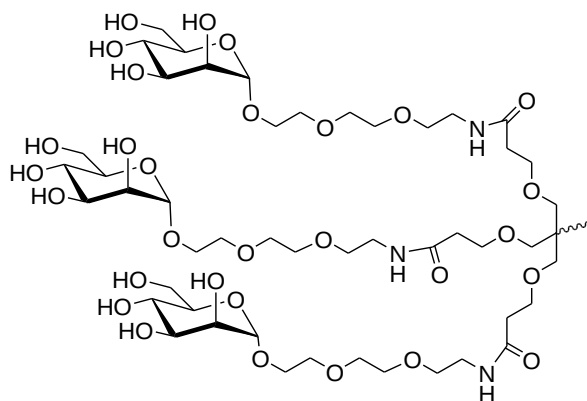
25 En algunas modalidades, por ejemplo, cuando las dos cadenas de un agente de ARNi de la invención son parte de una molécula más grande conectada por una cadena ininterrumpida de nucleótidos entre el extremo 3' de una cadena y el extremo 5' de la otra cadena respectiva que forma un bucle en horquilla que comprende, una pluralidad de

nucleótidos no emparejados, cada uno de los nucleótidos no emparejados dentro del bucle en horquilla puede comprender independientemente un derivado de GalNAc o GalNAc unido a través de un enlazador monovalente. El bucle en horquilla también puede formarse por un extremo saliente extendido en una cadena del dúplex.

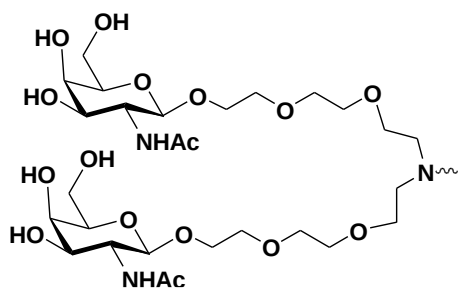
- 5 En una modalidad, un conjugado de carbohidratos para usar en las composiciones y métodos de la invención se selecciona del grupo que consiste en:



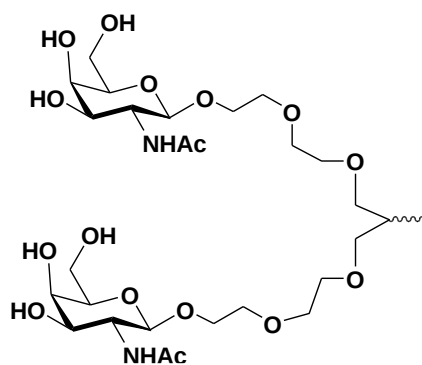
Fórmula II,



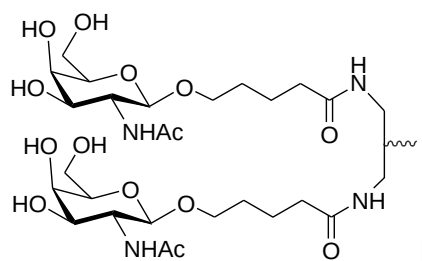
Fórmula III,



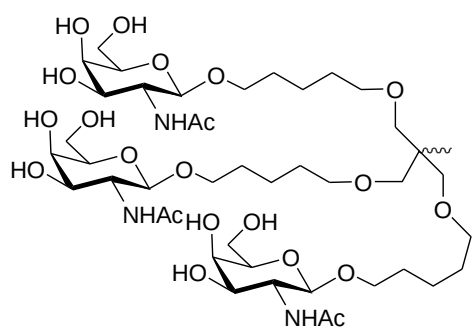
Fórmula IV,



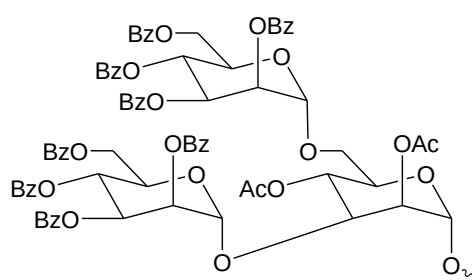
Fórmula V,



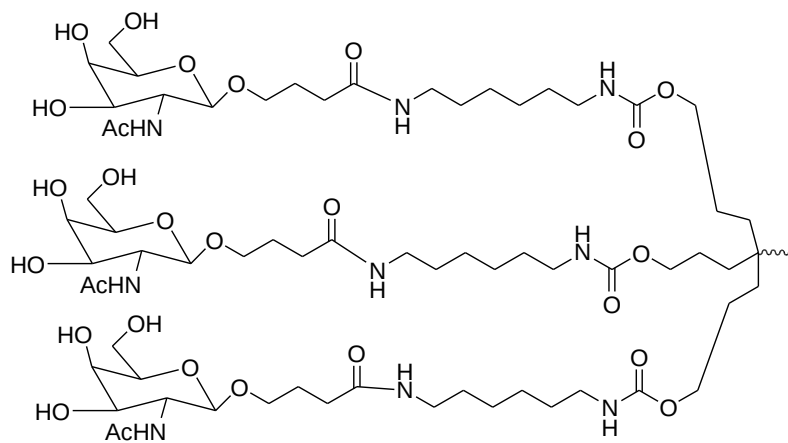
Fórmula VI,



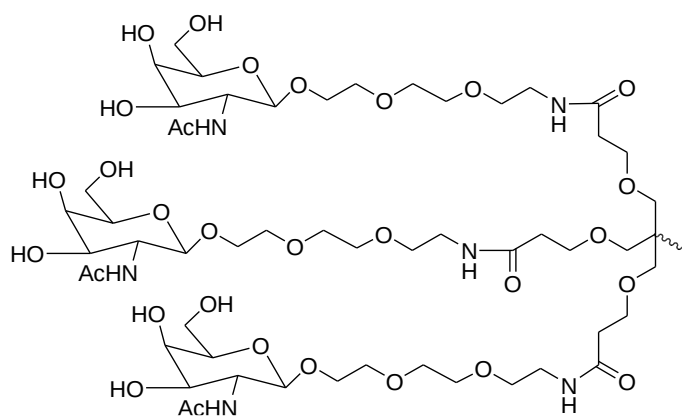
Fórmula VII,



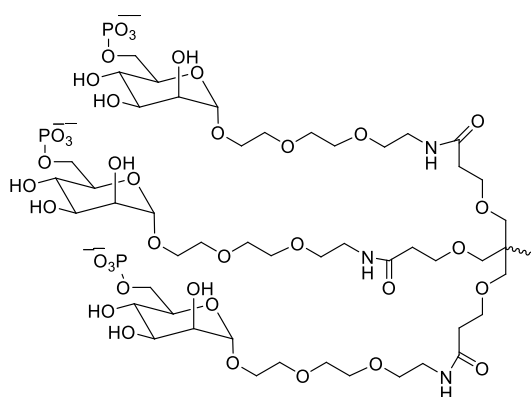
Fórmula VIII,



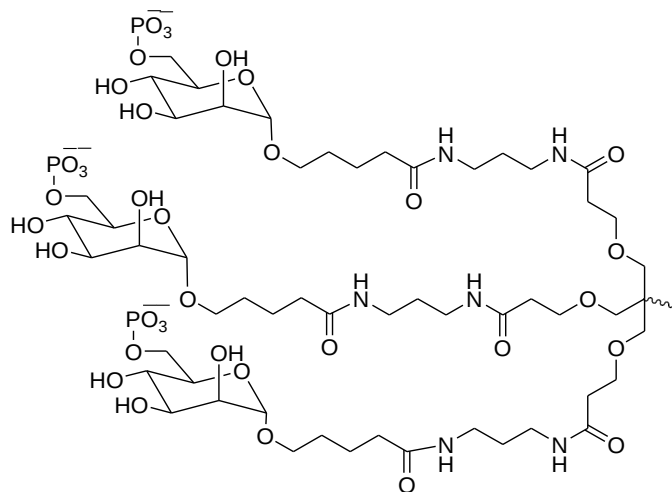
Fórmula IX,



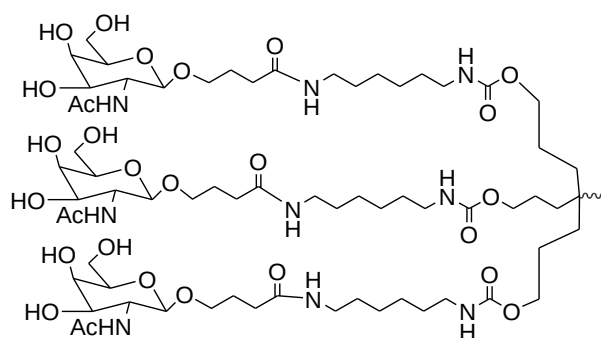
Fórmula X,



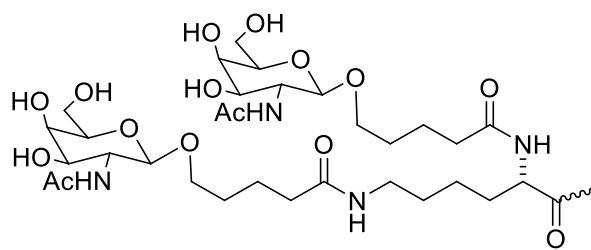
Fórmula XI,



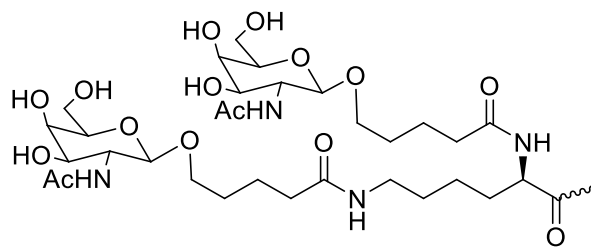
Fórmula XII,



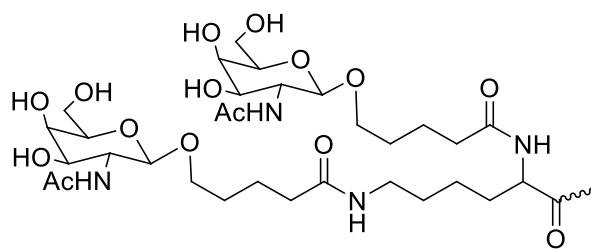
Fórmula XIII,



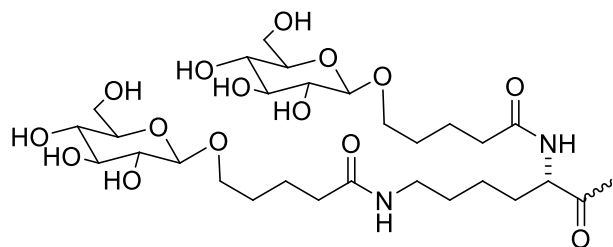
Fórmula XIV,



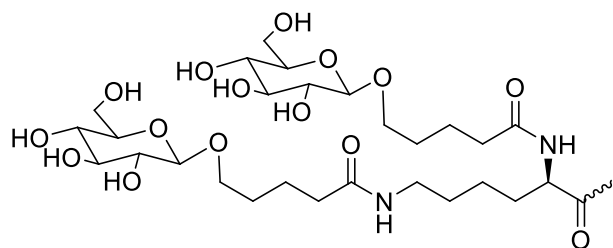
Fórmula XV,



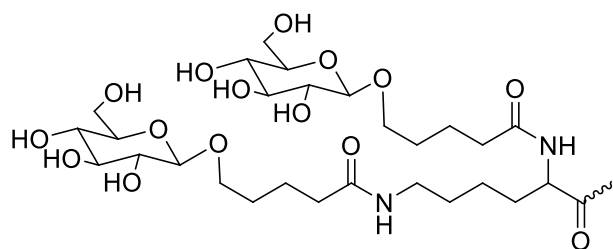
Fórmula XVI,



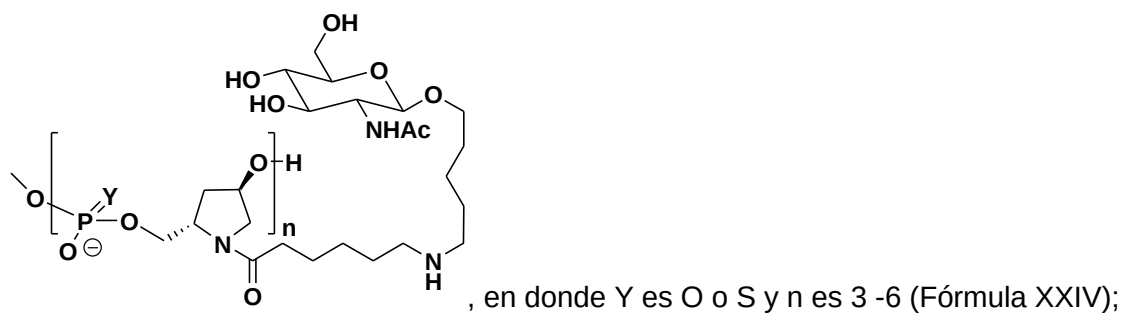
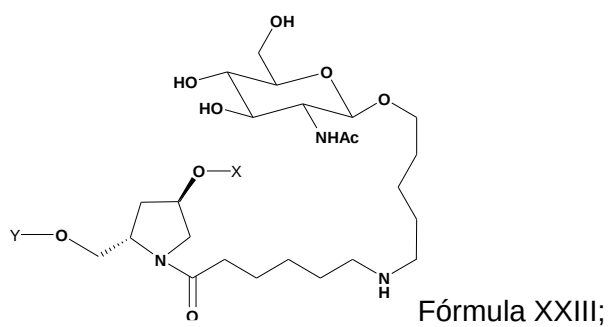
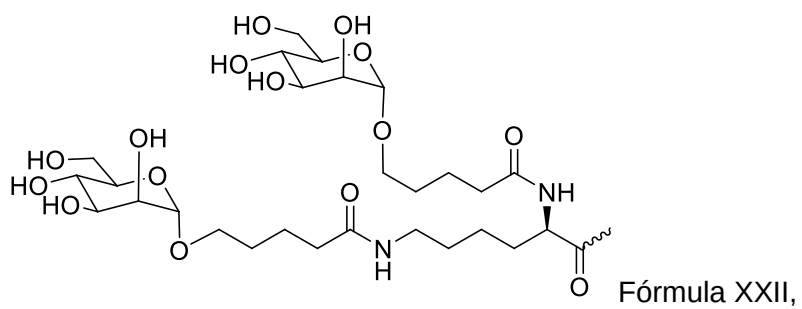
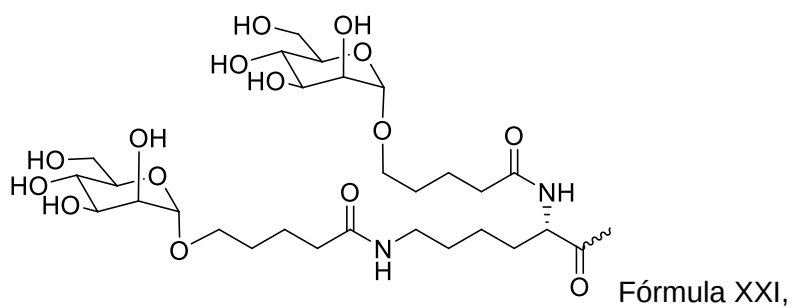
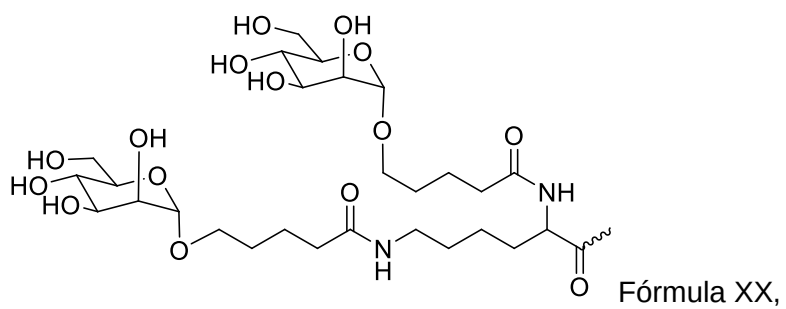
Fórmula XVII,

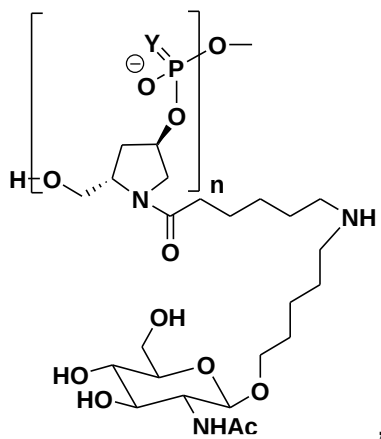


Fórmula XVIII,

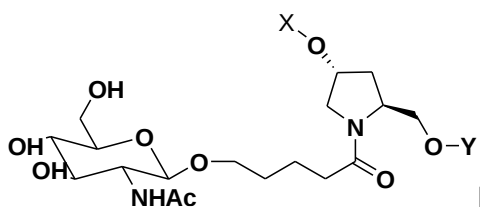


Fórmula XIX,

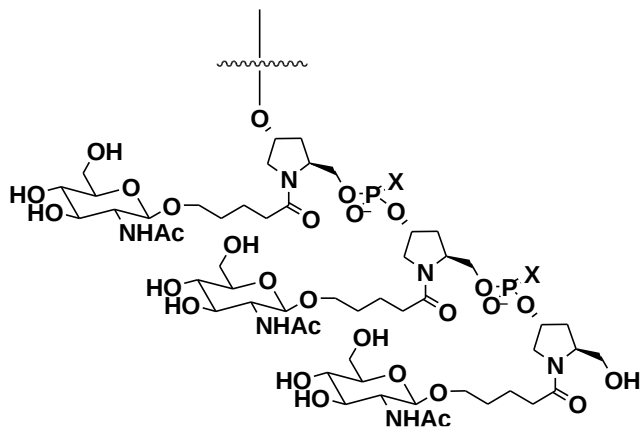




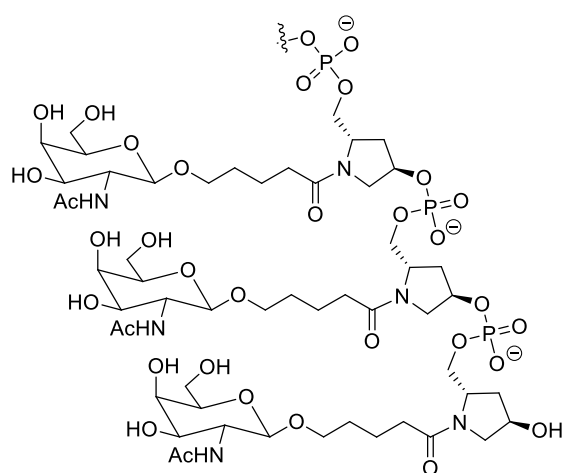
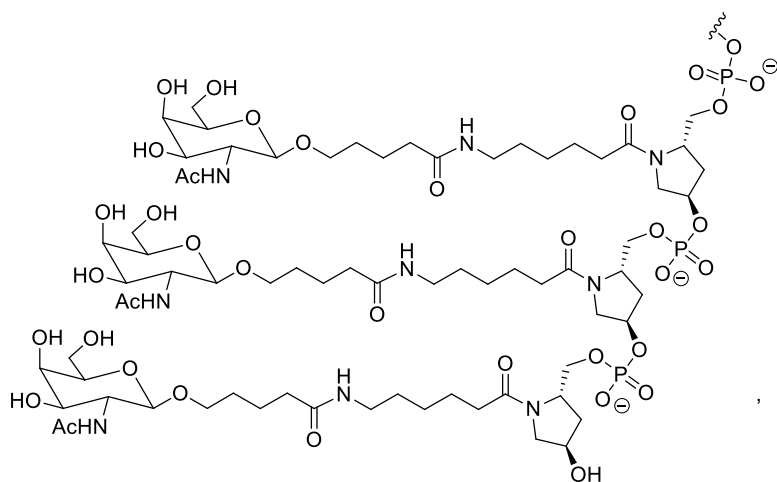
, en donde Y es O o S y n es 3-6 (Fórmula XXV);



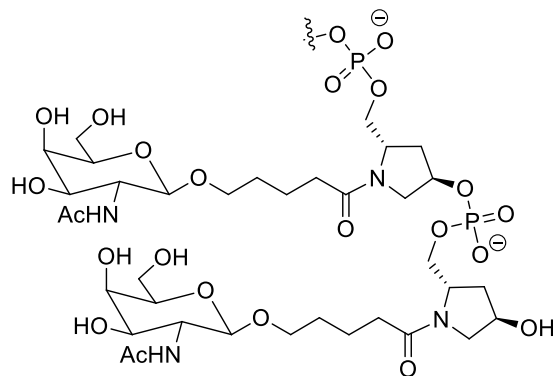
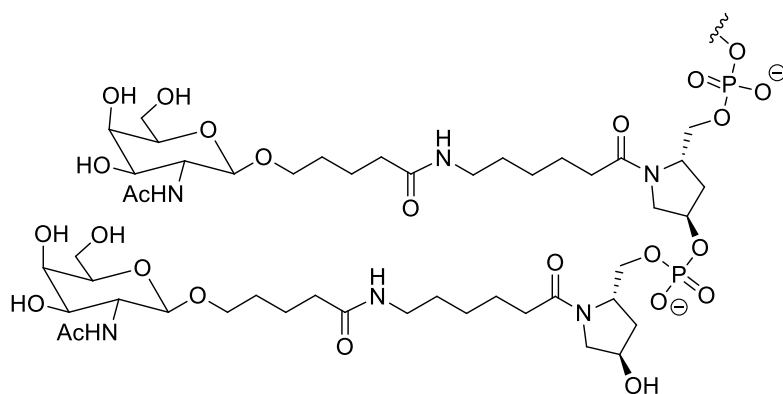
Fórmula XXVI;



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

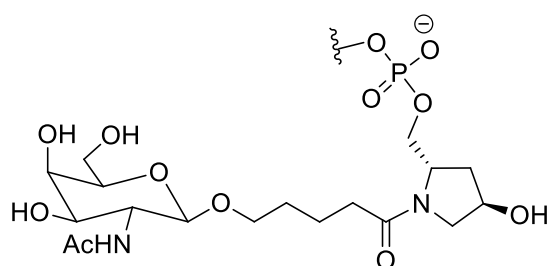
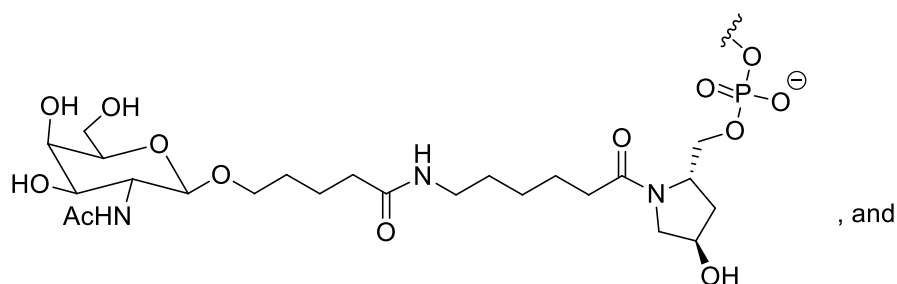


Fórmula XXVII; Fórmula XXIX;



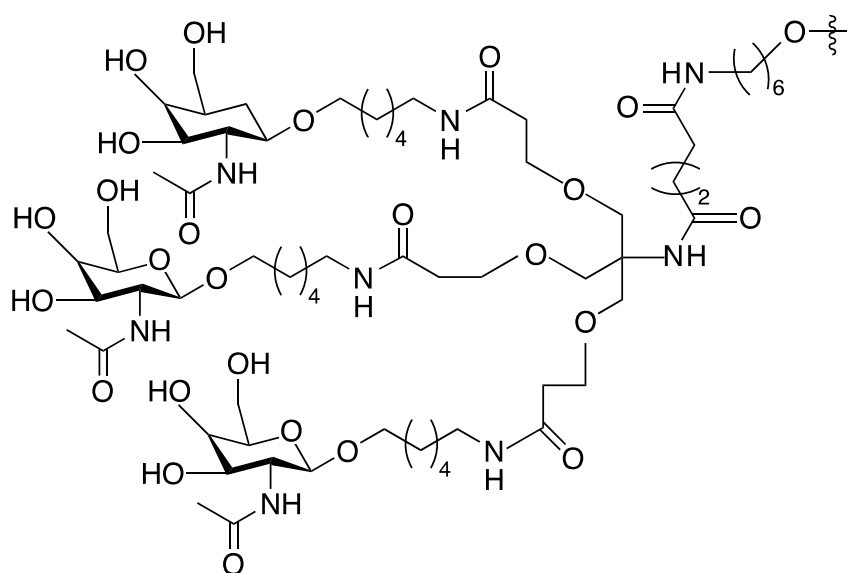
Fórmula XXX;

Fórmula XXXI;



Fórmula XXXII;

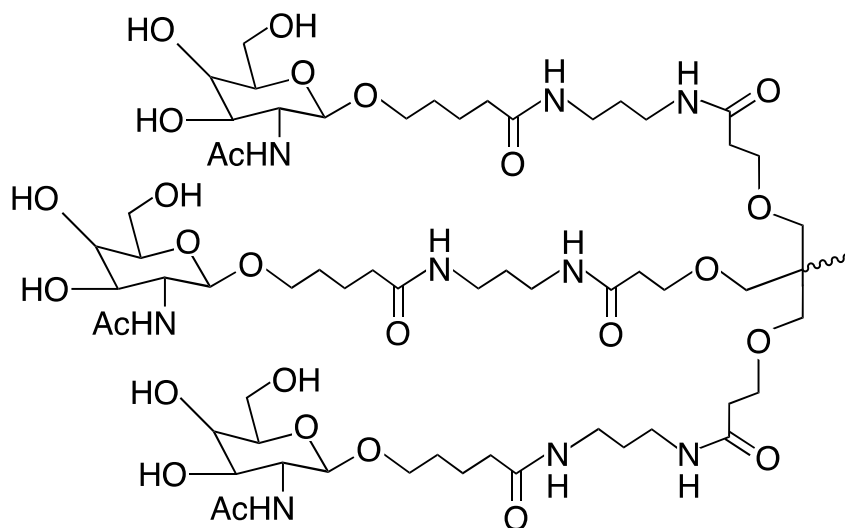
Fórmula XXXIII.



5

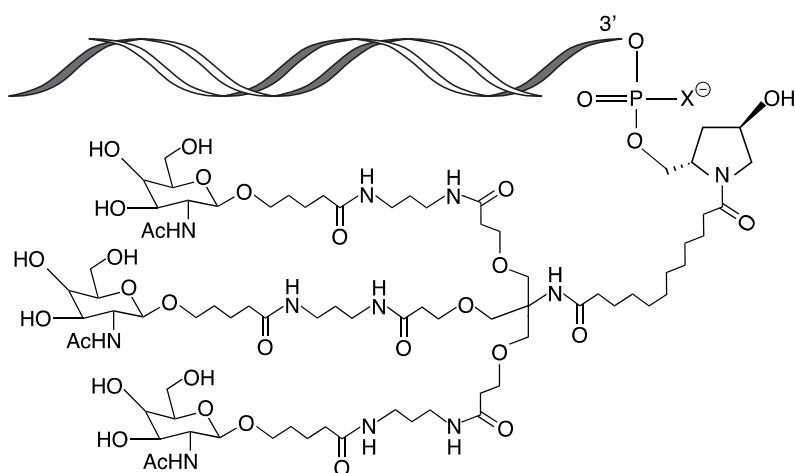
Fórmula XXXIV.

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

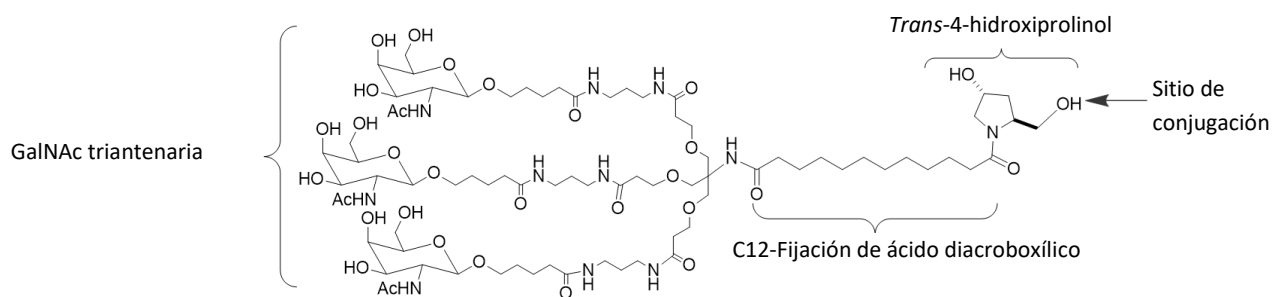


Fórmula II.

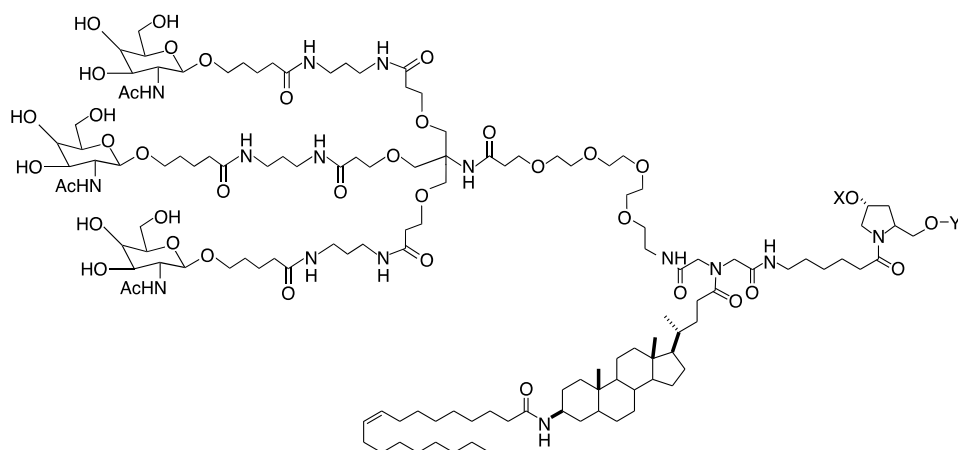
En algunas modalidades, el agente de ARNi se une al conjugado de carbohidratos a través de un enlazador como se muestra en el siguiente esquema, en donde X es O o S.



- 5 En algunas modalidades, el agente de ARNi se conjuga a L96 como se define en la Tabla 1 y se muestra a continuación:



Otro conjugado representativo de carbohidratos para usar en las modalidades descritas en la presente descripción incluye, de modo no taxativo,

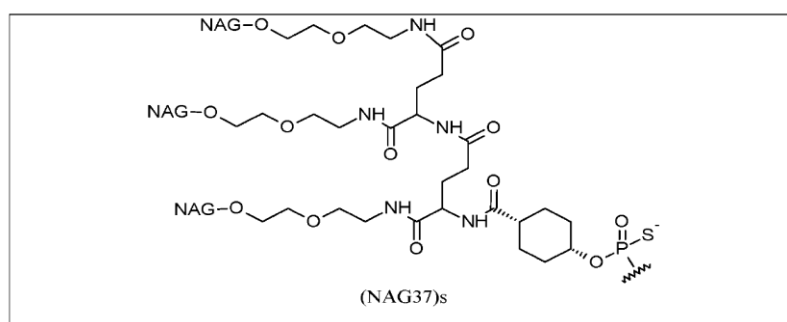


(Fórmula XXXVI), cuando uno de X o Y es un oligonucleótido, el otro es un hidrógeno.

En algunas modalidades, un ligando adecuado es un ligando descrito en WO 2019/055633, cuyo contenido completo se incorpora en la presente como referencia. En

5 una modalidad, el ligando comprende la estructura más abajo:

10



15

En determinadas modalidades de la invención, el derivado de GalNAc o GalNAc se une a un agente de ARNi de la invención a través de un enlazador monovalente. En

20 algunas modalidades de la invención, el derivado de GalNAc o GalNAc se une a un agente de ARNi de la invención a través de un enlazador bivalente. En otras modalidades de la

invención, el derivado de GalNAc o GalNAc se une a un agente de ARNi de la invención a través de un enlazador trivalente.

En una modalidad, los agentes de ARNi bicatenario de la invención comprenden uno o más derivados de GalNAc o GalNAc unidos al agente de ARNi. La GalNAc puede unirse a cualquier nucleótido a través de un enlazador en la cadena de sentido o cadena antisentido. La GalNAc puede unirse al extremo 5' de la cadena de sentido, el extremo 3' de la cadena de sentido, el extremo 5' de la cadena antisentido, o el extremo 3' de la cadena antisentido. En una modalidad, la GalNAc se une al extremo 3' de la cadena de sentido, por ejemplo, a través de un enlazador trivalente.

En otras modalidades, los agentes de ARNi bicatenario de la invención comprenden una pluralidad de (*por ejemplo*, 2, 3, 4, 5, o 6) derivados de GalNAc o GalNAc, cada uno se une independientemente a una pluralidad de nucleótidos del agente de ARNi bicatenario a través de una pluralidad de enlazadores, *por ejemplo*, enlazadores monovalentes.

En algunas modalidades, por ejemplo, cuando las dos cadenas 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 cadena respectiva formando un bucle en horquilla que comprende, una pluralidad de nucleótidos no emparejados, cada uno de los nucleótidos no emparejados dentro del bucle en horquilla puede comprender independientemente un derivado de GalNAc o GalNAc unido a través de un enlazador monovalente.

En algunas modalidades, el conjugado de carbohidrato comprende además uno o más ligandos adicionales como se describió anteriormente, tales como, de modo no taxativo, un modulador de PK o un péptido de penetración celular.

Los conjugados de carbohidratos adicionales y los enlazadores adecuados para usar en la presente invención incluyen los descritos en los números de publicación PCT WO 2014/179620 y WO 2014/179627, cuyos contenidos se incorporan en la presente descripción como referencia.

D. Enlazadores

En algunas modalidades, el conjugado o ligando descrito en la presente descripción puede unirse a un oligonucleótido de ARNi con varios enlazadores que pueden ser escindibles o no escindibles.

5 El término “enlazador” o “grupo de enlace” se refiere a un resto orgánico que conecta dos partes de un compuesto, por ejemplo, une covalentemente dos partes de un compuesto. Los enlazadores típicamente comprenden un enlace directo o un átomo tal como oxígeno o azufre, una unidad como NR₈, C(O), C(O)NH, SO, SO₂, SO₂NH o una cadena de átomos, como, por ejemplo, entre otros, alquilo sustituido o no sustituido, alquenilo sustituido o no
 10 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,
 15 alquinilarilalquinilo, alquilheteroarilalquilo, alquilheteroarilalquenilo, alquilheteroarilalquinilo, alquenilheteroarilalquilo, alquenilheteroarilalquenilo, alquenilheteroarilalquinilo, alquinilheteroarilalquilo, alquinilheteroarilalquenilo, alquinilheteroarilalquinilo, alquilheterociclilalquilo, alquilheterociclilalquenilo, alquilheterociclilalquinilo, alquenilheterociclilalquilo, alquenilheterociclilalquenilo, alquenilheterociclilalquinilo,
 20 alquinilheterociclilalquilo, alquinilheterociclilalquenilo, alquinilheterociclilalquinilo, alquilarilo, alquenilarilo, alquinilarilo, alquilheteroarilo, alquenilheteroarilo, alquinilheteroarilo, que uno o más metilenos pueden interrumpirse o terminarse en O, S, S(O), SO₂, N(R₈), C(O), arilo sustituido o no sustituido, heteroarilo sustituido o no sustituido, o heterocíclico sustituido o no sustituido; donde R₈ es hidrógeno, acilo, alifático, o alifático sustituido. En una modalidad,
 25 el enlazador es 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 de enlace escindible es uno que es suficientemente estable fuera de la célula, pero que al entrar en una célula diana se escinde para liberar las dos partes que el

enlazador mantiene unido. En una modalidad ilustrativa, el grupo de enlace escindible se escinde al menos aproximadamente 10 veces, 20 veces, 30 veces, 40 veces, 50 veces, 60 veces, 70 veces, 80 veces, 90 veces o más, o al menos 100 veces más rápido en una célula diana o en una primera condición de referencia (que puede, por ejemplo, seleccionarse 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 encontradas en la sangre o suero).

Los grupos de enlace escindibles son susceptibles a agentes de escisión, *por ejemplo*, pH, potencial redox, o la presencia de moléculas degradantes. Generalmente, los agentes de escisión son más prevalentes o se encuentran en niveles o actividades más altos dentro de las células que en el suero o la sangre. Los ejemplos de tales agentes degradantes incluyen: agentes redox que se seleccionan para sustratos particulares o que no tienen especificidad de sustrato, que incluye, *por ejemplo*, enzimas oxidativas o reductoras o agentes reductores tales como mercaptanos, presente en las células, que puede degradar un grupo de enlace escindible redox mediante la reducción; esterasas; endosomas o agentes que pueden crear un entorno ácido, *por ejemplo*, los que dan como resultado un pH de cinco o inferior; enzimas que pueden hidrolizar o degradar un grupo de enlace escindible por ácido al actuar como un ácido general, peptidasas (que pueden ser específicas del sustrato), y las fosfatasas.

Un grupo de enlace escindible, tal como un enlace disulfuro puede ser susceptible al pH. El pH del suero humano es de 7,4, mientras que el pH intracelular medio es ligeramente inferior, que varía de aproximadamente 7,1-7,3. Los endosomas tienen un pH más ácido, en el rango de 5,5 a 6,0, y los lisosomas tienen un pH aún más ácido en aproximadamente 5,0. Algunos enlazadores tendrán un grupo de enlace escindible que se escinde a un pH seleccionado, liberando así un lípido catiónico del ligando dentro de la célula, o en el compartimiento deseado de la célula.

Un enlazador puede incluir un grupo de enlace escindible que es escindible por una enzima particular. El tipo de grupo de enlace escindible incorporado en un enlazador puede

depender de la célula a la que se va a dirigir. Por ejemplo, un ligando dirigido al hígado puede enlazarse a un lipídico catiónico a través de un enlazador que incluye un grupo éster. Las células hepáticas son ricas en esterasas y, por lo tanto, el enlazador se escinde de forma más eficiente en las células hepáticas que en los tipos de células que no son ricas en esterasa. Otros tipos de células ricas en esterasas incluyen células del pulmón, la corteza renal y los testículos.

Los enlazadores que contienen enlaces peptídicos pueden usarse cuando se dirigen a tipos de células ricas en peptidasas, tales como células hepáticas y sinoviocitos.

En general, la idoneidad de un grupo de enlace escindible candidato puede evaluarse probando la capacidad de un agente degradante (o condición) para escindir el grupo de enlace candidato. También será conveniente probar el grupo de enlace escindible candidato para la capacidad de resistir la escisión en la sangre o cuando está en contacto con otro tejido no diana. Por lo tanto, se puede determinar la susceptibilidad relativa a la escisión entre una primera y una segunda condición, donde la primera se selecciona para indicar la escisión en una célula diana y la segunda se selecciona para indicar la escisión en otros tejidos o fluidos biológicos, *por ejemplo*, sangre o suero. Las evaluaciones pueden llevarse a cabo en sistemas libres de células, en células, en cultivo celular, en cultivo de órganos o tejidos, o en todo el animal. Puede ser útil realizar evaluaciones iniciales en condiciones de cultivo o sin células y confirmar mediante evaluaciones adicionales en todo el animal. En determinadas modalidades, los compuestos candidatos útiles se escinden al 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* seleccionadas para imitar condiciones intracelulares) en comparación con la sangre o el suero (o en condiciones *in vitro* seleccionadas para imitar condiciones extracelulares).

i. Grupos de enlace escindibles Redox

En determinadas modalidades, un grupo de enlace escindible es un grupo de enlace escindible redox que se escinde tras la reducción u oxidación. Un ejemplo de grupo de

enlace escindible de manera reductiva es un grupo de enlace de disulfuro (-S-S-). Para determinar si un grupo de enlace escindible candidato es un “grupo de enlace escindible de manera reductiva” adecuado, o por ejemplo es adecuado para usar con un resto de ARNi particular y un agente de direccionamiento particular, se pueden buscar los métodos

5 descritos en la presente descripción. Por ejemplo, un candidato puede evaluarse por incubación con ditioneitol (DTT) u otro agente reductor mediante el uso de reactivos conocidos en la técnica, que imitan la velocidad de escisión que se observaría en una célula, *por ejemplo*, una célula diana. Los candidatos también pueden evaluarse en condiciones que se seleccionan para imitar las condiciones de sangre o suero. En uno, los compuestos

10 candidatos se escinden en la sangre como máximo en aproximadamente el 10 %. En otras modalidades, los compuestos candidatos útiles se degradan al menos aproximadamente 2, 4, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o aproximadamente 100 veces más rápido en la célula (o en condiciones *in vitro* seleccionadas para imitar condiciones intracelulares) en comparación con la sangre (o en condiciones *in vitro* seleccionadas para imitar condiciones

15 extracelulares). La velocidad de escisión de compuestos candidatos puede determinarse usando ensayos de cinética enzimática estándar en condiciones elegidas para imitar medios intracelulares y en comparación con condiciones elegidas para imitar medios extracelulares.

ii. Grupos de enlace escindible basados en fosfato

20 En otras modalidades, un enlazador escindible comprende un grupo de enlace escindible basado en fosfato. Un grupo de enlace escindible a base de fosfato se escinde por agentes que degradan o hidrolizan el grupo fosfato. Un ejemplo de un agente que escinde los grupos fosfatos en las células son enzimas tales como las fosfatasas en las células. Ejemplos de grupos de enlace basados en fosfato son -O-P(O)(ORk)-O-, -O-

25 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-, en donde Rk en cada aparición puede ser, independientemente, alquilo C1-C20, haloalquilo C1-C20, arilo C6-C10, o aralquilo C7-C12.

Las modalidades ilustrativas incluyen -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-. En determinadas modalidades un grupo de enlace basado en fosfato es -O-P(O)(OH)-O-.

- 5 Estos candidatos pueden evaluarse usando métodos análogos a los descritos anteriormente.\

iii. Grupos de enlace escindibles por ácido

- En otras modalidades, un enlazador escindible comprende un grupo de enlace escindible ácido. Un grupo de enlace escindible por ácido es un grupo de enlace que se escinde en condiciones ácidas. En determinadas modalidades, los grupos de enlace escindibles por ácido se escinden en un entorno ácido con un pH de aproximadamente 6,5 o inferior (por ejemplo, aproximadamente 6,0, 5,5, 5,0 o inferior), o por agentes tales como enzimas que pueden actuar como un ácido general. En una célula, los orgánulos de pH bajo específicos, tales como endosomas y lisosomas pueden proporcionar un entorno de escisión para grupos de enlace escindibles por ácido. Los ejemplos de grupos de enlace escindibles por ácido incluyen, de modo no taxativo, hidrazonas, ésteres y ésteres de aminoácidos. Los grupos escindibles por ácido pueden tener la fórmula general -C=NN-, C(O)O, o -OC(O). Una modalidad ilustrativa es cuando el carbono unido al oxígeno del éster (el grupo alcoxi) es un grupo arilo, grupo alquilo sustituido, o grupo alquilo terciario tal como dimetilpentilo o t-butilo. Estos candidatos pueden evaluarse usando métodos análogos a los descritos anteriormente.

iv. Grupos de enlace basados en ésteres

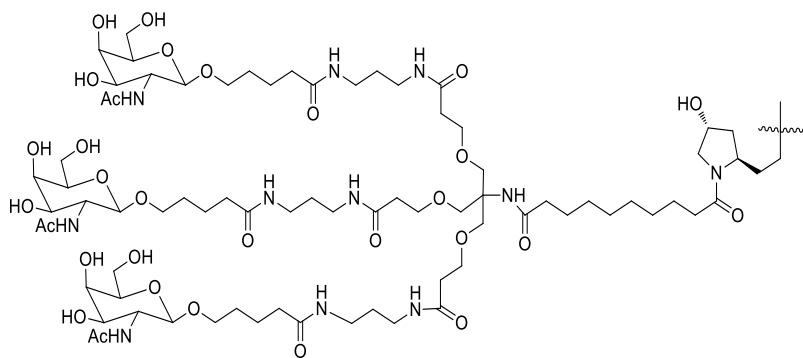
- 25 En otras modalidades, un enlazador escindible comprende un grupo de enlace escindible basado en ésteres. Un grupo de enlace escindible basado en ésteres se escinde por enzimas tales como esterasas y amidasas en las células. Los ejemplos de grupos de enlace escindible basados en ésteres incluyen, de modo no taxativo, ésteres de los grupos

alquileo, alquienilo y alquienilo. Los grupos de enlace escindibles por éster tienen la fórmula general $-C(O)O-$, o $-OC(O)-$. Estos candidatos pueden evaluarse usando métodos análogos a los descritos anteriormente.

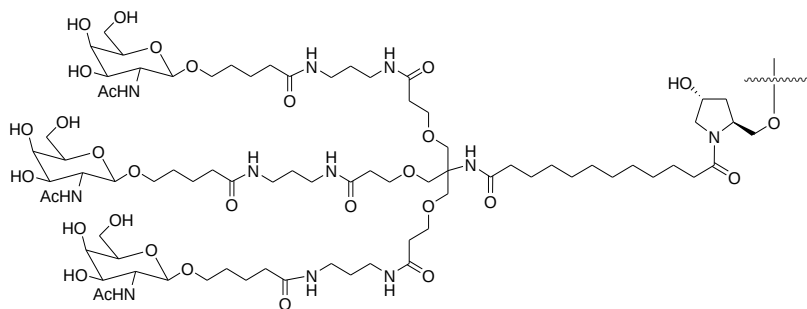
5 v. Grupos de escisión basados en péptidos

Aún en otras modalidades, un enlazador escindible comprende un grupo de enlace escindible basado en péptidos. Un grupo de enlace escindible basado en péptidos se escinde por enzimas tales como peptidasas y proteasas en células. Los grupos de enlace escindibles basados en péptidos son 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 puede formarse entre cualquier alquileo, alquienilo o alquienilo. Un enlace peptídico es un tipo especial de enlace amida formado entre aminoácidos para producir péptidos y proteínas. El grupo escindible basado en péptidos generalmente se limita al enlace peptídico (*es decir*, el enlace amida) formado entre aminoácidos que producen péptidos y proteínas y no incluye todo el grupo funcional amida. Los grupos de enlace escindibles basados en péptidos tienen la fórmula general $-NHCHRAC(O)NHCHRBC(O)-$, donde RA y RB son los grupos R de los dos aminoácidos adyacentes. Estos candidatos pueden evaluarse usando métodos análogos a los descritos anteriormente.

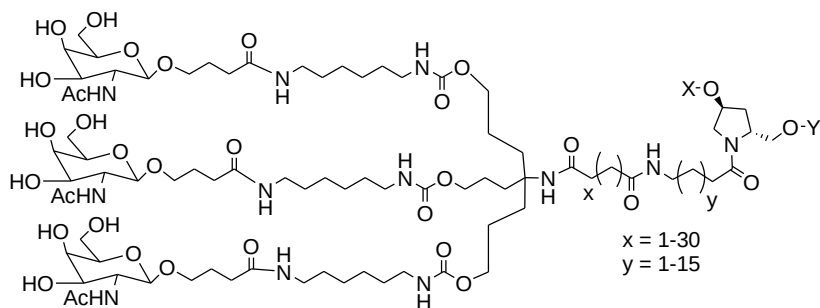
20 En algunas modalidades, un ARNi de la invención se conjuga a un carbohidrato a través de un enlazador. Los ejemplos no limitantes de conjugados de carbohidratos de ARNi con enlazadores de las composiciones y métodos de la invención incluyen, de modo no taxativo,



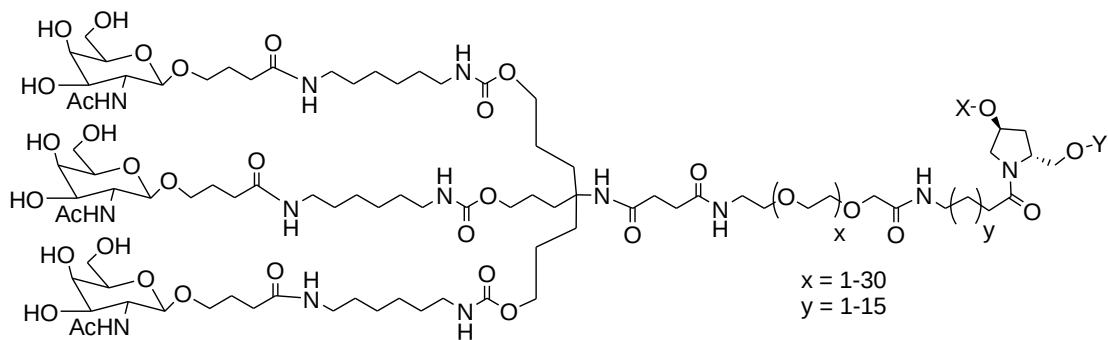
(Fórmula XXXVII),



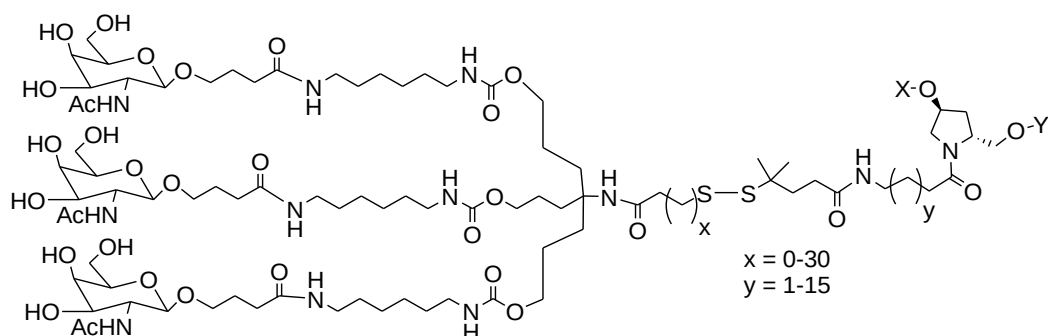
(Fórmula XXXVIII),



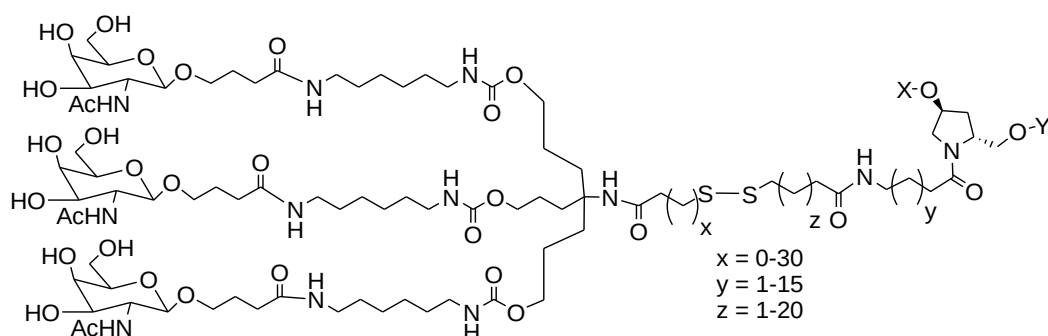
(Fórmula XXXIX),



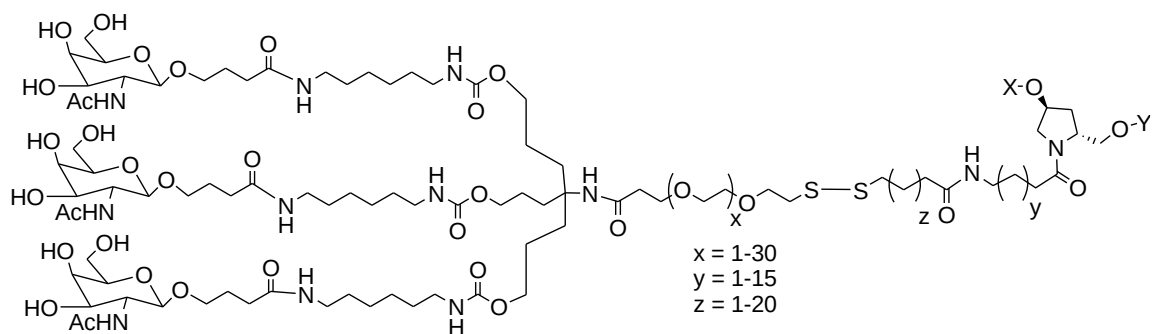
(Fórmula XL),



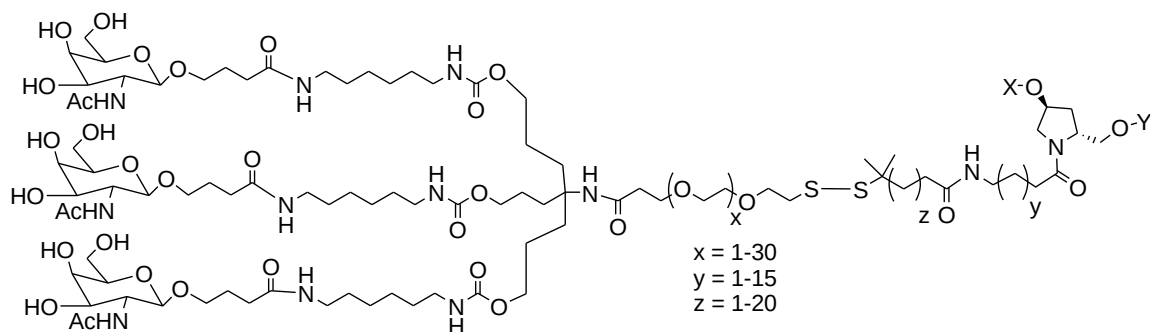
(Fórmula XLI),



5 (Fórmula XLII),



(Fórmula XLIII), y



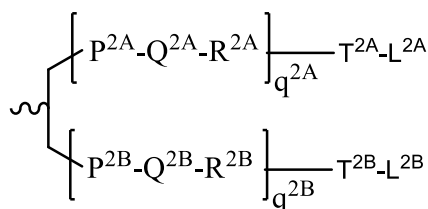
(Fórmula XLIV), cuando uno de X o Y es un oligonucleótido, el otro es un hidrógeno.

En determinadas modalidades de las composiciones y métodos de la invención, un ligando es uno o más derivados “GalNAc” (N-acetilgalactosamina) unidos a través de un enlazador ramificado bivalente o trivalente.

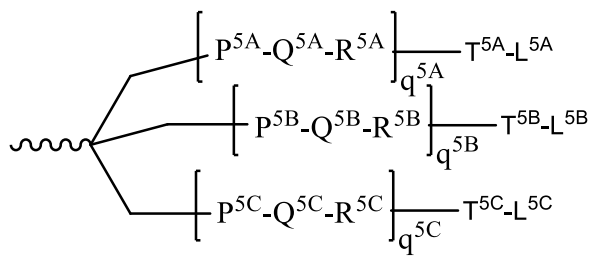
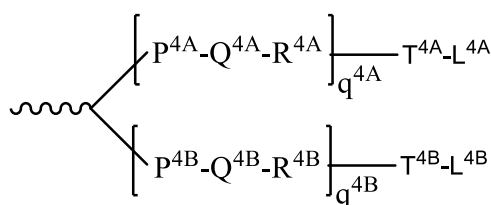
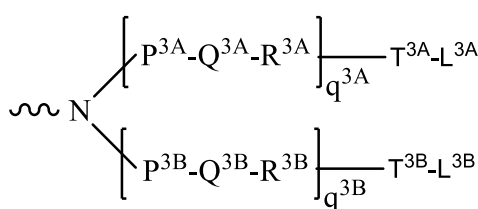
En una modalidad, un ARNbc de la invención se conjuga a un enlazador ramificado

- 5 bivalente o trivalente seleccionado del grupo de estructuras mostrado en cualquiera de la fórmula (XLV) – (XLVIII):

Fórmula XLV



Fórmula XLVI



Fórmula XLVII

Fórmula XLVIII

en donde:

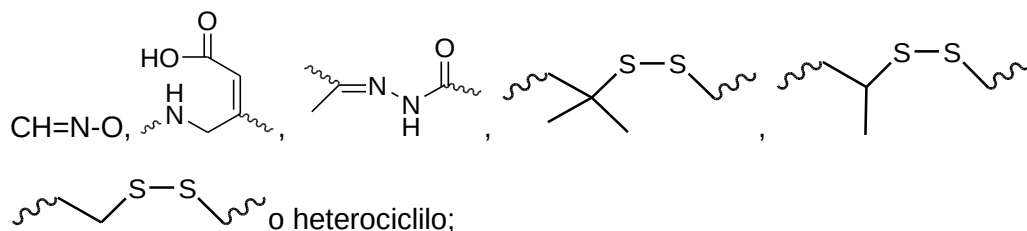
q^{2A}, q^{2B}, q^{3A}, q^{3B}, q^{4A}, q^{4B}, q^{5A}, q^{5B} y q^{5C} representan independientemente para cada aparición 0-20 y en donde la unidad de repetición puede ser la misma o diferente;

P^{2A}, P^{2B}, P^{3A}, P^{3B}, P^{4A}, P^{4B}, P^{5A}, P^{5B}, P^{5C}, T^{2A}, T^{2B}, T^{3A}, T^{3B}, T^{4A}, T^{4B}, T^{4A}, T^{5B}, T^{5C} son cada uno

- 15 independientemente para cada aparición ausente, CO, NH, O, S, OC(O), NHC(O), CH₂, CH₂NH o CH₂O;

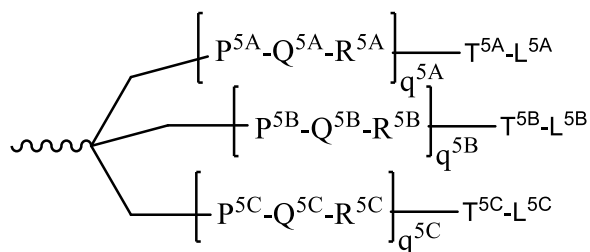
Q^{2A}, Q^{2B}, Q^{3A}, Q^{3B}, Q^{4A}, Q^{4B}, Q^{5A}, Q^{5B}, Q^{5C} son independientes para cada aparición ausente, alquileo, alquileo sustituido en donde uno o más metilenos pueden interrumpirse o terminarse por uno o más de O, S, S(O), SO₂, N(R^N), C(R')=C(R''), C≡C o C(O);

R^{2A} , R^{2B} , R^{3A} , R^{3B} , R^{4A} , R^{4B} , R^{5A} , R^{5B} , R^{5C} son cada uno independientemente para cada aparición ausente, NH, O, S, CH₂, C(O)O, C(O)NH, NHCH(R^a)C(O), -C(O)-CH(R^a)-NH-, CO,



- 5 L^{2A} , L^{2B} , L^{3A} , L^{3B} , L^{4A} , L^{4B} , L^{5A} , L^{5B} and L^{5C} representan el ligando; es decir cada uno independientemente para cada aparición un monosacárido (tal como GalNAc), disacárido, trisacárido, tetrasacárido, oligosacárido, o polisacárido; y R^a es H o cadena lateral de aminoácidos. Los derivados de GalNAc conjugados trivalentes son particularmente útiles para usar con agentes de ARNi para inhibir la expresión de un gen diana, tal como los de la
- 10 fórmula (XLIX):

Fórmula XLIX



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

- Los ejemplos de grupos enlazadores ramificados bivalentes y trivalentes adecuados
- 15 que conjugan derivados de GalNAc incluyen, de modo no taxativo, las estructuras mencionadas anteriormente como fórmulas II, VII, XI, X y XIII.

- Las patentes representativas de los EE. UU. que enseñan la preparación de conjugados de ARN incluyen: pero no se limitan a: núm. de patente de EE. UU. 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;
- 20 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

5 8,106,022, cuyos contenidos se incorporan en la presente como referencia.

No es necesario que todas las posiciones en un compuesto dado se modifiquen uniformemente, y de hecho más de una de las modificaciones mencionadas anteriormente puede incorporarse en un solo compuesto o incluso en un solo nucleósido dentro de un ARNi. La presente invención incluye además compuestos de ARNi que son compuestos quiméricos.

Los compuestos de ARNi “quiméricos” o “quimeras”, en el contexto de esta invención, son compuestos de ARNi, tales como agentes de ARN_{bc}, que contienen dos o más regiones químicamente distintas, cada una de ellas formada por al menos una unidad de monómero, *es decir*, un nucleótido en el caso de un compuesto de ARN_{bc}. Estos ARNi típicamente contienen al menos una región en donde el ARN se modifica para conferir al ARNi mayor resistencia a la degradación de la nucleasa, mayor captación celular o mayor afinidad de unión para el ácido nucleico diana. Una región adicional del ARNi puede servir como sustrato para enzimas capaces de escindir los híbridos de 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 de la diana de ARN, lo que mejora enormemente la eficiencia de la inhibición del ARNi de la expresión génica. En consecuencia, a menudo se pueden obtener resultados comparables con los ARNi más cortos cuando se usan los ARN_{bc} quiméricos, en comparación con los ARN_{bc} desoxi de fosforotioato que se hibridan a la misma región diana. La escisión de la diana de ARN puede detectarse rutinariamente por electroforesis en gel y, si es necesario, las técnicas de hibridación de ácidos nucleicos asociadas conocidas en la técnica.

En determinados casos, el ARN de un ARNi puede modificarse por un grupo no ligando. Un número de moléculas no ligandos se han conjugado a los ARNi para potenciar la actividad, la distribución celular o la captación celular del ARNi, y los procedimientos para realizar tales conjugaciones están disponibles en la literatura científica. Tales restos no

5 ligandos han incluido restos de lípidos, tales como colesterol (Kubo, T. et al., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 2007, 365(1):54-61; Letsinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, 86:6553), ácido cólico (Manoharan et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1994, 4:1053), un tioéter, p. ej., hexil-S-tritiltiol (Manoharan et al., *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1992, 660:306; Manoharan et al., *Bioorg. Med. Chem. Let.*, 1993, 3:2765), un tiocolesterol (Oberhauser et

10 al., *Nucl. Acids Res.*, 1992, 20:533), una cadena alifática, p. ej., residuos de dodecandiol o undecilo (Saison-Behmoaras et al., *EMBO J.*, 1991, 10:111; Kabanov et al., *FEBS Lett.*, 1990, 259:327; Svinarchuk et al., *Biochimie*, 1993, 75:49), un fosfolípido, p. ej., di-hexadecil-rac-glicerol o trietilamonio, 1,2-di-O-hexadecil-rac-glicero-3-H-fosfonato (Manoharan et al., *Tetrahedron Lett.*, 1995, 36:3651; Shea et al., *Nucl. Acids Res.*, 1990, 18:3777), una

15 poliamina o una cadena de polietilenglicol (Manoharan et al., *Nucleosides & Nucleotides*, 1995, 14:969), o ácido acético adamantano (Manoharan et al., *Tetrahedron Lett.*, 1995, 36:3651), un resto palmítico (Mishra et al., *Biochim. Biophys. Acta*, 1995, 1264:229), o un resto de octadecilamina o hexiloaminocarbonil-oxicolesterol (Crooke et al., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1996, 277:923). Las patentes representativas de los Estados Unidos que

20 enseñan la preparación de tales conjugados de ARN se han enumerado anteriormente. Los protocolos de conjugación típicos implican la síntesis de ARN que lleva un aminoenzalizador en una o más posiciones de la secuencia. El grupo amino luego se reacciona con la molécula que se conjuga usando reactivos de acoplamiento o activación adecuados. La reacción de conjugación puede realizarse ya sea con el ARN todavía unido al soporte sólido

25 o después de la escisión del ARN, en la fase de solución. La purificación del conjugado de ARN por HPLC típicamente proporciona el conjugado puro.

IV. Administración de un ARNi de la invención

La administración de un ARNi de la invención a una célula, *p. ej.*, una célula dentro de un sujeto, como un sujeto humano (*por ejemplo*, un sujeto que lo necesita, como un sujeto susceptible o diagnosticado con un trastorno asociado a la TTR, *p. ej.*, amiloidosis sistémica senil (SSA), amiloidosis familiar sistémica, polineuropatía amiloidótica familiar (FAP), miocardiopatía amiloidótica familiar (FAC), amiloidosis leptomeníngea/del sistema nervioso central (CNS), hipertiroidismo, una enfermedad ocular, *p. ej.*, la enfermedad de Stargardt, retinopatía diabética, degeneración macular asociada a la edad (AMD), *p. ej.*, AMD seca y AMD húmeda; un trastorno metabólico, *p. ej.*, un trastorno de la homeostasis de la glucosa y los lípidos, *p. ej.*, resistencia a la insulina asociada con la diabetes tipo II, y una enfermedad cardiovascular) pueden lograrse de diferentes maneras. Por ejemplo, la administración puede realizarse al contactar una célula con un ARNi de la invención ya sea *in vitro* o *in vivo*. La administración *in vivo* también puede realizarse directamente administrando una composición que comprende un ARNi, por ejemplo, un ARNbc, a un sujeto. Alternativamente, la administración *in vivo* puede realizarse indirectamente administrando uno o más vectores que codifican y dirigen la expresión del ARNi. Estas alternativas se discuten más adelante.

En general, cualquier método de administración de una molécula de ácido nucleico (*in vitro* o *in vivo*) puede adaptarse para su uso con un ARNi de la invención (ver, por ejemplo, Akhtar S. y Julian RL. (1992) *Trends Cell. Biol.* 2(5):139-144 y WO94/02595, que se incorporan en la presente como referencia en su totalidad). Para la administración *in vivo*, los factores a considerar para administrar una molécula de ARNi incluyen, por ejemplo, la estabilidad biológica de la molécula administrada, la prevención de efectos no específicos y la acumulación de la molécula administrada en el tejido diana. La interferencia de ARN también ha demostrado éxito con la administración local al SNC mediante inyección directa (Dorn, G., *et al.* (2004) *Nucleic Acids* 32:e49; Tan, PH., *et al.* (2005) *Gene Ther.* 12:59-66; Makimura, H., *et al.* (2002) *BMC Neurosci.* 3:18; Shishkina, GT., *et al.* (2004) *Neuroscience* 129:521-528; Thakker, ER., *et al.* (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101:17270-17275;

Akaneya, Y., *et al* (2005) *J. Neurophysiol.* 93:594-602). La modificación del ARN o del portador farmacéutico también puede permitir el direccionamiento del ARNi en el tejido diana y evitar efectos inespecíficos no deseados. Las moléculas de ARNi pueden modificarse mediante conjugación química a grupos lipófilos tales como colesterol para potenciar la captación celular y evitar la degradación. Por ejemplo, un ARNi dirigido a ApoB conjugado a un resto de colesterol lipófilo se inyectó sistémicamente en ratones y dio como resultado la inactivación del ARNm de apoB tanto en el hígado como en el yeyuno (Soutschek, J., *et al* (2004) *Nature* 432:173-178).

En una modalidad alternativa, el ARNi puede administrarse usando sistemas de administración de fármacos tales como una nanopartícula, un dendrímero, un polímero, liposomas o un sistema de administración catiónico. Los sistemas de administración catiónicos con carga positiva facilitan la unión de una molécula de ARNi (con carga negativa) y también potencian las interacciones en la membrana celular con carga negativa para permitir la captación eficiente de un ARNi por la célula. Los lípidos catiónicos, dendrímeros o polímeros pueden unirse a un ARNi, o inducirse a formar una vesícula o micela (ver *por ejemplo*, Kim SH, y otros (2008) *Journal of Controlled Release* 129(2):107-116) que envuelve un ARNi. La formación de vesículas o micelas evita además la degradación del ARNi cuando se administra de forma sistémica. Los métodos para fabricar y administrar complejos de ARNi catiónico están dentro de las capacidades de un experto en la técnica (ver *por ejemplo*, Sorensen, DR, y otros (2003) *J. Mol. Biol* 327:761-766; Verma, UN, y otros (2003) *Clin. Cancer Res.* 9:1291-1300; Arnold, AS y otros (2007) *J. Hypertens.* 25:197-205, que se incorporan en la presente descripción como referencia en su totalidad). Algunos ejemplos no limitantes de sistemas de administración de medicación útiles para la administración sistémica de los ARNi incluyen DOTAP (Sorensen, DR., *et al* (2003), *supra*; Verma, UN, *et al* (2003), *supra*), "partículas lipídicas de ácido nucleico sólidas" (Zimmermann, TS, *et al* (2006) *Nature* 441:111-114), cardiolipin (Chien, PY, *et al* (2005) *Cancer Gene Ther.* 12:321-328; Pal, A, *et al* (2005) *Int J. Oncol.* 26:1087-1091), polietilenimina (Bonnet ME, *et al* (2008) *Pharm. Res.* 16 de agosto publicación electrónica

previa a la impresión; Aigner, A. (2006) *J. Biomed. Biotechnol.* 7:1659), Arg-Gly-Asp (RGD) péptidos (Liu, S. (2006) *Mol. Pharm.* 3:472-487), y poliamidoaminas (Tomalia, DA, *et al* (2007) *Biochem. Soc. Trans.* 35:61-67; Yoo, H., *et al* (1999) *Pharm. Res.* 16:1799-1804). En algunas modalidades, un ARNi forma un complejo con ciclodextrina para la administración

5 sistémica. Los métodos para la administración y las composiciones farmacéuticas de los ARNi y las ciclodextrinas se pueden encontrar en la patente de EE. UU. núm. 7,427,605, que se incorpora en la presente como referencia en su totalidad. Determinados aspectos de la presente descripción se refieren a un método para reducir la expresión de un gen TTR en una célula, que comprende poner en contacto dicha célula con el agente de ARNi

10 bicatenario de la descripción. En una modalidad, la célula es una célula hepática, opcionalmente un hepatocito. En una modalidad, la célula es una célula extrahepática.

A. ARNi codificados por vectores de la invención

El ARNi dirigido al gen de la TTR puede expresarse a partir de unidades de

15 transcripción insertadas en vectores de ADN o ARN (ver, *por ejemplo*, Couture, A, y otros, *TIG.* (1996), 12:5-10; Skillern, A, y otros, publicación PCT internacional núm. WO 00/22113, Conrad, publicación PCT internacional núm. WO 00/22114, y Conrad, patente de Estados Unidos núm. 6,054,299). La expresión puede ser transitoria (en el orden de horas a semanas) o sostenida (semanas a meses o más), dependiendo del constructo específico

20 utilizado y el tejido o tipo de célula diana. Estos transgenes pueden introducirse como un constructo lineal, un plásmido circular o un vector viral, que puede ser un vector integrador o no integrador. El transgén también puede construirse para permitir que se herede como un plásmido extracromosómico (Gassmann, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1995) 92:1292).

Los sistemas de vectores virales que pueden utilizarse con los métodos y

25 composiciones que se describen en la presente descripción incluyen, pero no se limitan a:

(a) vectores de adenovirus; (b) vectores de retrovirus, que incluye, pero no se limitan a, vectores de lentivirus, virus de la leucemia murina de Moloney, *etc.*; (c) vectores de virus adenoasociados; (d) vectores de virus del herpes simple; (e) vectores de SV 40; (f) vectores

de virus de polioma; (g) vectores de virus del papiloma; (h) vectores de picornavirus; (i) vectores del virus de la viruela, tal como un ortopox, *por ejemplo*, vectores del virus de vaccinia o avipox, *por ejemplo*, la viruela del canario o la viruela aviar; y (j) un adenovirus sin entrañas o dependiente del auxiliar. Los virus de replicación defectuosa también pueden ser

5 ventajosos. Se incorporarán o no diferentes vectores en el genoma de las células. Los constructos pueden incluir secuencias víricas para la transfección, si se desea.

Alternativamente, el constructo puede incorporarse en vectores capaces de replicación episómica, por ejemplo, vectores EPV y EBV. Los constructos para la expresión

recombinante de un ARNi generalmente requerirán elementos reguladores, *por ejemplo*,

10 promotores, potenciadores, *etc.*, para garantizar la expresión del ARNi en las células diana.

Otros aspectos a considerar para los vectores y constructos se conocen en la técnica.

V. Composiciones farmacéuticas de la invención

La presente invención también incluye composiciones y formulaciones farmacéuticas

15 que incluyen los ARNi de la invención. En una modalidad, se proporcionan en la presente

descripción composiciones farmacéuticas que contienen un ARNi, como se describe en la

presente descripción, y un portador farmacéuticamente aceptable. Las composiciones

farmacéuticas que contienen el ARNi son útiles para prevenir o tratar un trastorno asociado

a la TTR, *p. ej.*, amiloidosis sistémica senil (SSA), amiloidosis familiar sistémica,

20 polineuropatía amiloidótica familiar (FAP), miocardiopatía amiloidótica familiar (FAC),

amiloidosis leptomeníngea/del sistema nervioso central (CNS) e hipertiroideosis.

Tales composiciones farmacéuticas se formulan basadas en el modo de

administración. Un ejemplo son las composiciones que se formulan para la administración

sistémica mediante administración parenteral, por ejemplo, mediante administración

25 subcutánea (SC), intramuscular (IM) o intravenosa (IV). Las composiciones farmacéuticas

de la invención pueden administrarse en dosis suficientes para inhibir la expresión de un gen

TTR.

En algunas modalidades, las composiciones farmacéuticas de la invención son estériles. En otra modalidad, las composiciones farmacéuticas de la invención están libres de pirógenos.

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden administrarse en dosis
5 suficientes para inhibir la expresión de un gen TTR. En general, una dosis adecuada de un ARNi de la invención estará en el rango de aproximadamente 0,001 a aproximadamente 200,0 miligramos por kilogramo de peso corporal del receptor por día, generalmente en el rango de aproximadamente 1 a 50 mg por kilogramo de peso corporal por día. Típicamente, una dosis adecuada de un ARNi de la invención estará en el rango de aproximadamente 0,1
10 mg/kg a aproximadamente 5,0 mg/kg, tal como, aproximadamente 0,3 mg/kg y aproximadamente 3,0 mg/kg. Un régimen de dosis repetidas puede incluir la administración de una cantidad terapéutica de ARNi de forma regular, como cada mes, una vez cada 3-6 meses o una vez al año. En determinadas modalidades, el ARNi se administra aproximadamente una vez al mes a aproximadamente una vez cada seis meses.

15 Después de un régimen de tratamiento inicial, los tratamientos pueden administrarse con menos frecuencia. La duración del tratamiento puede determinarse en función de la gravedad de la enfermedad.

En otras modalidades, una dosis única de las composiciones farmacéuticas puede ser de larga duración, de manera que las dosis se administran a intervalos no superiores a
20 1, 2, 3 o 4 meses. En algunas modalidades de la invención, se administra una dosis única de las composiciones farmacéuticas de la invención aproximadamente una vez al mes. En otras modalidades de la invención, una dosis única de las composiciones farmacéuticas de la invención se administra trimestralmente (*es decir*, aproximadamente cada tres meses). En otras modalidades de la invención, una dosis única de las composiciones farmacéuticas
25 de la invención se administra dos veces al año (*es decir*, aproximadamente una vez cada seis meses).

El experto en la técnica apreciará que determinados factores pueden influir en la dosis y el momento necesarios para tratar efectivamente a un sujeto, incluidos, entre otros,

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 efectiva, según corresponda, de una composición puede incluir un único tratamiento o una serie de tratamientos.

5 Las composiciones farmacéuticas de la presente descripción pueden administrarse de varias maneras dependiendo de si se desea un tratamiento local o sistémico y en el área a tratar. La administración puede ser tópica (que incluye oftálmica, vaginal, rectal, intranasal, transdérmica), oral o parenteral. La administración parenteral incluye inyección o infusión intravenosa, intraarterial, subcutánea, intraperitoneal o intramuscular; subdérmica, p. ej., a
10 través de un dispositivo implantado; o intracraneal, p. ej., por administración intraparenquimatosa, intratecal o intraventricular.

El ARNi puede administrarse de manera que se dirija a un tejido particular, tal como el hígado.

Las composiciones y formulaciones farmacéuticas para la administración tópica
15 pueden incluir parches transdérmicos, ungüentos, lociones, cremas, geles, gotas, supositorios, aerosoles, líquidos y polvos. Los portadores farmacéuticos convencionales, bases acuosas, en polvo o aceitosas, espesantes y similares pueden ser necesarios o deseables. Los condones recubiertos, los guantes y similares también pueden ser útiles. Las formulaciones tópicas adecuadas incluyen aquellas en las que los agentes de ARNi
20 presentados en la descripción están en mezcla con un agente de administración tópica tal como lípidos, liposomas, ácidos grasos, ésteres de ácidos grasos, esteroides, agentes quelantes y tensioactivos. Los lípidos y liposomas adecuados incluyen DMPC neutro (p. ej., etanolamina dioleoilfosfatidil DOPE, dimiristoilfosfatidil colina DMPC, distearofosfatidil colina) negativo (p. ej., dimiristoilfosfatidil glicerol DMPG) y catiónico (p. ej.
25 dioleoiltetrametilaminopropil DOTAP y dioleoilfosfatidil etanolamina DOTMA). Los agentes de ARNi presentados en la descripción pueden encapsularse dentro de liposomas o pueden formar complejos a estos, en particular a liposomas catiónicos. Alternativamente, los agentes de ARNi pueden formar complejos con lípidos, en particular con lípidos catiónicos.

Los ácidos grasos y ésteres adecuados incluyen, entre otros, ácido araquidónico, ácido oleico, ácido eicosanoico, ácido láurico, ácido caprílico, ácido cáprico, ácido mirístico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido linoleico, ácido linolenico, dicapato, tricapato, monooleína, dilaurin, gliceril 1-monocaprato, 1-dodecilazacicloheptano-2-ona, una acilcarnitina, una
 5 acicolina, o un éster de alquilo C1-20 (*p. ej.*, isopropilmiristato IPM), monoglicérido, diglicérido o una sal farmacéuticamente aceptable de este. Las formulaciones tópicas se describen en detalle en el documento US 6,747,014, que se incorpora en la presente descripción como referencia.

En una modalidad, los ARNip, agentes de ARN bicatenarios de la invención, se
 10 administran a una célula en una composición farmacéutica mediante una vía de administración tópica.

En una modalidad, la composición farmacéutica puede incluir un compuesto de ARNpi mezclado con un agente de administración tópica. El agente de administración tópica puede ser una pluralidad de vesículas microscópicas. Las vesículas microscópicas pueden ser
 15 liposomas. En algunas modalidades, los liposomas son liposomas catiónicos.

En otra modalidad, el agente de ARNbc se mezcla con un potenciador de penetración tópica. En una modalidad, el potenciador de penetración tópica es un ácido graso. El ácido graso puede ser ácido araquidónico, ácido oleico, ácido láurico, ácido caprílico, ácido cáprico, ácido mirístico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido linoleico,
 20 ácido linolénico, dicaprato, tricaprato, monooleína, dilaurina, gliceril 1-monocaprato, 1-dodecilazacicloheptano-2-ona, una acilcarnitina, una acicolina, o un éster de alquil C1-10, monoglicérido, diglicérido o una sal farmacéuticamente aceptable de este.

En otra modalidad, el potenciador de penetración tópica es una sal biliar. La sal biliar puede ser ácido cólico, ácido deshidrocólico, ácido desoxicólico, ácido glucólico, ácido
 25 glicólico, ácido glicodesoxicólico, ácido taurocólico, ácido taurodesoxicólico, ácido quenodesoxicólico, ácido ursodesoxicólico, tauro-24,25-dihidro-fusidato de sodio, glicodihidrofusinato de sodio, polioxietilen-9-lauril éter o una sal farmacéuticamente aceptable de este.

En otra modalidad, el potenciador de penetración es un agente quelante. El agente quelante puede ser EDTA, ácido cítrico, un salicilato, un derivado de N-acilo de colágeno, lauret-9, un derivado de N-aminoacilo de una beta-dicetona o una mezcla de estos.

En otra modalidad, el potenciador de penetración es un tensioactivo, *por ejemplo*, un
5 tensioactivo iónico o no iónico. El tensioactivo puede ser lauril sulfato de sodio, polioxietilen-9-lauril éter, polioxietilen-20-cetil éter, una emulsión perfluorquímica o mezcla de estos.

En otra modalidad, el potenciador de penetración puede seleccionarse de un grupo que consiste en ureas cíclicas insaturadas, 1-alkil-alconas, 1-alkenilazacilo-alcanonas, agentes antiinflamatorios esteroideos y mezclas de estos. En incluso otra modalidad, el
10 potenciador de penetración puede ser un glicol, un pirrol, una azona, o un terpenos.

En un aspecto, la invención presenta una composición farmacéutica que incluye un compuesto de ARNip, *por ejemplo*, un compuesto de ARNip bicatenario o un compuesto de ARNip (*por ejemplo*, un precursor, *por ejemplo*, un compuesto de ARNip más grande que puede procesarse en un compuesto de ARNip, o un ADN que codifica un compuesto de
15 ARNip, *por ejemplo*, un compuesto de ARNip bicatenario, o un compuesto de ARNip, o precursor del mismo) en una forma de dosificación inyectable. En una modalidad, la forma de dosificación inyectable de la composición farmacéutica incluye soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles. En algunas modalidades, la solución estéril puede incluir un diluyente tal como agua; solución salina; aceites fijos, polietilenglicoles, glicerina, o
20 propilenglicol.

Las moléculas de ARNi de la invención pueden incorporarse en composiciones farmacéuticas. Tales composiciones típicamente incluyen una o más especies de ARNi y un portador farmacéuticamente aceptable. Como se usa en la presente descripción, el término “portador farmacéuticamente aceptable” pretende incluir todos y cada uno de los solventes,
25 medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y de demora de absorción, y similares, compatibles con la administración farmacéutica a una célula, *por ejemplo*, una célula hepática. El uso de tales medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es bien conocido en la técnica. Excepto

en la medida en que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el compuesto activo, se contempla su uso en las composiciones. Los compuestos activos complementarios también pueden incorporarse en las composiciones.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención incluyen, de modo no taxativo, soluciones, emulsiones y formulaciones que contienen liposomas. Estas composiciones pueden generarse a partir de una variedad de componentes que incluyen, de modo no taxativo, líquidos preformados, sólidos autoemulsionantes y semisólidos autoemulsionantes. Las formulaciones incluyen aquellas que se dirigen al hígado.

Las formulaciones farmacéuticas de la presente invención, que pueden presentarse convenientemente en forma de dosificación unitaria, pueden prepararse de acuerdo con técnicas convencionales bien conocidas en la industria farmacéutica. Tales técnicas incluyen la etapa de asociar los ingredientes activos con los portadores o excipientes farmacéuticos. En general, las formulaciones se preparan al asociar uniforme e íntimamente los ingredientes activos con los portadores líquidos.

A. Formulaciones adicionales

i. Emulsiones

Las composiciones de la presente invención pueden prepararse y formularse como emulsiones. Las emulsiones son típicamente sistemas heterogéneos de un líquido disperso en otro en forma de gotitas que generalmente exceden 0,1 μm de diámetro (ver, por ejemplo, Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., y Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Idson, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volumen 1, p. 199; Rosoff, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., Volumen 1, p. 245; Block in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volumen 2, p. 335; Higuchi *et al.*, en Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1985, p. 301).

Las emulsiones son a menudo sistemas bifásicos que comprenden dos fases líquidas inmiscibles íntimamente mezcladas y dispersas entre sí. En general, las emulsiones pueden ser de la variedad agua en aceite (w/o) o aceite en agua (o/w). Cuando una fase acuosa se divide finamente y se dispersa como pequeñas gotitas en una fase oleosa a granel, la

5 composición resultante se denomina emulsión de agua en aceite (w/o). Alternativamente, cuando una fase oleosa se divide finamente y se dispersa como pequeñas gotitas en una fase acuosa a granel, la composición resultante se denomina emulsión de aceite en agua (o/w). Las emulsiones pueden contener componentes adicionales además de las fases dispersas, y el fármaco activo que puede estar presente como una solución ya sea en la

10 fase acuosa, la fase oleosa o en sí misma como una fase separada. Los excipientes farmacéuticos tales como emulsionantes, estabilizantes, tintes y antioxidantes también pueden estar presentes en emulsiones según sea necesario. Las emulsiones farmacéuticas también pueden ser múltiples emulsiones que se componen de más de dos fases tales como, por ejemplo, en el caso de las emulsiones de aceite en agua en aceite (o/w/o) y agua

15 en aceite en agua (w/o/w). Tales formulaciones complejas a menudo proporcionan determinadas ventajas que las emulsiones binarias simples no proporcionan. Múltiples emulsiones en las que las gotitas de aceite individuales de una emulsión o/w encierran pequeñas gotitas de agua constituyen una emulsión w/o/w. Del mismo modo, un sistema de gotitas de aceite encerradas en glóbulos de agua estabilizado en una fase continua oleosa

20 proporciona una emulsión o/w/o.

Las emulsiones se caracterizan por poca o nula estabilidad termodinámica. A menudo, la fase dispersa o discontinua de la emulsión se dispersa bien en la fase externa o continua y se mantiene en esta forma a través de los medios de emulsionantes o la viscosidad de la formulación. Otros medios para estabilizar las emulsiones implican el uso

25 de emulsionantes que pueden incorporarse en cualquiera de las fases de la emulsión. Los emulsionantes pueden clasificarse generalmente en cuatro categorías: tensioactivos sintéticos, emulsionantes de origen natural, bases de absorción y sólidos finamente dispersos (ver, por ejemplo, Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery

Systems, Allen, LV., Popovich NG., y Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Idson, en Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volumen 1, p. 199).

Los tensioactivos sintéticos, también conocidos como agentes activos en la superficie, han encontrado amplia aplicabilidad en la formulación de emulsiones y se han revisado en la literatura (ver, por ejemplo, Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., y Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Rieger, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 285; Idson, en Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 1988, volume 1, p. 199). Los tensioactivos son típicamente anfifílicos y comprenden una porción hidrófila y una hidrófoba. La relación entre la naturaleza hidrófila y la hidrófoba del tensioactivo se ha denominado equilibrio hidrófilo/lipófilo (HLB) y es una valiosa herramienta para categorizar y seleccionar tensioactivos en la preparación de formulaciones. Los tensioactivos se pueden clasificar en diferentes clases en función de la naturaleza del grupo hidrófilo: no iónico, aniónico, catiónico y anfótero (ver, por ejemplo, Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., y Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY Rieger, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volumen 1, p. 285).

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

La aplicación de formulaciones de emulsión a través de vías dermatológicas, orales y parenterales, y los métodos para su fabricación se han revisado en la bibliografía (ver, por ejemplo, Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., y Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8ª ed.), Nueva York, NY; 5 Idson, in Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y., volumen 1, p. 199).

ii. Microemulsiones

En una modalidad de la presente invención, las composiciones de los ARNi y los 10 ácidos nucleicos se formulan como microemulsiones. Una microemulsión puede definirse como un sistema de agua, aceite y anfífilo, que es una única solución líquida ópticamente isotrópica y termodinámicamente estable (ver, por ejemplo, Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., y Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Rosoff, en Pharmaceutical Dosage Forms, 15 Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volumen 1, p. 245). Típicamente, las microemulsiones son sistemas que se preparan al dispersar primero un aceite en una solución tensioactiva acuosa y luego agregar una cantidad suficiente de un cuarto componente, generalmente un alcohol de longitud de cadena intermedia para formar un sistema transparente. Por lo tanto, las microemulsiones también 20 se han descrito como dispersiones isotrópicamente transparentes y termodinámicamente estables de dos líquidos inmiscibles que se estabilizan mediante películas interfaciales de moléculas activas en la superficie (Leung y Shah, en: Controlled Release of Drugs: Polymers and Aggregate Systems, Rosoff, M., Ed., 1989, VCH Publishers, New York páginas 185-215).

25

iii. Micropartículas

Un ARNi de la invención puede incorporarse en una partícula, por ejemplo, una micropartícula. Las micropartículas pueden producirse mediante secado por atomización,

pero también pueden producirse mediante otros métodos que incluyen liofilización, evaporación, secado de lecho fluido, secado al vacío o una combinación de estas técnicas.

iv. Potenciadores de penetración

5 En una modalidad, la presente invención emplea varios potenciadores de la penetración para efectuar la administración eficiente de ácidos nucleicos, particularmente los ARNi, a la piel de los animales. La mayoría de los fármacos están presentes en solución tanto en formas ionizadas como no ionizadas. Sin embargo, por lo general, solo las medicaciones lipófilas o solubles en lípidos cruzan fácilmente las membranas celulares. Se
10 ha descubierto que incluso las medicaciones no lipófilas pueden cruzar las membranas celulares si la membrana a cruzar se trata con un potenciador de la penetración. Además de ayudar a la difusión de medicaciones no lipófilas a través de las membranas celulares, los potenciadores de la penetración también potencian la penetración de las medicaciones lipófilas.

15 Los potenciadores de la penetración pueden clasificarse como pertenecientes a una de cinco amplias categorías, es decir, surfactantes, ácidos grasos, sales biliares, agentes quelantes y no surfactantes no quelantes (ver, por ejemplo, Malmsten, M. Surfactants and polymers in drug delivery, Informa Health Care, Nueva York, NY, 2002; Lee *et al.*, Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1991, p.92). Cada una de las clases
20 mencionadas anteriormente de potenciadores de la penetración y su uso en la fabricación de composiciones farmacéuticas y la administración de agentes farmacéuticos son bien conocidos en la técnica.

v. Excipientes

25 A diferencia de un compuesto portador, un “portador farmacéutico” o “excipiente” es un disolvente, agente de suspensión o cualquier otro vehículo farmacológicamente inerte aceptable farmacéuticamente para administrar uno o más ácidos nucleicos a un animal. El excipiente puede ser líquido o sólido y se selecciona, con la forma de administración

planificada en mente, para proporcionar la masa deseada, la consistencia, etc., cuando se combina con un ácido nucleico y los otros componentes de una composición farmacéutica dada. Tal agente se conoce bien en la técnica.

5 *vi. Otros componentes*

Las composiciones de la presente invención pueden contener adicionalmente otros componentes adjuntos que se encuentran convencionalmente en composiciones farmacéuticas, en sus niveles de uso establecidos por la técnica. Por lo tanto, por ejemplo, las composiciones pueden contener materiales adicionales, compatibles, farmacéuticamente
10 activos tales como, por ejemplo, antipruríticos, astringentes, agentes antiinflamatorios o anestésicos locales, o pueden contener materiales adicionales útiles en la formulación física de varias formas de dosificación de las composiciones de la presente invención, tales como tintes, agentes saborizantes, conservantes, antioxidantes, opacantes, agentes espesantes y estabilizantes. Sin embargo, tales materiales, cuando se añaden, no deben interferir
15 indebidamente con las actividades biológicas de los componentes de las composiciones de la presente invención. Las formulaciones pueden esterilizarse y, si se desea, mezclarse con agentes auxiliares, *por ejemplo*, lubricantes, conservantes, estabilizantes, agentes humectantes, emulsionantes, sales para influir en la presión osmótica, amortiguadores, colorantes, saborizantes o sustancias aromáticas, y similares que no interactúan de manera
20 perjudicial con el(los) ácido(s) nucleico(s) de la formulación.

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

En algunas modalidades, las composiciones farmacéuticas presentadas en la
25 invención incluyen (a) uno o más ARNi y (b) uno o más agentes que funcionan mediante un mecanismo que no es de ARNi y que son útiles para tratar un trastorno asociado a la TTR, *p. ej.*, amiloidosis sistémica senil (SSA), amiloidosis familiar sistémica, polineuropatía amiloidótica familiar (FAP), miocardiopatía amiloidótica familiar (FAC), amiloidosis

leptomeníngea/del sistema nervioso central (CNS), hipertiroxinemia, una enfermedad ocular, *p. ej.*, la enfermedad de Stargardt, retinopatía diabética, degeneración macular asociada a la edad (AMD), *p. ej.*, AMD seca y AMD húmeda; un trastorno metabólico, *p. ej.*, un trastorno de la homeostasis de la glucosa y los lípidos, *p. ej.*, resistencia a la insulina asociada con la diabetes tipo II, y una enfermedad cardiovascular.

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

Los datos obtenidos a partir de ensayos de cultivo celular y estudios en animales pueden usarse para formular un rango de dosificación para su uso en humanos. La dosificación de las composiciones que se presentan en la presente descripción de la invención se encuentra generalmente dentro de un rango de concentraciones circulantes que incluyen la ED50, tal como una ED80 o ED90, con poca o ninguna toxicidad. La dosificación puede variar dentro de este rango en dependencia de la forma de dosificación empleada y la vía de administración utilizada. Para cualquier compuesto usado en los métodos presentados en la invención, la dosis profilácticamente efectiva puede estimarse inicialmente a partir de ensayos de cultivo celular. Una dosis puede formularse en modelos animales para lograr un intervalo de concentración plasmática circulante del compuesto o, cuando sea apropiado, del producto polipeptídico de una secuencia diana (*por ejemplo*, lograr una concentración reducida del polipéptido) que incluye la CI50 (*es decir*, la concentración del compuesto de prueba que logra una inhibición media máxima de los síntomas) o niveles más altos de inhibición como se determina en el cultivo celular. Tal información puede usarse para determinar con más precisión dosis útiles en humanos. Los

niveles en plasma pueden medirse, por ejemplo, mediante cromatografía líquida de alto rendimiento.

Además de su administración, como se describió anteriormente, los ARNi presentados en la invención pueden administrarse en combinación con otros agentes conocidos usados para la prevención o el tratamiento de un trastorno asociado a la TTR, *p. ej.*, amiloidosis sistémica senil (SSA), amiloidosis familiar sistémica, polineuropatía amiloidótica familiar (FAP), miocardiopatía amiloidótica familiar (FAC), amiloidosis leptomeníngea/del sistema nervioso central (CNS), e hipertiroxinemia. En cualquier caso, el médico administrador puede ajustar la cantidad y el momento de la administración de ARNi en función de los resultados observados usando medidas estándar de eficacia conocidas en la técnica o descritas en la presente descripción.

VI. Métodos para inhibir la expresión de la TTR

La presente invención también proporciona métodos para inhibir la expresión de un gen TTR en una célula. Los métodos incluyen contactar una célula con un agente de ARNi, por ejemplo, un agente de ARN bicatenario, en una cantidad efectiva para inhibir la expresión de TTR en la célula, inhibiendo así la expresión de TTR en la célula. En algunas modalidades de la descripción, la expresión de un gen TTR se inhibe preferentemente en el hígado (*p. ej.*, hepatocitos).

El contacto de célula con un ARNi, *por ejemplo*, un agente de ARN bicatenario, puede realizarse *in vitro* o *in vivo*. El contacto con una célula *in vivo* con el ARNi incluye poner en contacto una célula o grupo de células dentro de un sujeto, *por ejemplo*, un sujeto humano, con el ARNi. También son posibles combinaciones de métodos *in vitro* e *in vivo* para contactar una célula. El contacto con una celda puede ser directo o indirecto, como se discutió anteriormente. Además, el contacto con una célula puede lograrse mediante un ligando de direccionamiento, que incluye cualquier ligando descrito en la presente descripción o conocido en la técnica. En algunas modalidades, el ligando de

direccionamiento es un resto de carbohidrato, *por ejemplo*, un ligando GalNAc₃, o cualquier otro ligando que dirija el agente de ARNi a un sitio de interés.

El término “inhibir”, como se usa en la presente descripción, se usa indistintamente con “reducir”, “silenciar”, “regular a la baja”, “suprimir”, y otros términos similares, e incluye cualquier nivel de inhibición.

La frase “inhibir la expresión de una TTR” pretende referirse a la inhibición de la expresión de cualquier gen de la TTR (tal como, *por ejemplo*, un gen de la TTR de ratón, un gen de la TTR de rata, un gen de la TTR de mono, o un gen de la TTR humano) así como también variantes o mutantes de un gen de la TTR. Por lo tanto, el gen de la TTR puede ser un gen de la TTR de tipo salvaje, un gen de la TTR mutante o un gen de la TTR transgénico en el contexto de una célula, grupo de células u organismo genéticamente manipulado.

“Inhibir la expresión de un gen de la TTR” incluye cualquier nivel de inhibición de un gen de la TTR, *por ejemplo*, supresión al menos parcial de la expresión de un gen de la TTR. La expresión del gen TTR puede evaluarse en función del nivel, o el cambio en el nivel, de cualquier variable asociada con la expresión del gen TTR, *p. ej.*, nivel de ARNm de TTR o nivel de proteína TTR. Este nivel puede evaluarse en una célula individual o en un grupo de células, que incluyen, por ejemplo, una muestra derivada de un sujeto.

La inhibición puede evaluarse mediante una disminución en un nivel absoluto o relativo de una o más variables que se asocian con la expresión de la TTR en comparación con un nivel de control. El nivel de control puede ser cualquier tipo de nivel de control que se utiliza en la técnica, *por ejemplo*, un nivel inicial previo a la dosis, o un nivel determinado a partir de un sujeto, célula o muestra similar que no se trata o se trata con un control (tal como, *por ejemplo*, control de amortiguador solo o control de agente inactivo).

En algunas modalidades de los métodos de la invención, la expresión de un gen TTR se inhibe por al menos 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % o 95 %, o por debajo del nivel de detección del ensayo. En algunas modalidades, la expresión de un gen de la TTR se inhibe en al menos el 70 %. Se entiende además que la inhibición de la expresión de TTR en determinados tejidos, por ejemplo, en el hígado, sin una inhibición

significativa de la expresión en otros tejidos, por ejemplo, en el cerebro, puede ser conveniente. En determinadas modalidades, el nivel de expresión se determina usando el método de ensayo proporcionado en el Ejemplo 2 con una concentración de ARNi de 10 nM en la línea celular emparejada con la especie adecuada.

5 En determinadas modalidades, la inhibición de la expresión *in vivo* se determina mediante la atenuación del gen humano en un roedor que expresa el gen humano, *por ejemplo*, un ratón infectado con AAV que expresa el gen diana humano (*es decir*, la TTR), *por ejemplo*, cuando se administra como una dosis única, *por ejemplo*, a 3 mg/kg en el punto más bajo de la expresión de ARN. También se puede determinar la atenuación de la

10 expresión de un gen endógeno en un sistema de modelo animal, *por ejemplo*, después de la administración de una dosis única a, *por ejemplo*, 3 mg/kg en el punto más bajo de la expresión de ARN. Tales sistemas son útiles cuando la secuencia de ácidos nucleicos del gen humano y el gen animal modelo están suficientemente cerca de manera que el ARNi humano proporciona una atenuación efectiva del gen animal modelo. La expresión de ARN

15 en el hígado se determina usando métodos de PCR proporcionados en el Ejemplo 2.

La inhibición de la expresión de un gen TTR puede manifestarse mediante una reducción de la cantidad de ARNm expresado por una primera célula o grupo de células (tales células pueden estar presentes, *por ejemplo*, en una muestra que se deriva de un sujeto) en la que se transcribe un gen de TTR y que se trató (*por ejemplo*, al contactar la

20 célula o las células con un ARNi de la invención, o mediante la administración de un ARNi de la invención a un sujeto en el que las células están o estaban presentes) de manera que se inhibe la expresión de un gen de TTR, en comparación con una segunda célula o grupo de células sustancialmente idénticas a la primera célula o grupo de células pero que no se trataron de esta manera o no (célula(s) de control no tratada con un ARNi o no tratada con

25 un ARNi dirigido al gen de interés). En algunas modalidades, la inhibición se evalúa mediante el método que se proporciona en el Ejemplo 2 mediante el uso de una concentración de ARNi de 10 nM en la línea celular emparejada de la especie y la

expresión del nivel de ARNm en las células tratadas como un porcentaje del nivel de ARNm en las células de control, mediante el uso de la siguiente fórmula:

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

En otras modalidades, la inhibición de la expresión de un gen de la TTR puede evaluarse en términos de una reducción de un parámetro que se enlaza funcionalmente a la expresión del gen de la TTR, *por ejemplo*, el nivel de proteína TTR en sangre o suero de un sujeto. El silenciamiento del gen de la TTR puede determinarse en cualquier célula que exprese la TTR, ya sea endógeno o heterólogo a partir de un constructo de expresión, y mediante cualquier ensayo conocido en la técnica.

La inhibición de la expresión de una proteína TTR puede manifestarse mediante una reducción en el nivel de la proteína TTR que se expresa por una célula o grupo de células o en una muestra del sujeto (*por ejemplo*, el nivel de proteína en una muestra de sangre que se deriva de un sujeto). Como se explicó anteriormente, para la evaluación de la supresión del ARNm, la inhibición de los niveles de expresión de proteínas en una célula o grupo de células tratados puede expresarse de manera similar como un porcentaje del nivel de proteína en una célula de control o grupo de células, o el cambio en el nivel de proteína en una muestra del sujeto, *por ejemplo*, sangre o suero derivado de esta.

Una célula de control, un grupo de células o una muestra del sujeto que puede usarse para evaluar la inhibición de la expresión de un gen TTR incluye una célula, un grupo de células o una muestra del sujeto que aún no se ha contactado con un agente de ARNi de la invención. Por ejemplo, la célula de control, el grupo de células o la muestra del sujeto pueden derivarse de un sujeto individual (*por ejemplo*, un sujeto humano o animal) antes del tratamiento del sujeto con un agente de ARNi o un control de población emparejado apropiadamente.

El nivel del ARNm de la TTR que se expresa por una célula o grupo de células puede determinarse mediante el uso de cualquier método que se conoce en la técnica para evaluar la expresión del ARNm. En una modalidad, el nivel de expresión de la TTR en una muestra

se determina mediante la detección de un polinucleótido transcrito, o una porción de este, *por ejemplo*, ARNm del gen de la TTR. El ARN puede extraerse de las células usando técnicas de extracción de ARN que incluyen, por ejemplo, el uso de la extracción de isotiocianato de ácido de fenol/guanidina (RNAzol B; Biogenesis), los kits de preparación de ARN RNeasy™ (Qiagen®) o PAXgene™ (PreAnalytix™, Suiza). Los formatos de ensayo típicos que utilizan la hibridación con ácido ribonucleico incluyen ensayos de ejecución nuclear, RT-PCR, ensayos de protección de ARNasa, hibridación northern, hibridación *in situ* y análisis de micromatriz.

En algunas modalidades, el nivel de expresión de la TTR se determina mediante el uso de una sonda de ácido nucleico. El término “sonda”, como se usa en la presente descripción, se refiere a cualquier molécula que es capaz de unirse selectivamente a una TTR específico. Las sondas pueden ser sintetizadas por un experto en la técnica, o derivadas a partir de preparaciones biológicas adecuadas. Las sondas pueden diseñarse específicamente para marcarse. Los ejemplos de moléculas que pueden utilizarse como sondas incluyen, de modo no taxativo, ARN, ADN, proteínas, anticuerpos y moléculas orgánicas.

El ARNm aislado puede usarse en ensayos de hibridación o amplificación que incluyen, de modo no taxativo, análisis Southern o northern, análisis de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y matrices de sondas. Un método para la determinación de los niveles de ARNm implica contactar el ARNm aislado con una molécula de ácido nucleico (sonda) que puede hibridarse al ARNm de la TTR. En una modalidad, el ARNm se inmoviliza en una superficie sólida y entra en contacto con una sonda, por ejemplo, con el ARNm aislado en un gel de agarosa y transfiriendo el ARNm del gel a una membrana, tal como nitrocelulosa. En una modalidad alternativa, las sondas se inmovilizan en una superficie sólida y el ARNm se pone en contacto con las sondas, por ejemplo, en una matriz de chips del gen Affymetrix®. Un experto en la técnica puede adaptar fácilmente los métodos de detección de ARNm conocidos para su uso en la determinación del nivel de ARNm de la TTR.

Un método alternativo para determinar el nivel de expresión de TTR en una muestra implica el proceso de amplificación de ácidos nucleicos o transcriptasa inversa (para preparar el ADNc) de, por ejemplo, ARNm en la muestra, *por ejemplo*, mediante RT-PCR (la modalidad experimental establecida en Mullis, 1987, patente de Estados Unidos núm.

5 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 otros (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:1874-1878), sistema de amplificación transcripcional ((Kwoh y otros (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:1173-1177), Q-Beta Replicase (Lizardi y otros (1988) *Bio/Technology* 6:1197), replicación de círculos rodantes (Lizardi y otros, patente de Estados
10 Unidos núm. 5,854,033) o cualquier otro método de amplificación de ácidos nucleicos, seguido de la detección de las moléculas amplificadas mediante el uso de técnicas bien conocidas por los expertos en la técnica. Estos esquemas de detección son especialmente útiles para la detección de moléculas de ácido nucleico si tales moléculas están presentes en números muy bajos. En aspectos particulares de la invención, el nivel de expresión de la
15 TTR se determina mediante RT-PCR fluorogénica cuantitativa (*es decir*, el sistema TaqMan™). En algunas modalidades, el nivel de expresión se determina por el método proporcionado en el Ejemplo 2 usando, p. ej., una concentración de ARNip de 10 nM en la línea celular emparejada con la especie.

Los niveles de expresión del ARNm de la TTR se pueden monitorear mediante el uso
20 de una membrana de transferencia (tal como se usa en el análisis de hibridación tal como northern, Southern, de puntos, y similares), o micropocillos, tubos de muestras, geles, microesferas o fibras (o cualquier soporte sólido que comprende ácidos nucleicos unidos). Consulte las patentes de Estados Unidos núms. 5,770,722, 5,874,219, 5,744,305, 5,677,195 y 5,445,934, que se incorporan en la presente como referencia. La determinación del nivel
25 de expresión de la TTR puede comprender además el uso de sondas de ácido nucleico en solución.

En determinadas modalidades, el nivel de expresión de ARNm se evalúa usando ensayos de ADN ramificado (ADNb) o PCR en tiempo real (qPCR). El uso de estos métodos

se describe y ejemplifica en los Ejemplos presentados en la presente descripción. En algunas modalidades, el nivel de expresión se determina por el método proporcionado en el Ejemplo 2 usando, p. ej., una concentración de ARNip de 10 nM en la línea celular emparejada con la especie.

5 El nivel de expresión de la proteína TTR puede determinarse mediante el uso de cualquier método conocido en la técnica para la medición de los niveles de proteína. Tales métodos incluyen, por ejemplo, electroforesis, electroforesis capilar, cromatografía de líquidos de alto rendimiento (HPLC), cromatografía en capa fina (TLC), cromatografía de hiperdifusión, reacciones a la precipitina en líquido o gel, espectroscopía de absorción, un
10 ensayo colorimétrico, ensayos espectrofotométricos, citometría de flujo, inmunodifusión (única o doble), inmunoelectroforesis, transferencia western, radioinmunoensayo (RIA), enzimoimmunoanálisis de adsorción (ELISA), ensayos inmunofluorescentes, ensayos de electroquimioluminiscencia, y similares.

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

En algunas modalidades, la eficacia de los métodos de la invención puede monitorearse mediante la detección o el monitoreo de una reducción en un síntoma de un trastorno asociado a la TTR, *p. ej.*, reducción de la neuropatía sensitiva (*p. ej.*, parestesia,
20 hipoestesia en las extremidades distales), neuropatía autonómica (*p. ej.*, disfunción gastrointestinal, como úlcera gástrica, o hipotensión ortostática), neuropatía motora, convulsiones, demencia, mielopatía, polineuropatía, síndrome del túnel carpiano, insuficiencia autonómica, miocardiopatía, opacidades vítreas, insuficiencia renal, nefropatía, reducción sustancial del IMCm (índice de masa corporal modificado), disfunción del nervio
25 craneal, y la distrofia de la red de la córnea. Está bien dentro de la capacidad de un experto en la técnica de monitorear la eficacia de los métodos mediante la medición de cualquiera de dichos parámetros, o cualquier combinación de parámetros.

En algunas modalidades de los métodos de la invención, el ARNi se administra a un sujeto de manera que el ARNi se administra a un sitio específico dentro del sujeto. La inhibición de la expresión de la TTR puede evaluarse mediante el uso de mediciones del nivel o el cambio en el nivel del ARNm de la TTR o la proteína TTR en una muestra derivada del fluido o tejido del sitio específico dentro del sujeto (*por ejemplo*, hígado o sangre).

Como se usa en la presente descripción, los términos que detectan o determinan un nivel de un analito se refieren a realizar las etapas para determinar si un material, *por ejemplo*, proteína, ARN, está presente. Como se usa en la presente descripción, los métodos para detectar o determinar incluyen la detección o determinación de un nivel de analito que está por debajo del nivel de detección para el método usado.

VII. Métodos profilácticos y de tratamiento de la invención

La presente invención también proporciona métodos para usar un ARNi de la invención o una composición que contiene un ARNi de la invención para inhibir la expresión de TTR, para prevenir o tratar así un trastorno asociado con la TTR, *p. ej.*, amiloidosis sistémica senil (SSA), amiloidosis familiar sistémica, polineuropatía amiloidótica familiar (FAP), miocardiopatía amiloidótica familiar (FAC), amiloidosis leptomeníngea/del sistema nervioso central (CNS), hipertiroidismo, una enfermedad ocular, *p. ej.*, la enfermedad de Stargardt, retinopatía diabética, degeneración macular asociada a la edad (AMD), *p. ej.*, AMD seca y AMD húmeda; un trastorno metabólico, *p. ej.*, un trastorno de la homeostasis de la glucosa y los lípidos, *p. ej.*, resistencia a la insulina asociada con la diabetes tipo II, y una enfermedad cardiovascular. En los métodos de la invención, la célula puede ponerse en contacto con el ARNi *in vitro* o *in vivo*, es decir, la célula puede estar dentro de un sujeto.

Una célula adecuada para el tratamiento mediante el uso de los métodos de la invención puede ser cualquier célula que expresa un gen de la TTR, *por ejemplo*, una célula hepática. Una célula adecuada para usar en los métodos de la invención puede ser una célula de mamíferos, *por ejemplo*, una célula de primate (tal como una célula humana, que incluye una célula humana en un animal quimérico no humano, o una célula de primate no

humana, *por ejemplo*, una célula de mono o una célula de chimpancé), o una célula no primate. En determinadas modalidades, la célula es una célula humana, *por ejemplo*, una célula hepática humana. En los métodos de la invención, la expresión de la TTR se inhibe en la célula por al menos 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90 o 95, o hasta un nivel más abajo del nivel de detección del ensayo.

Los métodos *in vivo* de la invención pueden incluir administrar a un sujeto una composición que contiene un ARNi, donde el ARNi incluye una secuencia de nucleótidos que es complementaria a al menos una parte de un transcrito de ARN del gen de la TTR del mamífero al que se va a administrar el agente de ARNi. La composición puede administrarse por cualquier medio conocido en la técnica que incluye, entre otros, orales, intraperitoneal, o vías parenterales, incluidos los intracraneales (*p. ej.*, intraventricular, intraparenquimatoso, e intratecal), intravenoso, intramuscular, subcutánea, transdérmico, las vías respiratorias (aerosol), nasal, rectal, intraocular (*p. ej.*, periocular, conjuntival, subtenón, intracameral, intravítrea, intraocular, yuxtaescleral anterior o posterior, subretiniano, subconjuntival, retrobulbar, o inyección intracanalicular), intravenoso, intramuscular, subcutánea, transdérmico, las vías respiratorias (aerosol), y la administración tópica (incluidas la bucal y la sublingual).

En determinadas modalidades, las composiciones se administran por infusión intravenosa o inyección. En determinadas modalidades, las composiciones se administran por inyección subcutánea. En determinadas modalidades, las composiciones se administran por inyección intramuscular.

El modo de administración puede elegirse en función de si se desea un tratamiento local o sistémico y en función del área a tratar. La ruta y el lugar de administración pueden elegirse para potenciar el direccionamiento.

En un aspecto, la presente invención también proporciona métodos para inhibir la expresión de un gen de la TTR en un mamífero. Los métodos incluyen administrar al mamífero una composición que comprende un ARNbc que se dirige a un gen de la TTR en una célula del mamífero y mantener al mamífero durante un tiempo suficiente para obtener

la degradación del transcrito de ARNm de la TTR, de esta manera se inhibe la expresión del gen de la TTR en la célula. La reducción en la expresión génica puede evaluarse mediante cualquier método conocido en la técnica y mediante métodos, *por ejemplo* qRT-PCR, que se describen en la presente descripción, *por ejemplo*, en el Ejemplo 2. La reducción en la producción de proteínas puede evaluarse mediante cualquier método conocido en la técnica, *por ejemplo* ELISA. En determinadas modalidades, una muestra de biopsia hepática de punción sirve como material tisular para monitorear la reducción en la expresión del gen o proteína TTR. En otras modalidades, una muestra de sangre sirve como la muestra del sujeto para monitorear la reducción en la expresión de la proteína TTR.

La presente invención proporciona además métodos de tratamiento en un sujeto que lo necesita, *p. ej.*, a un sujeto diagnosticado con un trastorno asociado a la TTR, tal como amiloidosis sistémica senil (SSA), amiloidosis familiar sistémica, polineuropatía amiloidótica familiar (FAP), miocardiopatía amiloidótica familiar (FAC), amiloidosis leptomeníngea/del sistema nervioso central (CNS), hipertiroxinemia, una enfermedad ocular, *p. ej.*, la enfermedad de Stargardt, retinopatía diabética, degeneración macular asociada a la edad (AMD), *p. ej.*, AMD seca y AMD húmeda; un trastorno metabólico, *p. ej.*, un trastorno de la homeostasis de la glucosa y los lípidos, *p. ej.*, resistencia a la insulina asociada con la diabetes tipo II, y una enfermedad cardiovascular.

La presente invención proporciona además métodos de profilaxis en un sujeto que lo necesita. Los métodos de tratamiento de la invención incluyen administrar un ARNi de la invención a un sujeto, *por ejemplo*, un sujeto que se beneficiaría de una reducción de la expresión de TTR, en una cantidad profilácticamente efectiva de un ARNbc dirigido a un gen TTR o una composición farmacéutica que comprende un ARNbc dirigido a un gen TTR.

En un aspecto, la presente invención proporciona métodos para tratar a un sujeto que tiene un trastorno que se beneficiaría de la reducción en la expresión de la TTR, *p. ej.*, un trastorno asociado con la TTR, tal como amiloidosis sistémica senil (SSA), amiloidosis familiar sistémica, polineuropatía amiloidótica familiar (FAP), miocardiopatía amiloidótica familiar (FAC), amiloidosis leptomeníngea/del sistema nervioso central (CNS), hipertiroxinemia, una enfermedad

ocular, *p. ej.*, la enfermedad de Stargardt, retinopatía diabética, degeneración macular asociada a la edad (AMD), *p. ej.*, AMD seca y AMD húmeda; un trastorno metabólico, *p. ej.*, un trastorno de la homeostasis de la glucosa y los lípidos, *p. ej.*, resistencia a la insulina asociada con la diabetes tipo II, y una enfermedad cardiovascular.

- 5 El tratamiento de un sujeto que se beneficiaría de una reducción y/o inhibición de la expresión génica de TTR incluye tratamiento terapéutico (por ejemplo, un sujeto tiene un trastorno asociado a TTR) y tratamiento profiláctico (por ejemplo, el sujeto no un trastorno asociado a TTR o un sujeto puede estar en riesgo de desarrollar un trastorno asociado a TTR).

- 10 En algunas modalidades, el trastorno asociado a la TTR se selecciona del grupo que consiste en amiloidosis sistémica senil (SSA), amiloidosis familiar sistémica, polineuropatía amiloidótica familiar (FAP), miocardiopatía amiloidótica familiar (FAC), amiloidosis leptomeníngea/del sistema nervioso central (CNS), hipertiroxinemia, una enfermedad ocular, *p. ej.*, la enfermedad de Stargardt, retinopatía diabética, degeneración macular asociada a la edad (AMD), *p. ej.*, AMD seca y AMD húmeda; un trastorno metabólico, *p. ej.*, un trastorno de la
- 15 homeostasis de la glucosa y los lípidos, *p. ej.*, resistencia a la insulina asociada con la diabetes tipo II, y una enfermedad cardiovascular.

- En una modalidad, el sujeto padece de miocardiopatía amiloidótica familiar (FAC). En otra modalidad, el sujeto padece de FAC con un fenotipo mixto, *es decir*, un sujeto que tiene deficiencias tanto cardíacas como neurológicas. Aún en otra modalidad, el sujeto padece de
- 20 FAP con un fenotipo mixto, *es decir*, un sujeto que tiene deficiencias tanto neurológicas como cardíacas. En una modalidad, el sujeto padece de FAP que se ha tratado con un trasplante de hígado ortotópico (OLT).

- En otra modalidad, el sujeto padece de amiloidosis sistémica senil (SSA). En otras modalidades de los métodos de la invención, el sujeto padece de miocardiopatía amiloidótica
- 25 familiar (FAC) y amiloidosis sistémica senil (SSA). La TTR de secuencia normal provoca amiloidosis cardíaca en personas de edad avanzada y se denomina amiloidosis sistémica senil (SSA) (también llamada amiloidosis cardíaca senil (SCA) o amiloidosis cardíaca). La SSA a menudo está acompañada de depósitos microscópicos en muchos otros órganos. Las

mutaciones de la TTR aceleran el proceso de formación de amiloides en la TTR y son el factor de riesgo más importante para el desarrollo de amiloidosis por TTR clínicamente significativa (también llamada ATTR (tipo amiloidosis-transtiretina)). Se sabe que más de 85 variantes amiloidógenas de la TTR causan amiloidosis familiar sistémica.

- 5 En algunas modalidades de los métodos de la invención, el sujeto padece de polineuropatía amiloidótica familiar (FAP) relacionada con la transtiretina (TTR). Dichos sujetos pueden sufrir manifestaciones oculares, como opacidad vítrea y glaucoma. Un experto en la técnica sabe que la transtiretina amiloidógena (ATTR) sintetizada por el epitelio pigmentario retiniano (RPE) desempeña funciones importantes en el avance de la amiloidosis ocular.
- 10 Estudios anteriores han demostrado que la fotocoagulación con láser panretinal, que redujo las células del RPE, evitó la progresión de la deposición de amiloides en el vítreo, lo que indica que la supresión eficaz de la expresión de ATTR en el RPE puede convertirse en una terapia novedosa para la amiloidosis ocular (véase, *p. ej.*, Kawaji, T., et al., *Ophthalmology*. (2010) 117: 552-555). Otra enfermedad asociada con la TTR es la hipertiroidismo, también conocida como
- 15 “hipertiroidismo distranstiretinémica” o “hipertiroidismo disprealbuminémica”. Este tipo de hipertiroidismo puede ser secundaria a una mayor asociación de la tiroxina con la TTR debido a una molécula de TTR mutante con mayor afinidad por la tiroxina. Véase, *p. ej.*, Moses *et al.* (1982) *J. Clin. Invest.*, 86, 2025-2033.

- En algunas modalidades, el trastorno asociado a la TTR es una enfermedad ocular,
- 20 *p. ej.*, enfermedad de Stargardt, retinopatía diabética, degeneración macular relacionada con la edad (AMD), *p. ej.*, AMD seca y AMD húmeda, coloboma de iris, síndrome de acné comedogénico, microftalmia, drusen laminar basal, edema macular diabético, u oclusión de la vena retiniana. En algunas modalidades, el trastorno asociado a RBP4 es un trastorno metabólico, *p. ej.*, un trastorno de homeostasis de glucosa y lípidos, *p. ej.*, resistencia a la
- 25 insulina asociada con diabetes tipo II, o una enfermedad cardiovascular.

Como se usa en la presente descripción, el término “enfermedad de Stargardt” se refiere a un trastorno ocular genético que causa degeneración retiniana y pérdida de la visión. La enfermedad de Stargardt es una forma de degeneración macular y también se

denomina “degeneración macular juvenil” o “degeneración macular de Stargardt”. La enfermedad de Stargardt es la forma más frecuente de degeneración macular hereditaria, que afecta a alrededor de 30.000 personas en los EE. UU. La pérdida progresiva de la visión asociada con la enfermedad de Stargardt es causada por la degeneración de células fotorreceptoras en la parte central de la retina llamada mácula. La mácula es responsable de la visión central nítida, que es necesaria para tareas detalladas como leer, conducir y reconocer rostros. En la mayoría de las personas con enfermedad de Stargardt, se acumula un pigmento amarillo graso (lipofusina) en las células subyacentes de la mácula. Con el tiempo, la acumulación anormal de esta sustancia puede dañar las células que son críticas para una visión central clara. Además de la pérdida de la visión central, las personas con enfermedad de Stargardt tienen problemas con la visión nocturna que pueden dificultar la navegación con poca luz. Algunas personas afectadas también presentan deterioro de la visión del color. Los signos y síntomas de la enfermedad de Stargardt generalmente aparecen en las últimas etapas de la infancia hasta la edad adulta temprana y empeoran con el tiempo.

El aumento de la síntesis y la acumulación excesiva de lipofusina citotóxica, *p. ej.*, agregados de lípidos-proteínas-retinoides, en el RPE se demostró en un modelo de ratón de la enfermedad de Stargardt (*Abca4*^{-/-}). El principal componente citotóxico de la lipofusina RPE es el bisretinoide. La síntesis de lipofusina en la retina depende del influjo de retinol sérico de la circulación en el RPE, y la formación del complejo terciario RBP4/TTR/retinol en el suero es necesaria para este influjo. Como muestra Racz *et al.*, la administración de un antagonista de la RBP4 no retinoide a ratones *Abca4*^{-/-} redujo significativamente los niveles de RBP4 en suero e inhibió la síntesis de bisretinoides (Racz *et al. J Biol Chem.* 2018, 20;293(29):11574-11588), que representa una posible estrategia de tratamiento para la enfermedad de Stargardt y otros trastornos caracterizados por la acumulación excesiva de lipofusina.

Como se usa en la presente descripción, el término “degeneración macular relacionada con la edad” (“AMD”) o “degeneración macular” se refiere a una degeneración

progresiva de la parte central de la retina, en personas mayores de 55 años. La AMD representa el 8,7 % de todas las cegueras en todo el mundo. La AMD se caracteriza por grandes depósitos de drusas (depósitos que contienen lípidos y proteínas) debajo de la retina. Cuando la AMD daña la mácula, la parte central de la visión de una persona puede volverse borrosa u ondulada, y puede aparecer un punto ciego. La AMD puede causar pérdida de la visión rápida o lentamente, y puede hacer que sea muy difícil hacer cosas que requieran una visión nítida, como leer, coser, cocinar o conducir; también puede hacer que sea difícil ver con luz tenue. Hay dos tipos de AMD, conocida como AMD húmeda y AMD seca.

La degeneración macular es iniciada y perpetuada por la acumulación de derivados tóxicos de vitamina A en el epitelio pigmentario retiniano (RPE). La inhibición farmacológica de la administración de vitamina A o el metabolismo en el RPE puede enlentecer significativamente y reducir la pérdida de la visión en modelos animales de degeneración macular. Se demostró que los péptidos inhibidores que bloquean la interacción entre la RBP4 y su receptor, STRA6, reducen la administración de vitamina A a RPE, y podrían servir como base para el desarrollo de una terapia para tratar la degeneración macular (Farjo, *et al.*, 2013, *ARVO Annual Meeting*, 54(15), 1702).

La “AMD húmeda”, también llamada “AMD neovascular” o “degeneración macular húmeda”, se caracteriza por el crecimiento patológico de los vasos sanguíneos desde la coroides hasta la retina (neovascularización coroidea), impulsado en gran medida por la producción excesiva del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) por el epitelio pigmentario retiniano (RPE).

La “AMD seca”, también llamada “atrofia geográfica” o “degeneración macular seca”, es causada por la muerte celular del RPE y la degeneración del fotorreceptor, lo que provoca la pérdida de la visión.

Como se usa en la presente descripción, el término “retinopatía diabética” (“DR”) se refiere a una afección ocular que puede causar pérdida de la visión y ceguera en personas que tienen diabetes. Es causada por daños en los vasos sanguíneos del tejido sensible a la

luz en la parte posterior del ojo (retina). Al principio, la retinopatía diabética puede no causar síntomas o solo problemas de visión leves. Con el tiempo, puede causar ceguera. A pesar del control glucémico intensivo, el 80 % de los pacientes con diabetes tipo 2 pasarán a la DR en el plazo de los 15 años de la aparición de la enfermedad. Además, la retinopatía

5 diabética se desarrolla en el 70- 100 % de las personas con diabetes tipo 1. En las primeras etapas, los pacientes pueden presentar microaneurisma, exudados duros, hemorragias y manchas de algodón-lana en el fondo de ojo. A medida que la enfermedad avanza, los nuevos vasos sanguíneos pueden crecer debido a la isquemia, pero son frágiles, pueden causar hemorragia y, en última instancia, destruir la retina. El manejo de la DR gira en torno

10 a la fotocoagulación láser panretiniana para la enfermedad proliferativa, mientras que el edema macular diabético se trata con un tratamiento láser focal o en grilla y con esteroides y agentes anti-VEGF intraoculares. Las terapias actuales de DR se asocian con la administración inconveniente (cirugía láser, inyecciones intraoculares frecuentes) y efectos secundarios desagradables (glaucoma inducido por esteroides y cataratas). Estudios

15 recientes han demostrado que los niveles plasmáticos de la RBP4 se asociaron con retinopatía diabética en pacientes con diabetes tipo 2, y los pacientes con un nivel más alto de RBP4 tuvieron un mayor riesgo de desarrollar retinopatía diabética (Li *et al.*, *Biosci Rep.* 31 de octubre de 2018; 38(5): BSR20181100), lo que sugiere un posible papel de la RBP4 en la patogenia de las complicaciones de la DR.

20 Como se usa en la presente descripción, el término “edema macular diabético” (“DME”) se refiere a una forma de retinopatía diabética (DR), donde los vasos enfermos en la retina filtran líquido desde la circulación hacia la mácula, lo que conduce a una pérdida grave de la visión.

Como se usa en la presente descripción, el término “drusas laminales basales”

25 (“BLD”), también llamado “drusas cuticulares” o “drusas agrupadas de aparición temprana en la edad adulta”, se refiere a una afección en la que las drusas pequeñas se depositan aleatoriamente en la mácula. En las últimas etapas, estas drusas se vuelven más numerosas y se dispersan por toda la retina, que en última instancia, pueden provocar un

desprendimiento epitelial de pigmento grave de la mácula y provocar la pérdida de la visión. Los depósitos de drusas suelen ser autofluorescentes.

Como se usa en la presente descripción, el término “oclusión de la vena retiniana” (“RVO”) se refiere a un bloqueo de las venas pequeñas que transportan sangre fuera de la retina, que se subdivide en la RVO central y de la rama. La RVO central es causada por el deterioro del flujo de salida de la vena retiniana central, mientras que la RVO de la rama surge cuando se ocluye una rama de la vena central. Debido a la oclusión, es probable que la retina desarrolle isquemia, lo que provoca un aumento del VEGF y las proteínas inflamatorias, lo que puede impulsar el desarrollo de edema macular, neovascularización, glaucoma y, en última instancia, ceguera si no se trata. La oclusión en la RVO no puede tratarse, pero las complicaciones pueden tratarse mediante métodos como el tratamiento láser focal para el edema macular o el anti-VEGF para la neovascularización.

Un “trastorno ocular asociado con la TTR” incluye cualquier enfermedad ocular asociada con el gen o la proteína TTR y/o RBP4 en el ojo que se beneficiaría de la reducción de la expresión de la TTR. Dichas enfermedades oculares asociadas con la TTR se caracterizan por, por ejemplo, la acumulación de pigmento de lipofusina (enfermedad de Stargardt), depósitos de subproductos del metabolismo de las células oculares denominados drusas en la mácula (AMD y BLD) o neovascularización en la coroides o la retina (AMD, DR, DME, RVO) que se acumulan y provocan la obstrucción de la transmisión de la luz, el daño tisular y la disfunción o pérdida visual.

Los síntomas adicionales de una enfermedad ocular asociada con la TTR incluyen, por ejemplo, dificultad para ver en el centro de la visión, que es necesaria para leer, coser, cocinar, mirar caras y conducir, dificultad para ver con luz tenue, detección de puntos ciegos pequeños, visión borrosa y distorsionada, disminución de la adaptación a la oscuridad, sensibilidad a la luz, mala visión de color, o puntos flotantes o hilos oscuros. En la presente descripción se proporcionan más detalles sobre los signos y síntomas de las diversas enfermedades o afecciones y se conocen bien en la técnica.

Además de las enfermedades oculares, la TTR también está implicada en una variedad de trastornos metabólicos humanos, como trastornos de la homeostasis de la glucosa y los lípidos, y enfermedades cardiovasculares.

5 Como se usa en la presente descripción, un “trastorno metabólico” se refiere a cualquier enfermedad o trastorno que interrumpe el metabolismo normal, el proceso de convertir alimentos en energía a nivel celular. Los trastornos metabólicos afectan la capacidad de la célula para realizar reacciones bioquímicas críticas que implican el procesamiento o transporte de proteínas (aminoácidos), carbohidratos (azúcares y almidones) o lípidos (ácidos grasos). En algunas modalidades, un trastorno asociado a
10 RBP4 es un trastorno metabólico, *p. ej.*, un trastorno de la homeostasis de glucosa y lípidos, o una enfermedad cardiovascular.

Como se usa en la presente descripción, un “trastorno de la homeostasis de la glucosa y los lípidos” se refiere a cualquier enfermedad o trastorno que interrumpa el metabolismo normal de la glucosa y/o los lípidos. Ejemplos de trastornos de la homeostasis
15 de la glucosa y los lípidos incluyen, entre otros, diabetes, diabetes tipo I, diabetes tipo II, galactosemia, intolerancia hereditaria a la fructosa, deficiencia de fructosa 1,6-difosfatasa, trastornos del almacenamiento de glucógeno, trastornos congénitos de la glicosilación, resistencia a la insulina, insuficiencia de insulina, hiperinsulinemia, alteración de la tolerancia a la glucosa (IGT), aterosclerosis, dislipidemia, hipertrigliceridemia (incluida la
20 hipertrigliceridemia inducida por fármacos, hipertrigliceridemia inducida por diuréticos, hipertrigliceridemia inducida por alcohol, hipertrigliceridemia inducida por el agente bloqueador β -adrenérgico, hipertrigliceridemia inducida por estrógenos, hipertrigliceridemia inducida por glucocorticoides, hipertrigliceridemia inducida por retinoides, hipertrigliceridemia inducida por cimetidina, e hipertrigliceridemia familiar), pancreatitis aguda asociada con
25 hipertrigliceridemia, síndrome de quilomicrones, quilomicronemia familiar, deficiencia o resistencia de Apo-E, deficiencia de LPL o hipoactividad, hiperlipidemia (incluida la hiperlipidemia familiar combinada), hipercolesterolemia, gota asociada con hipercolesterolemia, xantomatosis (depósitos de colesterol subcutáneos), hiperlipidemia con

deficiencia heterogénea de LPL, hiperlipidemia con LDL elevada y deficiencia heterogénea de LPL, enfermedad del hígado graso, o estetohepatitis no alcohólica (NASH).

Como se usa en la presente descripción, el término “diabetes” se refiere a un grupo de enfermedades metabólicas caracterizadas por niveles altos de azúcar en sangre (glucosa) que resultan de defectos en la acción o secreción de insulina, o ambos. Hay dos tipos más frecuentes de diabetes, a saber, la diabetes tipo 1 y la diabetes tipo 2, que resultan de la incapacidad del cuerpo para regular la insulina. La insulina es una hormona liberada por el páncreas en respuesta al aumento de los niveles de azúcar en sangre (glucosa) en la sangre.

El término “diabetes tipo I”, como se usa en la presente descripción, se refiere a una enfermedad crónica que se produce cuando el páncreas produce muy poca insulina para regular los niveles de azúcar en sangre adecuadamente. La diabetes tipo I también se conoce como diabetes mellitus insulino dependiente, IDDM y diabetes de aparición juvenil. Las personas con diabetes tipo I (diabetes insulino dependiente) producen poca o nada de insulina. Aunque aproximadamente el 6 por ciento de la población de los Estados Unidos tiene algún tipo de diabetes, solo alrededor del 10 por ciento de todos los diabéticos tienen trastorno de tipo I. La mayoría de las personas con diabetes tipo I desarrollaron el trastorno antes de los 30 años. La diabetes tipo 1 representa el resultado de una destrucción autoinmunitaria progresiva de las células β pancreáticas con posterior deficiencia de insulina. Más del 90 por ciento de las células productoras de insulina (células beta) del páncreas se destruyen permanentemente. La deficiencia de insulina resultante es grave y, para sobrevivir, una persona con diabetes tipo I debe inyectarse insulina con regularidad.

En la diabetes tipo II (también conocida como diabetes mellitus no insulino dependiente, NDDM), el páncreas continúa fabricando insulina, a veces incluso a niveles más altos de lo normal. Sin embargo, el cuerpo desarrolla resistencia a la insulina y secreción de insulina desregulada. La diabetes tipo II puede ocurrir en niños y adolescentes, pero generalmente comienza después de los 30 años y se vuelve progresivamente más frecuente con la edad: alrededor del 15 % de las personas mayores de 70 años tienen

diabetes tipo II. La obesidad es un factor de riesgo para la diabetes tipo II, y entre el 80 y el 90 por ciento de las personas con este trastorno son obesas. En algunas modalidades, la diabetes incluye prediabetes. “Prediabetes” se refiere a una o más afecciones diabéticas tempranas, que incluyen deterioro de la utilización de la glucosa, niveles de glucosa en ayunas anormales o alterados, deterioro de la tolerancia a la glucosa, deterioro de la sensibilidad a la insulina y resistencia a la insulina. La prediabetes es un factor de riesgo importante para el desarrollo de la diabetes mellitus tipo 2, la enfermedad cardiovascular y la mortalidad. Se ha puesto mucho énfasis en el desarrollo de intervenciones terapéuticas que prevengan el desarrollo de la diabetes tipo 2 al tratar eficazmente la prediabetes.

La diabetes puede diagnosticarse mediante la administración de una prueba de tolerancia a la glucosa. Clínicamente, la diabetes a menudo se divide en varias categorías básicas. Los ejemplos principales de estas categorías incluyen diabetes mellitus autoinmunitaria, diabetes mellitus no insulino dependiente (NDDM de tipo 1), diabetes mellitus insulino dependiente (IDDM de tipo 2), diabetes mellitus no autoinmunitaria, diabetes mellitus no insulino dependiente (NIDDM de tipo 2) y diabetes de inicio en la madurez de los jóvenes (MODY). Otra categoría, a menudo denominada secundaria, se refiere a la diabetes causada por alguna afección identificable que causa o permite el desarrollo de un síndrome diabético. Algunos ejemplos de categorías secundarias incluyen diabetes causada por enfermedad pancreática, anomalías hormonales, diabetes inducida por fármacos o sustancias químicas, diabetes causada por anomalías en los receptores de insulina, diabetes asociada con síndromes genéticos y diabetes de otras causas (*véase, por ejemplo, Harrison's (1996) 14a ed., New York, McGraw-Hill*).

Las enfermedades cardiovasculares también se consideran “trastornos metabólicos”, como se define en la presente descripción. Estas enfermedades pueden incluir enfermedad de las arterias coronarias (también denominada enfermedad cardíaca isquémica), inflamación asociada con la enfermedad de las arterias coronarias, reestenosis, enfermedades vasculares periféricas y accidente cerebrovascular.

Los trastornos relacionados con el peso corporal también se consideran “trastornos metabólicos”, como se define en la presente descripción. Dichos trastornos pueden incluir obesidad, síndrome metabólico, incluidos componentes independientes del síndrome metabólico (p. ej., obesidad central, FBG/prediabetes/diabetes, hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia e hipertensión), hipotiroidismo, uremia y otras afecciones asociadas con el aumento de peso (incluido el aumento rápido de peso), pérdida de peso, mantenimiento de la pérdida de peso, o riesgo de volver a subir de peso después de la pérdida de peso.

En algunas modalidades, el agente de ARNi se administra a un sujeto en una cantidad eficaz para inhibir la expresión de TTR en una célula dentro del sujeto. La cantidad eficaz para inhibir la expresión de la TTR en una célula dentro de un sujeto puede evaluarse mediante los métodos descritos anteriormente, incluidos los métodos que implican la evaluación de la inhibición del ARNm de la TTR, proteína TTR, o variables relacionadas, como una reducción en la gravedad de un síntoma de un trastorno asociado con la TTR, *p. ej.*, reducción de la neuropatía sensitiva (*p. ej.*, parestesia, hipoestesia en las extremidades distales), neuropatía autonómica (*p. ej.*, disfunción gastrointestinal, como úlcera gástrica, o hipotensión ortostática), neuropatía motora, convulsiones, demencia, mielopatía, polineuropatía, síndrome del túnel carpiano, insuficiencia autonómica, miocardiopatía, opacidades vítreas, insuficiencia renal, nefropatía, reducción sustancial del IMCm (índice de masa corporal modificado), disfunción del nervio craneal, y la distrofia de la red de la córnea.

Un ARNi de la invención puede administrarse como un “ARNi libre”. Un ARNi libre se administra en ausencia de una composición farmacéutica. El ARNi desnudo puede estar en una solución amortiguadora adecuada. La solución amortiguadora puede comprender acetato, citrato, prolamina, carbonato o fosfato, o cualquier combinación de estos. En una modalidad, la solución amortiguadora es solución salina amortiguada con fosfato (PBS). El pH y la osmolaridad de la solución amortiguada que contiene el ARNi pueden ajustarse de manera que sea adecuado para administrar a un sujeto.

Alternativamente, un ARNi de la invención puede administrarse como una composición farmacéutica, tal como una formulación liposómica de ARNbc.

Los sujetos que se beneficiarían de una inhibición de la expresión génica de la TTR son sujetos susceptibles o diagnosticados con un trastorno asociado a TTR, tal como amiloidosis sistémica senil (SSA), amiloidosis familiar sistémica, polineuropatía amiloidótica familiar (FAP), miocardiopatía amiloidótica familiar (FAC), amiloidosis leptomeníngea/del sistema nervioso central (CNS), hipertiroxinemia, una enfermedad ocular, *p. ej.*, la enfermedad de Stargardt, retinopatía diabética, degeneración macular asociada a la edad (AMD), *p. ej.*, AMD seca y AMD húmeda; un trastorno metabólico, *p. ej.*, un trastorno de la homeostasis de la glucosa y los lípidos, *p. ej.*, resistencia a la insulina asociada con la diabetes tipo II, y una enfermedad cardiovascular. En una modalidad, el método incluye administrar una composición que se presenta en la presente descripción de manera que la expresión del gen TTR diana disminuye, tal como durante aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 1-6, 1-3 o 3-6 meses por dosis. En determinadas modalidades, la composición se administra una vez cada 3-6 meses.

En algunas modalidades, los ARNi útiles para los métodos y composiciones que se presentan en la presente descripción se dirigen específicamente a los ARN (primarios o procesados) del gen TTR diana. Las composiciones y métodos para inhibir la expresión de estos genes usando ARNi pueden prepararse y realizarse como se describe en la presente descripción.

La administración del ARNi de acuerdo con los métodos de la invención puede resultar en la prevención o el tratamiento de un trastorno asociado a la TTR, *p. ej.*, amiloidosis sistémica senil (SSA), amiloidosis familiar sistémica, polineuropatía amiloidótica familiar (FAP), miocardiopatía amiloidótica familiar (FAC), amiloidosis leptomeníngea/del sistema nervioso central (CNS), hipertiroxinemia, una enfermedad ocular, *p. ej.*, la enfermedad de Stargardt, retinopatía diabética, degeneración macular asociada a la edad (AMD), *p. ej.*, AMD seca y AMD húmeda; un trastorno metabólico, *p. ej.*, un trastorno de la homeostasis de la glucosa y los lípidos, *p. ej.*, resistencia a la insulina asociada con la diabetes tipo II, y una enfermedad cardiovascular. A los sujetos se les puede administrar una

cantidad terapéutica de ARNi, tal como aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 200 mg/kg.

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

La administración puede repetirse regularmente. En determinadas modalidades, después de un régimen de tratamiento inicial, los tratamientos pueden administrarse con menos frecuencia. Un régimen de dosis repetida puede incluir la administración de una cantidad terapéutica de ARNi de forma regular, tal como una vez al mes a una vez al año. En determinadas modalidades, el ARNi se administra aproximadamente una vez al mes a aproximadamente una vez cada tres meses, o aproximadamente una vez cada tres meses a aproximadamente una vez cada seis meses.

La invención proporciona además métodos y usos de un agente de ARNi o una composición farmacéutica de este para tratar a un sujeto que se beneficiaría de la reducción y/o inhibición de la expresión génica de la TTR, *por ejemplo*, un sujeto que tiene un trastorno asociado a TTR, en combinación con otros productos farmacéuticos y/u otros métodos terapéuticos, *por ejemplo*, con productos farmacéuticos conocidos o métodos terapéuticos conocidos, tales como, por ejemplo, los que se emplean actualmente para tratar los trastornos.

En consecuencia, en algunos aspectos de la invención, los métodos que incluyen la administración de un agente de ARNi de la invención, incluyen además administrar al sujeto uno o más agentes terapéuticos adicionales. Por ejemplo, en determinadas modalidades, un ARNi dirigido a TTR se administra en combinación con, p. ej., un agente útil para tratar un trastorno asociado a TTR. Las terapéuticas y los tratamientos adicionales ilustrativos para tratar un trastorno asociado a la TTR incluyen, un estabilizador de la TTR y un agente antiinflamatorio no esteroideo (NSAIDS), *p. ej.*, diflunisal, y diuréticos, y una combinación de cualquiera de los anteriores.

Un “agente terapéutico que estabiliza la TTR” o “que estabiliza un tetrámero de TTR” es un agente que reduce o evita la disociación de las subunidades de un tetrámero de TTR, *p. ej.*, en monómeros. En algunas modalidades, el agente reduce la formación de placas de amiloide de TTR, *p. ej.*, al reducir el nivel de monómeros de TTR o fragmentos proteolíticos de monómeros de TTR que forman placas de amiloide de TTR. Tales agentes incluyen, pero no se limitan a, tafamidis, diflunisal, y AG10.

El agente de ARNi y agentes terapéuticos adicionales pueden administrarse al mismo tiempo y/o en la misma combinación, *por ejemplo*, por vía parenteral, o el agente terapéutico adicional puede administrarse como parte de una composición separada o en momentos separados y/o por otro método conocido en la técnica o descrito en la presente descripción.

El agente de ARNi y un agente terapéutico adicional y/o tratamiento pueden administrarse al mismo tiempo y/o en la misma combinación, *por ejemplo*, por vía parenteral, o el agente terapéutico adicional puede administrarse como parte de una composición separada o en momentos separados y/o por otro método conocido en la técnica o descrito en la presente descripción.

VIII. Kits

En determinados aspectos, la presente descripción proporciona kits que incluyen un contenedor adecuado que contiene una formulación farmacéutica de un compuesto de ARNip, *por ejemplo*, un compuesto de ARNip bicatenario, o un compuesto de ARNip, (*por ejemplo*, un precursor, *por ejemplo*, un compuesto de ARNip más grande que puede procesarse en un compuesto de ARNip, o un ADN que codifica un compuesto de ARNip, *por ejemplo*, un compuesto de ARNip bicatenario, o un compuesto de ARNip, o precursor de estos).

Tales kits incluyen uno o más agente(s) de ARNbc e instrucciones para el uso, *por ejemplo*, instrucciones para administrar una cantidad profiláctica o terapéuticamente efectiva de un(os) agente(s) de ARNbc. El agente de ARNbc puede estar en un vial o en una jeringa

precargada. Los kits pueden comprender además, opcionalmente, medios para administrar el agente de ARNbc (*por ejemplo*, un dispositivo de inyección, tal como una jeringa precargada o un dispositivo autoinyector), o medios para medir la inhibición de la TTR (*por ejemplo*, medios para medir la inhibición del ARNm de la TTR, la proteína TTR y/o la actividad de la TTR). Tales medios para medir la inhibición de la TTR pueden comprender un medio para obtener una muestra de un sujeto, tal como, *por ejemplo*, una muestra de plasma. Los kits de la invención pueden comprender opcionalmente además medios para determinar la cantidad terapéuticamente efectiva o profilácticamente efectiva.

En determinadas modalidades, los componentes individuales de la formulación farmacéutica pueden proporcionarse en un contenedor, *por ejemplo*, un vial o una jeringa precargada. Alternativamente, puede ser conveniente proporcionar los componentes de la formulación farmacéutica por separado en dos o más contenedores, *por ejemplo*, un contenedor para una preparación de un compuesto de ARNip, y al menos otro para un compuesto portador. El kit puede empaquetarse en una serie de configuraciones diferentes, tales como uno o más contenedores en una sola caja. Los diferentes componentes se pueden combinar, *por ejemplo*, de acuerdo con las instrucciones proporcionadas con el kit. Los componentes pueden combinarse de acuerdo con un método que se describe en la presente descripción, *por ejemplo*, para preparar y administrar una composición farmacéutica. El kit también puede incluir un dispositivo de administración.

Esta invención se ilustra además con los siguientes ejemplos que no deben interpretarse como limitantes. Todo el contenido de todas las referencias, patentes y solicitudes de patentes publicadas mencionadas a lo largo de esta solicitud, así como las Figuras y el Listado de secuencias informal, se incorporan en la presente como referencia.

EJEMPLOS

Ejemplo 1. Síntesis de ARNi

Fuente de reactivos

Cuando la fuente de un reactivo no se proporciona específicamente en la presente
 5 descripción, dicho reactivo puede obtenerse de cualquier proveedor de reactivos para
 biología molecular en un estándar de calidad/pureza para su aplicación en biología
 molecular.

Diseño de ARNi_p

10 Los ARNi_p dirigidos a la 3'UTR del gen de la transtiretina humana (TTR) (humano:
 NCBI refseqID NM_000371.4, NCBI GeneID: 7276) se diseñaron mediante el uso de
 secuencias personalizadas de R y Python. El ARNm NM_000505.4 REFSEQ humano, tiene
 una longitud de 616 bases.

En la Tabla 2 se muestran listas detalladas de las secuencias de nucleótidos de
 15 cadena antisentido y de sentido de TTR no modificado. En la Tabla 3 se muestran listas
 detalladas de las secuencias de nucleótidos de cadena antisentido y sentido de TTR
 modificado.

Debe entenderse que, a lo largo de la solicitud, un nombre dúplex sin un decimal es
 equivalente a un nombre dúplex con un decimal que simplemente hace referencia al número
 20 de lote del dúplex. Por ejemplo, AD-959917 es equivalente a AD-959917.1.

Síntesis de ARNi_p

Los ARNi_p se diseñaron, sintetizaron y prepararon usando métodos conocidos en la
 técnica.

25 Brevemente, las secuencias de ARNi_p se sintetizaron en una escala de 1 μ mol
 usando un sintetizador Mermade 192 (BioAutomation) con química de fosforamidita en
 soportes sólidos. El soporte sólido era poro de vidrio controlado (500-1000 Å) cargado con
 un ligando GalNAc personalizado (conjugados 3'-GalNAc), soporte sólido universal (AM

Chemicals), o el primer nucleótido de interés. Los reactivos de síntesis auxiliares y los monómeros estándar de 2-cianoetil fosforamidita (2'-desoxi-2'-fluoro, 2'-O-metilo, ARN, ADN) se obtuvieron de Thermo-Fisher (Milwaukee, WI), Hongene (China) o Chemgenes (Wilmington, MA, EE. UU.). Se obtuvieron monómeros de fosforamidita adicionales de
 5 proveedores comerciales, se prepararon internamente o se obtuvieron mediante el uso de síntesis personalizada de varias CMO. Las fosforamiditas se prepararon a una concentración de 100 mM en acetonitrilo o acetonitrilo:DMF a 9:1 y se acoplaron usando 5-Etilitio-1H-tetrazol (ETT, 0,25 M en acetonitrilo) con un tiempo de reacción de 400 s. Los enlaces de fosforotioato se generaron mediante el uso de una solución de 100 mM de 3-
 10 ((Dimetilamino-metilideno) amino)-3H-1,2,4-ditiazol-3-tiona (DDTT, obtenido de Chemgenes (Wilmington, MA, EE. UU.)) en acetonitrilo/piridina anhidro (9:1 v/v). El tiempo de oxidación fue de 5 minutos. Todas las secuencias se sintetizaron con la eliminación final del grupo DMT ("DMT-Off").

Tras la finalización de la síntesis de fase sólida, los oligorribonucleótidos soportados
 15 por sólidos se trataron con 300 µL de metilamina (40 % acuoso) a temperatura ambiente en placas de 96 pocillos durante aproximadamente 2 horas para permitir la escisión del soporte sólido y la posterior eliminación de todos los grupos protectores bases lábiles adicionales. Para las secuencias que contienen cualquier enlace ribonucleótido natural (2'-OH) protegido con un grupo terc-butil dimetil silil (TBDMS), se realizó una segunda etapa de desprotección
 20 usando TEA.3HF (triethylamina trihidrofluoruro). A cada solución de oligonucleótidos en metilamina acuosa se añadió 200 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) y 300 µL de TEA.3HF y la solución se incubó durante aproximadamente 30 minutos a 60 °C. Después de la incubación, se permitió que la placa llegara a temperatura ambiente y los oligonucleótidos brutos se precipitaron mediante la adición de 1 ml de acetronitrilo:etanol 9:1 o
 25 etanol:isopropanol 1:1. A continuación, las placas se centrifugaron a 4 °C durante 45 minutos y el sobrenadante se decantó cuidadosamente con la ayuda de una pipeta multicanal. El sedimento oligonucleótido se resuspendió en 20 mM de NaOAc y se desaló posteriormente usando una columna de exclusión de tamaño HiTrap (5 ml, GE Healthcare)

en un sistema Agilent LC equipado con un muestreador automático, un detector UV, un medidor de conductividad y un colector de fracciones. Las muestras desaladas se recogieron en placas de 96 pocillos y luego se analizaron mediante LC-MS y espectrometría UV para confirmar la identidad y cuantificar la cantidad de material, respectivamente.

5 La duplicación de cadenas simples se realizó en un robot de manipulación de líquidos Tecan. Las cadenas simples sentido y antisentido se combinaron en una relación equimolar a una concentración final de 10 μ M en 1x PBS en placas de 96 pocillos, la placa se selló, se incubó a 100 °C durante 10 minutos y posteriormente se dejó volver lentamente a la temperatura ambiente durante un período de 2-3 horas. La concentración e identidad de
10 cada dúplex se confirmó y luego se usó posteriormente para ensayos de cribado *in vitro*.

Ejemplo 2. Métodos de cribado *in vitro*

Cultivo celular y transfecciones de 384 pocillos

Las células Hep3b (ATCC, Manassas, VA) se cultivan hasta una confluencia cercana
15 a 37 °C en una atmósfera de CO₂ al 5 % en Eagle's Minimum Essential Medium (Gibco) complementado con FBS al 10 % (ATCC) antes de ser liberadas de la placa por tripsinización. La transfección se lleva a cabo mediante la adición de 7,5 μ l de Opti-MEM más 0,1 μ l de Lipofectamina RNAiMax por pocillo (Invitrogen, Carlsbad CA. núm. de cat. 13778-150) a 2,5 μ l de cada dúplex de ARNip a un pocillo individual en una placa de 384
20 pocillos. La mezcla luego se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos. A continuación, se añade a la mezcla de ARNip cuarenta μ l de medio de cultivo completo sin antibiótico que contenía $\sim 1,5 \times 10^4$ células. Las células se incuban durante 24 horas antes de la purificación de ARN. Se realizan experimentos de dosis única a concentración dúplex final de 10 nM, 1 nM, y 0,1 nM.

25

Aislamiento del RNA total mediante el uso del Kit de aislamiento de ARNm

DYNABEADS (Invitrogen™, parte núm: 610-12)

Las células se lisan en 75 µl de amortiguador de lisis/de unión que contenía 3 µl de microesferas por pocillo y se mezclaron durante 10 minutos en un agitador electrostático. Los pasos de lavado se automatizaron en un Biotek EL406, usando un soporte de placa magnética. Las microesferas se lavan (en 90 µl) una vez en el amortiguador A, una vez en el amortiguador B y dos veces en el amortiguador E, con pasos de aspiración entre medio. Después de una aspiración final, se añade una mezcla a RT de 10 µl completa a cada pocillo, como se describe a continuación.

Síntesis de ADNc mediante el uso del kit de transcripción inversa de ADNc de alta capacidad ABI (Applied Biosystems, Foster City, CA, núm. de cat. 4368813)

Se añade por pocillo una mezcla maestra de 1 µl de amortiguador 10X, 0,4 l de dNTP 25X, 1l de cebadores aleatorios, 0,5 l de transcriptasa inversa, 0,5 l de inhibidor de ARNasa y 6,6 l de H₂O por reacción. Las placas se sellan, se agitan durante 10 minutos en un agitador electrostático y luego se incubaron a 37 °C durante 2 horas. Después de esto, las placas se agitaron a 80°C durante 8 minutos.

PCR en tiempo real

Se añaden dos microlitros (µl) de ADNc a una mezcla maestra que contiene 0,5 µl de la sonda GAPDH TaqMan humana (4326317E), 0,5 µl de TTR humana, 2 µl de agua libre de nucleasas y 5 µl de una mezcla maestra de sonda Lightcycler 480 (Roche núm. de cat. 04887301001) por pocillo en una placa de 384 pocillos (Roche núm. de cat. 04887301001). La PCR en tiempo real se realiza en un sistema LightCycler480 Real Time PCR (Roche).

Para calcular el factor de multiplicación relativo, los datos se analizan usando el método $\Delta\Delta C_t$ y se normalizan a ensayos realizados con células transfectadas con 10nM AD-1955, o células transfectadas simuladas. Las CI_{50} se calculan usando un modelo de ajuste de 4 parámetros usando XLFit y se normalizan a células transfectadas con AD-1955 o

simuladas transfectadas. Las secuencias de sentido y de antisentido de AD-1955 son:

sentido: cuuAcGcuGAGuAcuucGAdTsdT y antisentido UCGAAGuACUcAGCGuAAGdTsdT.

Los resultados de los cribados de dosis única de los dúplex de las Tablas 2 y 3 en células de hepatocitos de Cynomolgus se proporcionan en la Tabla 4.

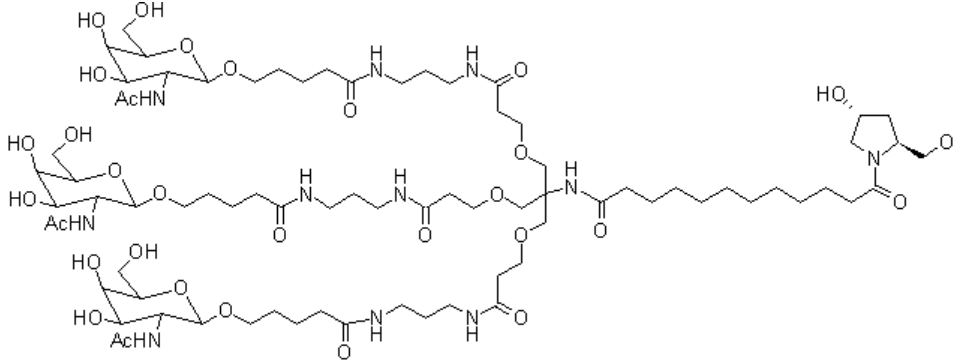
5

Tabla 1. Abreviaturas de monómeros de nucleótidos usadas en la representación de secuencias de ácidos nucleicos. Se debe entender que estos monómeros, cuando están presentes en un oligonucleótido, están unidos mutuamente por enlaces 5'-3'-fosfodiéster; y se entiende que cuando el nucleótido contiene una modificación 2'-fluoro, entonces el fluoro reemplaza el hidroxilo en esa posición en el nucleótido original (*es decir*, es un 2'-desoxi-2'-fluoronucleótido).

10

Abreviatura	Nucleótido(s)
A	Adenosina-3'-fosfato
Ab	beta-L-adenosina-3'-fosfato
Abs	beta-L-adenosina-3'-fosforotioato
Af	2'-fluoroadenosina-3'-fosfato
Afs	2'-fluoroadenosina-3'-fosforotioato
As	adenosina-3'-fosforotioato
C	citidina-3'-fosfato
Cb	beta-L-citidina-3'-fosfato
Cbs	beta-L-citidina-3'-fosforotioato
Cf	2'-fluorocitidina-3'-fosfato
Cfs	2'-fluorocitidina-3'-fosforotioato
Cs	citidina-3'-fosforotioato
G	guanosina-3'-fosfato
Gb	beta-L-guanosina-3'-fosfato
Gbs	beta-L-guanosina-3'-fosforotioato

Abreviatura	Nucleótido(s)
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
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	enlace de fosforotioato
L10	N-(coilesterilcarboxamidocaproil)-4-hidroxirolinol (Hyp-C6-Chol)

Abreviatura	Nucleótido(s)
L96	N-[tris(GalNAc-alquilo)-amidodecanoil]-4-hidroxiprolinol (Hyp-(GalNAc-alquilo)3) 
Y34	2-hidroximetil-tetrahidrofurano-4-metoxi-3-fosfato (abásico 2'-OMe furanosa)
Y44	ADN abásico invertido (2-hidroximetil-tetrahidrofurano-5-fosfato)
(Agn)	Ácido nucleico de adenosina-glicol (GNA)
(Cgn)	Ácido nucleico de citidina-glicol (GNA)
(Ggn)	Ácido nucleico de guanosina-glicol (GNA)
(Tgn)	S-Isómero del ácido nucleico de timidina-glicol (GNA)
P	Fosfato
VP	Vinilfosfonato
dA	2'-desoxiadenosina-3'-fosfato
dAs	2'-desoxiadenosina-3'-fosforotioato
dC	2'-desoxicitidina-3'-fosfato
dCs	2'-desoxicitidina-3'-fosforotioato
dG	2'-desoxiguanosina-3'-fosfato
dGs	2'-desoxiguanosina-3'-fosforotioato
dT	2'-desoxitimidina-3'-fosfato
dTs	2'-desoxitimidina-3'-fosforotioato
dU	2'-desoxiuridina

Abbreviatura	Nucleótido(s)
dUs	2`-desoxiuridina-3`-fosforotioato
(C2p)	citidina-2`-fosfato
(G2p)	guanosina-2'-fosfato
(U2p)	uridina-2'-fosfato
(A2p)	adenosina-2'-fosfato
(Chd)	2'-O-hexadecil-citidina-3'-fosfato
(Ahd)	2'-O-hexadecil-adenosina-3'-fosfato
(Ghd)	2'-O-hexadecil-guanosina-3'-fosfato
(Uhd)	2'-O-hexadecil-uridina-3'-fosfato

Tabla 2. Secuencias de cadena de sentido y antisentido no modificadas de agentes de ARNbc de TTR

Nombre dúplex	Secuencia de sentido 5' a 3'	SEQ ID NO:	Secuencia de antisentido 5' a 3'	SEQ ID NO:	Rango en NM_000371.4
AD-649237	CUGAAGGACGAGGGAUGGGAU		AUCCCAUCCCUCGUCCUUCAGGU		600-622
AD-649238	UGAAGGACGAGGGAUGGGAUU		AAUCCCAUCCCUCGUCCUUCAGG		601-623
AD-649239	GAAGGACGAGGGAUGGGAUUU		AAAUCCCAUCCCUCGUCCUUCAG		602-624
AD-649240	AAGGACGAGGGAUGGGAUUUU		AAAAUCCCAUCCCUCGUCCUUCA		603-625
AD-649241	AGGACGAGGGAUGGGAUUUCA		UGAAAUCCCAUCCCUCGUCCUUC		604-626
AD-649242	GGACGAGGGAUGGGAUUUCAU		AUGAAAUCCCAUCCCUCGUCCUU		605-627
AD-649243	GACGAGGGAUGGGAUUUCAUU		AAUGAAAUCCCAUCCCUCGUCCU		606-628
AD-649244	ACGAGGGAUGGGAUUUCAUGU		ACAUGAAAUCCCAUCCCUCGUCC		607-629
AD-649245	CGAGGGAUGGGAUUUCAUGUA		UACAUGAAAUCCCAUCCCUCGUC		608-630
AD-649246	GAGGGAUGGGAUUUCAUGUAA		UUACAUGAAAUCCCAUCCCUCGU		609-631
AD-649247	AGGGAUGGGAUUUCAUGUAAU		AUUACAUGAAAUCCCAUCCCUCG		610-632
AD-649248	GGAUGGGAUUUCAUGUAACU		AGUUACAUGAAAUCCCAUCCCUC		611-633
AD-649249	GGAUGGGAUUUCAUGUAACCA		UGGUUACAUGAAAUCCCAUCCCU		612-634
AD-649250	GAUGGGAUUUCAUGUAACCAA		UUGGUUACAUGAAAUCCCAUCCC		613-635

Nombre dúplex	Secuencia de sentido 5' a 3'	SEQ ID NO:	Secuencia de antisentido 5' a 3'	SEQ ID NO:	Rango en NM_000371.4
AD-649251	AUGGGAUUUCAUGUAACCAAU		AUUGGUUACAUGAAAUCCCAUCC		614-636
AD-649252	GGGAUUUCAUGUAACCAAGAU		AUCUUGGUUACAUGAAAUCCCAU		616-638
AD-649253	GGAUUUCAUGUAACCAAGAGU		ACUCUUGGUUACAUGAAAUCCCA		617-639
AD-649254	GAUUUCAUGUAACCAAGAGUA		UACUCUUGGUUACAUGAAAUCCC		618-640
AD-649255	AUUUCAUGUAACCAAGAGUAU		AUACUCUUGGUUACAUGAAAUCC		619-641
AD-649256	UUCAUGUAACCAAGAGUAUUU		AAAUACUCUUGGUUACAUGAAAU		621-643
AD-649258	CAUGUAACCAAGAGUAUUCCA		UGGAAUACUCUUGGUUACAUGAA		623-645
AD-649259	AUGUAACCAAGAGUAUUCCA		AUGGAAUACUCUUGGUUACAUGA		624-646
AD-649260	GUAACCAAGAGUAUUCCAUUU		AAAUUGGAAUACUCUUGGUUACAU		626-648
AD-649261	UAACCAAGAGUAUUCCAUUUU		AAAUGGAAUACUCUUGGUUACA		627-649
AD-649262	ACCAAGAGUAUUCCAUUUUUA		UAAAAUGGAAUACUCUUGGUUA		629-651
AD-649263	CCAAGAGUAUUCCAUUUUUAU		AUAAAAUGGAAUACUCUUGGUU		630-652
AD-649264	CAAGAGUAUUCCAUUUUUACU		AGUAAAAUGGAAUACUCUUGGU		631-653
AD-649265	AAGAGUAUUCCAUUUUUACUA		UAGUAAAAUGGAAUACUCUUGG		632-654
AD-649266	AGAGUAUUCCAUUUUUACUAA		UUAGUAAAAUGGAAUACUCUUG		633-655

Nombre dúplex	Secuencia de sentido 5' a 3'	SEQ ID NO:	Secuencia de antisentido 5' a 3'	SEQ ID NO:	Rango en NM_000371.4
AD-649267	GAGUAUCCAUUUUUACUAAA		UUUAGUAAAAAUGGAAUACUCUU		634-656
AD-649268	AGUAUCCAUUUUUACUAAAU		AUUUAGUAAAAAUGGAAUACUCU		635-657
AD-649269	GUAUCCAUUUUUACUAAAGU		ACUUUAGUAAAAAUGGAAUACUC		636-658
AD-649270	UAUCCAUUUUUACUAAAGCA		UGC UUUAGUAAAAAUGGAAUACU		637-659
AD-649271	AUCCAUUUUUACUAAAGCAU		AUGCUUUAGUAAAAAUGGAAUAC		638-660
AD-649272	UCCAUUUUUACUAAAGCAGU		ACUGCUUUAGUAAAAAUGGAAUA		639-661
AD-649274	CCAUUUUUACUAAAGCAGUGU		ACACUGCUUUAGUAAAAAUGGAA		641-663
AD-649275	CAUUUUUACUAAAGCAGUGUU		AACACUGCUUUAGUAAAAAUGGA		642-664
AD-649276	AUUUUUACUAAAGCAGUGUUU		AAACACUGCUUUAGUAAAAAUGG		643-665
AD-649277	UUUUACUAAAGCAGUGUUUUU		AAAAACACUGCUUUAGUAAAAAU		645-667
AD-649278	UUUACUAAAGCAGUGUUUUCA		UGAAAACACUGCUUUAGUAAAAA		646-668
AD-649279	UUACUAAAGCAGUGUUUUCAU		AUGAAAACACUGCUUUAGUAAAA		647-669
AD-649280	UACUAAAGCAGUGUUUUCACU		AGUGAAAACACUGCUUUAGUAAA		648-670
AD-649281	ACUAAAGCAGUGUUUUCACCU		AGGUGAAAACACUGCUUUAGUAA		649-671
AD-649282	CUAAAGCAGUGUUUUCACCUU		AAGGUGAAAACACUGCUUUAGUA		650-672

Nombre dúplex	Secuencia de sentido 5' a 3'	SEQ ID NO:	Secuencia de antisentido 5' a 3'	SEQ ID NO:	Rango en NM_000371.4
AD-649283	UAAAGCAGUGUUUUCACCUCA		UGAGGUGAAAACACUGCUUUAGU		651-673
AD-649284	AAAGCAGUGUUUUCACCUCAU		AUGAGGUGAAAACACUGCUUUAG		652-674
AD-649285	AAGCAGUGUUUUCACCUCAUA		UAUGAGGUGAAAACACUGCUUUA		653-675
AD-649286	AGCAGUGUUUUCACCUCAUUAU		AUAUGAGGUGAAAACACUGCUUU		654-676
AD-649287	AGAAGUCCAGGCAGAGACAAU		AUUGUCUCUGCCUGGACUUCUAA		683-705
AD-649288	GAAGUCCAGGCAGAGACAAUA		UAUUGUCUCUGCCUGGACUUCUA		684-706
AD-649290	AGUCCAGGCAGAGACAAUAAA		UUUAUUGUCUCUGCCUGGACUUC		686-708
AD-649291	GUCCAGGCAGAGACAAUAAAA		UUUUAUUGUCUCUGCCUGGACUU		687-709
AD-649292	UCCAGGCAGAGACAAUAAAAU		AUUUUAUUGUCUCUGCCUGGACU		688-710
AD-649293	CCAGGCAGAGACAAUAAAACA		UGUUUUAUUGUCUCUGCCUGGAC		689-711
AD-649294	CAGGCAGAGACAAUAAAACAU		AUGUUUUAUUGUCUCUGCCUGGA		690-712
AD-649295	AGGCAGAGACAAUAAAACAUU		AAUGUUUUAUUGUCUCUGCCUGG		691-713
AD-649296	GGCAGAGACAAUAAAACAUUU		AAAUGUUUUAUUGUCUCUGCCUG		692-714
AD-649297	GCAGAGACAAUAAAACAUUCU		AGAAUGUUUUAUUGUCUCUGCCU		693-715
AD-649298	AGAGACAAUAAAACAUUCCUU		AAGGAAUGUUUUAUUGUCUCUGC		695-717

Nombre dúplex	Secuencia de sentido 5' a 3'	SEQ ID NO:	Secuencia de antisentido 5' a 3'	SEQ ID NO:	Rango en NM_000371.4
AD-649299	GAGACAAUAAAACAUUCCUGU		ACAGGAAUGUUUUUUAUUGUCUCUG		696-718
AD-649300	AGACAAUAAAACAUUCCUGUU		AACAGGAAUGUUUUUUAUUGUCUCU		697-719
AD-649301	GACAAUAAAACAUUCCUGUGA		UCACAGGAAUGUUUUUUAUUGUCUC		698-720
AD-649302	ACAAUAAAACAUUCCUGUGAA		UUCACAGGAAUGUUUUUUAUUGUCU		699-721
AD-649303	AAUAAAACAUUCCUGUGAAAU		AUUUCACAGGAAUGUUUUUUAUUGU		701-723
AD-649304	AUAAAACAUUCCUGUGAAAGU		ACUUUCACAGGAAUGUUUUUUAUUG		702-724
AD-649305	UAAAACAUUCCUGUGAAAGGU		ACCUUUCACAGGAAUGUUUUUAUU		703-725
AD-649306	AAAACAUUCCUGUGAAAGGCA		UGCCUUUCACAGGAAUGUUUUUAU		704-726
AD-649307	AAACAUUCCUGUGAAAGGCAU		AUGCCUUUCACAGGAAUGUUUUUA		705-727
AD-649308	AACAUUCCUGUGAAAGGCACU		AGUGCCUUUCACAGGAAUGUUUU		706-728
AD-649309	ACAUUCCUGUGAAAGGCACUU		AAGUGCCUUUCACAGGAAUGUUU		707-729
AD-649310	CAUUCCUGUGAAAGGCACUUU		AAAGUGCCUUUCACAGGAAUGUU		708-730
AD-649311	AUUCCUGUGAAAGGCACUUUU		AAAAGUGCCUUUCACAGGAAUGU		709-731
AD-649312	UUCCUGUGAAAGGCACUUUUU		AAAAAGUGCCUUUCACAGGAAUG		710-732
AD-649313	UCCUGUGAAAGGCACUUUUCA		UGAAAAGUGCCUUUCACAGGAU		711-733

Nombre dúplex	Secuencia de sentido 5' a 3'	SEQ ID NO:	Secuencia de antisentido 5' a 3'	SEQ ID NO:	Rango en NM_000371.4
AD-649314	CCUGUGAAAGGCACUUUUCAU		AUGAAAAGUGCCUUUCACAGGAA		712-734
AD-649315	CUGUGAAAGGCACUUUUCAUU		AAUGAAAAGUGCCUUUCACAGGA		713-735
AD-649316	UGUGAAAGGCACUUUUCAUUU		AAAUGAAAAGUGCCUUUCACAGG		714-736
AD-649318	UGAAAGGCACUUUUCAUUCCA		UGGAAUGAAAAGUGCCUUUCACA		716-738
AD-649319	GAAAGGCACUUUUCAUUCCAU		AUGGAAUGAAAAGUGCCUUUCAC		717-739
AD-649320	CUGAAGGACGAGGGAUGGGAU		AUCCCATCCCUCGUCCUUCAGGU		600-622
AD-649321	UGAAGGACGAGGGAUGGGAUU		AAUCCCAUCCCUCGUCCUUCAGG		601-623
AD-649322	GAAGGACGAGGGAUGGGAUUU		AAAUCCCAUCCCUCGUCCUUCAG		602-624
AD-649323	AAGGACGAGGGAUGGGAUUUU		AAAUCCCAUCCCUCGUCCUUCA		603-625
AD-649324	AGGACGAGGGAUGGGAUUUCA		UGAAAUCCCAUCCCUCGUCCUUC		604-626
AD-649325	GGACGAGGGAUGGGAUUUCAU		AUGAAATCCCAUCCCUCGUCCUU		605-627
AD-649326	GACGAGGGAUGGGAUUUCAUU		AAUGAAAUCCCAUCCCUCGUCCU		606-628
AD-649327	ACGAGGGAUGGGAUUUCAUGU		ACAUGAAAUCCCAUCCCUCGUCC		607-629
AD-649328	CGAGGGAUGGGAUUUCAUGUA		UACAUGAAAUCCCAUCCCUCGUC		608-630
AD-649329	GAGGGAUGGGAUUUCAUGUAA		UUACATGAAAUCCCAUCCCUCGU		609-631

Nombre dúplex	Secuencia de sentido 5' a 3'	SEQ ID NO:	Secuencia de antisentido 5' a 3'	SEQ ID NO:	Rango en NM_000371.4
AD-649330	AGGGAUGGGAUUUCAUGUAAU		AUUACATGAAAUCCCAUCCCUCG		610-632
AD-649331	GGGAUGGGAUUUCAUGUAACU		AGUUACAUGAAAUCCCAUCCCUC		611-633
AD-649332	GGAUGGGAUUUCAUGUAACCA		UGGUUACAUGAAAUCCCAUCCCU		612-634
AD-649333	GAUGGGAUUUCAUGUAACCAA		UUGGUUACAUGAAAUCCCAUCCC		613-635
AD-649334	AUGGGAUUUCAUGUAACCAAU		AUUGGUTACAUGAAAUCCCAUCC		614-636
AD-649335	UGGGAUUUCAUGUAACCAAGA		UCUUGGTUACAUGAAAUCCCAUC		505-527
AD-649336	GGGAUUUCAUGUAACCAAGAU		AUCUUGGTUACAUGAAAUCCCAU		616-638
AD-649337	GGAUUUCAUGUAACCAAGAGU		ACUCUTGGUUACAUGAAAUCCCA		617-639
AD-649338	GAUUUCAUGUAACCAAGAGUA		UACUCUTGGUUACAUGAAAUCCC		618-640
AD-649339	AUUUCAUGUAACCAAGAGUAU		AUACUCTUGGUUACAUGAAAUCC		619-641
AD-649340	UUUCAUGUAACCAAGAGUAUU		AAUACUCUUGGUUACAUGAAAUC		620-642
AD-649341	UUCAUGUAACCAAGAGUAUUU		AAUACTCUUGGUUACAUGAAAU		621-643
AD-649342	UCAUGUAACCAAGAGUAUUCU		AGAAUACUCUUGGUUACAUGAAA		622-644
AD-649343	CAUGUAACCAAGAGUAUUCCA		UGGAAUACUCUUGGUUACAUGAA		623-645
AD-649344	AUGUAACCAAGAGUAUCCAU		AUGGAATACUCUUGGUUACAUGA		624-646

Nombre dúplex	Secuencia de sentido 5' a 3'	SEQ ID NO:	Secuencia de antisentido 5' a 3'	SEQ ID NO:	Rango en NM_000371.4
AD-649345	UGUAACCAAGAGUAUCCA UU		AAUGGAAUACUCUUGGUUACAUG		625-647
AD-649346	GUAACCAAGAGUAUCCA UUU		AAAUGGAAUACUCUUGGUUACAU		626-648
AD-649347	UAACCAAGAGUAUCCA UUUU		AAA AUGGAAUACUCUUGGUUACA		627-649
AD-649348	ACCAAGAGUAUCCA UUUUUA		UAAAAATGGAAUACUCUUGGUUA		629-651
AD-649349	CCAAGAGUAUCCA UUUUUUAU		AUAAAAAUGGAAUACUCUUGGUU		630-652
AD-649350	CAAGAGUAUCCA UUUUUUACU		AGUAAAAAUGGAAUACUCUUGGU		631-653
AD-649351	AAGAGUAUCCA UUUUUUACUA		UAGUAAAAAUGGAAUACUCUUGG		632-654
AD-649352	AGAGUAUCCA UUUUUUACUAA		UUAGUAAAAAUGGAAUACUCUUG		633-655
AD-649353	GAGUAUCCA UUUUUUACUAAA		UUUAGUAAAAAUGGAAUACUCUU		634-656
AD-649354	AGUAUCCA UUUUUUACUAAAU		AUUUAGTAAAAAUGGAAUACUCU		635-657
AD-649355	GUAUCCA UUUUUUACUAAAGU		ACUUUAGUAAAAAUGGAAUACUC		636-658
AD-649356	UAUCCA UUUUUUACUAAAGCA		UGC UUUAGUAAAAAUGGAAUACU		637-659
AD-649357	AUCCA UUUUUUACUAAAGCAU		AUGCUUTAGUAAAAAUGGAAUAC		638-660
AD-649358	UCCA UUUUUUACUAAAGCAGU		ACUGCUTUAGUAAAAAUGGAAUA		639-661
AD-649359	UCCA UUUUUUACUAAAGCAGUU		AACUGCTUUAGUAAAAAUGGAAU		640-662

Nombre dúplex	Secuencia de sentido 5' a 3'	SEQ ID NO:	Secuencia de antisentido 5' a 3'	SEQ ID NO:	Rango en NM_000371.4
AD-649360	CCAUUUUUACUAAAGCAGUGU		ACACUGCUUUAGUAAAAAUGGAA		641-663
AD-649361	CAUUUUUUACUAAAGCAGUGUU		AACACTGCUUUAGUAAAAAUGGA		642-664
AD-649362	AUUUUUUACUAAAGCAGUGUUU		AAACACTGCUUUAGUAAAAAUGG		643-665
AD-649363	UUUUUUACUAAAGCAGUGUUUU		AAAACACUGCUUUAGUAAAAAUG		644-666
AD-649364	UUUUACUAAAGCAGUGUUUUU		AAAAACACUGCUUUAGUAAAAAU		645-667
AD-649365	UUUACUAAAGCAGUGUUUUCA		UGAAAACACUGCUUUAGUAAAA		646-668
AD-649366	UUACUAAAGCAGUGUUUUCAU		AUGAAAACACUGCUUUAGUAAAA		647-669
AD-649367	UACUAAAGCAGUGUUUUCACU		AGUGAAAACACUGCUUUAGUAAA		648-670
AD-649368	ACUAAAGCAGUGUUUUCACCU		AGGUGAAAACACUGCUUUAGUAA		649-671
AD-649369	CUAAAGCAGUGUUUUCACCUU		AAGGUGAAAACACUGCUUUAGUA		650-672
AD-649370	UAAAGCAGUGUUUUCACCUCA		UGAGGTGAAAACACUGCUUUAGU		651-673
AD-649371	AAAGCAGUGUUUUCACCUCAU		AUGAGGTGAAAACACUGCUUUAG		652-674
AD-649372	AAGCAGUGUUUUCACCUCAUA		UAUGAGGTGAAAACACUGCUUUA		653-675
AD-649373	AGCAGUGUUUUCACCUCAUUA		AUAUGAGGUGAAAACACUGCUUU		654-676
AD-649374	AGAAGUCCAGGCAGAGACAAU		AUUGUCTCUGCCUGGACUUCUAA		683-705

Nombre dúplex	Secuencia de sentido 5' a 3'	SEQ ID NO:	Secuencia de antisentido 5' a 3'	SEQ ID NO:	Rango en NM_000371.4
AD-649375	GAAGUCCAGGCAGAGACAAUA		UAUUGUCUCUGCCUGGACUUCUA		684-706
AD-649376	AAGUCCAGGCAGAGACAAUAA		UUAUUGTCUCUGCCUGGACUUCU		685-707
AD-649377	AGUCCAGGCAGAGACAAUAAA		UUUAUTGUCUCUGCCUGGACUUC		686-708
AD-649378	GUCCAGGCAGAGACAAUAAAA		UUUUAUTGUCUCUGCCUGGACUU		687-709
AD-649379	UCCAGGCAGAGACAAUAAAAU		AUUUUATUGUCUCUGCCUGGACU		688-710
AD-649380	CCAGGCAGAGACAAUAAAACA		UGUUUUUAUUGUCUCUGCCUGGAC		689-711
AD-649381	CAGGCAGAGACAAUAAAACAU		AUGUUUTAUUGUCUCUGCCUGGA		690-712
AD-649382	AGGCAGAGACAAUAAAACAUU		AAUGUUTUAUUGUCUCUGCCUGG		691-713
AD-649383	GGCAGAGACAAUAAAACAUUU		AAAUGUTUUAUUGUCUCUGCCUG		692-714
AD-649384	GCAGAGACAAUAAAACAUUCU		AGAAUGTUUUUAUUGUCUCUGCCU		693-715
AD-649385	AGAGACAAUAAAACAUUCCUU		AAGGAATGUUUUAUUGUCUCUGC		695-717
AD-649386	GAGACAAUAAAACAUUCCUGU		ACAGGAAUGUUUUUAUUGUCUCUG		696-718
AD-649388	GACAAUAAAACAUUCCUGUGA		UCACAGGAAUGUUUUUAUUGUCUC		698-720
AD-649389	ACAAUAAAACAUUCCUGUGAA		UUCACAGGAAUGUUUUUAUUGUCU		699-721
AD-649390	CAAUAAAACAUUCCUGUGAAA		UUUCACAGGAAUGUUUUUAUUGUC		700-722

Nombre dúplex	Secuencia de sentido 5' a 3'	SEQ ID NO:	Secuencia de antisentido 5' a 3'	SEQ ID NO:	Rango en NM_000371.4
AD-649391	AAUAAAACAUUCCUGUGAAAU		AUUUCACAGGAAUGUUUUAUUGU		701-723
AD-649392	AUAAAACAUUCCUGUGAAAGU		ACUUUCACAGGAAUGUUUUAUUG		702-724
AD-649394	AAAACAUUCCUGUGAAAGGCA		UGCCUUTCACAGGAAUGUUUUAU		704-726
AD-649395	AAACAUUCCUGUGAAAGGCAU		AUGCCUTUCACAGGAAUGUUUUA		705-727
AD-649396	AACAUUCCUGUGAAAGGCACU		AGUGCCTUUCACAGGAAUGUUUU		706-728
AD-649397	ACAUUCCUGUGAAAGGCACUU		AAGUGCCUUUCACAGGAAUGUUU		707-729
AD-649398	CAUUCCUGUGAAAGGCACUUU		AAAGUGCCUUUCACAGGAAUGUU		708-730
AD-649399	AUUCCUGUGAAAGGCACUUUU		AAAAGTGCCUUUCACAGGAAUGU		709-731
AD-649400	UUCCUGUGAAAGGCACUUUUU		AAAAAGTGCCUUUCACAGGAAUG		710-732
AD-649401	UCCUGUGAAAGGCACUUUUCA		UGAAAAGUGCCUUUCACAGGAU		711-733
AD-649402	CCUGUGAAAGGCACUUUUCAU		AUGAAAAGUGCCUUUCACAGGAA		712-734
AD-649403	CUGUGAAAGGCACUUUUCAUU		AAUGAAAAGUGCCUUUCACAGGA		713-735
AD-649404	UGUGAAAGGCACUUUUCAUUU		AAAUGAAAAGUGCCUUUCACAGG		714-736
AD-649405	GUGAAAGGCACUUUUCAUUCU		AGAAUGAAAAGUGCCUUUCACAG		715-737
AD-649406	UGAAAGGCACUUUUCAUUCCA		UGGAATGAAAAGUGCCUUUCACA		716-738

Nombre dúplex	Secuencia de sentido 5' a 3'	SEQ ID NO:	Secuencia de antisentido 5' a 3'	SEQ ID NO:	Rango en NM_000371.4
AD-649407	GAAAGGCACUUUUCAUCCAU		AUGGAATGAAAAGUGCCUUUCAC		717-739
AD-68315	UGUAACCAAGAGUAUCCAUU		AAUGGAAUACUCUUGGUUACAUG		625-647
AD-68316	AACCAAGAGUAUCCAUUUUU		AAAAAUGGAAUACUCUUGGUUAC		628-650
AD-68317	CAGAGACAAUAAAACAUUCCU		AGGAAUGUUUUUAUUGUCUCUGCC		694-716
AD-68318	UUUUUACUAAAGCAGUGUUUU		AAAACACUGCUUUAGUAAAAAUG		644-666
AD-68326	UUUCAUGUAACCAAGAGUAUU		AAUACUCUUGGUUACAUGAAAUC		620-642
AD-68327	CAAUAAAACAUUCCUGUGAAA		UUUCACAGGAAUGUUUUUAUUGUC		700-722
AD-157442.5	AACCAAGAGUAUCCAUUUUU		AAAAATGGAAUACUCUUGGUUAC		628-650
AD-157470.8	CAGAGACAAUAAAACAUUCCU		AGGAATGUUUUAUUGUCUCUGCC		694-716
AD-65480	UGGGAUUUCAUGUAACCAAGA		UCUUGGUUACAUGAAAUCCCAUC		505-527

Tabla 3. Secuencias de cadena de sentido y antisentido modificadas de agentes de ARNbc de TTR

Nombr e dúplex	Secuencia de sentido 5' a 3'	SE Q ID NO:	Secuencia de antisentido 5' a 3'	SEQ ID NO:	Secuencia diana del ARNm	SEQ ID NO:
AD- 649237	csusgaagGfaCfGfAfgggauggga uL96		asUfscCccAfucccucgUfcCfuucag sgsu		ACCUGAAGGACGAGGGAUGGGA U	
AD- 649238	usgsaaggAfcGfAfGfggaugggau uL96		asAfsuccCfaucccucGfuCfcuuca sgsg		CCUGAAGGACGAGGGAUGGGAU U	
AD- 649239	gsasaggaCfGfAfGfGfaugggauu uL96		asAfsaucCfcaucccuCfGufccuuc sasg		CUGAAGGACGAGGGAUGGGAUU U	
AD- 649240	asasggacGfaGfGfGfaugggauuu uL96		asAfsaauCfccaucccUfcGfuccuu scsa		UGAAGGACGAGGGAUGGGAUUU C	
AD- 649241	asgsgacgAfgGfGfAfugggauuuc aL96		usGfsaaaUfcccuccCfuCfgucc ususc		GAAGGACGAGGGAUGGGAUUUC A	

Nombr e dúplex	Secuencia de sentido 5' a 3'	SE Q ID NO:	Secuencia de antisentido 5' a 3'	SEQ ID NO:	Secuencia diana del ARNm	SEQ ID NO:
AD- 649242	gsgsacgaGfgGfAfUfgggauuuca uL96		asUfsgaaAfucccauCfcUfcgucc susu		AAGGACGAGGGAUGGGAUUUUCA U	
AD- 649243	gsascgagGfgAfUfGfggauuucau uL96		asAfsugaAfaucccauCfcCfucguc scsu		AGGACGAGGGAUGGGAUUUUCAU G	
AD- 649244	ascsgaggGfaUfGfGfgauuucaug uL96		asCfsaugAfaaucccaUfcCfcucgu scsc		GGACGAGGGAUGGGAUUUUCAU GU	
AD- 649245	csgsagggAfuGfGfGfauuucaugu aL96		usAfscauGfaaaucccAfuCfccucg susc		GACGAGGGAUGGGAUUUUCAUGU A	
AD- 649246	gsasgggaUfgGfGfAfuuucaugua aL96		usUfsacaUfgaaauccCfaUfccuc sgsu		ACGAGGGAUGGGAUUUUCAUGUA A	
AD- 649247	asgsggauGfgGfAfUfuucauguaa uL96		asUfsuacAfugaaucCfcAfucccu scsg		CGAGGGAUGGGAUUUUCAUGUAA C	

Nombr e dúplex	Secuencia de sentido 5' a 3'	SE Q ID NO:	Secuencia de antisentido 5' a 3'	SEQ ID NO:	Secuencia diana del ARNm	SEQ ID NO:
AD- 649248	gsgsgaugGfgAfUfUfucauguaac uL96		asGfsuuaCfaugaaauCfcCfaucc csusc		GAGGGAUGGGAUUUCAUGUAAC C	
AD- 649249	gsgsauggGfaUfUfUfcauguaacc aL96		usGfsguuAfcaugaaaUfcCfcauc cscsu		AGGGAUGGGAUUUCAUGUAACC A	
AD- 649250	gsasugggAfuUfUfCfauguaacca aL96		usUfsgguUfacaugaaAfuCfccau cscsc		GGGAUGGGAUUUCAUGUAACCA A	
AD- 649251	asusgggaUfuUfCfAfuguaaccaa uL96		asUfsuggUfuacaugaAfaUfccca uscsc		GGAUGGGAUUUCAUGUAACCAA G	
AD- 649252	gsgsgauuUfcAfUfGfuaaccaaga uL96		asUfscuuGfguuacauGfaAfaucc csasu		AUGGGAUUUCAUGUAACCAAGA G	
AD- 649253	gsgsauuuCfaUfGfUfaaccaagag uL96		asCfsucuUfgguuacaUfgAfaauc cscsa		UGGGAUUUCAUGUAACCAAGAG U	

Nombr e dúplex	Secuencia de sentido 5' a 3'	SE Q ID NO:	Secuencia de antisentido 5' a 3'	SEQ ID NO:	Secuencia diana del ARNm	SEQ ID NO:
AD- 649254	gsasuuucAfuGfUfAfaccaagagua L96		usAfcscucUfugguuacAfuGfaaa uscsc		GGGAUUUCAUGUAACCAAGAGU A	
AD- 649255	asusuucaUfgUfAfAfccaagaguau L96		asUfsacuCfuugguuaCfaUfgaaa uscsc		GGAUUUCAUGUAACCAAGAGUA U	
AD- 649256	ususcaugUfaAfCfCfaagaguauu uL96		asAfsauaCfucuugguUfaCfauga asasu		AUUUCAUGUAACCAAGAGUAUU C	
AD- 649258	csasuguaAfcCfAfAfgaguauucca L96		usGfsgaaUfacucuugGfuUfacau gsasa		UUCAUGUAACCAAGAGUAUUCC A	
AD- 649259	asusguaaCfcAfAfGfaguauuccau L96		asUfsggaAfuacucuuGfgUfuaca usgsa		UCAUGUAACCAAGAGUAUUCCA U	
AD- 649260	gsusaaccAfaGfAfGfuauuccauuu L96		asAfsaugGfaauacucUfuGfguuu csasu		AUGUAACCAAGAGUAUUCCA U	

Nombr e dúplex	Secuencia de sentido 5' a 3'	SE Q ID NO:	Secuencia de antisentido 5' a 3'	SEQ ID NO:	Secuencia diana del ARNm	SEQ ID NO:
AD- 649261	usasaccaAfgAfGfUfauuccauuuu L96		asAfsaaUGfgaaucuCfuUfgguu ascsa		UGUAACCAAGAGUAUUCCAUUU U	
AD- 649262	ascscagaAfgUfAfUfuccauuuuuu L96		usAfsaaaAfuggaauaCfuCfuugg ususa		UAACCAAGAGUAUUCCAUUUUU A	
AD- 649263	cscsaagaGfuAfUfUfccauuuuuu L96		asUfsaaaAfauggaauAfcUfcuug gsusu		AACCAAGAGUAUUCCAUUUUUA C	
AD- 649264	csasagagUfaUfUfcfcauuuuuuac uL96		asGfsuaaAfaauggaaUfaCfucuu gsgsu		ACCAAGAGUAUUCCAUUUUUAC U	
AD- 649265	asasgaguAfuUfCfCfauuuuuacu aL96		usAfsaguaAfaaauggaAfuAfcucu usgsg		CCAAGAGUAUUCCAUUUUUACU A	
AD- 649266	asgsaguaUfuCfCfAfuuuuuuacua aL96		usUfsaguAfaaaauggAfaUfacuc ususg		CAAGAGUAUUCCAUUUUUACUA A	

Nombr e dúplex	Secuencia de sentido 5' a 3'	SE Q ID NO:	Secuencia de antisentido 5' a 3'	SEQ ID NO:	Secuencia diana del ARNm	SEQ ID NO:
AD- 649267	gsasguauUfcCfAfUfuuuuacuaa aL96		usUfsuagUfaaaaaugGfaAfuacu csusu		AAGAGUAUCCAUUUUUACUAA A	
AD- 649268	asgsuauuCfcAfUfUfuuuacuaaa uL96		asUfsuuaGfuaaaaauGfgAfauac uscsu		AGAGUAUCCAUUUUUACUAAA G	
AD- 649269	gsusauucCfaUfUfUfuuacuaaag uL96		asCfsuuuAfguaaaaaUfgGfaaua csusc		GAGUAUCCAUUUUUACUAAAG C	
AD- 649270	usasuuccAfuUfUfUfuacuaaagca L96		usGfscuuUfaguaaaaAfuGfgaau ascsu		AGUAUCCAUUUUUACUAAAGC A	
AD- 649271	asusuccaUfuUfUfUfacuaaagcau L96		asUfsgcuUfuaguaaaaAfaUfggaa usasc		GUAUCCAUUUUUACUAAAGCA G	
AD- 649272	ususccauUfuUfUfAfcuaaagcagu L96		asCfsugcUfuaguaaaAfaAfugga asusa		UAUCCAUUUUUACUAAAGCAG U	

Nombr e dúplex	Secuencia de sentido 5' a 3'	SE Q ID NO:	Secuencia de antisentido 5' a 3'	SEQ ID NO:	Secuencia diana del ARNm	SEQ ID NO:
AD- 649274	cscsauuuUfuAfCfUfaaagcagugu L96		asCfsacuGfcuuuaguAfaAfaaug gsasa		UCCAUUUUUACUAAAGCAGUG U	
AD- 649275	csasuuuuUfaCfUfAfaagcagugu uL96		asAfscacUfgcuuuagUfaAfaaa gsgsa		UCCAUUUUUACUAAAGCAGUGU U	
AD- 649276	asusuuuuAfcUfAfAfacaguguuu L96		asAfsacaCfugcuuuAfuAfaaaa usgsg		CCAUUUUUACUAAAGCAGUGUU U	
AD- 649277	ususuuacUfaAfAfGfcaguguuuu uL96		asAfsaaaCfacugcuUfaGfuaaa asasu		AUUUUUACUAAAGCAGUGUUUU C	
AD- 649278	ususuacuAfaAfGfCfaguguuuuc aL96		usGfsaaaAfcacugcuUfuAfguaa asasa		UUUUUACUAAAGCAGUGUUUUC A	
AD- 649279	ususacuaAfaGfCfAfguguuuuca uL96		asUfsgaaAfacacugcUfuUfagua asasa		UUUUACUAAAGCAGUGUUUUCA C	

Nombr e dúplex	Secuencia de sentido 5' a 3'	SE Q ID NO:	Secuencia de antisentido 5' a 3'	SEQ ID NO:	Secuencia diana del ARNm	SEQ ID NO:
AD- 649280	usascuaaAfgCfAfGfuguuuucacu L96		asGfsugaAfaacacugCfuUfuagu asasa		UUUACUAAAGCAGUGUUUUCAC C	
AD- 649281	ascsuaaaGfcAfGfUfguuuucaccu L96		asGfsgugAfaaacacuGfcUfuuag usasa		UUACUAAAGCAGUGUUUUCACC U	
AD- 649282	csusaaagCfaGfUfGfuuuucaccu uL96		asAfsgguGfaaaacacUfgCfuuuu gsusa		UACUAAAGCAGUGUUUUCACCU C	
AD- 649283	usasaagcAfgUfGfUfuuuaccuca L96		usGfsaggUfgaaaacaCfuGfcuuu asgsu		ACUAAAGCAGUGUUUUCACCUC A	
AD- 649284	asasagcaGfuGfUfUfuucaccuca uL96		asUfsgagGfugaaaacAfcUfgcuu usasg		CUAAAGCAGUGUUUUCACCUCA U	
AD- 649285	asasgcagUfgUfUfUfucaccucaua L96		usAfsugaGfgugaaaaCfaCfugcu ususa		UAAAGCAGUGUUUUCACCUCAU A	

Nombr e dúplex	Secuencia de sentido 5' a 3'	SE Q ID NO:	Secuencia de antisentido 5' a 3'	SEQ ID NO:	Secuencia diana del ARNm	SEQ ID NO:
AD- 649286	asgscaguGfuUfUfUfcaccucauau L96		asUfsaugAfggugaaaAfcAfcugc ususu		AAAGCAGUGUUUUCACCUCAUA U	
AD- 649287	asgsaaguCfcAfGfGfcagagacaa uL96		asUfsuguCfucugccuGfgAfcuuc usasa		UUAGAAGUCCAGGCAGAGACAA U	
AD- 649288	gsasagucCfaGfGfCfagagacaau aL96		usAfsuugUfcucugccUfgGfacuu csusa		UAGAAGUCCAGGCAGAGACAAU A	
AD- 649290	asgsuccaGfgCfAfGfagacaauaa aL96		usUfsuauUfgucucugCfcUfggac ususc		GAAGUCCAGGCAGAGACAAUAA A	
AD- 649291	gsusccagGfcAfGfAfgacaauaaaa L96		usUfsuuaUfugucucuGfcCfugga csusu		AAGUCCAGGCAGAGACAAUAAA A	
AD- 649292	uscscaggCfaGfAfGfacaauaaaa uL96		asUfsuuuAfuugucucUfgCfcugg ascsu		AGUCCAGGCAGAGACAAUAAAA C	

Nombr e dúplex	Secuencia de sentido 5' a 3'	SE Q ID NO:	Secuencia de antisentido 5' a 3'	SEQ ID NO:	Secuencia diana del ARNm	SEQ ID NO:
AD- 649293	cscsaggcAfgAfGfAfaauaaaaca L96		usGfsuuuUfauugucuCfuGfccug gsasc		GUCCAGGCAGAGACAAUAAAAC A	
AD- 649294	csasggcaGfaGfAfCfaauaaaaca uL96		asUfsguuUfuauugucUfcUfgccu gsgsa		UCCAGGCAGAGACAAUAAAACA U	
AD- 649295	asgsgcagAfgAfCfAfaaaaaacauu L96		asAfsuguUfuauuuguCfuCfugcc usgsg		CCAGGCAGAGACAAUAAAACAU U	
AD- 649296	gsgscagaGfaCfAfAfaaaaaacauu uL96		asAfsaugUfuuuauugUfcUfcugc csusg		CAGGCAGAGACAAUAAAACAUU C	
AD- 649297	gscsagagAfcAfAfUfaaaacauucu L96		asGfsaauGfuuuuauuGfuCfucug cscsu		AGGCAGAGACAAUAAAACAUUC C	
AD- 649298	asgsagacAfaUfAfAfaacauuccuu L96		asAfsggaAfuguuuuuUfuGfucuc usgsc		GCAGAGACAAUAAAACAUUCCU G	

Nombr e dúplex	Secuencia de sentido 5' a 3'	SE Q ID NO:	Secuencia de antisentido 5' a 3'	SEQ ID NO:	Secuencia diana del ARNm	SEQ ID NO:
AD- 649299	gsasgacaAfuAfAfAfacauuccugu L96		asCfsaggAfauguuuuAfuUfgucu csusg		CAGAGACAAUAAAACAUUCCUG U	
AD- 649300	asgsacaaUfaAfAfAfcuuccuguu L96		asAfscagGfaauguuUfaUfuguc uscsu		AGAGACAAUAAAACAUUCCUGU G	
AD- 649301	gsascaauAfaAfAfCfauuccuguga L96		usCfsacaGfgaanguUfuAfuugu csusc		GAGACAAUAAAACAUUCCUGUG A	
AD- 649302	ascsaauaAfaAfCfAuuccugugaa L96		usUfscacAfggaanguUfuUfauug uscsu		AGACAAUAAAACAUUCCUGUGA A	
AD- 649303	asasuaaaAfcAfUfUfccugugaaau L96		asUfsuucAfcaggaauGfuUfuau usgsu		ACAAUAAAACAUUCCUGUGAAA G	
AD- 649304	asusaaaaCfaUfUfCfcugugaaag uL96		asCfsuuuCfacaggaaUfgUfuua usug		CAAUAAAACAUUCCUGUGAAAG G	

Nombr e dúplex	Secuencia de sentido 5' a 3'	SE Q ID NO:	Secuencia de antisentido 5' a 3'	SEQ ID NO:	Secuencia diana del ARNm	SEQ ID NO:
AD- 649305	usasaaacAfuUfCfCfugugaaagg uL96		asCfscuuUfcacaggaAfuGfuuuu asusu		AAUAAAACAUUCCUGUGAAAGG C	
AD- 649306	asasaacaUfuCfCfUfgugaaaggc aL96		usGfscuuUfucacaggAfaUfguuu usasu		AUAAAACAUUCCUGUGAAAGGC A	
AD- 649307	asasacauUfcCfUfGfugaaaggca uL96		asUfsgccUfuucacagGfaAfuguu ususa		UAAAACAUUCCUGUGAAAGGCA C	
AD- 649308	asascauuCfcUfGfUfgaaaggcac uL96		asGfsugcCfuucacaGfgAfaugu ususu		AAAACAUUCCUGUGAAAGGCAC U	
AD- 649309	ascsauucCfuGfUfGfaaaggcacu uL96		asAfsgugCfcuuucacAfgGfaaug ususu		AAACAUUCCUGUGAAAGGCACU U	
AD- 649310	csasuuccUfgUfGfAfaaggcacuuu L96		asAfsaguGfccuuucaCfaGfgaaau gsusu		AACAUUCCUGUGAAAGGCACUU U	

Nombr e dúplex	Secuencia de sentido 5' a 3'	SE Q ID NO:	Secuencia de antisentido 5' a 3'	SEQ ID NO:	Secuencia diana del ARNm	SEQ ID NO:
AD- 649311	asusuccuGfuGfAfAfaggcacuuuu L96		asAfsaagUfgccuuucAfcAfggaau sgsu		ACAUUCCUGUGAAAGGCACUUU U	
AD- 649312	ususccugUfgAfAfAfggcacuuuuu L96		asAfsaaaGfugccuuuCfaCfagga asusg		CAUUCCUGUGAAAGGCACUUUU C	
AD- 649313	uscscuguGfaAfAfGfgcacuuuuca L96		usGfsaaaAfgugccuuUfcAfcagg asasu		AUUCCUGUGAAAGGCACUUUUC A	
AD- 649314	cscsugugAfaAfGfGfcacuuuucau L96		asUfsgaaAfagugccuUfuCfacag gsasa		UUCCUGUGAAAGGCACUUUUCA U	
AD- 649315	csusgugaAfaGfGfCfacuuuucau uL96		asAfsugaAfaagugccUfuUfcaca gsgsa		UCCUGUGAAAGGCACUUUUCAU U	
AD- 649316	usgsugaaAfgGfCfAfcuuuucauu uL96		asAfsaugAfaaagugcCfuUfucac asgsg		CCUGUGAAAGGCACUUUUCAUU C	

Nombr e dúplex	Secuencia de sentido 5' a 3'	SE Q ID NO:	Secuencia de antisentido 5' a 3'	SEQ ID NO:	Secuencia diana del ARNm	SEQ ID NO:
AD- 649318	usgsaaagGfcAfCfUfuucauucca L96		usGfsgaaUfgaaaaguGfcCfuuuc ascsa		UGUGAAAGGCACUUUUCAUUCC A	
AD- 649319	gsasaaggCfaCfUfUfucauucca uL96		asUfsggaAfugaaaagUfgCfcuuu csasc		GUGAAAGGCACUUUUCAUUCCA C	
AD- 649320	csusgaagGfaCfGfAfgggauggga uL96		asUfscCf(Tgn)cccucgUfcCfu ucagsgsu		ACCUGAAGGACGAGGGAUGGGA U	
AD- 649321	usgsaaggAfcGfAfGfggaugggau uL96		asAfsuccCf(Agn)ucccucGfuCfc uucasgsg		CCUGAAGGACGAGGGAUGGGAU U	
AD- 649322	gsasaggaCfGfGfGfauggggaau uL96		asAfsaucCf(Cgn)aucccuCfGfuCfc cuucsasg		CUGAAGGACGAGGGAUGGGAUU U	
AD- 649323	asasggacGfaGfGfGfauggggauiu uL96		asAfsaauCf(Cgn)caucccUfcGfu ccuuscsa		UGAAGGACGAGGGAUGGGAUUU C	

Nombr e dúplex	Secuencia de sentido 5' a 3'	SE Q ID NO:	Secuencia de antisentido 5' a 3'	SEQ ID NO:	Secuencia diana del ARNm	SEQ ID NO:
AD- 649324	asgsgacgAfgGfGfAfugggauuuc aL96		usGfsaaaUf(Cgn)ccauccCfuCfg uccususc		GAAGGACGAGGGAUGGGAUUUC A	
AD- 649325	gsgsacgaGfgGfAfUfgggauuuc uL96		asUfsgaaAf(Tgn)cccaucCfcUfc guccsusu		AAGGACGAGGGAUGGGAUUUCA U	
AD- 649326	gsascgagGfgAfUfGfggauuuc uL96		asAfsugaAf(Agn)ucccauCfcCfu cgucscsu		AGGACGAGGGAUGGGAUUUCAU G	
AD- 649327	ascsgaggGfaUfGfGfgauuuc uL96		asCfsaugAf(Agn)aucccaUfcCfc ucguscsc		GGACGAGGGAUGGGAUUUCAU GU	
AD- 649328	csgsagggAfuGfGfGfauuuc aL96		usAfscauGf(Agn)aaucCfCfc cucgsusc		GACGAGGGAUGGGAUUUCAUGU A	
AD- 649329	gsasgggaUfgGfGfAfuuuuc aL96		usUfsaca(Tgn)gaaauccCfaUfcc cucsgsu		ACGAGGGAUGGGAUUUCAUGUA A	

Nombr e dúplex	Secuencia de sentido 5' a 3'	SE Q ID NO:	Secuencia de antisentido 5' a 3'	SEQ ID NO:	Secuencia diana del ARNm	SEQ ID NO:
AD- 649330	asgsggauGfgGfAfUfuucauguaa uL96		asUfsuacAf(Tgn)gaaaucCfcAfu ccuscscg		CGAGGGAUGGGGAUUUCAUGUAA C	
AD- 649331	gsgsgaugGfgAfUfUfucauguaac uL96		asGfsuuaCf(Agn)ugaaauCfcCf aucccsusc		GAGGGAUGGGGAUUUCAUGUAAC C	
AD- 649332	gsgsauggGfaUfUfUfcauguaacc aL96		usGfsguuAf(Cgn)augaaaUfcCfc auccscsu		AGGGAUGGGGAUUUCAUGUAACC A	
AD- 649333	gsasugggAfuUfUfCfauguaacca aL96		usUfsgguUf(Agn)caugaaAfuCfc causcsc		GGAUGGGGAUUUCAUGUAACCA A	
AD- 649334	asusgggaUfuUfCfAfuguaaccaa uL96		asUfsuggUf(Tgn)acaugaAfaUfc ccauscsc		GGAUGGGGAUUUCAUGUAACCAA G	
AD- 649335	usgsggauUfuCfAfUfguaaccaag aL96		usCfsuugGf(Tgn)uacaugAfaAfu cccasusc		GAUGGGGAUUUCAUGUAACCAAG A	

Nombr e dúplex	Secuencia de sentido 5' a 3'	SE Q ID NO:	Secuencia de antisentido 5' a 3'	SEQ ID NO:	Secuencia diana del ARNm	SEQ ID NO:
AD- 649336	gsgsgauuUfcAfUfGfuaaccaaga uL96		asUfscuuGfg(Tgn)uacauGfaAfa ucccsasu		AUGGGAUUUCAUGUAACCAAGA G	
AD- 649337	gsgsauuuCfaUfGfUfaaccaagag uL96		asCfsucu(Tgn)gguuacaUfgAfaa uccscsa		UGGGAUUUCAUGUAACCAAGAG U	
AD- 649338	gsasuuucAfuGfUfAfaccaagagua L96		usAfs cucUf(Tgn)gguuacAfuGfa aaucscsc		GGAUUUCAUGUAACCAAGAGU A	
AD- 649339	asusuucaUfgUfAfAfccaagaguau L96		asUfsacuCf(Tgn)ugguuaCfaUfg aaauscsc		GGAUUUCAUGUAACCAAGAGUA U	
AD- 649340	ususucauGfuAfAfCfcaagaguau uL96		asAfsuacUf(Cgn)uugguuAfcAfu gaaasusc		GAUUUCAUGUAACCAAGAGUAU U	
AD- 649341	usausaugUfaAfCfCfaagaguauu uL96		asAfsauaCf(Tgn)cuugguUfaCfa ugaasasu		AUUUCAUGUAACCAAGAGUAUU C	

Nombr e dúplex	Secuencia de sentido 5' a 3'	SE Q ID NO:	Secuencia de antisentido 5' a 3'	SEQ ID NO:	Secuencia diana del ARNm	SEQ ID NO:
AD- 649342	uscsauguAfaCfCfAfagaguauucu L96		asGfsaauAf(Cgn)ucuuggUfuAfc augasasa		UUUCAUGUAACCAAGAGUAUUC C	
AD- 649343	csasuguaAfcCfAfAfgaguauucca L96		usGfsgaaUf(Agn)cucuugGfuUf acaugsasa		UUCAUGUAACCAAGAGUAUUCC A	
AD- 649344	asusguaaCfcAfAfGfaguauuccau L96		asUfsggaAf(Tgn)acucuuGfgUfu acausgsa		UCAUGUAACCAAGAGUAUUCCA U	
AD- 649345	usgsuaacCfaAfGfAfguauuccauu L96		asAfsuggAf(Agn)uacucuUfgGfu uacasusg		CAUGUAACCAAGAGUAUUCCAU U	
AD- 649346	gsusaaccAfaGfAfGfuauuccauuu L96		asAfsaugGf(Agn)auacucUfuGfg uuacsasu		AUGUAACCAAGAGUAUUCCAUU U	
AD- 649347	usasaccaAfgAfGfUfauuccauuuu L96		asAfsaauGfg(Agn)auacuCfuUfg guuascsa		UGUAACCAAGAGUAUUCCAUUU U	

Nombr e dúplex	Secuencia de sentido 5' a 3'	SE Q ID NO:	Secuencia de antisentido 5' a 3'	SEQ ID NO:	Secuencia diana del ARNm	SEQ ID NO:
AD- 649348	asc scaagAfgUfAfUfuccauuuuuua L96		usAfsaaaAf(Tgn)ggaauaCfuCfu uggususa		UAACCAAGAGUAUUCCAUUUUUU A	
AD- 649349	cscsaagaGfuAfUfUfccauuuuuuau L96		asUfsaaaAf(Agn)uggaauAfcUfc uuggsusu		AACCAAGAGUAUUCCAUUUUUUA C	
AD- 649350	csasagagUfaUfUfCfcuuuuuuac uL96		asGfsuaaAf(Agn)auggaaUfaCf ucuugsgsu		ACCAAGAGUAUUCCAUUUUUUAC U	
AD- 649351	asasgaguAfuUfCfCfauuuuuacu aL96		usAfsguaAf(Agn)aauggaAfuAfc ucuusgsg		CCAAGAGUAUUCCAUUUUUUACU A	
AD- 649352	asgsaguaUfuCfCfAfuuuuuacua aL96		usUfsaguAf(Agn)aaauggAfaUfa cucususg		CAAGAGUAUUCCAUUUUUUACUA A	
AD- 649353	gsasguauUfcCfAfUfuuuuuacuaa aL96		usUfsuagUf(Agn)aaaaugGfaAf uacucsusu		AAGAGUAUUCCAUUUUUUACUAA A	

Nombr e dúplex	Secuencia de sentido 5' a 3'	SE Q ID NO:	Secuencia de antisentido 5' a 3'	SEQ ID NO:	Secuencia diana del ARNm	SEQ ID NO:
AD- 649354	asgsuauuCfcAfUfUfuuuacuaaa uL96		asUfsuuaGf(Tgn)aaaaauGfgAf auacuscsu		AGAGUAUCCAUIUUUUACUAAA G	
AD- 649355	gsusauuCfaUfUfUfuuacuaaaag uL96		asCfsuuu(Agn)guaaaaaUfgGfa auacsusc		GAGUAUCCAUIUUUUACUAAAG C	
AD- 649356	usasuuccAfuUfUfUfuacuaaaagca L96		usGfscuuUf(Agn)guaaaaAfuGf gaauascsu		AGUAUCCAUIUUUUACUAAAGC A	
AD- 649357	asusuccaUfuUfUfUfacuaaaagcau L96		asUfsgcuUf(Tgn)aguaaaAfaUfg gaausasc		GUAUCCAUIUUUUACUAAAGCA G	
AD- 649358	ususccauUfuUfUfAfcuaaaagcagu L96		asCfsugcUf(Tgn)uaguaaAfaAfu ggaasusa		UAUCCAUIUUUUACUAAAGCAG U	
AD- 649359	uscscuuUfuUfAfcfuaaaagcaguu L96		asAfscugCf(Tgn)uuaguaAfaAfa uggasasu		AUCCAUIUUUUACUAAAGCAGU G	

Nombr e dúplex	Secuencia de sentido 5' a 3'	SE Q ID NO:	Secuencia de antisentido 5' a 3'	SEQ ID NO:	Secuencia diana del ARNm	SEQ ID NO:
AD- 649360	cscsauuuUfuAfCfUfaaagcagugu L96		asCfsacuGf(Cgn)uuuaguAfaAfa auggsasa		UCCAUUUUUACUAAAGCAGUG U	
AD- 649361	csasuuuuUfaCfUfAfaagcagugu uL96		asAfscac(Tgn)gcuuuagUfaAfaa augsgsa		UCCAUUUUUACUAAAGCAGUGU U	
AD- 649362	asusuuuuAfcUfAfAfacgaguguuu L96		asAfsacaCf(Tgn)gcuuuuGfuAfa aaausgsg		CCAUUUUUACUAAAGCAGUGUU U	
AD- 649363	ususuuuuCfuAfAfAfgcaguguuuu L96		asAfsaacAf(Cgn)ugcuuuAfgUfa aaaasusg		CAUUUUUACUAAAGCAGUGUUU U	
AD- 649364	ususuuacUfaAfAfGfcaguguuuu uL96		asAfsaaaCf(Agn)cugcuuUfaGfu aaaasasu		AUUUUUACUAAAGCAGUGUUUU C	
AD- 649365	ususuacuAfaAfGfCfaguguuuuc aL96		usGfsaaaAf(Cgn)acugcuUfuAfg uaaasasa		UUUUUACUAAAGCAGUGUUUUC A	

Nombr e dúplex	Secuencia de sentido 5' a 3'	SE Q ID NO:	Secuencia de antisentido 5' a 3'	SEQ ID NO:	Secuencia diana del ARNm	SEQ ID NO:
AD- 649366	ususacuaAfaGfCfAfguguuuuc uL96		asUfsgaaAf(Agn)cacugcUfuUfa guaasasa		UUUUACUAAAGCAGUGUUUUCA C	
AD- 649367	usascuaaAfgCfAfGfuguuuucacu L96		asGfsugaAf(Agn)acacugCfuUfu aguasasa		UUUACUAAAGCAGUGUUUUCAC C	
AD- 649368	ascsuaaaGfcAfGfUfguuuucaccu L96		asGfsgugAf(Agn)aacacuGfcUfu uagusasa		UUACUAAAGCAGUGUUUUCACC U	
AD- 649369	csusaaagCfaGfUfGfuuuucaccu uL96		asAfsgguGf(Agn)aaacacUfgCfu uuagsusa		UACUAAAGCAGUGUUUUCACCU C	
AD- 649370	usasaagcAfgUfGfUfuuuaccuca L96		usGfsagg(Tgn)gaaaacaCfuGfc uuuasgsu		ACUAAAGCAGUGUUUUCACCUC A	
AD- 649371	asasagcaGfuGfUfUfuucaccuca uL96		asUfsgagGf(Tgn)gaaaacAfcUfg cuuusasg		CUAAAGCAGUGUUUUCACCUCA U	

Nombr e dúplex	Secuencia de sentido 5' a 3'	SE Q ID NO:	Secuencia de antisentido 5' a 3'	SEQ ID NO:	Secuencia diana del ARNm	SEQ ID NO:
AD- 649372	asasgcagUfgUfUfUfuccucaua L96		usAfsugaGfg(Tgn)gaaaaCfaCfu gcuususa		UAAAGCAGUGUUUUCACCUCAU A	
AD- 649373	asgscaguGfuUfUfUfcaccucauau L96		asUfsaug(Agn)ggugaaaAfcAfcu gcsusu		AAAGCAGUGUUUUCACCUCAUA U	
AD- 649374	asgsaaguCfcAfGfGfcagagacaa uL96		asUfsuguCf(Tgn)cugccuGfgAfc uucusasa		UUAGAAGUCCAGGCAGAGACAA U	
AD- 649375	gsasagucCfaGfGfCfagagacaau aL96		usAfsuugUf(Cgn)ucugccUfgGfa cuucsusa		UAGAAGUCCAGGCAGAGACAAU A	
AD- 649376	asasguccAfgGfCfAfgagacaauaa L96		usUfsauuGf(Tgn)cucugcCfuGfg acuuscsu		AGAAGUCCAGGCAGAGACAAUA A	
AD- 649377	asgsuccaGfgCfAfGfagacaauaa aL96		usUfsuau(Tgn)gucucugCfcUfgg acususc		GAAGUCCAGGCAGAGACAAUAA A	

Nombr e dúplex	Secuencia de sentido 5' a 3'	SE Q ID NO:	Secuencia de antisentido 5' a 3'	SEQ ID NO:	Secuencia diana del ARNm	SEQ ID NO:
AD- 649378	gsusccagGfcAfGfAfgacaauaaaa L96		usUfsuuaUf(Tgn)gucucuGfcCfu ggacsusu		AAGUCCAGGCAGAGACAAUAAA A	
AD- 649379	uscscaggCfaGfAfGfacaauaaaa uL96		asUfsuuuAf(Tgn)ugucucUfgCfc uggascsu		AGUCCAGGCAGAGACAAUAAAA C	
AD- 649380	cscsaggcAfgAfGfAfcaauaaaaca L96		usGfsuuuUf(Agn)uugucuCfuGf ccuggsasc		GUCCAGGCAGAGACAAUAAAAC A	
AD- 649381	csasggcaGfaGfAfCfaauaaaaca uL96		asUfsguuUf(Tgn)auugucUfcUfg ccugsgsa		UCCAGGCAGAGACAAUAAAACA U	
AD- 649382	asgsgcagAfgAfCfAfauaaaacauu L96		asAfsuguUf(Tgn)uauuguCfuCfu gccusgsg		CCAGGCAGAGACAAUAAAACAU U	
AD- 649383	gsgscagaGfaCfAfAfuaaaacauu uL96		asAfsaugUf(Tgn)uuauugUfcUfc ugccsusg		CAGGCAGAGACAAUAAAACAUU C	

Nombr e dúplex	Secuencia de sentido 5' a 3'	SE Q ID NO:	Secuencia de antisentido 5' a 3'	SEQ ID NO:	Secuencia diana del ARNm	SEQ ID NO:
AD- 649384	gscsagagAfcAfAfUfaaaacauucu L96		asGfsaauGf(Tgn)uuuauuGfuCf ucugcscsu		AGGCAGAGACAAUAAAACAUUC C	
AD- 649385	asgsagacAfaUfAfAfaacauuccuu L96		asAfsggaAf(Tgn)guuuuaUfuGfu cucusgsc		GCAGAGACAAUAAAACAUUCCU G	
AD- 649386	gsasgacaAfuAfAfAfacauuccugu L96		asCfsaggAf(Agn)uguuuuAfuUfg ucucsusg		CAGAGACAAUAAAACAUUCCUG U	
AD- 649388	gsascaauAfaAfAfCfauuccuguga L96		usCfsacaGfg(Agn)auguuUfuAfu ugucsusc		GAGACAAUAAAACAUUCCUGUG A	
AD- 649389	ascsaauaAfaAfCfAfuuccugugaa L96		usUfscac(Agn)ggaauguUfuUfa uuguscsu		AGACAAUAAAACAUUCCUGUGA A	
AD- 649390	csasauaaAfaCfAfUfuccugugaaa L96		usUfsucaCf(Agn)ggaaugUfuUfu auugsusc		GACAAUAAAACAUUCCUGUGAA A	

Nombr e dúplex	Secuencia de sentido 5' a 3'	SE Q ID NO:	Secuencia de antisentido 5' a 3'	SEQ ID NO:	Secuencia diana del ARNm	SEQ ID NO:
AD- 649391	asasuaaaAfcAfUfUfccugugaaau L96		asUfsuucAf(Cgn)aggaauGfuUf uuauusgsu		ACAAUAAAACAUUCCUGUGAAA G	
AD- 649392	asusaaaaCfaUfUfCfcugugaaag uL96		asCfsuuuCf(Agn)caggaaUfgUfu uuaususg		CAAUAAAACAUUCCUGUGAAAG G	
AD- 649394	asasaacaUfUfCfUfgugaaaggc aL96		usGfscCUf(Tgn)cacaggAfaUfg uuuusasu		AUAAAACAUUCCUGUGAAAGGC A	
AD- 649395	asasacauUfcCfUfGfugaaaggca uL96		asUfsgccUf(Tgn)ucacagGfaAfu guuususa		UAAAACAUUCCUGUGAAAGGCA C	
AD- 649396	asascauuCfcUfGfUfgaaaggcac uL96		asGfsugcCf(Tgn)uucacaGfgAfa uguususu		AAAACAUUCCUGUGAAAGGCAC U	
AD- 649397	ascsauuCfuGfUfGfaaaggcacu uL96		asAfsgugCf(Cgn)uuucacAfgGfa augususu		AAACAUUCCUGUGAAAGGCACU U	

Nombr e dúplex	Secuencia de sentido 5' a 3'	SE Q ID NO:	Secuencia de antisentido 5' a 3'	SEQ ID NO:	Secuencia diana del ARNm	SEQ ID NO:
AD- 649398	csasuuccUfgUfGfAfaaggcacuuu L96		asAfsaguGf(Cgn)cuuucAfaGf gaaugsusu		AACAUUCCUGUGAAAGGCACUU U	
AD- 649399	asusuccuGfuGfAfAfaaggcacuuu L96		asAfsaag(Tgn)gccuuucAfcAfgg aausgsu		ACAUUCCUGUGAAAGGCACUUU U	
AD- 649400	ususccugUfgAfAfAfggcacuuuuu L96		asAfsaaaGf(Tgn)gccuuuCfaCfa ggaasusg		CAUUCCUGUGAAAGGCACUUUU C	
AD- 649401	uscscuguGfaAfAfGfgcacuuuuc L96		usGfsaaa(Agn)gugccuuUfcAfca ggasasu		AUUCCUGUGAAAGGCACUUUUC A	
AD- 649402	cscsugugAfaAfGfGfcacuuuuc L96		asUfsgaaAf(Agn)gugccuUfuCfa caggsasa		UUCCUGUGAAAGGCACUUUUCA U	
AD- 649403	csusgugaAfaGfGfCfacuuuuc uL96		asAfsugaAf(Agn)agugccUfuUfc acagsgsa		UCCUGUGAAAGGCACUUUUCAU U	

Nombr e dúplex	Secuencia de sentido 5' a 3'	SE Q ID NO:	Secuencia de antisentido 5' a 3'	SEQ ID NO:	Secuencia diana del ARNm	SEQ ID NO:
AD- 649404	usgsugaaAfgGfCfAfcuuuucuu uL96		asAfsaugAf(Agn)aagugcCfuUfu cacasgsg		CCUGUGAAAGGCACUUUUCAUU C	
AD- 649405	gsusgaaaGfgCfAfcfuuuucuuuc uL96		asGfsaauGf(Agn)aaagugCfcUf uucacsasg		CUGUGAAAGGCACUUUUCAUUC C	
AD- 649406	usgsaaagGfcAfCfUfuuucauucca L96		usGfsgaa(Tgn)gaaaaguGfcCfu uucascsa		UGUGAAAGGCACUUUUCAUUCC A	
AD- 649407	gsasaaggCfaCfUfUfuucauucca uL96		asUfsggaAf(Tgn)gaaaagUfgCfc uuucsasc		GUGAAAGGCACUUUUCAUUCCA C	
AD- 68315	usgsuaacCfaAfGfAfguauuccauu L96		asAfsuggAfauacucuUfgGfuuac asusg		CAUGUAACCAAGAGUAUUCCA U	
AD- 68316	asasccaaGfaGfUfAfuuccauuuu uL96		asAfsaaaUfggaauacUfcUfuggu usasc		GUAACCAAGAGUAUUCCAUUUU U	

Nombr e dúplex	Secuencia de sentido 5' a 3'	SE Q ID NO:	Secuencia de antisentido 5' a 3'	SEQ ID NO:	Secuencia diana del ARNm	SEQ ID NO:
AD- 68317	csasgagaCfaAfUfAfaaacauuccu L96		asGfsgaaUfguuuuauUfgUfcucu gscsc		GGCAGAGACAAUAAAACAUUCC U	
AD- 68318	ususuuuaCfuAfAfAfgcaguguuuu L96		asAfsaacAfcugcuuuAfgUfaaaa asusg		CAUUUUUACUAAAGCAGUGUUU U	
AD- 68326	ususucauGfuAfAfCfcaagaguau uL96		asAfsuacUfcuugguuAfcAfugaa asusc		GAUUUCAUGUAACCAAGAGUAU U	
AD- 68327	csasauaaAfaCfAfUfuccugugaaa L96		usUfsucaCfaggaugUfuUfuauu gsusc		GACAAUAAAACAUUCCUGUGAA A	
AD- 157442. 5	asasccaaGfaGfUfAfuuccauuuu uL96		asAfsaaa(Tgn)ggaauacUfcUfug guusasc		GUAACCAAGAGUAUUCCAUUUU U	

Nombr e dúplex	Secuencia de sentido 5' a 3'	SEQ Q ID NO:	Secuencia de antisentido 5' a 3'	SEQ ID NO:	Secuencia diana del ARNm	SEQ ID NO:
AD- 157470. 8	csasgagaCfaAfUfAfaaacauuccu L96		asGfsgaa(Tgn)guuuuuauUfgUfc ucugscsc		GGCAGAGACAAUAAAACAUUCC U	
AD- 65480	usgsggauUfuCfAfUfguaaccaag aL96		usCfsuugGfuuacaugAfaAfuccc asusc		GAUGGGAUUUCAUGUAACCAAG A	

Tabla 4. Cribados *in vitro* de dosis única en hepatocitos Cynomolgous primarios

	% de mensaje restante					
Nombre dúplex	10 nM	Desv. estándar	1 nM	Desv. estándar	0,1 nM	Desv. estándar
AD-649237	9,9	1,6	27,7	4,0	72,9	8,7
AD-649238	87,0	6,6	86,2	5,7	96,6	5,9
AD-649239	14,1	2,9	18,6	3,2	69,7	8,5
AD-649240	4,5	0,9	9,6	3,9	35,7	6,3
AD-649241	8,5	3,9	14,8	1,3	52,8	6,1
AD-649242	27,1	3,7	21,3	2,3	49,4	5,6
AD-649243	8,6	1,8	11,3	1,4	38,9	4,6
AD-649244	5,5	2,0	15,5	1,0	63,6	14,2
AD-649245	7,5	1,1	23,1	6,0	68,6	6,6
AD-649246	2,7	0,5	6,4	2,3	28,7	6,1
AD-649247	3,2	0,6	7,7	3,0	38,1	5,7
AD-649248	9,2	1,9	36,9	4,4	88,3	7,4
AD-649249	11,1	2,0	42,2	2,9	93,0	8,3
AD-649250	3,3	0,3	8,7	2,5	38,0	3,3
AD-649251	1,4	0,4	1,8	0,6	12,8	2,7
AD-65480	4,0	1,9	11,1	2,2	39,4	6,2
AD-649252	10,2	3,1	30,2	5,9	70,5	8,6
AD-649253	9,9	3,3	27,9	1,5	68,9	9,3
AD-649254	5,9	1,5	19,2	5,6	59,5	11,5
AD-649255	1,6	0,5	6,9	1,5	31,9	2,4
AD-68326	2,3	0,5	8,2	1,9	35,1	9,8
AD-649256	1,6	0,8	3,5	0,6	17,4	4,7
AD-649258	3,0	0,8	7,1	1,8	34,6	21,0

	% de mensaje restante					
Nombre dúplex	10 nM	Desv. estándar	1 nM	Desv. estándar	0,1 nM	Desv. estándar
AD-649259	4,9	1,3	6,0	1,1	21,8	3,8
AD-68315	1,0	0,6	2,7	0,7	13,6	5,2
AD-649260	1,3	0,7	2,7	0,9	14,4	2,9
AD-649261	2,6	0,5	5,5	1,5	25,3	3,9
AD-68316	1,1	0,2	4,5	3,6	14,9	2,9
AD-649262	1,4	0,5	3,9	1,7	22,1	5,6
AD-649263	0,9	0,4	3,1	0,5	19,6	3,4
AD-649264	2,4	2,1	4,5	2,2	15,7	4,9
AD-649265	1,1	0,3	5,9	2,2	19,6	9,5
AD-649266	0,8	0,5	1,7	0,5	12,2	1,6
AD-649267	0,8	0,3	2,2	0,7	8,4	2,9
AD-649268	1,5	0,7	3,6	0,9	20,3	6,5
AD-649269	3,6	0,8	21,2	6,9	63,2	8,3
AD-649270	6,4	0,9	22,6	4,0	68,2	6,9
AD-649271	4,0	0,7	12,2	1,6	48,4	6,3
AD-649272	5,4	4,8	10,2	2,8	45,7	15,6
AD-649274	5,1	1,7	32,7	3,4	89,1	12,4
AD-649275	3,4	1,2	10,8	2,4	46,3	10,2
AD-649276	4,2	0,9	8,2	1,2	35,6	2,9
AD-68318	1,1	0,6	6,4	0,7	20,1	6,4
AD-649277	4,4	0,5	7,3	0,9	33,7	5,8
AD-649278	2,2	0,7	4,8	0,9	27,0	8,2
AD-649279	1,2	0,1	3,4	0,6	17,3	3,6
AD-649280	0,9	0,3	2,9	0,4	17,7	4,7

	% de mensaje restante					
Nombre dúplex	10 nM	Desv. estándar	1 nM	Desv. estándar	0,1 nM	Desv. estándar
AD-649281	4,4	0,8	22,4	1,4	64,2	11,6
AD-649282	2,0	0,8	5,6	0,9	27,8	9,3
AD-649283	2,3	0,7	12,3	1,7	44,3	8,3
AD-649284	2,0	2,1	2,8	0,7	18,6	3,4
AD-649285	1,2	0,5	2,9	0,4	12,8	1,7
AD-649286	1,6	0,4	3,2	1,1	17,5	7,6
AD-649287	47,2	8,2	20,9	3,2	47,3	13,1
AD-649288	5,7	2,2	10,2	1,4	36,8	7,7
AD-649290	9,5	0,9	10,8	0,8	39,1	9,7
AD-649291	7,7	1,7	8,6	0,3	32,4	5,1
AD-649292	2,4	0,6	6,2	0,6	25,9	3,0
AD-649293	4,4	1,0	13,9	2,4	51,9	9,0
AD-649294	1,8	0,5	4,2	0,7	29,0	12,5
AD-649295	6,8	1,2	8,5	1,4	29,5	4,4
AD-649296	2,8	0,8	9,8	2,1	35,1	3,2
AD-649297	17,4	1,9	29,4	5,6	61,7	10,8
AD-68317	6,3	2,9	17,0	3,9	58,4	3,5
AD-649298	3,7	3,0	7,7	1,7	33,4	8,2
AD-649299	4,7	1,2	23,1	4,1	59,0	15,5
AD-649300	4,9	1,4	15,5	5,3	48,7	9,7
AD-649301	15,2	4,8	45,5	12,7	94,9	22,2
AD-649302	6,5	0,3	21,1	3,7	67,4	4,6
AD-68327	2,3	0,7	7,4	1,0	23,9	2,5
AD-649303	44,1	8,6	28,0	4,1	69,5	8,6

	% de mensaje restante					
Nombre dúplex	10 nM	Desv. estándar	1 nM	Desv. estándar	0,1 nM	Desv. estándar
AD-649304	4,6	1,7	25,6	3,3	65,0	14,7
AD-649305	22,5	3,3	55,8	6,2	100,1	3,5
AD-649306	52,2	6,3	79,4	8,9	106,9	2,7
AD-649307	13,5	1,0	18,8	2,6	56,4	5,6
AD-649308	62,6	13,6	71,1	20,1	118,9	36,5
AD-649309	50,2	4,3	62,2	6,3	82,1	6,9
AD-649310	70,0	5,5	76,9	7,0	95,0	5,0
AD-649311	83,6	3,3	78,4	6,0	99,3	5,2
AD-649312	89,1	5,8	90,0	7,0	98,9	2,2
AD-649313	91,8	2,4	91,7	10,4	102,8	5,3
AD-649314	93,6	7,1	90,4	13,7	105,7	5,6
AD-649315	88,2	3,0	78,5	8,0	93,5	8,0
AD-649316	101,9	14,2	82,0	2,9	92,0	13,9
AD-649318	86,1	3,0	88,5	7,3	85,6	1,4
AD-649319	89,8	5,0	86,3	5,4	90,8	9,9

Ejemplo 3. Relación de la actividad de la estructura (SAR) de los agentes de interés del ARNbc

Se realizaron las relaciones de actividad estructural de los agentes de ARNbc de interés identificados en el Ejemplo 2. Los agentes se diseñaron y sintetizaron como se describe en el Ejemplo 1. Los cribados de dosis única, en células Hep3B, se realizaron como se describe en el Ejemplo 2.

Las secuencias de nucleótidos no modificadas de los agentes en este ejemplo se muestran en la Tabla 5. Las secuencias de nucleótidos modificadas de los agentes en este

ejemplo se muestran en la Tabla 6. Los resultados del cribado de dosis única se proporcionan en la Tabla 7.

Tabla 5. Secuencias de cadena de sentido y antisentido no modificadas de agentes de ARNbc de TTR

Nombre dúplex	Secuencia de sentido 5' a 3'	SEQ ID NO:	Secuencia de antisentido 5' a 3'	SEQ ID NO:
AD-649263.3	CCAAGAGUAUCCAUUUUUUAU		AUAAAAAUGGAAUACUCUUGGUU	
AD-1134924.1	CCAAGAGUAUCCAUUUUUUAU		AUAAAAAUGGAAUACUCUUGGUU	
AD-1134925.1	CCAAGAGUAUCCAUUUUUUAU		AUAAAAAUGGAAUACUCUUGGUU	
AD-1134926.1	CCAAGAGUAUCCAUUUUUUAU		AUAAAAAUGGAAUACUCUUGGUU	
AD-1134927.1	CCAAGAGUAUCCAUUUUUUAU		AUAAAAAUGGAAUACUCUUGGUU	
AD-1134928.1	CCAAGAGUAUCCAUUUUUUAU		AUAAAAAUGGAAUACUCUUGGUU	
AD-1134929.1	CCAAGAGUAUCCAUUUUUUAU		AUAAAAAUGGAAUACUCUUGGUU	
AD-1134930.1	CCAAGAGUAUCCAUUUUUUAU		AUAAAAAUGGAAUACUCUUGGUU	
AD-1134931.1	CCAAGAGUAUCCAUUUUUUAU		AUAAAAAUGGAAUACUCUUGGUU	
AD-1134932.1	CCAAGAGUAUCCAUUUUUUAU		AUAAAAAUGGAAUACUCUUGGUU	
AD-1134933.1	CCAAGAGUAUCCAUUUUUUAU		AUAAAAAUGGAAUACUCUUGGUU	
AD-1134934.1	CCAAGAGUAUCCAUUUUUUAU		AUAAAAAUGGAAUACUCUUGGUU	
AD-1134935.1	CCAAGAGUAUCCAUUUUUUAU		AUAAAAAUGGAAUACUCUUGGCC	
AD-1134936.1	AAGAGUAUCCAUUUUUUAU		AUAAAAAUGGAAUACUCUUGG	

Nombre dúplex	Secuencia de sentido 5' a 3'	SEQ ID NO:	Secuencia de antisentido 5' a 3'	SEQ ID NO:
AD-1134937.1	CCAAGAGUAUCCAUUUUUUAU		AUAAAAAUGGAAUACUCUUGGCC	
AD-1134938.1	AAGAGUAUCCAUUUUUUAU		AUAAAAAUGGAAUACUCUUGG	
AD-1134939.1	CCAAGAGUAUCCAUUUUUUAU		AUAAAAAUGGAAUACUCUUGGCC	
AD-1134940.1	AAGAGUAUCCAUUUUUUAU		AUAAAAAUGGAAUACUCUUGG	
AD-1134941.1	CCAAGAGUAUCCAUUUUUUAU		AUAAAAAUGGAAUACUCUUGGCC	
AD-1134942.1	AAGAGUAUCCAUUUUUUAU		AUAAAAAUGGAAUACUCUUGG	
AD-1134943.1	CCAAGAGUAUCCAUUUUUUAU		AUAAAAAUGGAAUACUCUUGGCC	
AD-1134944.1	AAGAGUAUCCAUUUUUUAU		AUAAAAAUGGAAUACUCUUGG	
AD-1134945.1	CCAAGAGUAUCCAUUUUUUAU		AUAAAAAUGGAAUACUCUUGGCC	
AD-1134946.1	AAGAGUAUCCAUUUUUUAU		AUAAAAAUGGAAUACUCUUGG	
AD-1134947.1	CCAAGAGUAUCCAUUUUUUAU		AUAAAAAUGGAAUACUCUUGGCC	
AD-1134948.1	AAGAGUAUCCAUUUUUUAU		AUAAAAAUGGAAUACUCUUGG	
AD-649264.3	CAAGAGUAUCCAUUUUUACU		AGUAAAAAUGGAAUACUCUUGGU	
AD-1134949.1	CAAGAGUAUCCAUUUUUACU		AGUAAAAAUGGAAUACUCUUGGU	
AD-1134950.1	CAAGAGUAUCCAUUUUUACU		AGUAAAAAUGGAAUACUCUUGGU	

Nombre dúplex	Secuencia de sentido 5' a 3'	SEQ ID NO:	Secuencia de antisentido 5' a 3'	SEQ ID NO:
AD-1134951.1	CAAGAGUAUCCAUUUUUACU		AGUAAAAAUGGAAUACUCUUGGU	
AD-1134952.1	CAAGAGUAUCCAUUUUUACU		AGUAAAAAUGGAAUACUCUUGGU	
AD-1134953.1	CAAGAGTAUCCAUUUUUACU		AGUAAAAAUGGAAUACUCUUGGU	
AD-1134954.1	CAAGAGUAUCCAUUUUUACU		AGUAAAAAUGGAAUACUCUUGCC	
AD-1134955.1	AGAGUAUCCAUUUUUACU		AGUAAAAAUGGAAUACUCUUG	
AD-1134956.1	CAAGAGUAUCCAUUUUUACU		AGUAAAAAUGGAATACUCUUGGU	
AD-1134957.1	CAAGAGUAUCCAUUUUUACU		AGUAAAAAUGGAAUACUCUUGGU	
AD-1134958.1	CAAGAGTAUCCAUUUUUACU		AGUAAAAAUGGAAUACUCUUGGU	
AD-1134959.1	CAAGAGUAUCCAUUUUUACU		AGUAAAAAUGGAAUACUCUUGGU	
AD-1134960.1	CAAGAGTAUCCAUUUUUACU		AGUAAAAAUGGAAUACUCUUGGU	
AD-1134961.1	CAAGAGUAUCCAUUUUUACU		AGUAAAAAUGGAAUACUCUUGCC	
AD-1134962.1	AGAGUAUCCAUUUUUACU		AGUAAAAAUGGAAUACUCUUG	
AD-1134963.1	CAAGAGUAUCCAUUUUUACU		AGUAAAAAUGGAAUACUCUUGCC	
AD-1134964.1	AGAGUAUCCAUUUUUACU		AGUAAAAAUGGAAUACUCUUG	
AD-1134965.1	CAAGAGTAUCCAUUUUUACU		AGUAAAAAUGGAAUACUCUUGCC	

Nombre dúplex	Secuencia de sentido 5' a 3'	SEQ ID NO:	Secuencia de antisentido 5' a 3'	SEQ ID NO:
AD-1134966.1	AGAGTAUUCCAUUUUUACU		AGUAAAAAUGGAAUACUCUUG	
AD-1134967.1	CAAGAGUAUUCCAUUUUUACU		AGUAAAAAUGGAATACUCUUGCC	
AD-1134968.1	AGAGUAUUCCAUUUUUACU		AGUAAAAAUGGAATACUCUUG	
AD-649352.3	AGAGUAUUCCAUUUUUACUAA		UUAGUAAAAAUGGAAUACUCUUG	
AD-1134969.1	AGAGUAUUCCAUUUUUACUAA		UUAGUAAAAAUGGAAUACUCUUG	
AD-1134970.1	AGAGUAUUCCAUUUUUACUAU		AUAGUAAAAAUGGAAUACUCUUG	
AD-1134971.1	AGAGUAUUCCAUUUUUACUAA		UUAGTAAAAAUGGAAUACUCUUG	
AD-1134972.1	AGAGUAUUCCAUUUUUACUAA		UUAGUAAAAAUGGAAUACUCUUG	
AD-1134973.1	AGAGUAUUCCAUUUUUACUAA		UUAGTAAAAAUGGAAUACUCUUG	
AD-1134974.1	AGAGUAUUCCAUUUUUACUAA		UUAGUAAAAAUGGAAUACUCUUG	
AD-1134975.1	AGAGUAUUCCAUUUUUACUAA		UUAGUAAAAAUGGAAUACUCUCC	
AD-1134976.1	AGUAUUCCAUUUUUACUAA		UUAGUAAAAAUGGAAUACUCU	
AD-1134977.1	AGAGUAUUCCAUUUUUACUAU		AUAGTAAAAAUGGAAUACUCUUG	
AD-1134978.1	AGAGUAUUCCAUUUUUACUAU		AUAGTAAAAAUGGAAUACUCUUG	
AD-1134979.1	AGAGUAUUCCAUUUUUACUAU		AUAGTAAAAAUGGAAUACUCUUG	

Nombre dúplex	Secuencia de sentido 5' a 3'	SEQ ID NO:	Secuencia de antisentido 5' a 3'	SEQ ID NO:
AD-1134980.1	AGAGUAUCCAUUUUUACUAU		AUAGTAAAAAUGGAAUACUCUUG	
AD-1134981.1	AGAGUAUCCAUUUUUACUAU		AUAGTAAAAAUGGAAUACUCUUG	
AD-1134982.1	AGAGUAUCCAUUUUUACUAU		AUAGTAAAAAUGGAAUACUCUUG	
AD-1134983.1	AGAGUAUCCAUUUUUACUAU		AUAGTAAAAAUGGAAUACUCUUG	
AD-1134984.1	AGAGUAUCCAUUUUUACUAU		AUAGTAAAAAUGGAAUACUCUUG	
AD-1134985.1	AGAGUAUCCAUUUUUACUAU		AUAGTAAAAAUGGAAUACUCUUG	
AD-1134986.1	AGAGUAUCCAUUUUUACUAU		AUAGTAAAAAUGGAAUACUCUUG	
AD-1134987.1	AGAGUAUCCAUUUUUACUAU		AUAGTAAAAAUGGAAUACUCUUG	
AD-1134988.1	AGAGUAUCCAUUUUUACUAU		AUAGTAAAAAUGGAAUACUCUUG	
AD-1134989.1	AGAGUAUCCAUUUUUACUAU		AUAGTAAAAAUGGAAUACUCUCC	
AD-1134990.1	AGAGUAUCCAUUUUUACUAU		AUAGTAAAAAUGGAAUACUCUCC	
AD-1134991.1	AGAGUAUCCAUUUUUACUAU		AUAGTAAAAAUGGAAUACUCUCC	
AD-1134992.1	AGAGUAUCCAUUUUUACUAU		AUAGTAAAAAUGGAAUACUCUCC	
AD-1134993.1	AGUAUCCAUUUUUACUAU		AUAGTAAAAAUGGAAUACUCU	
AD-1134994.1	AGUAUCCAUUUUUACUAU		AUAGTAAAAAUGGAAUACUCU	

Nombre dúplex	Secuencia de sentido 5' a 3'	SEQ ID NO:	Secuencia de antisentido 5' a 3'	SEQ ID NO:
AD-1134995.1	AGUAUUGCAUUUUUACUAU		AUAGTAAAAAUGGAAUACUCU	
AD-1134996.1	AGUAUUGCAUUUUUACUAU		AUAGTAAAAAUGGAAUACUCU	
AD-1134997.1	AGAGUAUUGCAUUUUUACUAA		UUAGUAAAAAUGGAAUACUCUUG	
AD-823016.4	CUAAAGCAGUGUUUUCACCUA		UAGGTGAAAACACUGCUUUAGUA	
AD-1134998.1	CUAAAGCAGUGUUUUCACCUA		UAGGTGAAAACACUGCUUUAGUA	
AD-1134999.1	CUAAAGCAGUGUUUUCACCUA		UAGGTGAAAACACUGCUUUAGUA	
AD-1135000.1	CUAAAGCAGUGUUUUCACCUU		AAGGTGAAAACACUGCUUUAGUA	
AD-1135001.1	CUAAAGCAGUGUUUUCACCUA		UAGGTGAAAACACUGCUUUAGUA	
AD-1135002.1	CUAAAGCAGUGUUUUCACCUA		UAGGTGAAAACACUGCUUUAGCC	
AD-1135003.1	AAAGCAGUGUUUUCACCUA		UAGGTGAAAACACUGCUUUAG	
AD-1135004.1	CUAAAGCAGUGUUUUCACCUA		AAGGTGAAAACACUGCUUUAGUA	
AD-1135005.1	CUAAAGCAGUGUUUUCACCUA		AAGGTGAAAACACUGCUUUAGUA	
AD-1135006.1	CUAAAGCAGUGUUUUCACCUA		AAGGTGAAAACACUGCUUUAGCC	
AD-1135007.1	CUAAAGCAGUGUUUUCACCUA		AAGGTGAAAACACUGCUUUAGCC	
AD-1135008.1	AAAGCAGUGUUUUCACCUA		AAGGTGAAAACACUGCUUUAG	

Nombre dúplex	Secuencia de sentido 5' a 3'	SEQ ID NO:	Secuencia de antisentido 5' a 3'	SEQ ID NO:
AD-1135009.1	AAAGCAGUGUUUUCACCUA		AAGGTGAAAACACUGCUUUAG	

Tabla 6. Secuencias de cadena de sentido y antisentido modificadas de agentes de ARNbc de TTR

Nombre dúplex	Secuencia de sentido 5' a 3'	SEQ ID NO:	Secuencia de antisentido 5' a 3'	SEQ ID NO:	Secuencia diana del ARNm	SEQ ID NO:
AD-649263.3	cscsaagaGfuAfUfUfccauuuuu auL96		asUfsaaaAfauggaauAfcUfcuuggs usu		AACCAAGAGUAUUGCAUUUUU AC	
AD-1134924.1	cscsaagaguAfUfUfccauuuuuu uL96		asUfsaaaAfauggaauAfcUfcuuggs usu		AACCAAGAGUAUUGCAUUUUU AC	
AD-1134925.1	cscsaagadGuAfUfUfccauuuuu auL96		asUfsaaaAfauggaauAfcUfcuuggs usu		AACCAAGAGUAUUGCAUUUUU AC	

Nombre dúplex	Secuencia de sentido 5' a 3'	SEQ ID NO:	Secuencia de antisentido 5' a 3'	SEQ ID NO:	Secuencia diana del ARNm	SEQ ID NO:
AD-1134926.1	cscsaagagudAUfUfccauuuuuu uL96		asUfsaaaAfauggaauAfcUfcuuggs usu		AACCAAGAGUAUUGCAUUUUU AC	
AD-1134927.1	cscsaagadGudAUfUfccauuuu uauL96		asUfsaaaAfauggaauAfcUfcuuggs usu		AACCAAGAGUAUUGCAUUUUU AC	
AD-1134928.1	cscsaagaGfuAfUfUfccauuuuu auL96		asUfsaadAadAuggaauAfcUfcuug gsusu		AACCAAGAGUAUUGCAUUUUU AC	
AD-1134929.1	cscsaagaGfuAfUfUfccauuuuu auL96		asUfsaaaAfauggaauAcUfcuugg susu		AACCAAGAGUAUUGCAUUUUU AC	

Nombre dúplex	Secuencia de sentido 5' a 3'	SEQ ID NO:	Secuencia de antisentido 5' a 3'	SEQ ID NO:	Secuencia diana del ARNm	SEQ ID NO:
AD-1134930.1	cscsaagaGfuAfUfUfccauuuuu auL96		asUfsaadAadAuggaudAcUfcuug gsusu		AACCAAGAGUAUUCCAUUUUU AC	
AD-1134931.1	cscsaagaguAfUfUfccauuuuuu uL96		asUfsaadAadAuggaauAfcUfcuug gsusu		AACCAAGAGUAUUCCAUUUUU AC	
AD-1134932.1	cscsaagadGuAfUfUfccauuuuu auL96		asUfsaadAadAuggaauAfcUfcuug gsusu		AACCAAGAGUAUUCCAUUUUU AC	
AD-1134933.1	cscsaagaguAfUfUfccauuuuuu uL96		asUfsaadAadAuggaudAcUfcuug gsusu		AACCAAGAGUAUUCCAUUUUU AC	

Nombre dúplex	Secuencia de sentido 5' a 3'	SEQ ID NO:	Secuencia de antisentido 5' a 3'	SEQ ID NO:	Secuencia diana del ARNm	SEQ ID NO:
AD-1134934.1	cscsaagadGuAfUfUfccauuuuuauL96		asUfsaadAadAuggaudAcUfcuuggsusu		AACCAAGAGUAUUGCAUUUUUUAC	
AD-1134935.1	cscsaagaGfuAfUfUfccauuuuuauL96		asUfsaaaAfauggaauAfcUfcuuggscsc		CCAAGAGUAUUGCAUUUUUUUA	
AD-1134936.1	asasgaGfuAfUfUfccauuuuuuuauL96		asUfsaaaAfauggaauAfcUfcuusgsg		AACCAAGAGUAUUGCAUUUUUUAC	
AD-1134937.1	cscsaagaguAfUfUfccauuuuuuauL96		asUfsaadAadAuggaauAfcUfcuuggscsc		CCAAGAGUAUUGCAUUUUUUUA	

Nombre dúplex	Secuencia de sentido 5' a 3'	SEQ ID NO:	Secuencia de antisentido 5' a 3'	SEQ ID NO:	Secuencia diana del ARNm	SEQ ID NO:
AD-1134938.1	asasgaguAfUfUfccauuuuuauL96		asUfsaadAadAuggaauAfcUfcuusgsg		AACCAAGAGUAUCCAUIUUUUUAC	
AD-1134939.1	cscsaagadGuAfUfUfccauuuuuauL96		asUfsaadAadAuggaauAfcUfcuuggscsc		CCAAGAGUAUCCAUIUUUUUAC	
AD-1134940.1	asasgadGuAfUfUfccauuuuuauL96		asUfsaadAadAuggaauAfcUfcuusgsg		AACCAAGAGUAUCCAUIUUUUUAC	
AD-1134941.1	cscsaagagudAUfUfccauuuuuauL96		asUfsaadAadAuggaauAfcUfcuuggscsc		CCAAGAGUAUCCAUIUUUUUAC	

Nombre dúplex	Secuencia de sentido 5' a 3'	SEQ ID NO:	Secuencia de antisentido 5' a 3'	SEQ ID NO:	Secuencia diana del ARNm	SEQ ID NO:
AD-1134942.1	asasgagudAUfUfccauuuuuauL96		asUfsaadAadAuggaauAfcUfcuusgsg		AACCAAGAGUAUUGCAUUUUUAC	
AD-1134943.1	cscsaagadGudAUfUfccauuuuuauL96		asUfsaadAadAuggaauAfcUfcuuggscsc		CCAAGAGUAUUGCAUUUUUUA	
AD-1134944.1	asasgadGudAUfUfccauuuuuauL96		asUfsaadAadAuggaauAfcUfcuusgsg		AACCAAGAGUAUUGCAUUUUUAC	
AD-1134945.1	cscsaagagudAUfUfccauuuuuauL96		asUfsaadAadAuggaauAcUfcuuggscsc		CCAAGAGUAUUGCAUUUUUUA	

Nombre dúplex	Secuencia de sentido 5' a 3'	SEQ ID NO:	Secuencia de antisentido 5' a 3'	SEQ ID NO:	Secuencia diana del ARNm	SEQ ID NO:
AD-1134946.1	asasgagudAUfUfccauuuuuauL96		asUfsaadAadAuggaudAcUfcuusgsg		AACCAAGAGUAUUCCAUUUUUAC	
AD-1134947.1	cscsaagadGudAUfUfccauuuuuauL96		asUfsaadAadAuggaudAcUfcuuggscsc		CCAAGAGUAUUCCAUUUUUUA	
AD-1134948.1	asasgadGudAUfUfccauuuuuauL96		asUfsaadAadAuggaudAcUfcuusgsg		AACCAAGAGUAUUCCAUUUUUAC	
AD-649264.3	csasagagUfaUfUfCfcacuuuuuuauL96		asGfsuaaAfaauggaaUfaCfucuuugsgsu		ACCAAGAGUAUUCCAUUUUUUA	
AD-1134949.1	csasagagUfaUfUfCfcacuuuuuuauL96		asdGsuaaAfaauggaaUfaCfucuugsgsu		ACCAAGAGUAUUCCAUUUUUUA	

Nombre dúplex	Secuencia de sentido 5' a 3'	SEQ ID NO:	Secuencia de antisentido 5' a 3'	SEQ ID NO:	Secuencia diana del ARNm	SEQ ID NO:
AD-1134950.1	csasagagUfaUfUfCfcauuuuua cuL96		asGfsuadAadAauggaaUfaCfucuu gsgsu		ACCAAGAGUAUUGCAUUUUUUA CU	
AD-1134951.1	csasagagUfaUfUfCfcauuuuua cuL96		asdGsuadAadAauggaaUfaCfucu ugsgsu		ACCAAGAGUAUUGCAUUUUUUA CU	
AD-1134952.1	csasagaguaUfUfCfcauuuuuac uL96		asGfsuuaaAfaauggaaUfaCfucuugs gsu		ACCAAGAGUAUUGCAUUUUUUA CU	
AD-1134953.1	csasagagdTaUfUfCfcauuuuua cuL96		asGfsuuaaAfaauggaaUfaCfucuugs gsu		ACCAAGAGUAUUGCAUUUUUUA CU	

Nombre dúplex	Secuencia de sentido 5' a 3'	SEQ ID NO:	Secuencia de antisentido 5' a 3'	SEQ ID NO:	Secuencia diana del ARNm	SEQ ID NO:
AD-1134954.1	csasagagUfaUfUfCfcauuuuuacuL96		asGfsuaaAfaauggaaUfaCfucuugscsc		ACCAAGAGUAUUCCAUUUUUUA CU	
AD-1134955.1	asgsagUfaUfUfCfcauuuuuacuL96		asGfsuaaAfaauggaaUfaCfucususg		CAAGAGUAUUCCAUUUUUUA U	
AD-1134956.1	csasagaguaUfUfCfcauuuuuacuL96		asdGsuadAadAauggdAadTadCu cuugsgsu		ACCAAGAGUAUUCCAUUUUUUA CU	
AD-1134957.1	csasagaguaUfUfCfcauuuuuacuL96		asdGsuaaAfaauggaaUfaCfucuugsgsu		ACCAAGAGUAUUCCAUUUUUUA CU	

Nombre dúplex	Secuencia de sentido 5' a 3'	SEQ ID NO:	Secuencia de antisentido 5' a 3'	SEQ ID NO:	Secuencia diana del ARNm	SEQ ID NO:
AD-1134958.1	csasagagdTaUfUfCfcauuuuua cuL96		asdGsuaaAfaauggaaUfaCfucuug sgsu		ACCAAGAGUAUUGCAUUUUUUA CU	
AD-1134959.1	csasagaguaUfUfCfcauuuuuac uL96		asdGsuadAadAauggaaUfaCfucu ugsgsu		ACCAAGAGUAUUGCAUUUUUUA CU	
AD-1134960.1	csasagagdTaUfUfCfcauuuuua cuL96		asdGsuadAadAauggaaUfaCfucu ugsgsu		ACCAAGAGUAUUGCAUUUUUUA CU	
AD-1134961.1	csasagagUfaUfUfCfcauuuuua cuL96		asdGsuadAadAauggaaUfaCfucu ugscsc		ACCAAGAGUAUUGCAUUUUUUA CU	

Nombre dúplex	Secuencia de sentido 5' a 3'	SEQ ID NO:	Secuencia de antisentido 5' a 3'	SEQ ID NO:	Secuencia diana del ARNm	SEQ ID NO:
AD-1134962.1	asgsagUfaUfUfCfcauuuuuacuL96		asdGsuadAadAauggaaUfaCfucusug		CAAGAGUAUUCCAUUUUUACU	
AD-1134963.1	csasagaguaUfUfCfcauuuuuacuL96		asdGsuadAadAauggaaUfaCfucusugscsc		ACCAAGAGUAUUCCAUUUUUUA CU	
AD-1134964.1	asgsaguaUfUfCfcauuuuuacuL96		asdGsuadAadAauggaaUfaCfucusug		CAAGAGUAUUCCAUUUUUACU	
AD-1134965.1	csasagagdTaUfUfCfcauuuuuacuL96		asdGsuadAadAauggaaUfaCfucusugscsc		ACCAAGAGUAUUCCAUUUUUUA CU	

Nombre dúplex	Secuencia de sentido 5' a 3'	SEQ ID NO:	Secuencia de antisentido 5' a 3'	SEQ ID NO:	Secuencia diana del ARNm	SEQ ID NO:
AD-1134966.1	asgsagdTaUfUfCfcauuuuuacuL96		asdGsuadAadAauggaaUfaCfucusug		CAAGAGUAUUCCAUUUUUACU	
AD-1134967.1	csasagaguaUfUfCfcauuuuuacuL96		asdGsuadAadAauggdAadTadCu cuugscsc		ACCAAGAGUAUUCCAUUUUUUA CU	
AD-1134968.1	asgsaguaUfUfCfcauuuuuacuL96		asdGsuadAadAauggdAadTadCucususg		CAAGAGUAUUCCAUUUUUACU	
AD-649352.3	asgsaguaUfuCfCfAfuuuuuacu aaL96		usUfsaguAf(Agn)aaauggAfaUfacucusug		CAAGAGUAUUCCAUUUUUACUAA	
AD-1134969.1	asgsaguaUfuCfCfdAuuuuuuacu aaL96		usUfsaguAf(Agn)aaauggAfaUfacucusug		CAAGAGUAUUCCAUUUUUACUAA	

Nombre dúplex	Secuencia de sentido 5' a 3'	SEQ ID NO:	Secuencia de antisentido 5' a 3'	SEQ ID NO:	Secuencia diana del ARNm	SEQ ID NO:
AD-1134970.1	asgsaguaUfuCfcdAUfuuuuacu aaL96		usUfsaguAf(Agn)aaauggAfaUfac ucususg		CAAGAGUAUUC CAUUUUUAC UAA	
AD-1134971.1	asgsaguaUfuCfCfAfuuuuuacu auL96		asUfsaguAf(Agn)aaauggAfaUfac ucususg		CAAGAGUAUUC CAUUUUUAC UAA	
AD-1134972.1	asgsaguaUfuCfCfAfuuuuuacu aaL96		usUfsagdTa(Agn)aaauggAfaUfac ucususg		CAAGAGUAUUC CAUUUUUAC UAA	
AD-1134973.1	asgsaguaUfuCfCfAfuuuuuacu aaL96		usUfsaguAf(A2p)aaauggAfaUfac ucususg		CAAGAGUAUUC CAUUUUUAC UAA	

Nombre dúplex	Secuencia de sentido 5' a 3'	SEQ ID NO:	Secuencia de antisentido 5' a 3'	SEQ ID NO:	Secuencia diana del ARNm	SEQ ID NO:
AD-1134974.1	asgsaguaUfuCfCfAfuuuuuacu aaL96		usUfsagdTa(A2p)aaauggAfaUfac ucususg		CAAGAGUAUUCCAUUUUUAC UAA	
AD-1134975.1	asgsaguaUfuCfCfAfuuuuuacu aaL96		usUfsaguAf(Agn)aaauggdAaUfac ucususg		CAAGAGUAUUCCAUUUUUAC UAA	
AD-1134976.1	asgsaguaUfuCfCfAfuuuuuacu aaL96		usUfsaguAf(Agn)aaauggAfaUfac ucusCSC		CAAGAGUAUUCCAUUUUUAC UAA	
AD-1134977.1	asgsuaUfuCfCfAfuuuuuacu aaL96		usUfsaguAf(Agn)aaauggAfaUfac uscsu		AGAGUAUUCCAUUUUUACUAA	

Nombre dúplex	Secuencia de sentido 5' a 3'	SEQ ID NO:	Secuencia de antisentido 5' a 3'	SEQ ID NO:	Secuencia diana del ARNm	SEQ ID NO:
AD-1134978.1	asgsaguaUfuCfCfAfuuuuuacu auL96		asUfsagdTa(Agn)aaauggAfaUfac ucususg		CAAGAGUAUUCCAUUUUUAC UAA	
AD-1134979.1	asgsaguaUfuCfCfAfuuuuuacu auL96		asUfsagdTa(Agn)aaauggdAaUfa cucususg		CAAGAGUAUUCCAUUUUUAC UAA	
AD-1134980.1	asgsaguaUfuCfCfAfuuuuuacu auL96		asUfsagdTa(A2p)aaauggAfaUfac ucususg		CAAGAGUAUUCCAUUUUUAC UAA	
AD-1134981.1	asgsaguaUfuCfCfAfuuuuuacu auL96		asUfsagdTa(A2p)aaauggdAaUfa cucususg		CAAGAGUAUUCCAUUUUUAC UAA	

Nombre dúplex	Secuencia de sentido 5' a 3'	SEQ ID NO:	Secuencia de antisentido 5' a 3'	SEQ ID NO:	Secuencia diana del ARNm	SEQ ID NO:
AD-1134982.1	asgsaguaUfuCfCfdAuuuuuacu auL96		asUfsagdTa(Agn)aaauggAfaUfac ucususg		CAAGAGUAUUCCAUUUUUAC UAA	
AD-1134983.1	asgsaguaUfuCfCfdAuuuuuacu auL96		asUfsagdTa(Agn)aaauggdAaUfa cucususg		CAAGAGUAUUCCAUUUUUAC UAA	
AD-1134984.1	asgsaguaUfuCfCfdAuuuuuacu auL96		asUfsagdTa(A2p)aaauggAfaUfac ucususg		CAAGAGUAUUCCAUUUUUAC UAA	
AD-1134985.1	asgsaguaUfuCfCfdAuuuuuacu auL96		asUfsagdTa(A2p)aaauggdAaUfa cucususg		CAAGAGUAUUCCAUUUUUAC UAA	

Nombre dúplex	Secuencia de sentido 5' a 3'	SEQ ID NO:	Secuencia de antisentido 5' a 3'	SEQ ID NO:	Secuencia diana del ARNm	SEQ ID NO:
AD-1134986.1	asgsaguaUfuCfcdAUfuuuuacu auL96		asUfsagdTa(Agn)aaauggAfaUfac ucususg		CAAGAGUAUUCCAUUUUUAC UAA	
AD-1134987.1	asgsaguaUfuCfcdAUfuuuuacu auL96		asUfsagdTa(Agn)aaauggdAaUfa cucususg		CAAGAGUAUUCCAUUUUUAC UAA	
AD-1134988.1	asgsaguaUfuCfcdAUfuuuuacu auL96		asUfsagdTa(A2p)aaauggAfaUfac ucususg		CAAGAGUAUUCCAUUUUUAC UAA	
AD-1134989.1	asgsaguaUfuCfcdAUfuuuuacu auL96		asUfsagdTa(A2p)aaauggdAaUfa cucususg		CAAGAGUAUUCCAUUUUUAC UAA	

Nombre dúplex	Secuencia de sentido 5' a 3'	SEQ ID NO:	Secuencia de antisentido 5' a 3'	SEQ ID NO:	Secuencia diana del ARNm	SEQ ID NO:
AD-1134990.1	asgsaguaUfuCfCfdAuuuuuacu auL96		asUfsagdTa(Agn)aaauggAfaUfac ucuscsc		CAAGAGUAUCCAUIUUUUUAC UAA	
AD-1134991.1	asgsaguaUfuCfCfdAuuuuuacu auL96		asUfsagdTa(Agn)aaauggdAaUfa cucuscsc		CAAGAGUAUCCAUIUUUUUAC UAA	
AD-1134992.1	asgsaguaUfuCfCfdAuuuuuacu auL96		asUfsagdTa(A2p)aaauggAfaUfac ucuscsc		CAAGAGUAUCCAUIUUUUUAC UAA	
AD-1134993.1	asgsaguaUfuCfCfdAuuuuuacu auL96		asUfsagdTa(A2p)aaauggdAaUfa cucuscsc		CAAGAGUAUCCAUIUUUUUAC UAA	

Nombre dúplex	Secuencia de sentido 5' a 3'	SEQ ID NO:	Secuencia de antisentido 5' a 3'	SEQ ID NO:	Secuencia diana del ARNm	SEQ ID NO:
AD-1134994.1	asgsuaUfuCfCfdAuuuuuacuau L96		asUfsagdTa(Agn)aaauggAfaUfac uscsu		AGAGUAUUCCAUUUUUACUAA	
AD-1134995.1	asgsuaUfuCfCfdAuuuuuacuau L96		asUfsagdTa(Agn)aaauggdAaUfa cuscsu		AGAGUAUUCCAUUUUUACUAA	
AD-1134996.1	asgsuaUfuCfCfdAuuuuuacuau L96		asUfsagdTa(A2p)aaauggAfaUfac uscsu		AGAGUAUUCCAUUUUUACUAA	
AD-1134997.1	asgsuaUfuCfCfdAuuuuuacuau L96		asUfsagdTa(A2p)aaauggdAaUfa cuscsu		AGAGUAUUCCAUUUUUACUAA	
AD-823016.4	csusaaagCfaGfUfGfuuuuaccc uaL96		usAfsaggdTg(A2p)aaacacUfgCfuu uagsusa		UACUAAAGCAGUGUUUUCAC CUC	

Nombre dúplex	Secuencia de sentido 5' a 3'	SEQ ID NO:	Secuencia de antisentido 5' a 3'	SEQ ID NO:	Secuencia diana del ARNm	SEQ ID NO:
AD-1134998.1	csusaaagCfagUfdGuuuuaccu aL96		usAfsggdTg(A2p)aaacacUfgCfu uagsusa		UACUAAAGCAGUGUUUUCAC CUC	
AD-1134999.1	csusaaagCfadGudGUfuuucac cuaL96		usAfsggdTg(A2p)aaacacUfgCfu uagsusa		UACUAAAGCAGUGUUUUCAC CUC	
AD-1135000.1	csusaaagCfaGfUfGfuuuucacc uuL96		asAfsggdTg(A2p)aaacacUfgCfu uagsusa		UACUAAAGCAGUGUUUUCAC CUC	
AD-1135001.1	csusaaagCfaGfUfGfuuuucacc uaL96		usdAsggdTg(A2p)aaacacUfgCfu uuagsusa		UACUAAAGCAGUGUUUUCAC CUC	

Nombre dúplex	Secuencia de sentido 5' a 3'	SEQ ID NO:	Secuencia de antisentido 5' a 3'	SEQ ID NO:	Secuencia diana del ARNm	SEQ ID NO:
AD-1135002.1	csusaaagCfaGfUfGfuuuucaccuaL96		usAfsggdTg(A2p)aaacacUfgCfuuuagscsc		UACUAAAGCAGUGUUUUCAC CUC	
AD-1135003.1	asasagCfaGfUfGfuuuucaccuaL96		usAfsggdTg(A2p)aaacacUfgCfuuuasg		CUAAAGCAGUGUUUUCACCU C	
AD-1135004.1	csusaaagCfagUfdGuuuucaccuaL96		asdAsggdTg(A2p)aaacacUfgCfuuuagsusa		UACUAAAGCAGUGUUUUCAC CUC	
AD-1135005.1	csusaaagCfadGudGUfuuuacacuaL96		asdAsggdTg(A2p)aaacacUfgCfuuuagsusa		UACUAAAGCAGUGUUUUCAC CUC	

Nombre dúplex	Secuencia de sentido 5' a 3'	SEQ ID NO:	Secuencia de antisentido 5' a 3'	SEQ ID NO:	Secuencia diana del ARNm	SEQ ID NO:
AD-1135006.1	csusaaagCfagUfdGuuuucaccu aL96		asdAsggdTg(A2p)aaacacUfgCfu uuagscsc		UACUAAAGCAGUGUUUUCAC CUC	
AD-1135007.1	csusaaagCfadGudGUfuuucac cuaL96		asdAsggdTg(A2p)aaacacUfgCfu uuagscsc		UACUAAAGCAGUGUUUUCAC CUC	
AD-1135008.1	asasagCfagUfdGuuuucaccua L96		asdAsggdTg(A2p)aaacacUfgCfu uusasg		CUAAAGCAGUGUUUUCACCU C	
AD-1135009.1	asasagCfadGudGUfuuucaccu aL96		asdAsggdTg(A2p)aaacacUfgCfu uusasg		CUAAAGCAGUGUUUUCACCU C	

Tabla 7. Cribados *in vitro* de dosis única en células Hep3B

Nombre dúplex	50 nM	STDE V	10 nM	STDE V	1 nM	STDE V	0,1 nM	STDE V
AD-649263.3	3,59	0,88	2,58	0,54	3,39	1,09	20,52	6,80
AD-1134924.1	3,51	1,42	3,92	1,91	3,71	0,96	19,87	4,64
AD-1134925.1	4,05	2,40	3,05	1,08	4,14	2,53	12,92	3,98
AD-1134926.1	4,50	1,35	3,34	1,23	5,55	1,89	16,21	6,50
AD-1134927.1	3,59	1,19	3,73	0,31	5,13	1,98	14,40	2,57
AD-1134928.1	2,56	0,69	2,91	0,49	3,47	0,51	11,03	3,20
AD-1134929.1	3,37	1,82	3,17	0,87	4,80	1,24	16,19	2,50
AD-1134930.1	1,49	0,39	2,08	0,62	3,53	1,23	7,57	2,29
AD-1134931.1	3,62	1,19	3,97	1,54	3,18	1,65	21,57	6,92
AD-1134932.1	5,82	0,79	5,16	1,62	6,94	1,25	21,26	5,08
AD-1134933.1	3,59	1,05	4,11	1,12	4,99	1,37	22,04	6,24
AD-1134934.1	5,43	2,04	4,00	0,68	7,60	1,66	30,92	12,34
AD-1134935.1	3,42	1,76	3,95	0,35	7,74	1,70	27,25	9,69
AD-1134936.1	2,40	1,13	3,80	0,59	5,33	2,39	16,94	5,51
AD-1134937.1	2,51	0,82	3,36	0,73	6,37	1,93	21,05	9,05
AD-1134938.1	1,17	0,50	3,26	0,90	3,04	0,58	7,20	2,40
AD-1134939.1	2,86	0,77	3,01	1,13	3,30	0,44	15,87	2,88
AD-1134940.1	4,44	2,00	3,07	0,67	6,62	4,33	21,03	1,48
AD-1134941.1	4,28	2,31	3,91	0,32	7,30	2,83	25,80	3,90
AD-1134942.1	2,72	1,50	4,69	1,12	4,05	1,47	18,32	7,37
AD-1134943.1	1,77	0,64	4,12	1,01	6,19	2,72	20,18	9,77
AD-1134944.1	1,85	1,49	3,01	0,77	5,35	2,37	15,78	5,59
AD-1134945.1	1,75	0,35	3,64	1,82	9,89	9,93	19,27	13,11
AD-1134946.1	4,15	0,57	4,52	1,18	5,21	0,76	21,71	9,03

Nombre dúplex	50 nM	STDE V	10 nM	STDE V	1 nM	STDE V	0,1 nM	STDE V
AD-1134947.1	3,12	1,73	5,81	1,13	14,51	1,78	37,70	5,89
AD-1134948.1	2,66	1,03	3,99	0,78	8,53	2,73	19,97	3,13
AD-649264.3	3,32	1,61	3,17	0,90	7,01	1,58	21,67	8,15
AD-1134949.1	2,75	2,07	3,68	1,27	5,56	1,29	20,73	5,70
AD-1134950.1	1,36	0,52	3,16	1,92	4,69	1,97	9,24	2,27
AD-1134951.1	0,75	0,25	4,34	5,81	3,03	1,11	5,28	4,51
AD-1134952.1	5,01	2,65	3,89	1,18	8,17	3,89	27,68	21,94
AD-1134953.1	3,09	1,52	5,80	3,12	7,95	2,08	31,87	12,75
AD-1134954.1	4,92	5,84	3,93	1,27	10,77	4,69	28,26	4,34
AD-1134955.1	3,12	2,13	5,33	0,97	8,02	2,07	25,60	6,65
AD-1134956.1	1,76	1,07	2,99	1,01	6,10	1,87	22,32	1,75
AD-1134957.1	4,09	3,22	3,66	0,88	14,04	13,75	20,80	4,66
AD-1134958.1	1,24	0,21	4,40	1,49	5,76	1,87	19,18	6,34
AD-1134959.1	1,56	1,77	3,10	0,83	3,30	1,89	11,39	2,37
AD-1134960.1	4,46	1,74	4,21	1,09	4,41	1,49	10,29	2,93
AD-1134961.1	6,34	4,62	3,98	1,21	9,72	2,44	29,22	23,79
AD-1134962.1	1,49	0,58	3,94	1,20	11,88	13,87	13,84	4,48
AD-1134963.1	4,88	4,27	6,19	2,27	7,99	2,97	18,86	5,66
AD-1134964.1	1,75	0,29	3,80	1,56	4,66	0,57	12,11	2,11
AD-1134965.1	1,67	0,78	4,23	0,69	7,61	0,83	12,17	4,72
AD-1134966.1	0,72	0,10	2,98	0,56	3,87	1,61	7,78	2,16
AD-1134967.1	3,59	1,39	3,29	0,68	8,67	3,14	27,10	6,99
AD-1134968.1	9,29	7,68	6,48	2,93	13,13	2,21	41,28	12,20
AD-649352.3	2,22	1,19	4,53	1,38	12,49	2,22	33,30	9,49
AD-1134969.1	3,79	1,67	5,69	1,38	10,04	1,51	34,14	8,78

Nombre dúplex	50 nM	STDE V	10 nM	STDE V	1 nM	STDE V	0,1 nM	STDE V
AD-1134970.1	1,92	1,03	2,92	0,39	6,29	0,67	16,78	4,95
AD-1134971.1	1,47	0,50	3,85	1,21	6,99	0,82	20,25	7,51
AD-1134972.1	2,25	1,10	5,17	1,48	8,78	4,43	26,72	7,62
AD-1134973.1	1,21	0,53	2,52	0,92	3,90	1,39	15,91	6,51
AD-1134974.1	2,42	0,92	3,02	0,73	10,75	6,21	21,16	10,37
AD-1134975.1	5,56	1,44	8,79	0,90	25,39	9,89	73,20	17,49
AD-1134976.1	4,01	2,02	7,02	1,49	16,12	6,64	46,99	4,67
AD-1134977.1	5,25	4,03	6,17	1,49	13,32	6,43	45,95	8,58
AD-1134978.1	1,83	1,20	3,51	1,22	8,02	2,02	17,91	5,45
AD-1134979.1	6,07	2,30	8,15	3,14	24,69	8,69	57,44	17,16
AD-1134980.1	2,94	3,56	4,06	1,43	9,34	3,28	19,86	6,30
AD-1134981.1	0,74	0,30	5,03	0,15	7,73	1,62	27,87	7,17
AD-1134982.1	2,37	0,78	3,49	1,13	5,78	1,54	24,37	3,31
AD-1134983.1	5,24	3,02	8,60	2,50	35,63	9,34	63,89	6,64
AD-1134984.1	6,05	5,00	4,90	0,52	12,73	2,26	38,25	7,70
AD-1134985.1	2,43	2,21	3,48	1,02	14,21	2,58	30,15	7,15
AD-1134986.1	1,49	0,91	3,43	1,86	11,10	5,13	21,03	4,22
AD-1134987.1	4,15	4,14	5,05	4,00	21,23	5,09	41,67	13,56
AD-1134988.1	3,00	3,94	2,82	1,77	8,27	3,58	19,12	9,53
AD-1134989.1	2,85	1,52	3,17	1,04	10,05	5,24	36,81	12,84
AD-1134990.1	7,61	4,89	9,07	2,32	34,61	10,58	63,48	7,99
AD-1134991.1	50,22	19,64	49,12	6,25	101,7 1	17,49	136,51	23,16
AD-1134992.1	2,41	0,93	3,45	1,46	15,51	6,88	31,13	8,62
AD-1134993.1	7,95	3,63	11,19	1,82	41,88	9,00	77,13	21,75

Nombre dúplex	50 nM	STDE V	10 nM	STDE V	1 nM	STDE V	0,1 nM	STDE V
AD-1134994.1	2,39	1,08	6,06	1,49	18,85	0,59	43,13	18,95
AD-1134995.1	11,15	5,70	23,39	2,85	47,27	10,06	85,90	29,94
AD-1134996.1	0,71	0,24	2,29	0,53	4,15	1,38	20,18	2,40
AD-1134997.1	7,40	2,06	13,11	9,24	46,61	12,33	98,20	30,88
AD-823016.4	1,63	1,07	3,43	0,82	10,39	1,89	19,72	4,88
AD-1134998.1	3,90	1,52	4,25	1,51	12,24	2,79	41,32	8,36
AD-1134999.1	1,89	0,85	4,03	1,08	12,44	5,35	22,17	1,79
AD-1135000.1	1,27	0,41	3,16	1,17	6,73	1,22	13,45	3,19
AD-1135001.1	0,78	0,28	3,62	2,05	4,48	2,84	14,71	10,28
AD-1135002.1	1,10	0,68	6,28	2,10	4,86	2,89	19,69	13,10
AD-1135003.1	2,99	0,31	2,61	0,98	6,32	4,89	19,24	3,86
AD-1135004.1	1,89	1,61	2,40	0,51	3,69	1,66	15,45	1,46
AD-1135005.1	1,12	0,64	1,71	0,57	3,08	1,31	11,95	4,45
AD-1135006.1	1,78	0,13	3,93	1,25	12,12	5,53	28,83	2,03
AD-1135007.1	0,84	0,26	2,45	0,90	4,56	2,41	16,49	5,07
AD-1135008.1	1,43	0,60	2,20	0,48	2,28	1,00	11,78	2,20
AD-1135009.1	0,98	0,62	2,02	0,81	2,19	1,09	7,28	4,01

Ejemplo 4. Selección *in vivo* de dúplex de ARNbc en ratones

Los dúplex de interés, identificados a partir de los estudios *in vitro* anteriores, se evaluaron *in vivo*. En particular, en el día -14 antes de la dosis, los ratones de tipo silvestre (C57BL/6) se transdujeron mediante administración intravenosa de 2×10^{11} partículas virales de un vector de virus adenoasociado 8 (AAV8) que codifica TTR humana. En particular, los ratones recibieron un AAV8 que codifica la TTR humana.

En el día 0, grupos de tres ratones recibieron por vía subcutánea una dosis única de 1 mg/kg de los agentes de interés o el control de PBS. El día 7 después de la dosis los animales fueron sacrificados, se recolectaron muestras de hígado y se congelaron instantáneamente en nitrógeno líquido. El ARNm tisular se extrajo y se analizó mediante el método de RT-QPCR.

Los niveles de ARNm de TTR humana se compararon con los del gen constitutivo GAPDH. Luego, los valores se normalizaron al promedio del grupo de control con vehículo de PBS. Los datos se expresaron como porcentaje del valor inicial y se presentaron como media más desviación estándar. Los resultados, mostrados en la Figura 1, demuestran que los agentes dúplex ilustrativos evaluados reducen potentemente el nivel del ARN mensajero de TTR humana *in vivo*.

Ejemplo 5. Selección *in vivo* de dúplex de ARNbc en monos *cynomolgus*

Los dúplex de interés, identificados en los estudios con ratones anteriores, se evaluaron en monos *cynomolgus*. Los animales (N=3 por grupo) recibieron una dosis única subcutánea de 0,5 mg/kg de un agente de ARNbc (AD-649263, AD-1134938, AD-649264, AD-1134966, o AD-65496) el día 1.

El AD-65496, identificado previamente como un agente de ARNbc que inhibe de manera potente y duradera el ARNm de la TTR humana y la proteína, se usó como comparador. La secuencia de nucleótidos modificada de la cadena de sentido de AD-65496 es 5'- usgsggauUfuCfAfUfguaaccaaga – 3' y la secuencia de nucleótidos modificada de la cadena antisentido de AD-65496 es 5'- VPusCfsuugGfuuAfcaugAfaAfucccasusc – 3'.

Se obtuvo sangre los días -8, 0, 8, 15, 20, 29, 36, 43, 50, 64, 78 y 92 después de la dosis. Los niveles de ARNm de la TTR se determinaron como se describió anteriormente. Los datos se expresaron como porcentaje del valor inicial y se presentaron como media más/menos desviación estándar. Los resultados se muestran en la Figura 2.

Los datos demuestran que la administración subcutánea de una dosis única de 0,5 mg/kg de AD-649263, AD-1134938, AD-649264, AD-1134966 o AD-65496 inhibe potente y

duraderamente el ARNm de la TTR. Los datos también demuestran que la inactivación del ARNm de la TTR después de la administración subcutánea de una dosis única de 0,5 mg/kg de AD-1134966 o AD-649264 es similar a la inactivación y la duración de la inactivación de TTR observada con el dúplex previamente evaluado, AD-65496. Además, los datos

- 5 demuestran que la inactivación del ARNm de la TTR después de la administración subcutánea de una dosis única de 0,5 mg/kg de AD-1134938 o AD-1134966 es similar a la inactivación observada con cada dúplex original respectivo (AD-649263 o AD-649264). Los datos también demuestran que AD-649264 es más potente que AD-649263 *in vivo*, recapitulando los datos obtenidos en los experimentos con AAV descritos en el Ejemplo 4.

EQUIVALENTES

Los expertos en la técnica reconocerán, o podrán determinar usando no más que experimentación rutinaria, muchos equivalentes a las modalidades y métodos específicos descritos en la presente descripción. Tales equivalentes pretenden abarcarse por el alcance

5 de las siguientes reivindicaciones.

Listado de secuencias informales**SEQ ID NO:1**

>NM_000371.4 Homo sapiens transtiretina (TTR), ARNm

```

5  ACAGAAGTCCACTCATTCTTGGCAGGATGGCTTCTCATCGTCTGCTCCTCCTCTGCCTT
   GCTGGACTGGT
   ATTTGTGTCTGAGGCTGGCCCTACGGGCACCGGTGAATCCAAGTGTCTCTGATGGTC
   AAAGTTCTAGAT
   GCTGTCCGAGGCAGTCCTGCCATCAATGTGGCCGTGCATGTGTTTCAGAAAGGCTGCTG
10  ATGACACCTGGG
   AGCCATTTGCCTCTGGGAAAACCAAGTGAGTCTGGAGAGCTGCATGGGCTCACAACTGA
   GGAGGAATTTGT
   AGAAGGGATATACAAAGTGGAATAGACACCAAATCTTACTGGAAGGCACTTGGCATCT
   CCCCATTCCAT
15  GAGCATGCAGAGGTGGTATTCACAGCCAACGACTCCGGCCCCCGCCGCTACACCATTG
   CCGCCCTGCTGA
   GCCCCTACTCCTATTCCACCACGGCTGTCGTCACCAATCCCAAGGAATGAGGGACTTCT
   CCTCCAGTGGA
   CCTGAAGGACGAGGGATGGGATTTTCATGTAACCAAGAGTATTCCATTTTTACTAAAGCA
20  GTGTTTTTCACC
   TCATATGCTATGTTAGAAGTCCAGGCAGAGACAATAAAACATTCCTGTGAAAGGCA

```

SEQ ID NO:2

>NM_013697.2 Mus musculus transtiretina (Ttr), ARNm

```

25  ACACAGATCCACAAGCTCCTGACAGGATGGCTTCCCTTCGACTCTTCCTCCTTTGCCTC
   GCTGGACTGGT
   ATTTGTGTCTGAAGCTGGCCCCGCGGGTGCTGGAGAATCCAAATGTCCTCTGATGGTCA
   AAGTCCTGGAT

```

GCTGTCCGAGGCAGCCCTGCTGTAGACGTGGCTGTAAAAGTGTTCAAAAAGACCTCTG
AGGGATCCTGGG
AGCCCTTTGCCTCTGGGAAGACCGCGGAGTCTGGAGAGCTGCACGGGCTCACCACAG
ATGAGAAGTTTGT
5 AGAAGGAGTGTACAGAGTAGAACTGGACACCAAATCGTACTGGAAGACACTTGGCATT
CCCCGTTCCAT
GAATTCGCGGATGTGGTTTTTCACAGCCAACGACTCTGGCCATCGCCACTACACCATCGC
AGCCCTGCTCA
GCCCATACTCCTACAGCACCACGGCTGTCGTCAGCAACCCCCAGAATTGAGAGACTCA
10 GCCCAGGAGGAC
CAGGATCTTGCCAAAGCAGTAGCATCCCATTGTACCAAACAGTGTTCTTGCTCTATAA
ACCGTGTTAG
CAGCTCAGGAAGATGCCGTGAAGCATTCTTATTAACCACCTGCTATTTCAATCAAACCTG
TGTTTCTTTT
15 TTATTTCTCATTTTTCTCCCCTGCTCCTAAAACCCAAAATTTTTTAAAGAATTCTAGAAG
GTATGCGAT
CAAACTTTTTAAAGAAAGAAAATACTTTTTGACTCATGGTTTAAAGGCATCCTTTCCATCT
TGGGGAGGT
CATGGGTGCTCCTGGCAACTTGCTTGAGGAAGATAGGTCAGAAAGCAGAGTGGACCAA
20 CCGTTCAATGTT
TTACAAGCAAAACATACACTAACATGGTCTGTAGCTATTAAAAGCACACAATCTGAAGGG
CTGTAGATGC
ACAGTAGTGTTTTCCAGAGCATGTTCAAAGCCCTGGGTTCAATCACAATACTGAAAAG
TAGGCCAAAA
25 AACATTCTGAAAATGAAATATTTGGGTTTTTTTTTATAACCTTTAGTGACTAAATAAGCC
AAATCTAGG

SEQ ID NO:3

>NM_012681.1 *Rattus norvegicus* transtiretina (Ttr), ARNm

CCTGACAGGATGGCTTCCCTTCGCCTGTTCCCTCCTCTGCCTCGCTGGACTGATATTTGC
GTCTGAAGCTG

GCCCTGGGGGTGCTGGAGAATCCAAGTGTCTCTGATGGTCAAAGTCCTGGATGCTGT

5 CCGAGGCAGCCC

TGCTGTCGATGTGGCCGTGAAAGTGTTCAAAAGGACTGCAGACGGAAGCTGGGAGCCG
TTTGCCTCTGGG

AAGACCGCCGAGTCTGGAGAGCTGCACGGGCTCACCACAGATGAGAAGTTCACGGAAG
GGGTGTACAGGG

10 TAGAACTGGACACCAAATCATACTGGAAGGCTCTTGGCATTTCCTCCATTCCATGAATAC
GCAGAGGTGGT

TTTCACAGCCAATGACTCTGGTCATCGCCACTACACCATCGCAGCCCTGCTCAGCCCGT
ACTCCTACAGC

ACCACTGCTGTCGTCAGTAACCCCCAGAACTGAGGGACCCAGCCCACGAGGACCAAGA

15 TCTTGCCAAAGC

AGTAGCTCCCATTTGTACTGAAACAGTGTCTTCTGCTCTATAAACCGTGTTAGCAACTCGG
GAAGATGCCG

TGAAACGTTCTTATTAAACCACCTTTATTTTCATTC

20 **SEQ ID NO:4**

>NM_001283593.1 *Macaca fascicularis* transtiretina (TTR), ARNm

GCAGGATGGCTTCTCATCGTCTGCTCCTCCTCTGCCTCGCTGGACTGGTATTTGTGTCT
GAGGCTGGTCC

TACGGGCGTTGATGAATCCAAGTGTCTCTGATGGTCAAAGTTCTAGATGCCGTCCGAG

25 GCAGTCCTGCT

GTCAATGTGGCTGTGAACGTGTTCAAAAAGGCTGCTGATGAGACCTGGGCGCCATTTG
CCTCTGGGAAAA

CCAGTGAGTCTGGAGAGCTGCATGGGCTCACAACCTGAGGAGGAATTTGTAGAAGGGAT
ATACAAAGTGGA

AATAGACACCAAATCTTACTGGAAGTCACTTGGCATCTCCCCATTCCATGAGCATGCAG
AGGTGGTATTC

5 ACAGCCAACGATTCCGGCCCCCGCCACTACACCATCGCCGCCCTGCTGAGCCCCTACT
CCTATTCCACCA

CGGCTGTCGTCACCAATCCCAAGGAATGAGGGACTTCTCCAGAGGATCTGAAGGACGA
G

10 **SEQ ID NO:5**

>NM_001261679.1 *Macaca mulatta* transtiretina (TTR), ARNm

GAATCAGCAGGTTTGGAGTCAGATTGGCAGGGATAAGCAGCCTAGCTCAGGAGAAGTG
GGTATAAAAGCC

CCAGGCTGGGAGCAGCCATCACAGAAGTCCACTCGTTCTTGGCAGGATGGCTTCTCAT

15 CGTCTGCTCCTC

CTCTGCCTCGCTGGACTGGTATTTGTGTCTGAGGCTGGTCCTACGGGCGTTGATGAATC
CAAGTGTCTC

TGATGGTCAAAGTTCTAGATGCCGTCCGAGGCAGTCCTGCTGTCAATGTGGCTGTGAAC
GTGTTCAAAAA

20 GGCTGCTGATGAGACCTGGGCGCCATTTGCCTCTGGGAAAACCAAGTGAGTCTGGAGAG
CTGCATGGGCTC

ACAACTGAGGAGGAATTTGTAGAAGGGATATACAAAGTGGAAATAGACACCAAATCTTA
CTGGAAGTCAC

TTGGCATCTCCCCATTCCATGAGCATGCAGAGGTGGTATTCACAGCCAACGATTCCGGC

25 CCCCGCCACTA

CACCATCGCCGCCCTGCTGAGCCCCTACTCCTATTCCACCACGGCTGTCGTCACCAATC
CCAAGGAATGA

GGGACTTCTCCAGAGGATCTGAAGGACGAGGGATGGGATTTTCATGTAACCAAGAGTATT
CCATTTTTACT

AAAGCAGTGTTTTACCTCATAAGCTATGTTAGGAGTCCAGGCAGAGACAATAAAACATT
CCTGTGAAAG

5 GCAAA

SEQ ID NO:6

Complemento inverso de la SEQ ID NO:1

TGCCTTTACAGGAATGTTTTATTGTCTCTGCCTGGACTTCTAACATAGCATATGAGGTG
10 AAAACACTGCTTTAGTAAAAATGGAATACTCTTGGTTACATGAAATCCCATCCCTCGTCC
TTCAGGTCCACTGGAGGAGAAGTCCCTCATTCCTTGGGATTGGTGACGACAGCCGTGG
TGGAATAGGAGTAGGGGCTCAGCAGGGCGGCAATGGTGTAGCGGCGGGGGCCGGAG
TCGTTGGCTGTGAATACCACCTCTGCATGCTCATGGAATGGGGAGATGCCAAGTGCCTT
CCAGTAAGATTTGGTGTCTATTTCCACTTTGTATATCCCTTCTACAAATTCCTCCTCAGTT
15 GTGAGCCCATGCAGCTCTCCAGACTCACTGGTTTTCCAGAGGCAAATGGCTCCCAGG
TGTCATCAGCAGCCTTTCTGAACACATGCACGGCCACATTGATGGCAGGACTGCCTCG
GACAGCATCTAGAACTTTGACCATCAGAGGACACTTGGATTACCGGTGCCCCGTAGGG
CCAGCCTCAGACACAAATACCAGTCCAGCAAGGCAGAGGAGGAGCAGACGATGAGAAG
CCATCCTGCCAAGAATGAGTGGACTTCTGT

20

SEQ ID NO:7

Complemento inverso de la SEQ ID NO:2

CCTAGATTTGGCTTTATTTAGTCACTAAAGGTTATAAAAAAAAAACCCAAATATTTCATTTT
CAGAATGTTTTTTGGCCTACTTTTCAGTATTGTGATTGAACCCAGGGCTTTTGAACATGC
25 TCTGGGAAAACACTACTGTGCATCTACAGCCCTTCAGATTGTGTGCTTTTAATAGCTACA
GACCATGTTAGTGTATGTTTTGCTTGTAACATTGAACGGTTGGTCCACTCTGCTTTCT
GACCTATCTTCCTCAAGCAAGTTGCCAGGAGCACCCATGACCTCCCCAAGATGGAAAG
GATGCCTTTAAACCATGAGTCAAAAAGTATTTCTTTCTTTAAAAAGTTTGATCGCATACC

TTCTAGAATTCTTTAAAAAATTTTGGGTTTTAGGAGCAGGGGAGAAAAATGAGGAAATAA
 AAAAGAAACACAGTTTGAATGAAATAGCAGGTGGTTTAATAAGAATGCTTCACGGCATCT
 TCCTGAGCTGCTAACACGGTTTATAGAGCAAGAACTGTTTTGGTACAAATGGGATGC
 TACTGCTTTGGCAAGATCCTGGTCCTCCTGGGCTGAGTCTCTCAATTCTGGGGGTTGCT
 5 GACGACAGCCGTGGTGCTGTAGGAGTATGGGCTGAGCAGGGCTGCGATGGTGTAGTG
 GCGATGGCCAGAGTCGTTGGCTGTGAAAACCACATCCGCGAATTCATGGAACGGGGAA
 ATGCCAAGTGTCTTCCAGTACGATTTGGTGTCCAGTTCTACTCTGTACACTCCTTCTACA
 AACTTCTCATCTGTGGTGAGCCCGTGCAGCTCTCCAGACTCCGCGGTCTTCCCAGAGG
 CAAAGGGCTCCCAGGATCCCTCAGAGGTCTTTTTGAACACTTTTACAGCCACGTCTACA
 10 GCAGGGCTGCCTCGGACAGCATCCAGGACTTTGACCATCAGAGGACATTTGGATTCTC
 CAGCACCCGCGGGGCCAGCTTCAGACACAAATACCAGTCCAGCGAGGCAAAGGAGGA
 AGAGTCGAAGGGAAGCCATCCTGTCAGGAGCTTGTGGATCTGTGT

SEQ ID NO:8

15 Complemento inverso de la SEQ ID NO:3

GAATGAAATAAAGGTGGTTTAATAAGAACGTTTCACGGCATCTTCCCGAGTTGCTAACAC
 GGTTTATAGAGCAAGAACTGTTTCAGTACAAATGGGAGCTACTGCTTTGGCAAGATC
 TTGGTCCTCGTGGGCTGGGTCCCTCAGTTCTGGGGGTTACTGACGACAGCAGTGGTG
 TGTAGGAGTACGGGCTGAGCAGGGCTGCGATGGTGTAGTGGCGATGACCAGAGTCATT
 20 GGCTGTGAAAACCACCTCTGCGTATTCATGGAATGGGGAAATGCCAAGAGCCTTCCAGT
 ATGATTTGGTGTCCAGTTCTACCCTGTACACCCCTTCCGTGAACTTCTCATCTGTGGTGA
 GCCCGTGCAGCTCTCCAGACTCGGCGGTCTTCCCAGAGGCAAACGGCTCCCAGCTTCC
 GTCTGCAGTCCTTTTGAACACTTTACGGCCACATCGACAGCAGGGCTGCCTCGGACA
 GCATCCAGGACTTTGACCATCAGAGGACACTTGGATTCTCCAGCACCCCCAGGGCCAG
 25 CTTCAGACGCAAATATCAGTCCAGCGAGGCAGAGGAGGAACAGGCGAAGGGAAGCCAT
 CCTGTCAGG

SEQ ID NO:9

Complemento inverso de la SEQ ID NO:4

CTCGTCCTTCAGATCCTCTGGAGAAGTCCCTCATTCTTGGGATTGGTGACGACAGCCG
 TGGTGGAATAGGAGTAGGGGCTCAGCAGGGCGGCGATGGTGTAGTGGCGGGGGCCG
 GAATCGTTGGCTGTGAATACCACCTCTGCATGCTCATGGAATGGGGAGATGCCAAGTGA
 5 CTTCCAGTAAGATTTGGTGTCTATTTCCACTTTGTATATCCCTTCTACAAATTCCTCCTCA
 GTTGTGAGCCCATGCAGCTCTCCAGACTCACTGGTTTTCCAGAGGCAAATGGCGCCC
 AGGTCTCATCAGCAGCCTTTTTGAACACGTTACAGCCACATTGACAGCAGGACTGCCT
 CGGACGGCATCTAGAACTTTGACCATCAGAGGACACTTGGATTCATCAACGCCCCGTAGG
 ACCAGCCTCAGACACAAATACCAGTCCAGCGAGGCAGAGGAGGAGCAGACGATGAGAA
 10 GCCATCCTGC

SEQ ID NO:10

Complemento inverso de la SEQ ID NO:5

TTTGCCTTTCACAGGAATGTTTTATTGTCTCTGCCTGGACTCCTAACATAGCTTATGAGG
 15 TGAAAACACTGCTTTAGTAAAAATGGAATACTCTTGGTTACATGAAATCCCATCCCTCGT
 CCTTCAGATCCTCTGGAGAAGTCCCTCATTCTTGGGATTGGTGACGACAGCCGTGGTG
 GAATAGGAGTAGGGGCTCAGCAGGGCGGCGATGGTGTAGTGGCGGGGGCCGGAATC
 GTTGGCTGTGAATACCACCTCTGCATGCTCATGGAATGGGGAGATGCCAAGTGACTTCC
 AGTAAGATTTGGTGTCTATTTCCACTTTGTATATCCCTTCTACAAATTCCTCCTCAGTTGT
 20 GAGCCCATGCAGCTCTCCAGACTCACTGGTTTTCCAGAGGCAAATGGCGCCCAGGTC
 TCATCAGCAGCCTTTTTGAACACGTTACAGCCACATTGACAGCAGGACTGCCTCGGAC
 GGCATCTAGAACTTTGACCATCAGAGGACACTTGGATTCATCAACGCCCCGTAGGACCAG
 CCTCAGACACAAATACCAGTCCAGCGAGGCAGAGGAGGAGCAGACGATGAGAAGCCAT
 CCTGCCAAGAACGAGTGGACTTCTGTGATGGCTGCTCCCAGCCTGGGGCTTTTATACC
 25 CACTTCTCCTGAGCTAGGCTGCTTATCCCTGCCAATCTGACTCCAAACCTGCTGATTC

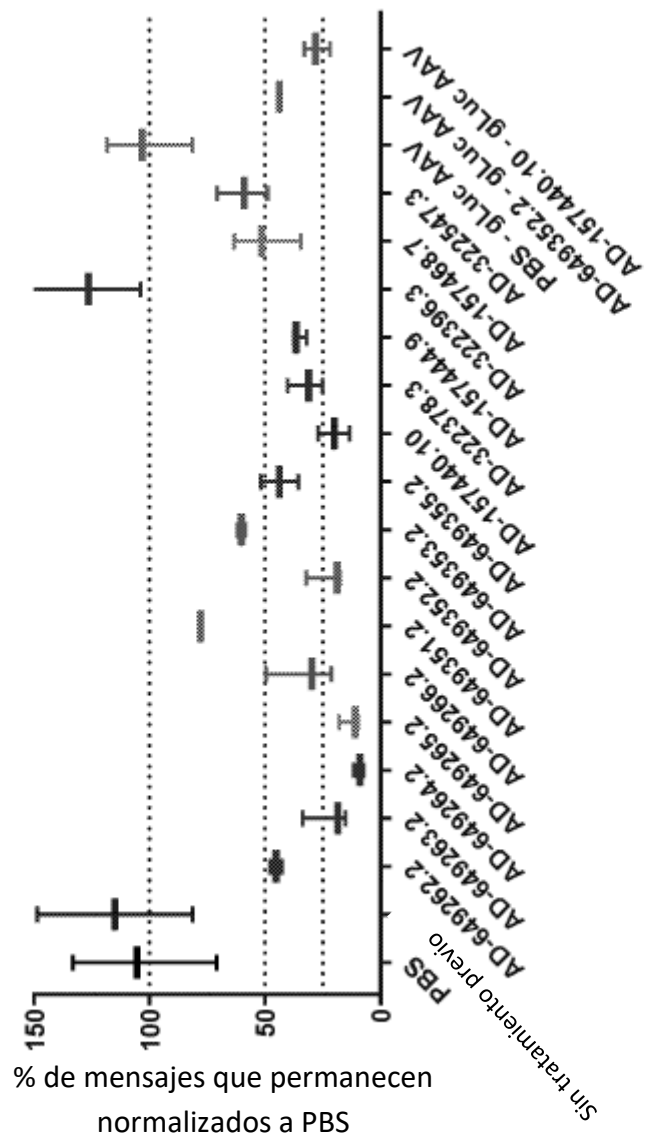


Figura 1

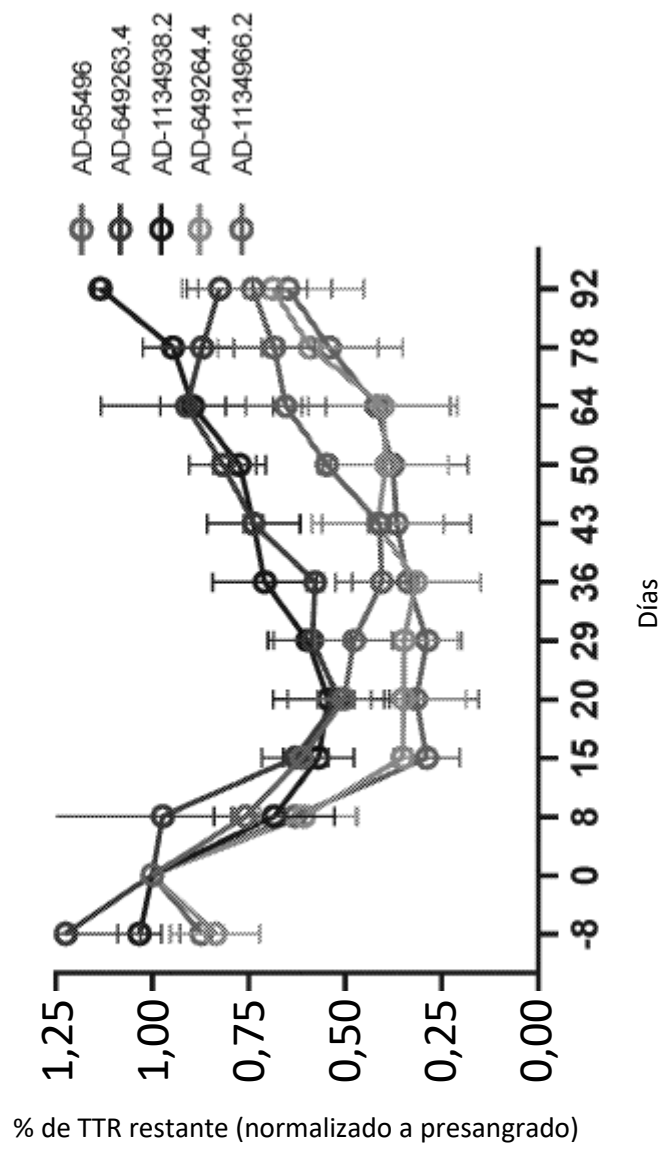


Figura 2