

COMPOSICIONES Y MÉTODOS PARA INHIBIR LA EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA ANGIOTENSINÓGENO (AGT)

CAMPO DE LA INVENCION

La invención se refiere, en parte, a composiciones y métodos que pueden utilizarse para inhibir la expresión de la proteína angiotensinógeno (AGT).

TÉCNICA ANTERIOR

El sistema renina-angiotensina-aldosterona (RAAS) desempeña un papel clave en la regulación de la presión arterial. La cascada del RAAS comienza con la secreción de renina a la circulación por parte de las células glomerulares del riñón. La secreción de renina es estimulada por varios factores, incluyendo la sobrecarga de Na^+ en el túbulo distal, estimulación β -simpática y/o disminución de la perfusión renal. La renina activa en el plasma divide el angiotensinógeno (producido por el hígado) en angiotensina I, que posteriormente se convierte en angiotensina II mediante la enzima convertidora de angiotensina (ECA) circulante y expresada localmente. La mayoría de los efectos de la angiotensina II sobre el RAAS se ejercen a través de su unión al receptor de angiotensina II tipo 1 (AT1R), lo que resulta en vasoconstricción arterial, efectos tubulares y glomerulares como la mejora en la regulación de la reabsorción de Na^+ o la tasa de filtración glomerular. Además, la estimulación de AT1R, junto con otros estímulos (por ejemplo, corticotropina, hormona antidiurética, catecolaminas, endotelina, serotonina) y los niveles de Mg^{2+} y K^+ , conduce a la liberación de aldosterona, que posteriormente promueve la excreción de Na^+ y K^+ en el túbulo renal distal.

La desregulación del RAAS causada, por ejemplo, por la producción excesiva de angiotensina II y/o la estimulación de AT1R causa hipertensión, lo que puede provocar, por ejemplo, un aumento del estrés oxidativo, la promoción de la inflamación, la hipertrofia y la fibrosis en el corazón, los riñones y las arterias, y provocar, por ejemplo, fibrosis ventricular

izquierda, remodelación arterial y glomeruloesclerosis.

La hipertensión arterial es la enfermedad más prevalente y manejable en los países desarrollados, afectando al 20-50% de la población adulta. La hipertensión es un factor de riesgo importante para diversas enfermedades, trastornos y afecciones, como la reducción de la esperanza de vida, la enfermedad renal crónica, el accidente cerebrovascular, el infarto de miocardio, la insuficiencia cardíaca, el aneurisma (por ejemplo, el aneurisma aórtico), la enfermedad arterial periférica, la lesión cardíaca (por ejemplo, dilatación o hipertrofia cardíaca) y otras enfermedades, trastornos y/o condiciones relacionados con el sistema cardiovascular. Además, se ha demostrado que la hipertensión es un factor de riesgo importante para la morbilidad y mortalidad cardiovascular, ya que representa o constituye el 62% de todos los accidentes cerebrovasculares y el 49% de todos los casos de enfermedades cardíacas. En 2017, se produjo un cambio en las pautas para el diagnóstico, la prevención y el tratamiento de la hipertensión, lo que proporcionó objetivos para reducir aún más la presión arterial disminuyendo adicionalmente el riesgo de desarrollar enfermedades y trastornos relacionados con la hipertensión. (Consultar, por ejemplo, Reboussin, etc., Systematic Review for the 2017ACC/AHA/AAPA/ABC/ACPM/AGS/APhA/ASH/ASPC/NMA/PCNA Guideline for the Prevention, Detection, Evaluation and Management of High Blood Pressure in Adults: A report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines, J Am Coll Cardiol. 2017 Nov. 7. Pii: S0735-1097(17)41517-8. doi: 10.1016/j.jacc.2017.11.004; y Whelton, etc. (2017ACC/AHA/ AAPA/ ABC/ACPM/AGS/ APhA/ASH/ASPC/NMA/PCNA Guideline for the Prevention, Detection, Evaluation, and Management of High Blood Pressure in Adults: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines. J Am Coll Cardiol. 2017 Nov 7. pii: S0735-1097(17)41519-1.doi:10.1016/j.jacc.2017.11.006).

A pesar de la gran cantidad de medicamentos antihipertensivos disponibles para el tratamiento de la hipertensión, más de dos tercios de los sujetos no están controlados con un medicamento antihipertensivo y requieren dos o más medicamentos antihipertensivos de entre diferentes clases de fármacos. Esto reduce aún más el número de sujetos con presión arterial

controlada debido a la disminución de la adherencia y al aumento de los efectos secundarios a medida que aumenta la dosis.

Por consiguiente, existe una necesidad en las técnicas de terapias alternativas y terapias combinadas para el tratamiento de la hipertensión y otras enfermedades relacionadas con los angiotensinógenos.

CONTENIDO DE LA INVENCION

De acuerdo con un aspecto de la presente invención, se proporciona un agente de ácido ribonucleico bicatenario (dsRNA) para inhibir la expresión de angiotensinógeno (AGT), el agente dsRNA que comprende una hebra sentido y una hebra antisentido, posiciones de nucleótido 2 a 18 en la hebra antisentido que incluye una región de complementariedad a una transcripción de AGT RNA, en la que la región de complementariedad comprende al menos 15 nucleótidos contiguos que difieren en 0, 1, 2 o 3 nucleótidos de una de las secuencias antisentido enumeradas en las Tablas 1-4 y, opcionalmente, incluye un ligando dirigido. En algunas modalidades, la región complementaria a la transcripción de AGT RNA comprende al menos 15, 16, 17, 18 o 19 nucleótidos contiguos que difieren en no más de 3 nucleótidos de una de las secuencias antisentido enumeradas en las Tablas 1-4. En algunas modalidades, la hebra antisentido del dsRNA es al menos sustancialmente complementaria a cualquiera de un área diana de la SEQ ID NO: 519 y se proporciona en cualquiera de las Tablas 1-4. En algunas modalidades, la hebra antisentido del dsRNA es totalmente complementaria a cualquiera de un área diana de SEQ ID NO: 519 y se proporciona en cualquiera de las Tablas 1-4. En algunas modalidades, el agente dsRNA comprende cualquiera de las secuencias de hebra sentido enumeradas en las Tablas 1-4, en las que la secuencia de hebra sentido es al menos sustancialmente complementaria a la secuencia de hebra antisentido en el agente dsRNA. En algunas modalidades, el agente dsRNA comprende cualquiera de las secuencias de hebra sentido enumeradas en las Tablas 1 a 4, en las que la secuencia de hebra sentido es totalmente complementaria a la secuencia de hebra antisentido en el agente de dsRNA. En algunas modalidades, el agente dsRNA comprende cualquiera de las secuencias de hebras antisentido enumeradas en las Tablas 1-4. En algunas modalidades, el agente dsRNA incluye el conjunto de secuencias como una

secuencia dúplex en cualquiera de las Tablas 1 a 4.

En algunas modalidades, el agente dsRNA comprende una hebra sentido que difiere en 0, 1, 2 o 3 nucleótidos de la fórmula (A): fórmula 5'-Z₁AGCUUGUUUGUGAAACZ₂-3' (A), en la que la secuencia de nucleótidos Z₁ tiene 0-15 nucleótidos de longitud, Z₂ se selecciona uno de entre A, U, C, G o no existe. En algunas modalidades, Z₁ es una secuencia de nucleótidos que comprende 1-4 motivos de nucleótidos. En ciertas modalidades, la secuencia de nucleótidos Z₁ comprende 1, 2, 3 o 4 nucleótidos de longitud. En ciertas modalidades, Z₂ es A. En ciertas modalidades, Z₁ es una secuencia de nucleótidos que comprende CACC o GACC. En ciertas modalidades, la secuencia de nucleótidos Z₁ se selecciona una de entre las siguientes: C, AC, UC, GC, CC, ACC, UCC, GCC, CCC, GACC, AACC, UACC, CACC, CGACC, CCGACC, ACCGACC, ACCGACC, AACCGACC, CAACCGACC, CCAACCGACC, UCCAACCGACC, UUCAACCGACC, AUUCAACCGACC, AAUCCAACCGACC o GAAUCCAACCGACC. En algunas modalidades, el agente dsRNA comprende una hebra antisentido que difiere en 0, 1, 2 o 3 nucleótidos de la fórmula (B): fórmula 5'-Z₃GUUUCACAAACAAGCUZ₄-3' (B), en la que Z₃ se selecciona de A, U, C, G o no existe, la secuencia de nucleótidos Z₄ tiene una longitud de 0-15 nucleótidos. En ciertas modalidades, Z₄ es una secuencia de nucleótidos que comprende 1-4 nucleótidos de longitud. En ciertas modalidades, Z₄ es una secuencia de nucleótidos que comprende 1, 2, 3 o 4 nucleótidos. En ciertas modalidades, Z₃ es U. En ciertas modalidades, la secuencia de nucleótidos Z₄ se selecciona a partir de secuencias de nucleótidos que comprenden GGUC o GGUG. En ciertas modalidades, la secuencia de nucleótidos Z₄ se selecciona entre: G, GU, GC, GA, GG, GGU, GGA, GGC, GGG, GGUG, GGUC, GGUU, GGUA, GGUCG, GGUCGG, GGUCGGU, GGUCGGUU, GGUCGGUUG, GGUCGGUUGG, GGUCGGUUGGA, GGUCGGUUGGAA, GGUCGGUUGGAAU, GGUCGGUUGGAAUU o GGUCGGUUGGAAUUC. En algunas modalidades, el agente dsRNA comprende una hebra sentido y una hebra antisentido, la hebra sentido y la hebra antisentido comprenden respectivamente una secuencia de nucleótidos que difieren en 0, 1, 2 o 3 nucleótidos de la fórmula (A) y la fórmula (B) como se describe en este documento, y opcionalmente comprenden un ligando dirigido. En ciertas

modalidades, la hebra sentido (A) y la hebra antisentido (B) del agente dsRNA no tienen cada una más de 35 nucleótidos de longitud. En ciertas modalidades, la secuencia de nucleótidos Z_1 y Z_4 son total o parcialmente complementarias. En algunas modalidades, el agente dsRNA comprende una hebra sentido que difiere en 0, 1, 2 o 3 nucleótidos de la fórmula (A'): 5'- Z_1 'CAGCUUGUUUGUGAAACA-3' Fórmula (A'), el agente dsRNA comprende una hebra antisentido que difiere en 0, 1, 2 o 3 nucleótidos de la fórmula (B'): Fórmula 5'-UGUUUCACAAACAAGCUG Z_4 '-3' (B'), la secuencia de nucleótidos Z_1 y Z_4 incluyen de forma independiente 0-13 nucleótidos. En algunas modalidades, las secuencias de nucleótidos Z_1 ' y Z_4 ' comprenden independientemente 1, 2 o 3 nucleótidos. En ciertas modalidades, la secuencia de nucleótidos Z_1 ' se selecciona entre: A, U, G, C, AC, UC, GC, CC, GAC, AAC, UAC, CAC, CGAC, CCGAC, ACCGAC, AACCGAC, CAACCGAC o GAAUCCAACCGAC. La secuencia de nucleótidos Z_4 ' es seleccionada entre una de las siguientes opciones: U, C, A, G, GU, GA, GC, GG, GUG, GUC, GUU, GUA, GUCG, GUCGG, GUCGGU, GUCGGUU, GUCGGUUG o GUCGGUUGGAAUUC.

En algunas modalidades, el agente dsRNA comprende una hebra sentido y una hebra antisentido, la hebra antisentido comprende al menos 15 nucleósidos contiguos que difieren en 0, 1, 2 o 3 nucleótidos de cualquiera de las secuencias antisentido enumeradas a continuación:

5'-UACUCAUUAGAAGAAAAGGUG-3' (SEQ ID NO: 162);

5'-UCUUAGACCAAGGAGAAACGG-3' (SEQ ID NO: 163);

5'-UGUUUCACAAACAAGCUGGUC-3' (SEQ ID NO: 167);

5'-UGUUUCACAAACAAGCUGGUG-3'(SEQ ID NO:523);

5'-UUCGGUUGGAAUUCUUUUUGC-3' (SEQ ID NO: 184);

5'-GUUUUCACAAACAAGCUGG-3' (SEQ ID NO:653).

En algunas modalidades, el agente dsRNA comprende una hebra sentido y una hebra antisentido, la hebra sentido y antisentido comprende al menos 15 nucleótidos contiguos que difieren en 0, 1, 2 o 3 nucleótidos de cualquiera de las secuencias de nucleótidos enumeradas a continuación, respectivamente:

Hebra sentido: 5'-CACCUUUUCUAAUGAGUA-3' (SEQ ID NO: 65),

Hebra antisentido: 5'-UACUCAUUAGAAGAAAAGGUG-3' (SEQ ID NO: 162) .

En algunas modalidades, el agente dsRNA comprende una hebra sentido y una hebra antisentido, la hebra sentido y antisentido comprenden al menos 15 nucleótidos contiguos que difieren en 0, 1, 2 o 3 nucleótidos de cualquiera de las secuencias de nucleótidos enumeradas a continuación, respectivamente:

Hebra sentido: 5'-CCGUUUCUCCUUGGUAGA-3' (SEQ ID NO: 66),

Hebra antisentido: 5'-UCUUAGAAGAAGGAGAAACGG-3' (SEQ ID NO: 163).

En algunas modalidades, el agente dsRNA comprende una hebra sentido y una hebra antisentido, la hebra sentido y antisentido comprenden al menos 15 nucleótidos contiguos que difieren en 0, 1, 2 o 3 nucleótidos de cualquiera de las secuencias de nucleótidos enumeradas a continuación, respectivamente:

Hebra sentido: 5'-GACCAGCUUGUUUGUACA-3' (SEQ ID NO: 70),

Hebra antisentido: 5'-UGUUUCACAAACAAGCUGGUC-3' (SEQ ID NO: 167).

En algunas modalidades, el agente dsRNA comprende una hebra sentido y una hebra antisentido, la hebra sentido y antisentido comprenden al menos 15 nucleótidos contiguos que difieren en 0, 1, 2 o 3 nucleótidos de cualquiera de las secuencias de nucleótidos enumeradas a continuación, respectivamente:

Hebra sentido: 5'-CACCAGCUUGUUUGUACA-3' (SEQ ID NO: 522)

Hebra antisentido: 5'-UGUUUCACAAAAGCUGGUG-3' (SEQ ID NO: 523);

En algunas modalidades, el agente dsRNA comprende una hebra sentido y una hebra antisentido, la hebra sentido y antisentido comprenden al menos 15 nucleótidos contiguos que difieren en 0, 1, 2 o 3 nucleótidos de cualquiera de las secuencias de nucleótidos enumeradas a continuación,

respectivamente:

Hebra sentido: 5'-GCAAAAAAAAAAAAAAAAAACCGAA-3' (SEQ ID NO: 87),

Hebra antisentido: 5'-UUCGGUUGAUUUUUUUGC-3' (SEQ ID NO: 184).

En algunas modalidades, el agente dsRNA comprende una hebra sentido y una hebra antisentido, la hebra sentido y antisentido comprenden al menos 15 nucleótidos contiguos que difieren en 0, 1, 2 o 3 nucleótidos de cualquiera de las secuencias de nucleótidos enumeradas a continuación, respectivamente:

Hebra sentido: 5'-CCAGCUUGUUUGUGAAAC-3' (SEQ ID NO: 652),

Hebra antisentido: 5'-GUUUCACAAACAAGCUGG-3' (SEQ ID NO: 653) .

En algunas modalidades, el dúplex del agente dsRNA se selecciona de cualquier dúplex de AD00158- 19-2, AD00158-19-1, AD00158-3, AD00158-1, AD00158-2, AD00158, AD00159, AD00159-1, AD00159-2, AD00159-19-1, AD00159-19-2, AD00163, AD00163-1, AD00163-2, AD00163-19-1, AD00163-19-2, AD00163-3, AD00300-1, AD00300-19-1, AD00300-19-2 en la Tabla 1.

En algunas modalidades, el dúplex del agente dsRNA se selecciona de cualquier dúplex de: AV01227, AV01228, AV01229, AV01230, AV01231, AV01232, AV01233, AV01234, AV01235, AV01236, AV01237, AV01238, AV01239, AV01240, AV01241, AV01242, AV01243, AV01244, AV01245, AV01246, AV01247, AV01248, AV01249, AV01250, AV01251, AV01252, AV01253, AV01254, AV01255, AV01256, AV01257 o AV01711 en la Tabla 1.

En algunas modalidades, el agente dsRNA comprende al menos un nucleótido modificado. En ciertas modalidades, todos o sustancialmente todos los nucleótidos de la hebra antisentido son nucleótidos modificados. En algunas modalidades, al menos un nucleótido modificado incluye: nucleótido 2'-O-metilo, nucleótido 2'-fluoro, nucleótido 2'-desoxi, imitador de nucleótido 2'3'-seco, nucleótido bloqueado, nucleótido de ácido

nucleico desbloqueado (unlocked nucleic acid nucleotide, UNA), nucleótido de ácido nucleico de glicol (glycol nucleic acid nucleotide, GNA), nucleótido 2'-F-Arabino, 2'- nucleótido de methoxyetilo, nucleótido abásico, ribitol, nucleótido invertido, nucleótido abásico invertido, nucleótido 2'-Ome invertido, nucleótido 2'-desoxi invertido, nucleótido 2'-amino-modificado, nucleótido modificado con 2'-alquilo, nucleótido de mofolino y nucleótido 3'-OMe, un nucleótido que incluye un grupo 5'-fosforotioato, o un nucleótido terminal unido a un derivado de colesterol o al grupo bisdecilamida del ácido dodecanoico, un nucleótido 2'-aminomodificado, una fosforamidita o una base no natural incluyendo el nucleótido.

En algunas modalidades, estos agentes de ácido ribonucleico bicatenario (dsRNA) comprenden una hebra sentido y una hebra antisentido que es complementaria al menos a una porción de un RNAm correspondiente a un gen diana, en la que la hebra antisentido del dsRNA comprende una secuencia de nucleótidos mostrada como fórmula (C) y la hebra sentido de dsRNA comprende una secuencia de nucleótidos mostrada como fórmula (D), la hebra antisentido comprende la fórmula (C) enumerada en la dirección de 3' a 5':

$3'-(N_L)_n N_{M1} N_L N_{M2} N_L N_F N_L N_{M3} N_L N_{M4} N_L N_{M5} N_{M6} N_L N_{M7} N_{M8} N_L N_F$
 N_L -5' fórmula (C),

La hebra sentido comprende la fórmula (D) enumerada en la dirección de 5' a 3':

$5'-(N'_L)_n N'_L N'_L N'_L N'_{N1} N'_{N2} N'_{N3} N'_{N4} N'_F N'_L N'_{N5} N'_{N6} N'_L N'_L N'_L N'_L N'_L N'_L N'_L$ -
 3' fórmula(D).

En donde, cada N_F representa un nucleótido 2'-fluoro-modificado; N_{M1} , N_{M2} , N_{M3} , N_{M4} , N_{M5} , N_{M6} , N_{M7} y N_{M8} representan de forma independiente el ácido nucleósido modificado o no modificado, solo hay tres nucleótidos 2'-fluoro-modificados o solo uno 2'-fluoro-modificado en N_{M1} , N_{M2} , N_{M3} , N_{M4} , N_{M5} , N_{M6} , N_{M7} y N_{M8} ; cada N_L representa independientemente un nucleótido modificado o no modificado, y la modificación no es un nucleótido 2'-fluoro-modificado; cada N'_F representa un nucleótido 2'-fluoro-modificado; N'_{N1} , N'_{N2} , N'_{N3} , N'_{N4} , N'_{N5} y N'_{N6} , representan independientemente nucleótidos modificados o no modificados. Solo hay dos nucleótidos 2'-fluoro-modificados en N'_{N1} , N'_{N2} , N'_{N3} , N'_{N4} , N'_{N5} y N'_{N6} ;

cada N'_L representa independientemente un nucleótido modificado o no modificado, y la modificación no es un nucleótido 2'-fluoro-modificado; y n y n' pueden ser números enteros de 0 a 7.

En ciertas modalidades, el nucleótido en la posición 2, 7, 12, 14 y 16 (contando desde el primer nucleótido emparejado del extremo 5') de la hebra antisentido representada por la fórmula (C) es 2'-flúor-15 nucleótidos modificados; y el nucleótido en las posiciones 9, 11 y 13 (contando desde el primer nucleótido emparejado del extremo 3') de la hebra sentido representada por la fórmula (D) es un nucleótido 2'-fluoro-modificado. En ciertas modalidades, los nucleótidos en las posiciones N_{M2} , N_{M3} , N_{M6} de la hebra antisentido representada por la fórmula (C) son nucleótidos 2'-fluoromodificados; Los nucleótidos en las posiciones N'_{N3} , N'_{N5} de la hebra sentido que se muestra en la fórmula (D) son nucleótidos 2'-fluoro-modificados.

En algunas modalidades, el agente dsRNA comprende un nucleótido E-vinilfosfonato en el extremo 5' de la hebra guía. En ciertas modalidades, el agente dsRNA comprende al menos un enlace internucleósido fosforotioato. En ciertas modalidades, la hebra sentido comprende al menos un enlace internucleósido fosforotioato. En algunas modalidades, la hebra antisentido comprende al menos un enlace internucleósido fosforotioato. En algunas modalidades, la hebra sentido comprende 1, 2, 3, 4, 5 o 6 enlaces internucleósidos fosforotioatos. En algunas modalidades, la hebra antisentido comprende 1, 2, 3, 4, 5 o 6 enlaces internucleósidos fosforotioatos.

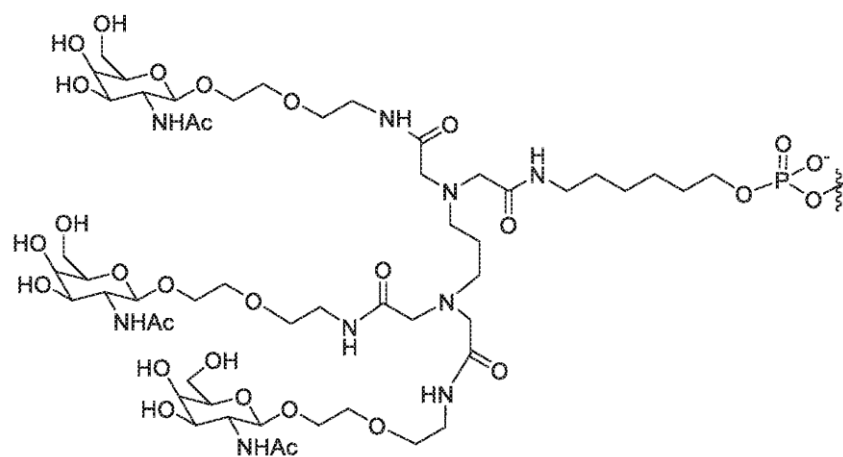
En ciertas modalidades, todos o sustancialmente todos los nucleótidos de las hebras sentido y antisentido son nucleótidos modificados. En algunas modalidades, la hebra sentido modificada es una secuencia de hebra sentido modificada enumerada en las Tablas 2-4. En algunas modalidades, la hebra antisentido modificada es una hebra modificada secuencia de hebras antisentido enumeradas en las Tablas 2-4.

En ciertas modalidades, la hebra sentido es complementaria o sustancialmente complementaria a la hebra antisentido, y la región de complementariedad tiene entre 16 y 23 nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, la región complementaria tiene una longitud de 19-21 nucleótidos. En ciertas modalidades, la región complementaria es de 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos de

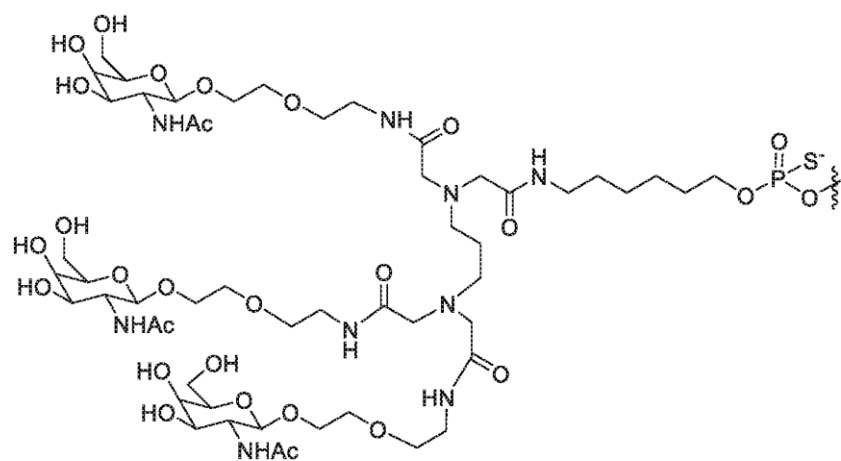
longitud.

En algunas modalidades, cada hebra no tiene más de 40 nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, cada hebra no tiene más de 30 nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, cada hebra no tiene más de 25 nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, cada hebra no tiene más de 23 nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, cada hebra es de 4, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos de longitud.

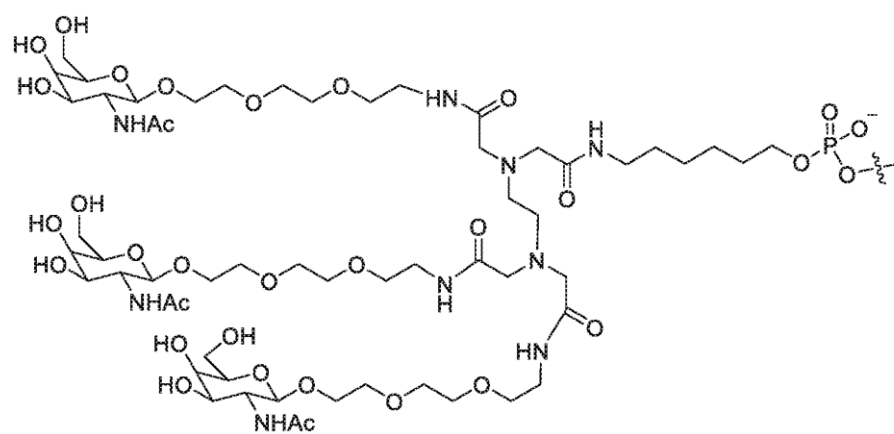
En ciertas modalidades, el agente dsRNA comprende al menos un nucleótido modificado y además comprende uno o más grupos de direccionamiento o enlace. En algunas modalidades, uno o más grupos de direccionamiento o grupos de enlace se conjugan con la hebra sentido. En algunas modalidades, el grupo de direccionamiento o grupo de enlace incluye N-acetil-galactosamina (GalNAc). En algunas modalidades, los grupos de direccionamiento tienen la siguiente estructura:



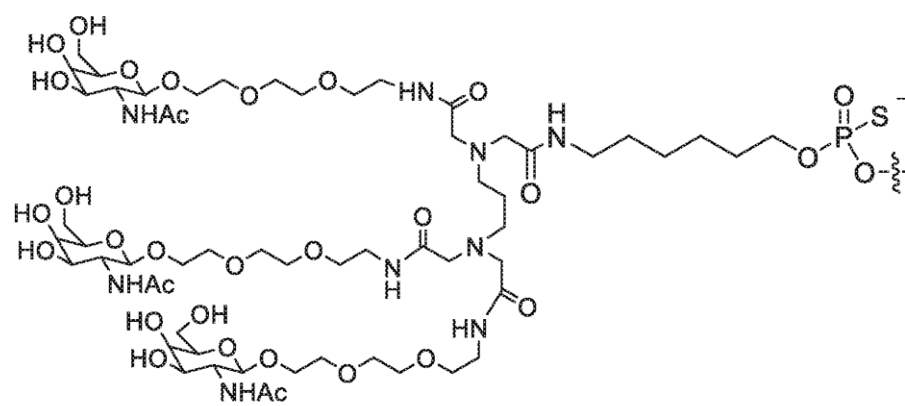
GLO-1,



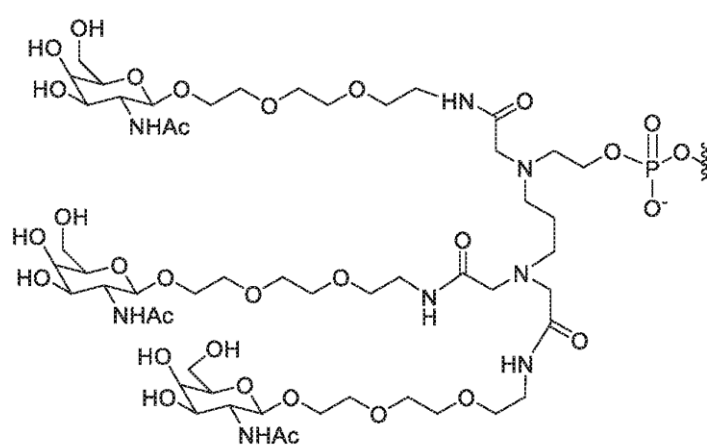
GLS-1,



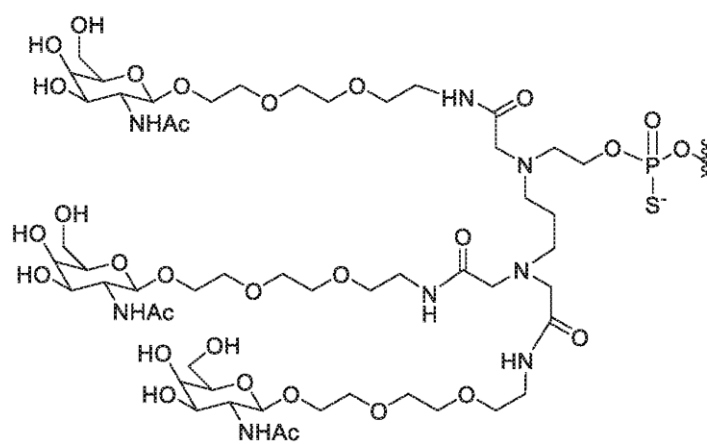
GLO-2,



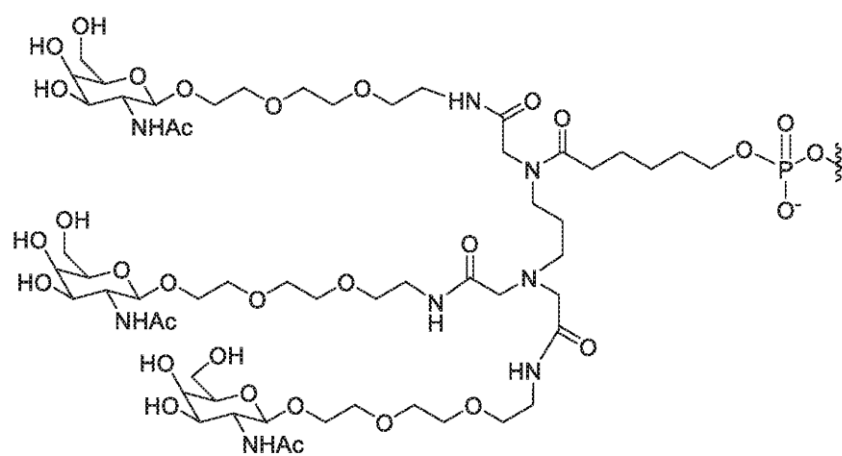
GLS-2,



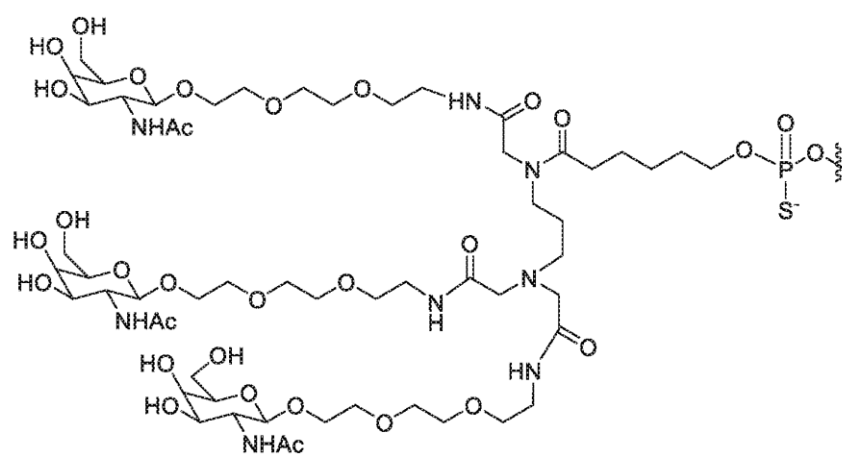
GLO-3



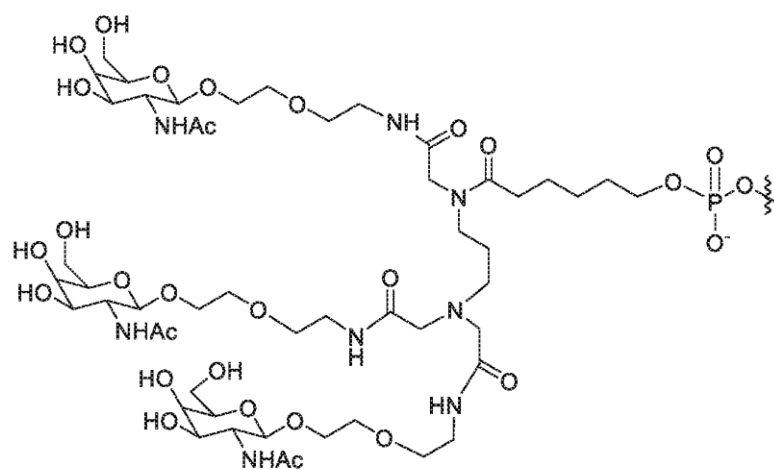
GLS-3,



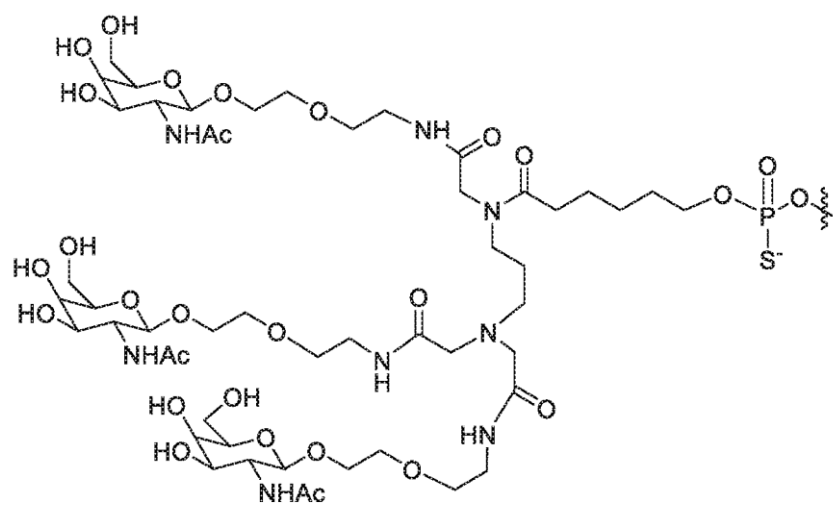
GLO-4,



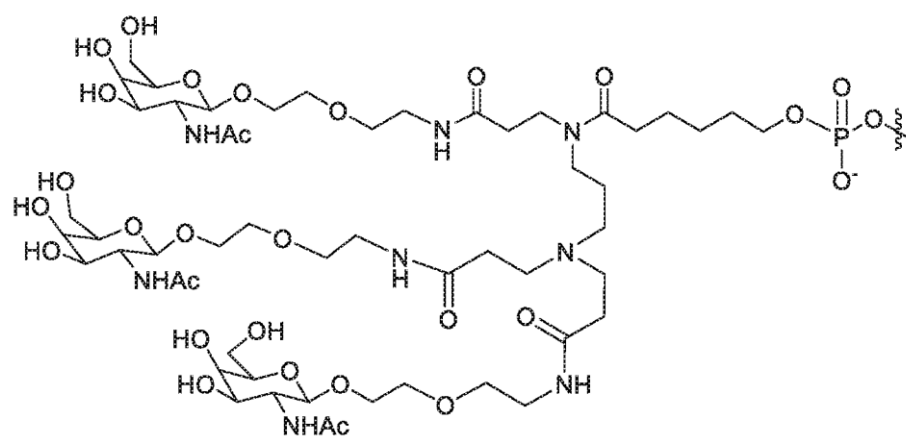
GLS-4,



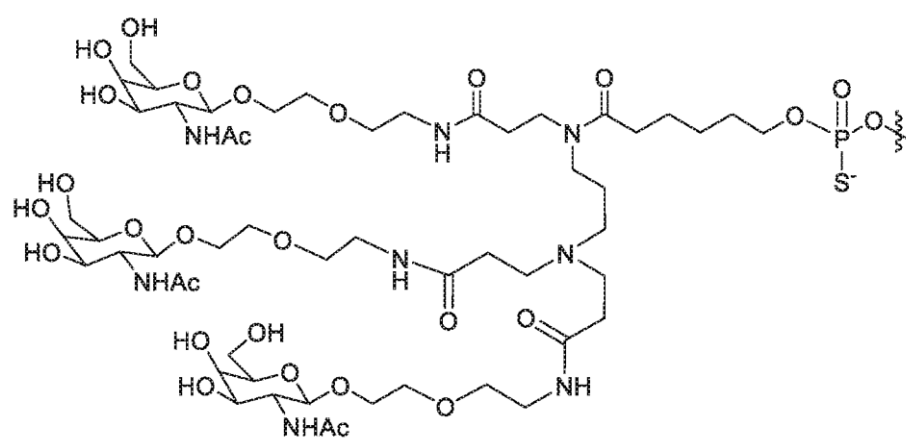
GLO-5,



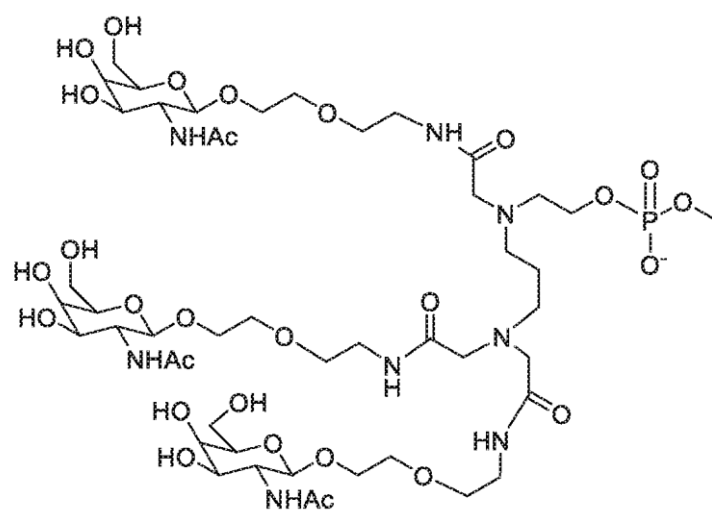
GLS-5,



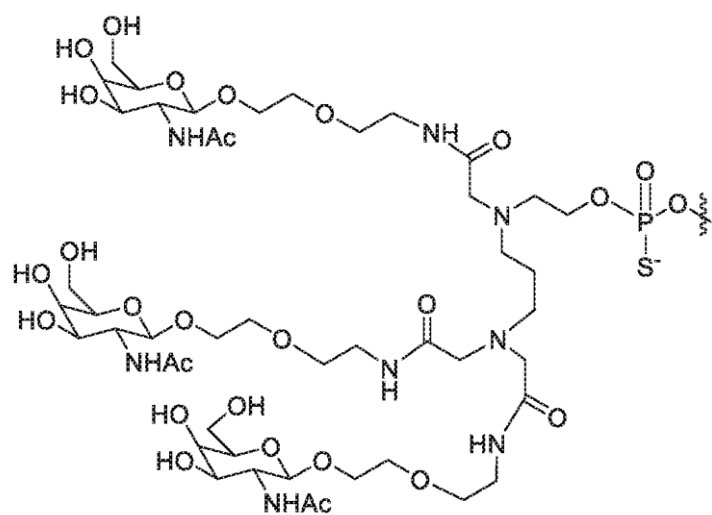
GLO-6,



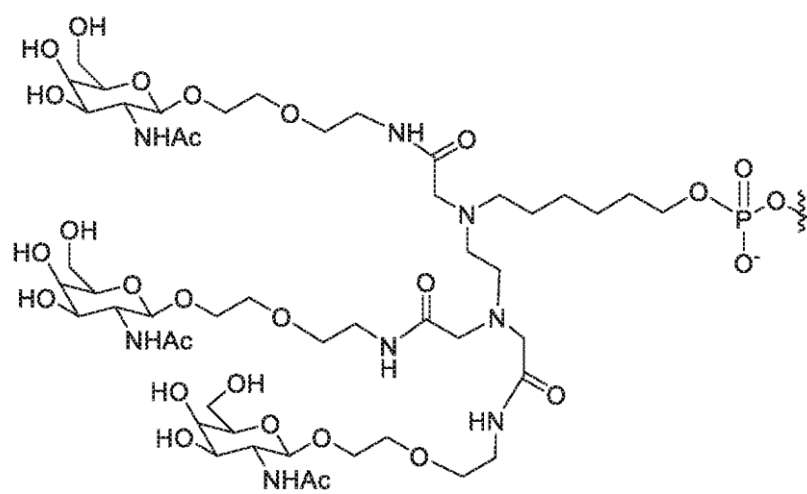
GLS-6,



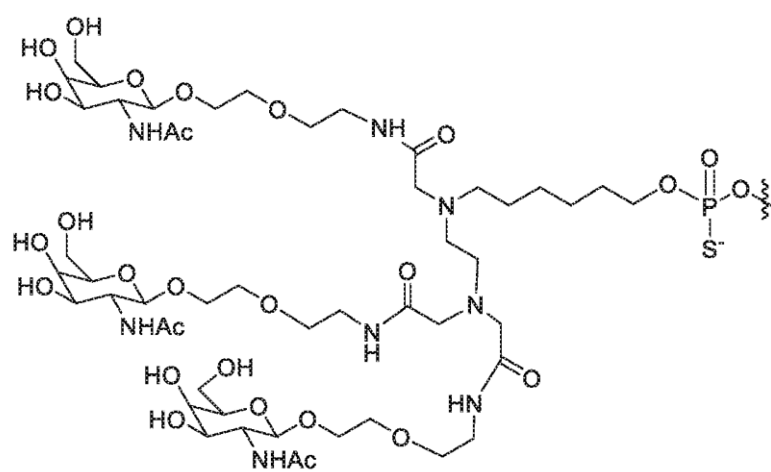
GLO-7,



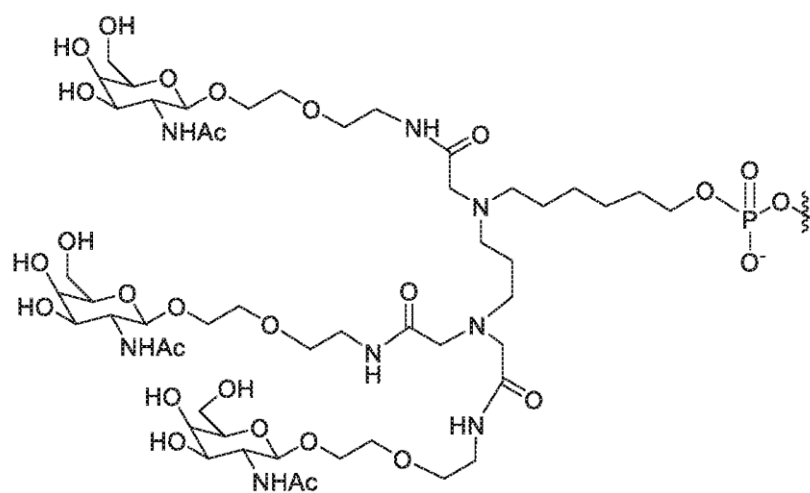
GLS-7,



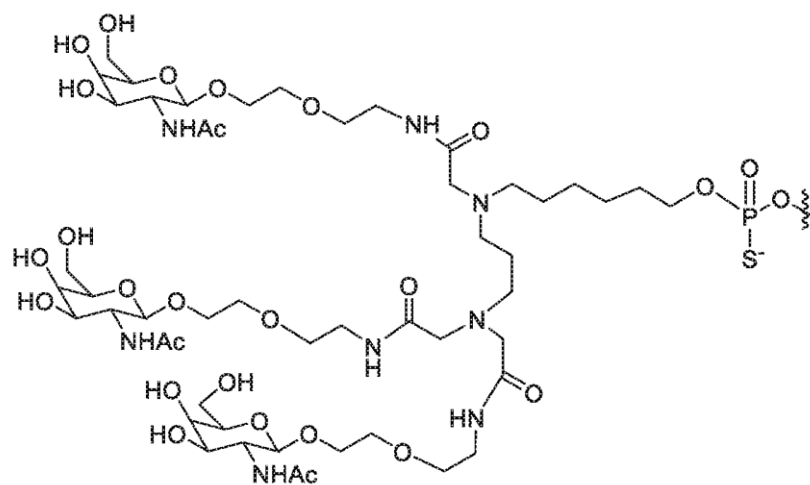
GLO-8,



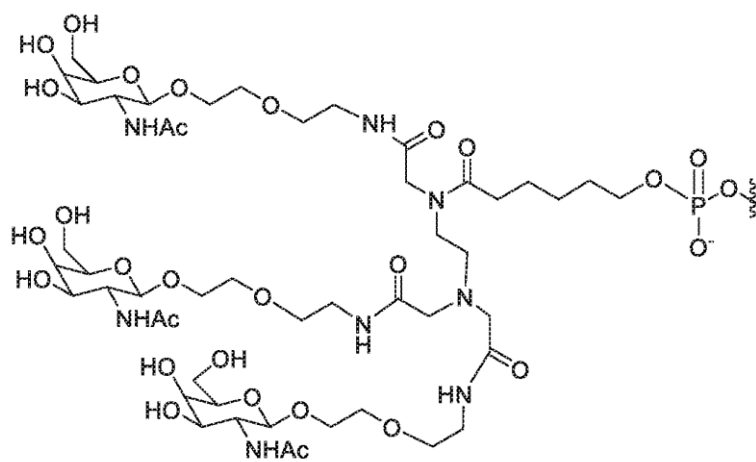
GLS-8,



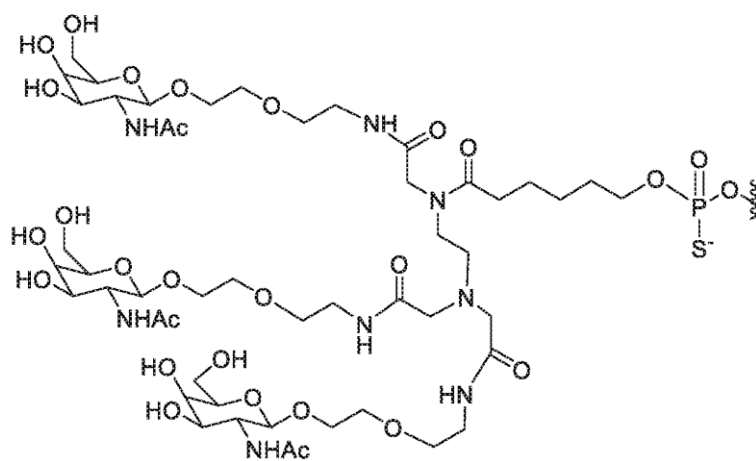
GLO-9,



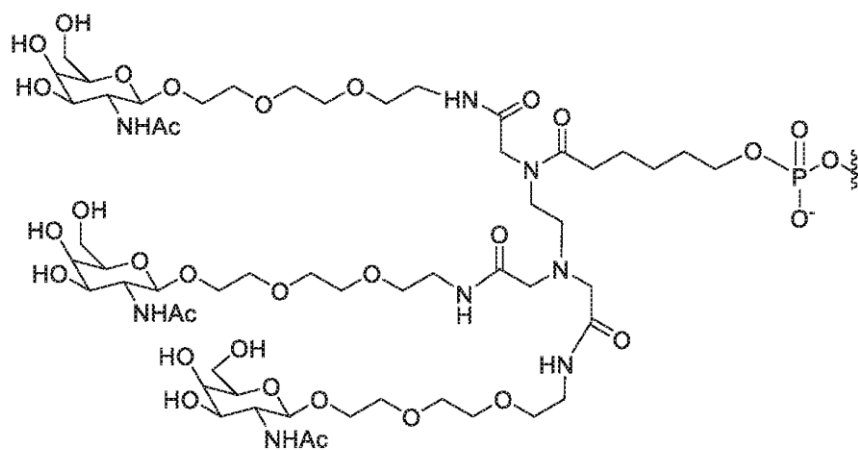
GLS-9,



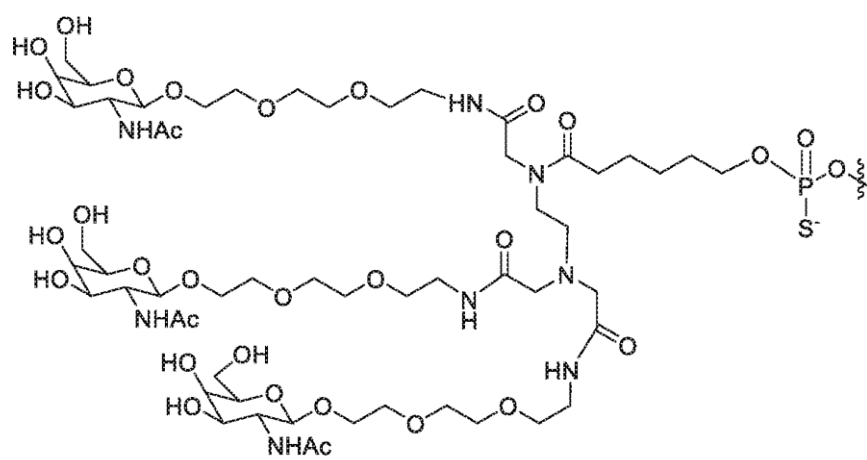
GLO-10,



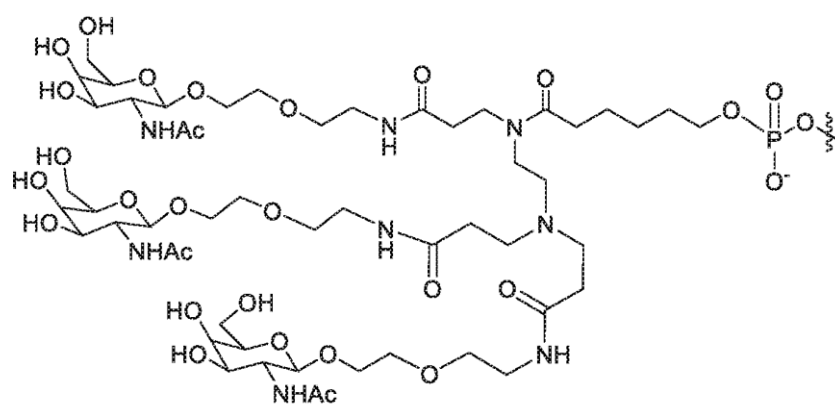
GLS-10,



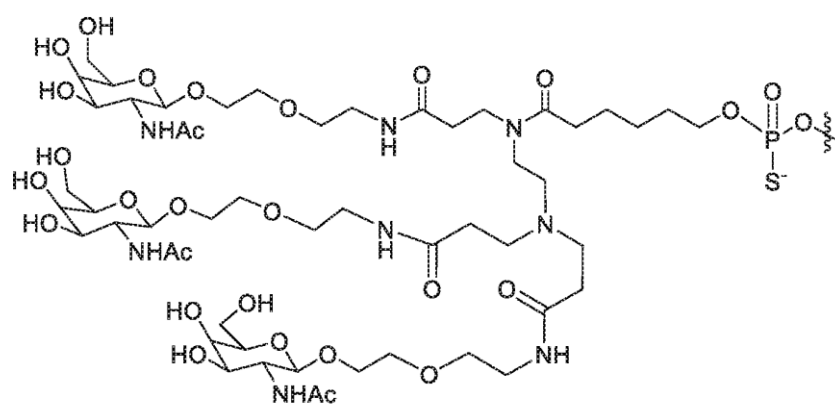
GLO-11,



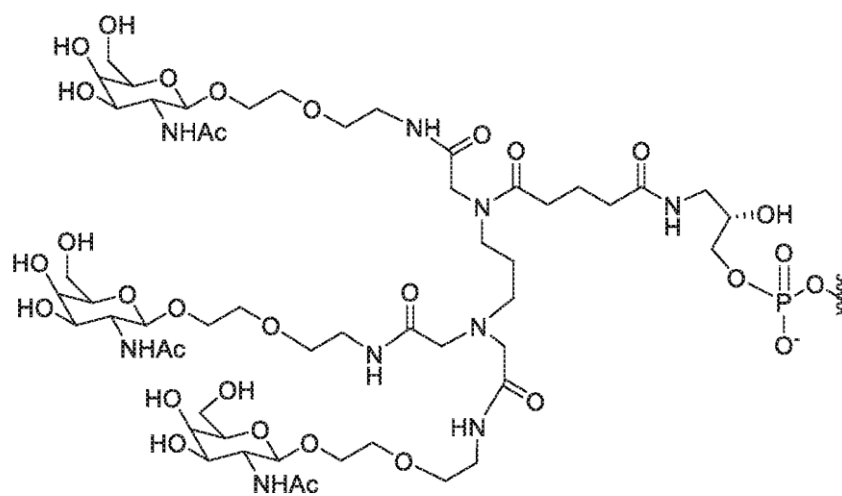
GLS-11,



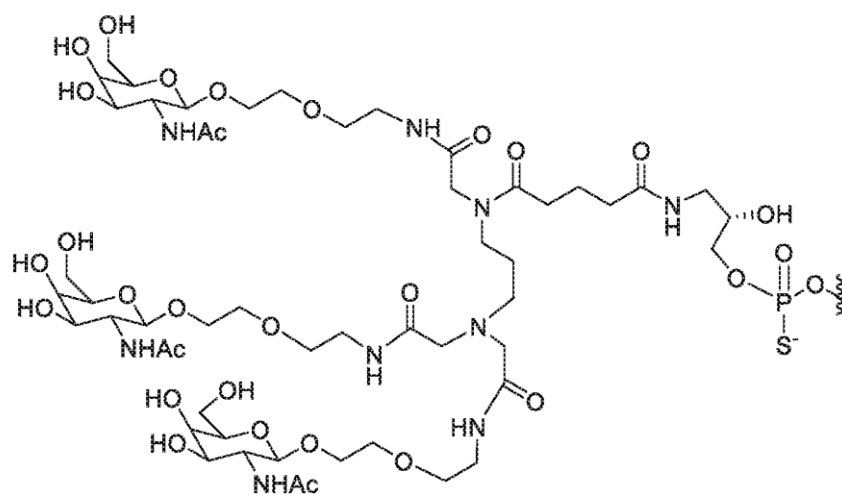
GLO-12,



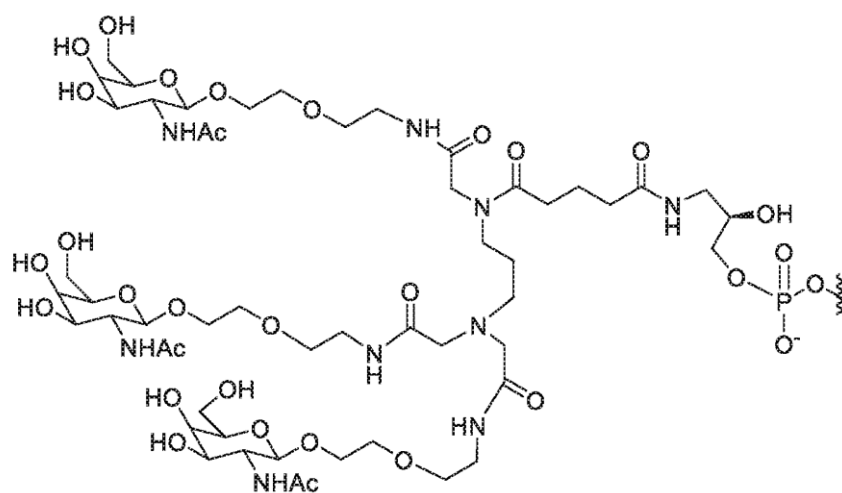
GLS-12,



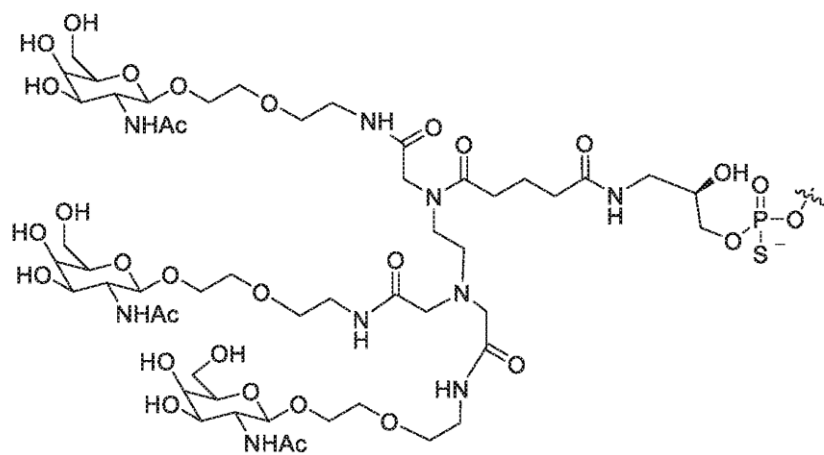
GLO-13,



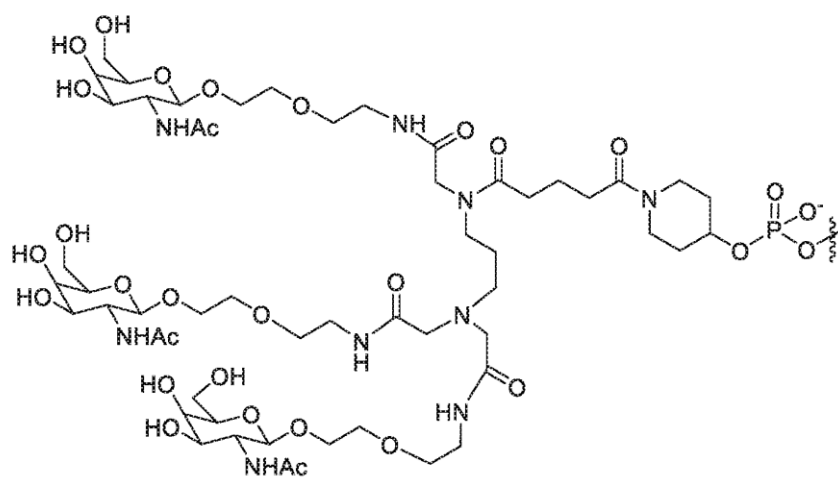
GLS-13,



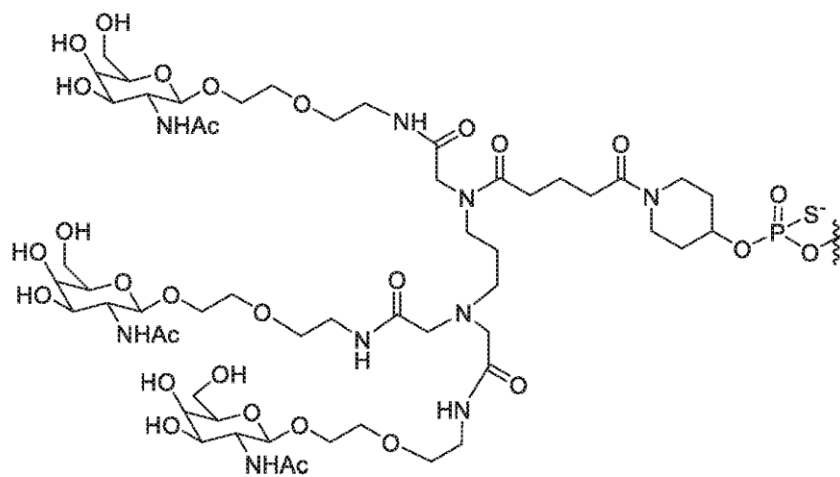
GLO-14,



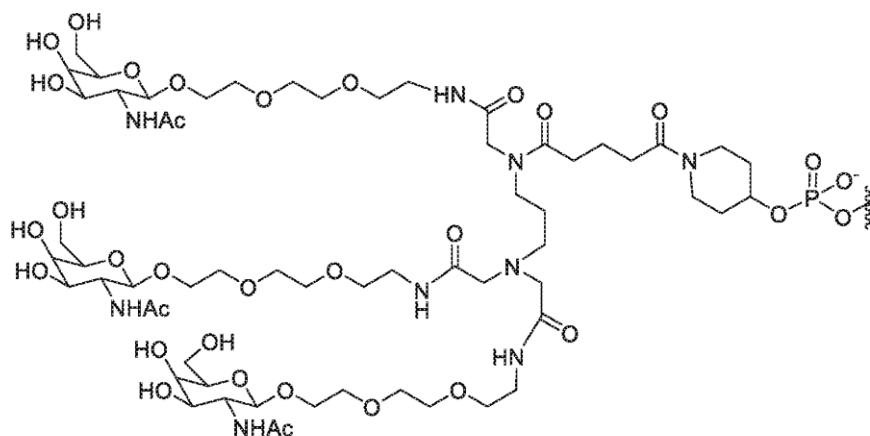
GLS-14,



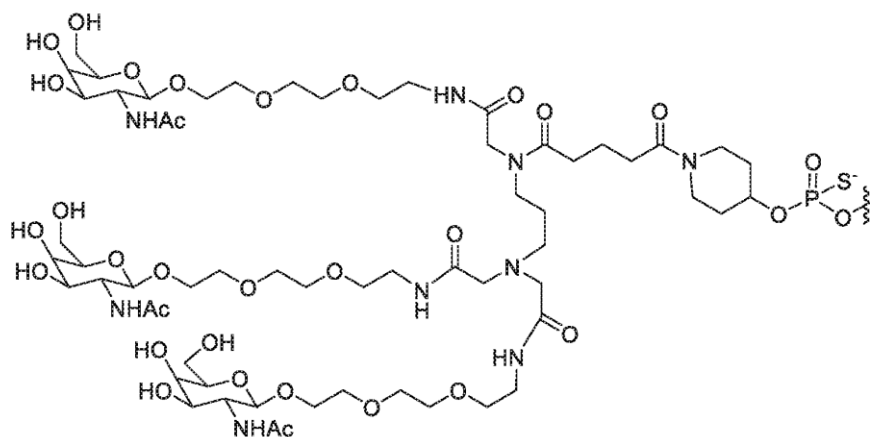
GLO-15,



GLS-15,



GLO-16, 或



GLS-16。

En ciertas modalidades, el agente dsRNA comprende un grupo diana conjugado con el extremo 5' de la hebra sentido. En algunas modalidades, el agente dsRNA comprende un grupo diana conjugado con el extremo 3' de la hebra sentido. En algunas modalidades, la hebra antisentido comprende un residuo abásico invertido en el extremo 3'-terminal. En ciertas modalidades, la hebra sentido comprende uno o dos residuos abásicos invertidos en los extremos 3' y/o 5'. En algunas modalidades, el agente dsRNA tiene dos extremos romos. En algunas modalidades, al menos una hebra comprende un saliente de 3' de al menos 1 nucleótido. En algunas modalidades, al menos una hebra comprende un saliente de 3' que incluye al menos 2 nucleótidos.

En ciertas modalidades, la presente invención se refiere a oligómeros de ácido nucleico (UNA) desbloqueados para su uso en terapia.

El ácido nucleico desbloqueado (unlocked nucleic acid, UNA) es un análogo acíclico del RNA en el que se ha cortado el enlace entre los átomos C2' y C3' del anillo de ribosa. Se ha demostrado que la incorporación de UNA es bien tolerada y, en algunos casos, incluso mejora la actividad del silenciamiento del gen siRNA (Meghan A. et al. "Locked vs. unlocked nucleic acids (LNA vs. UNA): contrasting structures work towards common therapeutic goals". *Chem. Soc. Rev.*, 2011, **40**, 5680–5689).

UNA es una modificación termolábil, y la sustitución de ribonucleótidos por UNA reduce la fuerza de apareamiento de bases y la estabilidad dúplex. Situar estratégicamente a UNA en la región semilla de la hebra antisentido de siRNA puede reducir la actividad fuera del objetivo en el mecanismo de silenciamiento génico mediado por microRNA (miRNA). miRNA reconoce principalmente los genes diana a través del apareamiento de bases entre la región de la semilla antisentido (2-8 desde el extremo 5') y el mRNA diana para la supresión génica. Cada miRNA regula potencialmente un gran número de genes. La hebra antisentido siRNA cargada por el complejo silenciador inducido por RNA (RISC) también puede regular potencialmente una gran cantidad de genes no deseados a través de mecanismos mediados por miRNA. Por lo tanto, la adición de nucleótidos termolábiles, como UNA, a la región semilla del siRNA puede reducir la actividad fuera del objetivo (Lam JK, Chow MY, Zhang Y, Leung SW. siRNA Versus miRNA as Therapeutics for Gene Silencing. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2015 Sep 15;4(9):e252. doi: 10.1038/mtna.2015.23. PMID: 26372022; PMCID: PMC4877448.). En particular, dichos oligonucleótidos de RNA o complejos de oligonucleótidos de RNA contienen al menos un monómero de nucleótido UNA en la región semilla. (Narendra Vaish et al. "Improved specificity of gene silencing by siRNAs containing unlocked nucleobase analog". *Nucleic Acids Research*, 2011, Vol. 39, No. 5 1823–1832).

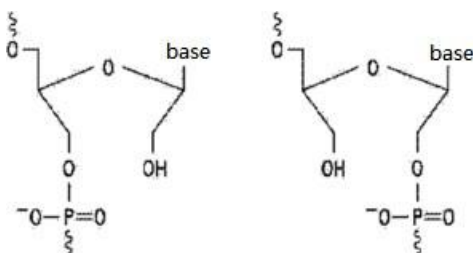
Según la presente técnica, las ventajas potenciales de incorporar UNA en oligonucleótidos de RNA o complejos de oligonucleótidos de RNA incluyen, entre otras:

1. Reducir la actividad fuera del objetivo. La adición de UNA en la región

semilla del siRNA reducirá la fuerza del emparejamiento de bases de la región semilla, reduciendo así la posible actividad fuera del objetivo causada por el mecanismo de micro-RNA.

2. UNA es bien tolerada en términos de actividad de siRNA. En algunos casos, UNA puede conducir a una mayor actividad.

Los monómeros UNA de ejemplo que se pueden usar en esta solución técnica incluyen, entre otros:



En algunas modalidades, el agente dsRNA es un dúplex modificado seleccionado de cualquiera de los dúplex: AD00158-19-2, AD00158-19-1, AD00158-3, AD00158-1, AD00158-2, AD00158, AD00159, AD00159-1, AD00159-2, AD00159-19-1, AD00159-19-2, AD00163, AD00163-1, AD00163-2, AD00163-19-1, AD00163-19-2, AD00163-3, AD00300-1, AD00300-19-1, AD00300-19-2 en las tablas 2-4.

En algunas modalidades, el agente dsRNA es un dúplex modificado seleccionado de cualquiera de los dúplex: AV01227, AV01228, AV01229, AV01230, AV01231, AV01232, AV01233, AV01234, AV01235, AV01236, AV01237, AV01238, AV01239, AV01240, AV01241, AV01242, AV01243, AV01244, AV01245, AV01246, AV01247, AV01248, AV01249, AV01250, AV01251, AV01252, AV01253, AV01254, AV01255, AV01256, AV01257 en las tablas 2 a 4.

Según otro aspecto de la presente invención, se proporciona una composición que incluye cualquier modalidad del aspecto del agente de dsRNA mencionado anteriormente de la invención. En determinadas modalidades, la composición también incluye un vehículo farmacéuticamente aceptable. En algunas modalidades, la composición también incluye uno o más agentes terapéuticos adicionales. En determinadas modalidades, las composiciones se

envasan en kits, recipientes, paquetes, dispensadores, jeringas precargadas o viales. En algunas modalidades, la composición se formula para administración subcutánea o intravenosa (IV).

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona una célula que comprende cualquier modalidad del aspecto agente dsRNA de la invención antes mencionado. En algunas modalidades, las células son células de mamíferos, opcionalmente células humanas.

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona un método para inhibir la expresión del gen AGT en una célula, el método que comprende: (i) preparar una célula que incluya una cantidad efectiva de cualquier modalidad del aspecto agente dsRNA antes mencionado de la invención o cualquier modalidad de una composición de la invención antes mencionada. En ciertas modalidades, el método también incluye: (ii) mantener la célula preparada durante un tiempo suficiente para obtener la degradación de la transcripción de mRNA del gen AGT, inhibiendo así la expresión del gen AGT en las células. En algunas modalidades, las células están en un sujeto y el agente dsRNA se administra al sujeto por vía subcutánea. En algunas modalidades, las células están en un sujeto y el agente dsRNA se administra al sujeto por vía intravenosa IV. En ciertas modalidades, el método comprende además la evaluación de la inhibición del gen AGT después de administrar el agente dsRNA al sujeto, en el que los medios para evaluar comprenden: (i) la determinación de una o más características fisiológicas de una enfermedad o condición asociada a AGT en el sujeto, y (ii) comparar la característica fisiológica determinada con una característica fisiológica inicial previa al tratamiento de la enfermedad o condición asociada a AGT y/o una característica fisiológica de control de la enfermedad o condición asociada a AGT, en donde la comparación indica una presencia o ausencia de inhibición de expresión del gen AGT en el sujeto. En algunas modalidades, la característica fisiológica determinada es el nivel AGT en la sangre. En algunas modalidades, la característica fisiológica determinada es la presión arterial, que incluye presión arterial sistólica (SBP), presión arterial diastólica (DBP) y presión arterial media (MAPR). Una reducción de los niveles AGT en la sangre y/o de la presión arterial indica una reducción de

la expresión del gen AGT en el sujeto.

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona un método para inhibir la expresión del gen AGT en un sujeto, que comprende la administración al sujeto de una cantidad efectiva de una modalidad del aspecto del agente dsRNA antes mencionado o una modalidad de la composición antes mencionada. En algunas modalidades, el agente dsRNA se administra al sujeto por vía subcutánea. En ciertas modalidades, el agente dsRNA se administra al sujeto mediante administración intravenosa IV. En algunas modalidades, el método comprende además: evaluar la inhibición del gen AGT con posterioridad a la administración del agente de dsRNA, donde los medios para evaluar incluyen: (i) determinar una o más características fisiológicas de una enfermedad o condición asociada a AGT en el sujeto; (ii) comparar la característica fisiológica determinada con una característica fisiológica previa al tratamiento inicial de una enfermedad o condición asociada a AGT y/o una característica fisiológica de control de una enfermedad o condición asociada a AGT; en donde la comparación indica la presencia o ausencia de inhibición de la expresión del gen AGT en el sujeto. En algunas modalidades, la característica fisiológica determinada es el nivel AGT en la sangre. En algunas modalidades, la característica fisiológica determinada es la presión arterial, que incluye la presión arterial sistólica (SBP), la presión arterial diastólica (DBP) y la presión arterial media (MAPR). Una reducción de los niveles AGT en la sangre y/o de la presión arterial indica una reducción de la expresión del gen AGT en el sujeto.

Según otro aspecto de la presente invención, se proporciona un método para tratar una enfermedad o condición relacionada con la proteína AGT, que comprende: administrar a un sujeto una cantidad eficaz de cualquier modalidad de los agentes de dsRNA mencionados anteriormente de la presente invención o cualquier modalidad de la combinación antes mencionada de la presente invención, para inhibir la expresión del gen AGT. En determinadas modalidades, la enfermedad o condición asociada a AGT se selecciona del grupo que consiste en: enfermedad hipertensiva, hipertensión arterial, hipertensión límite, hipertensión esencial, hipertensión secundaria, hipertensión sistólica o diastólica aislada, hipertensión asociada

al embarazo, hipertensión diabética, hipertensión resistente, hipertensión refractaria, hipertensión paroxística, hipertensión renovascular, hipertensión de Goldblatt, hipertensión ocular, glaucoma, hipertensión pulmonar, hipertensión portal, hipertensión venosa sistémica, hipertensión sistólica, hipertensión inestable; enfermedad cardíaca hipertensiva, nefropatía hipertensiva, aterosclerosis, arteriosclerosis, enfermedad vascular, nefropatía diabética, retinopatía diabética, insuficiencia cardíaca crónica, miocardiopatía, miocardiopatía diabética, glomeruloesclerosis, estenosis aórtica, aneurisma aórtico, fibrosis ventricular, insuficiencia cardíaca, infarto de miocardio, angina, accidente cerebrovascular, enfermedad renal, insuficiencia renal, esclerosis sistémica, retraso del crecimiento intrauterino (IUGR), restricción del crecimiento fetal. En algunas modalidades, el método comprende, además: administrar al sujeto un régimen de tratamiento adicional. En algunas modalidades, el régimen de tratamiento adicional incluye el tratamiento de una enfermedad o condición asociada a AGT. En determinadas modalidades, el régimen de tratamiento adicional comprende: administrar al sujeto uno o más polinucleótidos antisentido AGT de la invención; administrar al sujeto un agente terapéutico dsRNA no AGT; y efectuar modificaciones de conducta en el sujeto. En algunas modalidades, el agente terapéutico dsRNA no AGT es uno de los siguientes: agentes terapéuticos adicionales tales como diuréticos, inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ACE), antagonistas del receptor de angiotensina II, betabloqueantes, vasodilatadores, bloqueadores de los canales de calcio, antagonistas de aldosterona, Agonistas α_2 , inhibidores de la renina, bloqueadores α , agentes adrenérgicos de acción periférica, agonistas parciales selectivos del receptor D1, antagonistas alfa-adrenérgicos no selectivos, antimineralocorticoides esteroideos sintéticos o combinaciones de cualquiera de los anteriores, y agentes terapéuticos para la hipertensión formulados como combinaciones farmacéuticas.

En algunas modalidades, el agente dsRNA se administra por vía subcutánea al sujeto. En ciertas modalidades, el agente dsRNA se administra al sujeto por vía intravenosa IV. En algunas modalidades, el método comprende además la determinación de la eficacia del agente de

ácido ribonucleico bicatenario (dsRNA) administrado en el sujeto. En algunas modalidades, los medios para la determinación de la eficacia de un tratamiento en un sujeto comprende: (i) la determinación de una o más características fisiológicas de una enfermedad o condición asociada a AGT en el sujeto; (ii) comparar las características fisiológicas determinadas con una característica fisiológica basal previa al tratamiento de la enfermedad o condición asociada a AGT, en la que la comparación indique una o más de la presencia, ausencia y nivel de eficacia de la administración del ácido ribonucleico bicatenario (dsRNA) al sujeto. En algunas modalidades, la característica fisiológica determinada es el nivel AGT en la sangre. En algunas modalidades, la característica fisiológica determinada es la presión arterial, que incluye la presión arterial sistólica (SBP), la presión arterial diastólica (DBP) y la presión arterial media (MAPR). Una reducción de los niveles AGT en sangre y/o una reducción de la presión arterial indica la presencia de eficacia de la administración de un agente de ácido ribonucleico bicatenario (dsRNA) a un sujeto.

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona un método para disminuir un nivel de proteína AGT en un sujeto en comparación con un nivel basal previo al tratamiento de la proteína AGT en el sujeto, el método incluye la administración al sujeto de una cantidad efectiva de cualquier modalidad de un aspecto del agente dsRNA de la invención antes mencionado, o cualquier modalidad de una composición de la invención antes mencionada, para disminuir el nivel de expresión del gen AGT. En algunas modalidades, el agente de dsRNA se administra al sujeto por vía subcutánea o por vía intravenosa IV.

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se utiliza un método para alterar una característica fisiológica de una enfermedad o condición asociada a AGT en un sujeto en comparación con una característica fisiológica basal previa al tratamiento de la enfermedad o condición asociada a AGT en el sujeto, el método incluye administrar al sujeto una cantidad eficaz de cualquier modalidad de un aspecto de agente de dsRNA antes mencionado de la invención, o cualquier modalidad de una composición de la invención antes mencionada, para alterar la característica fisiológica de la enfermedad o condición asociada a AGT en

el sujeto. En algunas modalidades, el agente de dsRNA se administra al sujeto por vía subcutánea o por vía intravenosa IV. En determinadas modalidades, la característica fisiológica son los niveles AGT en la sangre. En algunas modalidades, la característica fisiológica determinada es la presión arterial, que incluye presión arterial sistólica (SBP), presión arterial diastólica (DBP) y presión arterial media (MAPR).

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS SECUENCIAS

Dúplex AD00051 a AD00122-19-2 , AD00163-3, AV01227 a AV01257, AV01711 se muestran en la Tabla 1 y se exhiben sus secuencias de hebra sentido.

Dúplex AD00051 a AD00122-19-2 , AD00163-3, AV01227 a AV01257, AV01711 se muestran en la Tabla 1 y se exhiben sus secuencias de hebras antisentido.

SEQ ID NO: 519 es mRNA del angiotensinógeno humano (AGT) [NCBI: Secuencia de referencia NM_001384479.1]:

```
GAAGAAGCTGCCGTTGTTCTGGGTACTACAGCAGAAGGGTATGCGGAAG
CGAGCACCCCAGTCTGAGATGGCTCCTGCCGGTGTGAGCCTGAGGGCCA
CCATCCTCTGCCTCCTGGCCTGGGCTGGCCTGGCTGCAGGTGACCGGGT
GTACATACACCCCTTCCACCTCGTCATCCACAATGAGAGTACCTGTGAGC
AGCTGGCAAAGGCCAATGCCGGGAAGCCCAAAGACCCACCTTCATACCT
GCTCCAATTCAGGCCAAGACATCCCCTGTGGATGAAAAGGCCCTACAGGA
CCAGCTGGTGCTAGTCGCTGCAAACTTGACACCGAAGACAAGTTGAGG
GCCGCAATGGTCGGGATGCTGGCCAACTTCTTGGGCTTCCGTATATATGG
CATGCACAGTGAGCTATGGGGCGTGGTCCATGGGGCCACCGTCCTCTCC
CCAACGGCTGTCTTTGGCACCCCTGGCCTCTCTCTATCTGGGAGCCTTGGA
CCACACAGCTGACAGGCTACAGGCAATCCTGGGTGTTCTTGGAAGGACA
AGAACTGCACCTCCCGGCTGGATGCGCACAAGGTCCTGTCTGCCCTGCA
GGCTGTACAGGGCCTGCTAGTGGCCCAGGGCAGGGCTGATAGCCAGGC
CCAGCTGCTGCTGTCCACGGTGGTGGGCGTGTTACAGCCCCAGGCCTG
CACCTGAAGCAGCCGTTTGTGCAGGGCCTGGCTCTCTATACCCCTGTGGT
CCTCCACGCTCTCTGGACTTCACAGAACTGGATGTTGCTGCTGAGAAGA
TTGACAGGTTTCATGCAGGCTGTGACAGGATGGAAGACTGGCTGCTCCCTG
```

ATGGGAGCCAGTGTGGACAGCACCCCTGGCTTTCAACACCTACGTCCACT
TCCAAGGGAAGATGAAGGGCTTCTCCCTGCTGGCCGAGCCCCAGG
AGTTCTGGGTGGACAACAGCACCTCAGTGTCTGTTCCCATGCTCTC
TGGCATGGGCACCTTCCAGCACTGGAGTGACATCCAGGACAACCTTC
TCGGTGAICTCAAGTGCCCTTCACTGAGAGCGCCTGCCTGCTGCTG
ATCCAGCCTCACTATGCCTCTGACCTGGACAAGGTGGAGGGTCTCA
CTTTCCAGCAAACTCCCTCAACTGGATGAAGAACTATCTCCCCG
GACCATCCACCTGACCATGCCCCAACTGGTGCTGCAAGGATCTTAT
GACCTGCAGGACCTGCTCGCCCAGGCTGAGCTGCCCCGCCATTCTG
CACACCGAGCTGAACCTGCAAAAATTGAGCAATGACCGCATCAGGG
TGGGGGAGGTGCTGAACAGCATTTTTTTTGGAGCTTGAAGCGGATGA
GAGAGAGCCACAGAGTCTACCCAACAGCTTAACAAGCCTGAGGT
CTTGAGGTGACCCTGAACCGCCCCATTCTGTTTGCTGTGTATGAT
CAAAGCGCCACTGCCCTGCACTTCCTGGGCGCGTGGCCAACCCG
CTGAGCACAGCATGAGGCCAGGGCCCCAGAACACAGTGCCTGGCA
AGGCCTCTGCCCCTGGCCTTTGAGGCAAAGGCCAGCAGCAGATAA
CAACCCCGGACAAATCAGCGATGTGTCACCCCAGTCTCCACCTT
TTCTTCTAATGAGTCGACTTTGAGCTGGAAAGCAGCCGTTTCTCCTT
GGTCTAAGTGTGCTGCATGGAGTGAGCAGTAGAAGCCTGCAGCGG
CACAAATGCACCTCCCAGTTTGCTGGGTTTATTTTAGAGAATGGGG
GTGGGGAGGCAAGAACCAGTGTTTAGCGCGGGACTACTGTTCCAA
AAAGAATTCCAACCGACCAGCTTGTTTGTAACAAAAAAGTGTTCC
CTTTTCAAGTTGAGAACAAAAATTGGGTTTTAAATTAAGTATACAT
TTTTGCATTGCCTTCGGTTTGTATTTAGTGTCTTGAATGTAAGAACAT
GACCTCCGTGTAGTGTCTGTAATACCTTAGTTTTTTCCACAGATGCTT
GTGATTTTTGAACAATACGTGAAAGATGCAAGCACCTGAATTTCTGTT
TGAATGCGGAACCATAGCTGGTTATTTCTCCCTTGTGTTAGTAATAA
ACGTCTTGCCACAATAAGCCTCCAAAAA.

SEQ ID NO: 520 es mRNA de angiotensinógeno (AGT) de ratón
[NCBI Secuencia de referencia: NM_007428.4].

ATGACTCCACGGGGGCAGGCCTGAAGGCCACCATCTTCTGCATCTTGAC
CTGGGTCAGCCTGACGGCTGGGGACCGCGTATACATCCACCCCTTCCATC

TCCTTTACCACAACAAGAGCACCTGCGCCCAGCTGGAGAACCCCAGT
GTGGAGACACTCCCAGAGTCAACGTTTCGAGCCTGTGCCCATTTCAG
GCCAAGACCTCCCCTGTGAATGAGAAGACCCTGCATGATCAGCTCG
TGCTGGCCGCCGAGAAGCTAGAGGATGAGGACCGGAAGCGGGCT
GCCCAGGTGCAATGATCGCCAACTTCGTGGGCTTCCGCATGTACA
AGATGCTGAATGAGGCAGGAAGTGGGGCCAGTGGGGGCCATCCTCT
CACCACCAGCTCTCTTTGGCACCTGGTCTCTTTCTACCTTGGATC
CTTAGATCCCACGGCCAGCCAGCTGCAGACGCTGCTGGATGTCCC
TGTGAAGGAGGGGAGACTGCACCTCCCGACTAGATGGACACAAGGT
CCTCGCTGCCCTGCGGGCCATTTCAGGGCTTGCTGGTCACCCAGGG
TGGGAGCAGCAGCCAGACACCCCTGCTACAGTCCATTGTGGTGGG
GCTCTTCACTGCTCCAGGCTTTCGTCTAAAGCACTCATTTGTTTCTAGA
GCCTGGCTCTCTTTACCCCTGCCCTCTTCCCACGCTCTCTGGATTT
ATCCACTGACCCAGTTCTTGCCACTGAGAAAATCAACAGGTTTCATAA
AGGCTGTGACAGGGTGGAAGATGAACTTGCCACTGGAGGGGGTCA
GTACAGACAGCACCCCTACTTTTCAACACCTACGTTCACTTCCAAGGA
ACGATGAGAGGTTTCTCTCAGCTGCCTGGAGTCCATGAATTCTGGG
TGGACAACAGCATCTCGGTGTCTGTGCCCATGATCTCCGGCACTGG
CAACTTCCAGCACTGGAGTGACACCCAGAACAACTTCTCCGTGACG
TGCGTGCCCCCTAGGTGAGAGAGCCACCCTGCTGCTCATCCAGCCC
CACTGCACCTCAGATCTCGACAGGGTGGAGGCCCTCATCTTCCGG
AACGACCTCCTGACTTGGATAGAGAACCCGCCTCCTCGGGCCATC
CGCCTGACTCTGCCCCAGCTGGAAATCCGAGGATCCTACAATCTGC
AGGACCTGCTGGCTGAGGACAAGCTGCCCACCCTTTTGGGTGCGG
AGGCAAATCTGAACAACATTGGTGACACCAACCCCCGAGTGGGAG
AGGTTCTCAATAGCATCCTCCTCGAACTCAAAGCAGGAGAGGAGGA
ACAGCCGACCACGTCTGTCCAGCAGCCTGGCTCACCGGAGGCACT
GGATGTGACCCTGAGCAGCCCCTTCTGTTTCGCCATCTACGAGCA
GGACTCAGGCACGCTGCACTTTCTGGGCAGAGTGAATAACCCCCA
GAGTGTGGTGTGA.

SEQ ID NO: 521 es mRNA del angiotensinógeno (AGT) del monomolgus [NCBI Secuencia de referencia: NM_001283634.1]

ATGCAGAAGCGAGCACCCCAGTCCGAGATGGCTCCTGCCAGCGT
GAGCCTGAGGGCCACCATCCTCTGCCTCCTGGCCTGGGCTGGCCT
GGCCACAGGTGACCGGGTGTACATACACCCCTTCCACCTCGTCATC
CACAATGAGAGTACCTGTGAGCAGCTGGCAAAGGCCGATGCTGGG
AAGCCCAAAGATCCCACCTTCACACCTGTTCCGATACAGGCCAAGA
CGTCTCCTGTGGATGAAAAGGCCCTGCAGGACCAGCTAGTGCTGG
TTGCCGCAAACTCGACACCGAGGACAAGTTGAGAGCCGCGATGG
TCGGGATGCTGGCCAACTTCTTGGGCTTCCGTATATATGGCATGCA
CAGTGAGCTATGGGGCGTGGTCCATGGGGCCACCATCCTCTCCCC
AACGGCTGTCTTTGGCACCCCTGGCCTCTCTCTACCTGGGAGCGTTG
GACCACACAGCCGACAGGCTACAGGCAATCCTGGGCGTCCCTTGG
AAGGACAAGAACTGCACCTCCCGGCTGGATGCGCACAAGGTCCTC
TCTGCCCTGCAGGCTGTACAGGGCCTGCTGGTGGCCCAGGGCAG
GGCTGACGGCCAGTCCCAGCTGCTGTTGTCCACAGTGGTGGGTCT
CTTCACAGCCCCAGATCTGCACCTGAAGCAGCCGTTTGTGCAGGG
CCTGGCTCTCTATGCCCCTGTGGTCCTCCCACGCTCTCTGGACTTC
ACAGACCTGGAAGTCGCTGCTGAGAAGATTGACAGGTTTCATGCAG
GCTGTGACAGGATGGAAGATTAGCAGCCCCCTGACGGGAGCCAGT
GCGGACAGCACCCCTGGTTTTCAACACCTACGTCCATTTCCAAGGGA
AGATGAGGGACTTCTTCCTGCTGGCTGAGCCCCAGGAGTTCTGGG
TGGACAACAGCACCTCAGTGTCTGTCCCCATGCTGTCTGGCGTGG
GCACCTTCCAGCACTGGAGCGACGCCCAGGACAACCTTCTCAGTGA
CTCAAGTGCCCTTTACTGAGAGCGCCTGCTTGCTGCTGATTAGCC
TCACTACGCCTCTGACCTGGACAAGGTGGAGGGTCTCACTTTCCAG
CAAACTCCCTCAACTGGATGAAGAACTGTCTCCCCGGGCCATCC
ACCTGACCATGCCCCGACTGGTGCTGCGAGGATCTTATGACCTGCA
GGACCTGCTTGCCCAGGCTGAGCTGCCCCGCCATTCTGGGCACCGA
GCTGAACCTGCAAAAATTGAGCAATGACAACCTCAGGGTGGGGAA
GGTGCTGAACAGCATTCTTTTTGAACTCGAAGCGGATGAGAGAGAG
CCCACAGAGTCTACCCGACAGCTGAACAGGCCTGAGTTCTTGGAG
GTGACCCTGGACCGCCCATTCTGTTTGCTGTGTATGATCAAAGTG
CCACTGCCCTGCACTTCCTGGGCCGTGTGGCCAACCCGCTGAGCC

CAGCATGA.

En las secuencias mostradas en la Tabla 2, las modificaciones químicas se indican como: mayúsculas: 2'-fluoro; minúsculas: 2'-OMe; Tiofosfato: *.

En las secuencias que se muestran en la Tabla 3, las moléculas de administración utilizadas en los estudios in vivo se indican como "GLO-0" en el extremo 3' de cada hebra sentido. Las modificaciones químicas se expresan como: mayúsculas: 2'-fluoro; minúsculas: 2'-OMe; Tiofosfato: *; ácido nucleico desbloqueado: UNA (Nota: AD00052, AD00113-AD00260: no UNA; AD00282-AD00301: versión UNA).

En las secuencias mostradas en la Tabla 4, las modificaciones químicas se indican como: mayúsculas: 2'-fluoro; minúsculas: 2'-OMe; Tiofosfato: *; Invab = abásico invertido.

DESCRIPCIÓN DE LOS GRÁFICOS ADJUNTOS:

La Figura 1 muestra un gráfico que muestra los niveles séricos de proteína AGT en monos cynomolgus después de la administración de 2 mg/kg de AD00158-1, AD00158-2, AD00163-1, AD00159-1 y AD00300-1, respectivamente;

La Figura 2 muestra un gráfico que exhibe el nivel sérico de proteína AGT en monos cynomolgus después de la administración de 10 mg/kg de AD00163-3;

La Figura 3 muestra un gráfico que exhibe los cambios en la SBP sérica en monos cynomolgus después de la administración de 10 mg/kg de AD00163-3;

La Figura 4 muestra un gráfico que exhibe la presión arterial media (MBP) de monos cynomolgus después de la administración de 10 mg/kg de AD00163-3;

La Figura 5 muestra un gráfico que exhibe la presión arterial diastólica (DBP) en monos cynomolgus después de la administración de 10 mg/kg de AD00163-3.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

La invención, en parte, incluye agentes RNAi, por ejemplo, aunque

no se limita a agentes RNAi bicatenarios (ds), que son capaces de inhibir la expresión del gen angiotensinógeno (AGT). La invención, en parte, también incluye composiciones que comprenden agentes AGT RNAi y métodos de uso de las composiciones. Los agentes AGT RNAi descritos en este documento se pueden unir a compuestos de administración para su administración a las células, incluida la administración a los hepatocitos. Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden comprender al menos un agente dsAGT y un compuesto de administración. En algunas modalidades de la invención, el compuesto de administración es un compuesto de administración que contiene GalNAc. Los agentes AGT RNAi administrados a las células son capaces de inhibir la expresión del gen AGT, reduciendo así la actividad del producto proteico AGT del gen en la célula. Los agentes dsRNAi de la invención son útiles en el tratamiento de enfermedades y afecciones asociadas a AGT. Dichos agentes de dsRNAi incluyen, por ejemplo, los dúplex AD00051 a AD00122-19-2 que se muestran en la Tabla 1. En algunas modalidades, los agentes de dsRNAi preferidos incluyen, por ejemplo, los dúplex AD00158, AD00163, AD00159, AD00290, AD00300 o AD00122. En otras modalidades, los agentes dsRNAi preferidos incluyen, por ejemplo, AD00158-1, AD00158-2, AD00163-1, AD00163-3, AD00159-1 o AD00300-1. En otras modalidades, dichos agentes dsRNAi incluyen variantes dúplex, por ejemplo, variantes del dúplex AD00158, AD00163, AD00163-3, AD00159, AD00290, AD00300 o AD00122.

En algunas modalidades de la invención, reducir la expresión AGT en una célula o un sujeto trata una enfermedad o condición asociada con la expresión AGT en la célula o el sujeto, respectivamente. Ejemplos no limitantes de enfermedades y afecciones tratables reduciendo la actividad AGT son: enfermedad hipertensiva, hipertensión arterial, hipertensión límite, hipertensión esencial, hipertensión secundaria, hipertensión sistólica o diastólica aislada, hipertensión relacionada con el embarazo, hipertensión diabética, hipertensión resistente, hipertensión refractaria, hipertensión paroxística, hipertensión renovascular, hipertensión de Goldblatt, hipertensión ocular, glaucoma, hipertensión pulmonar, hipertensión portal, hipertensión venosa sistémica, hipertensión

sistólica, hipertensión inestable; enfermedad cardíaca hipertensiva, nefropatía hipertensiva, aterosclerosis, arteriosclerosis, enfermedad vascular, nefropatía diabética, retinopatía diabética, insuficiencia cardíaca crónica, miocardiopatía, miocardiopatía diabética, glomeruloesclerosis, estenosis aórtica, aneurisma aórtico, fibrosis ventricular, insuficiencia cardíaca, infarto de miocardio, angina de pecho, accidente cerebrovascular, enfermedad renal, insuficiencia renal, esclerosis sistémica, retraso del crecimiento intrauterino (IUGR), restricción del crecimiento fetal.

A continuación, se describen las formas de fabricar y utilizar composiciones que comprenden agentes monocatenarios (ssRNA) y bicatenarios (dsRNA) AGT para inhibir la expresión génica AGT, así como las composiciones y métodos para tratar enfermedades y afecciones causadas o reguladas por la expresión del gen AGT. El término "RNAi" también se conoce en la técnica y puede denominarse "siRNA".

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "RNAi" se refiere a un agente que comprende RNA y media la escisión dirigida de una transcripción de RNA a través de una vía del complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC). Como se sabe en la técnica, un área diana de RNAi se refiere a una porción contigua de la secuencia de nucleótidos de una molécula de mRNA formada durante la transcripción de un gen, incluido el RNA mensajero (mRNA) que es un producto del procesamiento del RNA de un producto de transcripción primaria. La porción diana de la secuencia será al menos lo suficientemente larga como para servir como sustrato para la escisión dirigida por RNAi en esa porción o cerca de ella. Una secuencia diana puede tener entre 8 y 30 nucleótidos de largo (inclusive), entre 10 y 30 nucleótidos de largo (inclusive), entre 12 y 25 nucleótidos de largo (inclusive), entre 15 y 23 nucleótidos de largo (inclusive), entre 16 y 23 nucleótidos de largo (inclusive), o de 18 a 23 nucleótidos de largo (inclusive), incluidas todas las longitudes más cortas dentro de cada rango indicado. En algunas modalidades de la invención, una secuencia diana tiene 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 o 26 nucleótidos de longitud. En determinada modalidad, una secuencia diana tiene entre 9 y 26 nucleótidos de longitud (inclusive), incluidos todos los subrangos y números enteros intermedios. Por ejemplo, aunque no se

pretende que sea limitante, en ciertas modalidades de la invención una secuencia diana es 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos de longitud, con la secuencia totalmente o al menos sustancialmente complementaria de al menos parte de un transcrito de RNA de un gen AGT. Algunos aspectos de la invención incluyen composiciones farmacéuticas que comprenden uno o más agentes AGT dsRNA y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En determinadas modalidades de la invención, un AGT RNAi como se describe en el presente documento inhibe la expresión de la proteína AGT.

Como se usa en el presente documento, un "agente de dsRNA" significa una composición que contiene una molécula oligonucleotídica de RNA o similar a RNA (por ejemplo, RNA químicamente modificado) que es capaz de degradar o inhibir la traducción de transcritos de RNA mensajero (mRNA) de un mRNA diana en una manera específica de secuencia. Aunque no se desea limitarse a una teoría particular, los agentes de DsRNA de la invención pueden operar a través del mecanismo de interferencia de RNA (es decir, induciendo interferencia de RNA a través de la interacción con la maquinaria de la vía de interferencia de RNA (complejo silenciador inducido por RNA o RISC) de células de mamíferos). o por cualquier mecanismo o vía alternativa. Los métodos para silenciar genes en células de plantas, invertebrados y vertebrados son bien conocidos en la técnica [véase, por ejemplo, (Sharp et al., *Genes Dev.* 2001, 15:485; Bernstein, et al., (2001) *Nature* 409). :363; Nykanen, et al., (2001) *Cell* 107:309; y Elbashir, et al., (2001) *Genes Dev* 15:188)], la divulgación de cada uno de los cuales se incorpora al presente documento por referencia en su totalidad.]. Los procedimientos de silenciamiento génico conocidos en la técnica se pueden utilizar junto con la divulgación proporcionada en este documento para inhibir la expresión AGT.

Los agentes dsRNA divulgados en este documento se componen de una hebra sentido y una hebra antisentido, e incluyen, entre otros: RNA de interferencia corta (siRNA), agentes RNAi, micro RNA (miRNA), RNA de horquilla corta (shRNA) y sustratos de cubitos (Dicer). La hebra antisentido de los agentes dsRNA descritos en este documento es, al menos parcialmente, complementaria al mRNA al que se dirige. Se entiende en la

técnica que se pueden utilizar diferentes longitudes de estructura dúplex de dsRNA para inhibir la expresión génica diana. Por ejemplo, se sabe que los dsRNAs que tienen una estructura dúplex de 19, 20, 21, 22 y 23 pares de bases son efectivos para inducir interferencia de RNA (Elbashir et al., EMBO 2001, 20:6877-6888). También se sabe en la técnica que las estructuras dúplex de RNA más cortas o más largas son asimismo efectivas para inducir interferencias de RNA. AGT dsRNA en ciertas modalidades de la invención puede incluir al menos una hebra de una longitud mínima de 21 nt o puede tener dúplex más cortos basados en una de las secuencias establecidas en cualquiera de las Tablas 1-4 menos 1, 2, 3 nt. También puede ser eficaz reducir 4 nucleótidos en uno o ambos extremos en comparación con los dsRNA enumerados en las Tablas 1 a 4 respectivamente. En algunas modalidades de la invención, los agentes AGT dsRNA pueden tener una secuencia parcial de al menos 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más nucleótidos contiguos de una o más secuencias de las Tablas 1-4, y difieren en su capacidad de inhibir la expresión de un gen AGT en no más del 5%, 10%, 15%, 20%, 25% o 30% del nivel de inhibición resultante de un dsRNA que comprende la secuencia completa, que también se conoce en este documento como la secuencia "parental".

Ciertas modalidades de las composiciones y métodos de la invención incluyen RNA monocatenario en la composición y/o administrar RNA monocatenario a un sujeto. Por ejemplo, las hebras antisentido enumeradas en cualquiera de las Tablas 1-4 pueden ser una composición o en una composición administrada a un sujeto para reducir la actividad del polipéptido AGT y/o la expresión del gen AGT en el sujeto. Las Tablas 1-4 muestran ciertas secuencias de bases de extensión central de la hebra antisentido y del núcleo de la hebra sentido del agente AGT dsRNA. Las moléculas antisentido monocatenarias que pueden incluirse en determinadas composiciones de la invención y/o administrarse en determinados métodos de la invención se denominan en el presente documento "agentes antisentido monocatenarios" o "agentes polinucleotídicos antisentido". Las moléculas con sentido monocatenario que pueden incluirse en determinadas composiciones y/o administrarse en determinados métodos de la invención se denominan en el presente

documento "agentes con sentido monocatenario" o "agentes polinucleotídicos con sentido". El término "secuencia de bases" en el presente documento se refiere a una secuencia de polinucleótidos sin modificaciones químicas ni compuestos de administración. Por ejemplo, la hebra sentido que se muestra en la Tabla 1 corresponde a la secuencia de bases relativa a la Tabla 3; sin embargo, la modificación química respectiva y los compuestos de administración se muestran en las secuencias correspondientes en la Tabla 3. A las secuencias divulgadas en el presente documento se les pueden asignar identificadores. Por ejemplo, una secuencia sentido monocatenaria puede identificarse mediante "hebra sentido SS#"; una secuencia antisentido monocatenaria puede identificarse mediante "hebra antisentido AS#", y un dúplex que incluye una hebra sentido y una hebra antisentido puede identificarse con un "Duplex AD#".

La Tabla 1 incluye las hebras sentido y antisentido y proporciona los números de identificación de los dúplex formados por las hebras sentido y antisentido en la misma fila en la Tabla 1. En ciertas modalidades de la invención, la secuencia antisentido comprende nucleobase u o nucleobase a en su primera posición. En determinadas modalidades de la invención, la secuencia antisentido comprende la nucleobase u en su primera posición. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "posición coincidente" se refiere en cierto sentido a la posición en cada hebra que "se empareja" entre sí cuando las dos hebras actúan como un dúplex. Por ejemplo, en una hebra sentido de 21 nucleobases y una hebra antisentido de 21 nucleobases, la nucleobase en la posición 1 de la hebra sentido y la posición 21 en la hebra antisentido están en "posiciones coincidentes". En otro ejemplo más no limitante en una hebra sentido de 23 nucleobases y una hebra antisentido de 23 nucleobases, la nucleobase 2 de la hebra sentido y la posición 22 de la hebra antisentido están en posiciones coincidentes. En otro ejemplo no limitante, en una hebra sentido de 18 nucleobases y una hebra antisentido de 18 nucleobases, la nucleobase en la posición 1 de la hebra sentido y la nucleobase 18 en la hebra antisentido están en posiciones coincidentes, y la nucleobase 4 en la hebra sentido y la nucleobase 15 en la hebra antisentido están en posiciones coincidentes. Un experto en la técnica entenderá cómo identificar posiciones coincidentes

en hebras sentido y antisentido que son o serán hebras dúplex y hebras emparejadas.

La última columna de la tabla 1 indica un AD#/AV# dúplex para un dúplex que incluye las secuencias sentido y antisentido en la misma fila de la tabla. Por ejemplo, en la Tabla 1 se muestra el dúplex asignado "Dúplex AD#AD00051", que incluye la hebra sentido y la hebra antisentido. Por lo tanto, cada fila de la tabla 1 identifica un dúplex de la invención, cada uno de los cuales comprende secuencias sentido y antisentido que se muestran en la misma fila, con el identificador asignado para cada dúplex que se muestra al final de la fila en una columna.

En algunas modalidades de los métodos de la invención, se administra al sujeto un agente RNAi que comprende la secuencia de polinucleótidos que se muestra en la Tabla 1. En algunas modalidades de la presente invención, el agente RNAi administrado al sujeto comprende un dúplex que abarca al menos una de las secuencias de bases enumeradas en la Tabla 1 y que comprende 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 o 24 modificaciones de secuencia. En algunas modalidades de los métodos de la invención, que comprenden además unir el agente RNAi de la secuencia de polinucleótidos que se muestra en la Tabla 1 a una molécula de administración, un ejemplo no limitante corresponde a un compuesto de administración que incluye GalNAc.

Tabla 1: Secuencias de hebras antisentido y sentido de agentes AGT RNAi no modificados. Todas las secuencias se muestran en una dirección de 5' a 3'. Dúplex AD#/AV# es el número asignado al dúplex de ambas hebras de la misma fila de la tabla.

Secuencia de hebra sentido 5'→ 3'	SEQ ID NO	Secuencia de hebra antisentido 5'→ 3'	SEQ ID NO	Duplex AD#/ AV#
GCGUCAUCCACAAUGAGAGUA	1	UACUCUCAUUGUGGAUGACGC	98	AD00051
GUCAUCCACAAUGAGAGUACA	2	UGUACUCUCAUUGUGGAUGAC	99	AD00052
GAUCCACAAUGAGAGUACCUA	3	UAGGUACUCUCAUUGUGGAUC	100	AD00053
GUCCACAAUGAGAGUACCUGA	4	UCAGGUACUCUCAUUGUGGAC	101	AD00054
GUUCUUGGGCUUCCGUUAUAUA	5	UAUAUACGGAAGCCCAAGAAC	102	AD00055
GUUGGGCUUCCGUUAUAUAUGA	6	UCAUAUAUACGGAAGCCCAAC	103	AD00056
GUGGGCUUCCGUUAUAUAUGGA	7	UCCAUAUAUACGGAAGCCAC	104	AD00057
GGCUUCCGUUAUAUAUGGCAUA	8	UAUGCCAUAUAUACGGAAGCC	105	AD00058
GCUUCCGUUAUAUAUGGCAUGA	9	UCAUGCCAUAUAUACGGAAGC	106	AD00059
GCGUAUAUAUGGCAUGCACAA	10	UUGUGCAUGCCAUAUAUACGC	107	AD00060
GGUUCCUUGGAAGGACAAGAA	11	UUCUUGUCCUCCAAGGAACC	108	AD00061
GAGAAGAUUGACAGGUUCAUA	12	UAUGAACCUGUCAAUUCUUCUC	109	AD00062
GAUGCAGGCUGUGACAGGAUA	13	UAUCCUGUCACAGCCUGCAUC	110	AD00063
GGAGUUCUGGGUGGACAACAA	14	UUGUUGUCCACCCAGAACUCC	111	AD00064
GCAACAGCACCUCAGUGUCUA	15	UAGACACUGAGGUGCUGUUGC	112	AD00065
GGGGUCUCACUUUCCAGCAAA	16	UUUGCUGGAAAGUGAGACCCC	113	AD00066
GUCACUUUCCAGCAAAACUCA	17	UGAGUUUUGCUGGAAAGUGAC	114	AD00067
GCCAGCAAAACUCCCUCAACA	18	UGUUGAGGGAGUUUUGCUGGC	115	AD00068
GAGCAAAACUCCCUCAACUGA	19	UCAGUUGAGGGAGUUUUGCUC	116	AD00069
GGAGCUGAACCUGCAAAAUA	20	UAUUUUUGCAGGUUCAGCUCC	117	AD00070

GCUGAACCUGCAAAAUUGAA	21	UUCAUUUUUUGCAGGUUCAGC	118	AD00071
GGAACCGCCCAUUCCUGUUUA	22	UAAACAGGAAUGGGCGGUUCC	119	AD00072
GAACCGCCCAUUCCUGUUUGA	23	UCAAACAGGAAUGGGCGGUUC	120	AD00073
GUUCCUGUUUGCUGUGUAUGA	24	UCAUACACAGCAAACAGGAAC	121	AD00074
GCUGUUUGCUGUGUAUGAUCA	25	UGAUCAUACACAGCAAACAGC	122	AD00075
GUGUUUGCUGUGUAUGAUCAA	26	UUGAUCAUACACAGCAAACAC	123	AD00076
GUUGCUGUGUAUGAUCAAAGA	27	UCUUUGAUCAUACACAGCAAC	124	AD00077
GUCCCACCUUUUCUUCUAAUA	28	UAUUAGAAGAAAAGGUGGGAC	125	AD00078
GACCUUUUCUUCUAAUGAGUA	29	UACUCAUUAGAAGAAAAGGUC	126	AD00079
GCCUUUUCUUCUAAUGAGUCA	30	UGACUCAUUAGAAGAAAAGGC	127	AD00080
GCGUUUCUCCUUGGUCUAAGA	31	UCUUAGACCAAGGAGAAACGC	128	AD00081
GUUUCUCCUUGGUCUAAGUGA	32	UCACUUAGACCAAGGAGAAAC	129	AD00082
GGUUUGCUGGGUUUAUUUUAA	33	UUAAAAUAAACCCAGCAAACC	130	AD00083
GUUUGCUGGGUUUAUUUUAGA	34	UCUAAAAUAAACCCAGCAAAC	131	AD00084
GUUGCUGGGUUUAUUUUAGAA	35	UUCUAAAAUAAACCCAGCAAC	132	AD00085
GGGGUUUAUUUUAGAGAAUGA	36	UCAUUCUCUAAAAUAAACCCC	133	AD00086
GGGUUUAUUUUAGAGAAUGGA	37	UCCAUUCUCUAAAAUAAACCC	134	AD00087
GGGCAAGAACCAGUGUUUAGA	38	UCUAAACACUGGUUCUUGCCC	135	AD00088

GGCAAGAACCAGUGUUUAGCA	39	UGC UAAACACUGGUUCUUGCC	136	AD00089
GCAAGAACCAGUGUUUAGCGA	40	UCGCUAAACACUGGUUCUUGC	137	AD00090
GCUGUCCAAAAAGAAUCCA	41	UGGAAUUCUUUUUGGAACAGC	138	AD00091
GGUUCCAAAAAGAAUCCAAA	42	UUUGGAAUUCUUUUUGGAACC	139	AD00092
GUUCCAAAAAGAAUCCAACA	43	UGUUGGAAUUCUUUUUGGAAC	140	AD00093
GCAAAAAGAAUCCAACCGAA	44	UUCGGUUGGAAUUCUUUUUGC	141	AD00094

GAAAAAGAAUCCAACCGACA	45	UGUCGGUUGGAAUUCUUUUUC	142	AD00095
GCAACCGACCAGCUUGUUUGA	46	UCAAACAAGCUGGUCGGUUGC	143	AD00096
GAACCGACCAGCUUGUUUGUA	47	UACAAACAAGCUGGUCGGUUC	144	AD00097
GGACCAGCUUGUUUGUGAAAA	48	UUUUCACAAACAAGCUGGUCC	145	AD00098
GACCAGCUUGUUUGUGAAACA	49	UGUUUCACAAACAAGCUGGUC	146	AD00099
GCCAGCUUGUUUGUGAAACAA	50	UUGUUUCACAAACAAGCUGGC	147	AD00100
GUCAUCCACAAUGAGAGUACA	51	UGUACUCUCAUUGUGGAUGAC	148	AD00101
GUGGGCUUCCGUUAUAUUGGA	52	UCCAUAUAUACGGAAGCCCAC	149	AD00113
GCUGUUUGCUGUGUAUGAUC	53	UGAUCAUACACAGCAAACAGC	150	AD00114
GGUUUGCUGGGUUUAUUUUAA	54	UUAAAAUAAACCCAGCAAACC	151	AD00115
GCCAGCUUGUUUGUGAAACAA	55	UUGUUUCACAAACAAGCUGGC	152	AD00116

GUCCCACCUUUUCUUCUAAUA	56	UAUUAGAAGAAAAGGUGGGAC	153	AD00122
GCCUUUUCUUCUAAUGAGUCA	57	UGACUCAUUAGAAGAAAAGGC	154	AD00123
GGGGUUUAUUUUAGAGAAUGA	58	UCAUUCUCUAAAAUAAACCCC	155	AD00124
GGUUCAAAAAGAAUUCCAA	59	UUUGGAAUUCUUUUUGGAACC	156	AD00125
GUUCCAAAAAGAAUCCAACA	60	UGUUGGAAUUCUUUUUGGAAC	157	AD00126
CAUCCACAAUGAGAGUACCUA	61	UAGGUACUCUCAUUGUGGAUG	158	AD00154
CUUCUUGGGCUUCCGUUAUAUA	62	UAUAUACGGAAGCCCAAGAAG	159	AD00155
CAUGCAGGCUGUGACAGGAUA	63	UAUCCUGUCACAGCCUGCAUG	160	AD00156
GCUGAACCUGCAAAAAUUGAA	64	UUCAAUUUUUGCAGGUUCAGC	161	AD00157
CACCUUUUCUUCUAAUGAGUA	65	UACUCAUUAGAAGAAAAGGUG	162	AD00158
CCGUUUCUCCUUGGUCUAAGA	66	UCUUAGACCAAGGAGAAACGG	163	AD00159
ACUGUUCAAAAAGAAUCCA	67	UGGAAUUCUUUUUGGAACAGU	164	AD00160
CAAAAAGAAUCCAACCGACA	68	UGUCGGUUGGAAUUCUUUUUG	165	AD00161
CGACCAGCUUGUUUGUGAAAA	69	UUUUCACAAACAAGCUGGUCG	166	AD00162
GACCAGCUUGUUUGUGAAACA	70	UGUUUCACAAACAAGCUGGUC	167	AD00163
UCGUCAUCCACAAUGAGAGUA	71	UACUCUCAUUGUGGAUGACGA	168	AD00252
GUCCACAAUGAGAGUACCUGA	72	UCAGGUACUCUCAUUGUGGAC	169	AD00253

AGGGUCUCACUUUCCAGCAAA	73	UUUGCUGGAAAGUGAGACCCU	170	AD00254
CUGUUUGCUGUGUAUGAUCAA	74	UUGAUCAUACACAGCAAACAG	171	AD00255
UUUGCUGUGUAUGAUCAAAGA	75	UCUUUGAUCAUACACAGCAAA	172	AD00256
GUUUCUCCUUGGUCUAAGUGA	76	UCACUUAGACCAAGGAGAAAC	173	AD00257
GCAAGAACCAGUGUUUAGCGA	77	UCGCUAAACACUGGUUCUUGC	174	AD00258
CCAAAAGAAUCCAACCGAA	78	UUCGGUUGGAAUUCUUUUUGG	175	AD00259
CAACCGACCAGCUUGUUUGUA	79	UACAAACAAGCUGGUCGGUUG	176	AD00260
GACCUUUUCUUCUAAUGAGUA	80	UACUCAUUAGAAGAAAAGGUC	177	AD00158-1
GACCUUUCUUCUAGCGAGUA	81	UACUCAUUAGAAGAAAAGGUC	178	AD00158-2
GACCUUUUCUUCUAAUGAGUA	82	UACUCAUUAGAAGAAAAGGUC	179	AD00158-3
CACCAGCUUGUUUGUGAAACA	83	UGUUUCACAAACAAGCUGGUG	180	AD00163-1
CACCAGCUUGUUUGUGAAACA	84	UGUUUCACAAACAAGCUGGUG	181	AD00163-2
GCGUUUCUCCUUGGUCUAAGA	85	UCUUAGACCAAGGAGAAACGC	182	AD00159-1
GCGUUUCUCCUUGGUCUAAGA	86	UCUUAGACCAAGGAGAAACGC	183	AD00159-2
GCAAAAAGAAUCCAACCGAA	87	UUCGGUUGGAAUUCUUUUUGC	184	AD00300-1
CCUUUUCUUCUAAUGAGUA	88	UACUCAUUAGAAGAAAAGG	185	AD00158-19-1
CCAGCUUGUUUGUGAAACA	89	UGUUUCACAAACAAGCUGG	186	AD00163-19-1
GUUUCUCCUUGGUCUAAGA	90	UCUUAGACCAAGGAGAAAC	187	AD00159-19-1

AAAAAGAAUCCAACCGAA	91	UUCGGUUGGAAUUCUUUUU	188	AD00300-19-1
CCCACCUUUUCUUCUAAUA	92	UAUUAGAAGAAAAGGUGGG	189	AD00122-19-1
CCUUUUCUUCUAAUGAGUU	93	AACUCAUUAGAAGAAAAGG	190	AD00158-19-2
CCAGCUUGUUUGUGAAACU	94	AGUUUCACAAACAAGCUGG	191	AD00163-19-2
GUUUCUCCUUGGUCUAAGU	95	ACUUAGACCAAGGAGAAAC	192	AD00159-19-2
AAAAAGAAUCCAACCGAU	96	AUCGGUUGGAAUUCUUUUU	193	AD00300-19-2
CCCACCUUUUCUUCUAAUU	97	AAUUAGAAGAAAAGGUGGG	194	AD00122-19-2
CACCAGCUUGUUUGUGAAACA	522	UGUUUCACAAACAAGCUGGUG	523	AD00163-3
CACCAGCUUGUUUGUGAAACA	528	UGUUUCACAAACAAGCUGGUG	559	AV01227
CACCAGCUUGUUUGUGAAACU	529	AGUUUCACAAACAAGCUGGUG	560	AV01228
CACCAGCUUGUUUGUGAAACC	530	GGUUUCACAAACAAGCUGGUG	561	AV01229
CACCAGCUUGUUUGUGAAACG	531	CGUUUCACAAACAAGCUGGUG	562	AV01230
AGCUUGUUUGUGAAACA	532	UGUUUCACAAACAAGCU	563	AV01231
CAGCUUGUUUGUGAAACA	533	UGUUUCACAAACAAGCUG	564	AV01232
ACAGCUUGUUUGUGAAACA	534	UGUUUCACAAACAAGCUGU	565	AV01233
UCAGCUUGUUUGUGAAACA	535	UGUUUCACAAACAAGCUGA	566	AV01234
GCAGCUUGUUUGUGAAACA	536	UGUUUCACAAACAAGCUGC	567	AV01235

CCAGCUUGUUUGUGAAACA	537	UGUUUCACAAACAAGCUGG	568	AV01236
ACCAGCUUGUUUGUGAAACA	538	UGUUUCACAAACAAGCUGGU	569	AV01237
UCCAGCUUGUUUGUGAAACA	539	UGUUUCACAAACAAGCUGGA	570	AV01238
GCCAGCUUGUUUGUGAAACA	540	UGUUUCACAAACAAGCUGGC	571	AV01239
CCCAGCUUGUUUGUGAAACA	541	UGUUUCACAAACAAGCUGGG	572	AV01240
GACCAGCUUGUUUGUGAAACA	542	UGUUUCACAAACAAGCUGGUC	573	AV01241
AACCAGCUUGUUUGUGAAACA	543	UGUUUCACAAACAAGCUGGUU	574	AV01242
UACCAGCUUGUUUGUGAAACA	544	UGUUUCACAAACAAGCUGGUA	575	AV01243
CGACCAGCUUGUUUGUGAAACA	545	UGUUUCACAAACAAGCUGGUCG	576	AV01244
CCGACCAGCUUGUUUGUGAAACA	546	UGUUUCACAAACAAGCUGGUCGG	577	AV01245

ACCGACCAGCUUGUUUGUGAAACA	547	UGUUUCACAAACAAGCUGGUCGGU	578	AV01246
AACCGACCAGCUUGUUUGUGAAACA	548	UGUUUCACAAACAAGCUGGUCGGUU	579	AV01247
CAACCGACCAGCUUGUUUGUGAAAC A	549	UGUUUCACAAACAAGCUGGUCGGUUG	580	AV01248
GAAUCCAACCGACCAGCUUGUUUG UGAAACA	550	UGUUUCACAAACAAGCUGGUCGGUUG GAAUUC	581	AV01249
CACCAGCUUGUUUGUGAAACA	551	UGUUUCACAAACAAGCUGGUGUU	582	AV01250
CACCAGCUUGUUUGUGAAACA	552	UGUUUCACAAACAAGCUGGUGGA	583	AV01251

CACCAGCUUGUUUGUGAAACA	553	UGUUUCACAAACAAGCUGGUG	584	AV01252
CACCAGCUUGUUUGUGAAACA	554	UGUUUCACAAACAAGCUGGUG	585	AV01253
CACCAGCUUGUUUGUGAAACA	555	UGUUUCACAAACAAGCUGGUG	586	AV01254
CACCAGCUUGUUUGUAAAACA	556	UGUUUCACAAACAAGCUGGUG	587	AV01255
CACCAGCUUGUUUGUGAAUA	557	UAUUUCACAAACAAGCUGGUG	588	AV01256
CACCAGCUUGUUUGUGAAACA	558	UGUUUCACAAACAAGCUGGUG	589	AV01257
CCAGCUUGUUUGUGAAAC	652	GUUUCACAAACAAGCUGG	653	AV01711

La Tabla 2 muestra ciertas secuencias de hebra antisentido y de hebra sentido del agente AGT RNAi modificado químicamente de la invención. En algunas modalidades de los métodos de la invención, se administra a la célula y/o al sujeto un agente RNAi que tiene la secuencia de polinucleótidos que se muestra en la Tabla 2. En algunas modalidades de los métodos de la invención, se administra al sujeto un agente RNAi que tiene la secuencia de polinucleótidos que se muestra en la Tabla 2. En algunas modalidades de la invención, el agente RNAi administrado al sujeto comprende los dúplex indicados en la primera columna de la Tabla 2, y comprende las modificaciones de secuencia de la secuencia de las hebras sentido y antisentido que se muestran en las columnas tercera y sexta de la misma fila en la Tabla. 2, respectivamente. En algunas modalidades de los métodos de la invención, las secuencias que se muestran en la Tabla 2 pueden unirse a (también denominadas en el presente documento "conjugadas con") un compuesto capaz de administrar un agente RNAi a células y/o tejidos de un sujeto. Ejemplos no limitantes de compuestos de administración que pueden usarse en ciertas modalidades de la presente invención son compuestos que contienen GalNAc. En la Tabla 2, la primera columna indica el número de AD dúplex o el número AV de la secuencia de bases, correspondiente a la Tabla 1. Para la secuencia de bases identificada por el número de AD dúplex, no solo se muestra la secuencia de bases contenida en las hebras sentido y antisentido. sino también se muestra la modificación química designada que se exhibe en la misma fila de la Tabla 2. Por ejemplo, la primera fila de la Tabla 1 muestra la secuencia de bases monocatenarias sentido y antisentido, que juntas forman un dúplex, identificado como: dúplex AD# AD00051; y en el dúplex AD# AD00051 enumerado en la Tabla 2. Como dúplex, contiene las secuencias de bases de AD00051-SS y AD00051-AS, y contiene modificaciones químicas en las secuencias sentido y antisentido que se muestran en las columnas tercera y sexta, respectivamente. La "Hebra Sentido SS#" en la columna 2 de la Tabla 2 es el identificador asignado para la secuencia sentido (incluyendo modificaciones) que se muestra en la columna 3 en la misma fila. La "Hebra Antisentido AS#" en la quinta columna de la Tabla 2 es el identificador asignado para la secuencia antisentido (incluyendo modificaciones) que se muestra en la sexta columna.

Tabla 2: Se proporcionan secuencias de hebras antisentido y sentido de agentes de AGT RNAi modificados químicamente. Todas las secuencias se muestran de 5' a 3'. Estas secuencias se utilizaron en algunos de los estudios de pruebas in vitro descritos en este documento. Las modificaciones químicas se expresan como: mayúsculas: 2'-fluoro; minúsculas: 2'-OMe; Tiofosfato: *

Dúplex AD#	Hebra sentido SS#	Secuencia sentido	SEQ ID NO	Hebra antisentido AS#	Secuencia antisentido	SEQ ID NO
AD00051	AD00051-SS	g*c*gucaucCaCaAugagagu*a	195	AD00051-AS	u*A*cucuCauugUgGaUgac*g*c	245
AD00053	AD00053-SS	g*a*uccacaAuGaGaguaccu*a	196	AD00053-AS	u*A*gguaCucucAuUgUgga*u*c	246
AD00054	AD00054-SS	g*u*ccacaaUgAgAguaccug*a	197	AD00054-AS	u*C*agguAcucuCaUuGugg*a*c	247
AD00055	AD00055-SS	g*u*ucuuggGcUuCcguauau*a	198	AD00055-AS	u*A*uauaCggaaGcCcAga*a*c	248
AD00056	AD00056-SS	g*u*ugggcuUcCgUauauaug*a	199	AD00056-AS	u*C*auauAuacgGaAgCcca*a*c	249
AD00057	AD00057-SS	g*u*gggcuuCcGuAuauaugg*a	200	AD00057-AS	u*C*cauaUauacGgAaGccc*a*c	250
AD00058	AD00058-SS	g*g*cuuccgUaUaUauggcau*a	201	AD00058-AS	u*A*ugccAuauaUaCgGaag*c*c	251
AD00059	AD00059-SS	g*c*uuccguAuAuAuggcaug*a	202	AD00059-AS	u*C*augcCauauAuAcGgaa*g*c	252
AD00060	AD00060-SS	g*c*guauauAuGgCaugcaca*a	203	AD00060-AS	u*U*gugcAugccAuAuAuac*g*c	253
AD00061	AD00061-SS	g*g*uuccuuGgAaGgacaaga*a	204	AD00061-AS	u*U*cuugUccuuCcAaGgaa*c*c	254
AD00062	AD00062-SS	g*a*gaagauUgAcAgguucau*a	205	AD00062-AS	u*A*ugaaCcuguCaAuCuuc*u*c	255
AD00063	AD00063-SS	g*a*ugcaggCuGuGacaggau*a	206	AD00063-AS	u*A*uccuGucacAgCcUgca*u*c	256
AD00064	AD00064-SS	g*g*aguucuGgGuGgacaaca*a	207	AD00064-AS	u*U*guugUccacCcAgAacu*c*c	257
AD00065	AD00065-SS	g*c*aacagcAcCuCagugucu*a	208	AD00065-AS	u*A*gacaCugagGuGcUguu*g*c	258

AD00066	AD00066-SS	g*g*ggucucAcUuUccagcaa*a	209	AD00066-AS	u*U*ugcuGgaaaGuGaGacc*c*c	259
AD00067	AD00067-SS	g*u*cacuuuCcAgCaaaacuc*a	210	AD00067-AS	u*G*aguuUugcuGgAaAgug*a*c	260
AD00068	AD00068-SS	g*c*cagcaaAaCuCccucaac*a	211	AD00068-AS	u*G*uugaGggagUuUuGcug*g*c	261
AD00069	AD00069-SS	g*a*gcaaaaCuCcCucaacug*a	212	AD00069-AS	u*C*aguuGagggAgUuUugc*u*c	262
AD00070	AD00070-SS	g*g*agcugaAcCuGcaaaaau*a	213	AD00070-AS	u*A*uuuuUgcagGuUcAgcu*c*c	263
AD00071	AD00071-SS	g*c*u gaaccUgCaAaaauuga*a	214	AD00071-AS	u*U*caauUuuugCaGgUuca*g*c	264
AD00072	AD00072-SS	g*g*aaccgcCcAuUccuguuu*a	215	AD00072-AS	u*A*aacaGgaauGgGcGguu*c*c	265
AD00073	AD00073-SS	g*a*accgccCaUuCcuguuug*a	216	AD00073-AS	u*C*aaacAggaaUgGgCggu*u*c	266
AD00074	AD00074-SS	g*u*uccuguUuGcUguguauug*a	217	AD00074-AS	u*C*auacAcagcAaAcAgga*a*c	267
AD00075	AD00075-SS	g*c*uguuugCuGuGuaugauc*a	218	AD00075-AS	u*G*aucaUacacAgCaAaca*g*c	268
AD00076	AD00076-SS	g*u*guuugcUgUgUaugauca*a	219	AD00076-AS	u*U*gaucAuacaCaGcAaac*a*c	269
AD00077	AD00077-SS	g*u*ugcuguGuAuGaucaaag*a	220	AD00077-AS	u*C*uuugAucauAcAcAgca*a*c	270
AD00078	AD00078-SS	g*u*cccaccUuUuCuucuaau*a	221	AD00078-AS	u*A*uuagAagaaAaGgUggg*a*c	271
AD00079	AD00079-SS	g*a*ccuuuuCuUcUaaugagu*a	222	AD00079-AS	u*A*cucaUuagaAgAaAagg*u*c	272
AD00080	AD00080-SS	g*c*cuuuucUuCuAaugaguc*a	223	AD00080-AS	u*G*acucAuuagAaGaAaag*g*c	273
AD00081	AD00081-SS	g*c*g uuuuCuCcUuGgucuaag*a	224	AD00081-AS	u*C*uuagAccaaGgAgAaac*g*c	274
AD00082	AD00082-SS	g*u*uucuccUuGgUcuaagug*a	225	AD00082-AS	u*C*acuuAgaccAaGgAgaa*a*c	275
AD00083	AD00083-SS	g*g*uuugcuGgGuUauuuuuu*a	226	AD00083-AS	u*U*aaaaUaaacCcAgCaaa*c*c	276
AD00084	AD00084-SS	g*u*uugcugGgUuUauuuuag*a	227	AD00084-AS	u*C*uaaaAuaaaCcCaGcaa*a*c	277
AD00085	AD00085-SS	g*u*ugcuggGuUuAuuuuaga*a	228	AD00085-AS	u*U*cuaaAauaaAcCcAgca*a*c	278

AD00086	AD00086-SS	g*g*gguuuaUuUuAgagaau*g*a	229	AD00086-AS	u*C*auucUcuaaAaUaAacc*c*c	279
AD00087	AD00087-SS	g*g*guuuauUuUaGagaau*g*a	230	AD00087-AS	u*C*cauuCucuaAaAuAaac*c*c	280
AD00088	AD00088-SS	g*g*gcaagaAcCaGuguuuag*a	231	AD00088-AS	u*C*uaaaCacugGuUcUugc*c*c	281
AD00089	AD00089-SS	g*g*caagaaCcAgUguuuagc*a	232	AD00089-AS	u*G*cuaaAcacuGgUuCuug*c*c	282
AD00090	AD00090-SS	g*c*aagaacCaGuGuuuagcg*a	233	AD00090-AS	u*C*gcuaAacacUgGuUcuu*g*c	283
AD00091	AD00091-SS	g*c*uguuccAaAaAgaauucc*a	234	AD00091-AS	u*G*gaauUcuuuUuGgAaca*g*c	284
AD00092	AD00092-SS	g*g*uuccaaAaAgAauuccaa*a	235	AD00092-AS	u*U*uggaAuucuUuUuGgaa*c*c	285
AD00093	AD00093-SS	g*u*uccaaaAaGaAuuccaac*a	236	AD00093-AS	u*G*uuggAauucUuUuUgga*a*c	286
AD00094	AD00094-SS	g*c*aaaaagAaUuCcaaccga*a	237	AD00094-AS	u*U*cggUggaaUuCuUuuu*g*c	287
AD00095	AD00095-SS	g*a*aaaagaAuUcCaaccgac*a	238	AD00095-AS	u*G*ucggUuggaAuUcUuuu*u*c	288
AD00096	AD00096-SS	g*c*aaccgaCcAgCuuguuug*a	239	AD00096-AS	u*C*aaacAagcuGgUcGguu*g*c	289
AD00097	AD00097-SS	g*a*accgacCaGcUuguuugu*a	240	AD00097-AS	u*A*caaaCaagcUgGuCggU*u*c	290
AD00098	AD00098-SS	g*g*accagcUuGuUugugaaa*a	241	AD00098-AS	u*U*uucaCaaacAaGcUggU*c*c	291
AD00099	AD00099-SS	g*a*ccagcuUgUuUgugaaac*a	242	AD00099-AS	u*G*uuucAcaaaCaAgCugg*u*c	292
AD00100	AD00100-SS	g*c*cagcuGuUuGugaaaca*a	243	AD00100-AS	u*U*guuuCacaaAcAaGcug*g*c	293
AD00101	AD00101-SS	g*u*cauccaCaAuGagaguac*a	244	AD00101-AS	u*G*uacuCucauUgUgGaug*a*c	294
AV01227	AV01227-SS	c*a*ccagcuUgUuUgugaaac*a	590	AV01227-AS	u*G*uuucAcaaaCaAgCugg*u*g	621
AV01228	AV01228-SS	c*a*ccagcuUgUuUgugaaac*u	591	AV01228-AS	a*G*uuucAcaaaCaAgCugg*u*g	622
AV01229	AV01229-SS	c*a*ccagcuUgUuUgugaaac*c	592	AV01229-AS	g*G*uuucAcaaaCaAgCugg*u*g	623
AV01230	AV01230-SS	c*a*ccagcuUgUuUgugaaac*g	593	AV01230-AS	c*G*uuucAcaaaCaAgCugg*u*g	624
AV01231	AV01231-SS	a*g*cuUgUuUgugaaac*a	594	AV01231-AS	u*G*uuucAcaaaCaAg*C*u	625

AV01232	AV01232-SS	c*a*gcUgUuUgugaaac*a	595	AV01232-AS	u*G*uuucAcaaaCaAgC*u*g	626
AV01233	AV01233-SS	a*c*agcuUgUuUgugaaac*a	596	AV01233-AS	u*G*uuucAcaaaCaAgCu*g*u	627
AV01234	AV01234-SS	u*c*agcuUgUuUgugaaac*a	597	AV01234-AS	u*G*uuucAcaaaCaAgCu*g*a	628

AV01235	AV01235-SS	g*c*agcuUgUuUgugaaac*a	598	AV01235-AS	u*G*uuucAcaaaCaAgCu*g*c	629
AV01236	AV01236-SS	c*c*agcuUgUuUgugaaac*a	599	AV01236-AS	u*G*uuucAcaaaCaAgCu*g*g	630
AV01237	AV01237-SS	a*c*cagcuUgUuUgugaaac*a	600	AV01237-AS	u*G*uuucAcaaaCaAgCug*g*u	631
AV01238	AV01238-SS	u*c*cagcuUgUuUgugaaac*a	601	AV01238-AS	u*G*uuucAcaaaCaAgCug*g*a	632
AV01239	AV01239-SS	g*c*cagcuUgUuUgugaaac*a	602	AV01239-AS	u*G*uuucAcaaaCaAgCug*g*c	633
AV01240	AV01240-SS	c*c*cagcuUgUuUgugaaac*a	603	AV01240-AS	u*G*uuucAcaaaCaAgCug*g*g	634
AV01241	AV01241-SS	g*a*ccagcuUgUuUgugaaac*a	604	AV01241-AS	u*G*uuucAcaaaCaAgCugg*u*c	635
AV01242	AV01242-SS	a*a*ccagcuUgUuUgugaaac*a	605	AV01242-AS	u*G*uuucAcaaaCaAgCugg*u*u	636
AV01243	AV01243-SS	u*a*ccagcuUgUuUgugaaac*a	606	AV01243-AS	u*G*uuucAcaaaCaAgCugg*u*a	637
AV01244	AV01244-SS	c*g*accagcuUgUuUgugaaac*a	607	AV01244-AS	u*G*uuucAcaaaCaAgCuggu*c*g	638
AV01245	AV01245-SS	c*c*gaccagcuUgUuUgugaaac* a	608	AV01245-AS	u*G*uuucAcaaaCaAgCugguc*g*g	639
AV01246	AV01246-SS	a*c*cgaccagcuUgUuUgugaaac* *a	609	AV01246-AS	u*G*uuucAcaaaCaAgCuggucg*g* u	640
AV01247	AV01247-SS	a*a*ccgaccagcuUgUuUgugaaa c*a	610	AV01247-AS	u*G*uuucAcaaaCaAgCuggucgg*u *u	641
AV01248	AV01248-SS	c*a*accgaccagcuUgUuUgugaa	611	AV01248-AS	u*G*uuucAcaaaCaAgCuggucggu*	642

		ac*a			u*g	
AV01249	AV01249-SS	g*a*auuccaaccgaccagcuUgUu Ugugaaac*a	612	AV01249-AS	u*G*uuucAcaaaCaAgCuggucggu uggaaau*u*c	643
AV01250	AV01250-SS	c*a*ccagcuUgUuUgugaaac*a	613	AV01250-AS	u*G*uuucAcaaaCaAgCuggug*u*u	644
AV01251	AV01251-SS	c*a*ccagcuUgUuUgugaaac*a	614	AV01251-AS	u*G*uuucAcaaaCaAgCuggug*g*a	645
AV01252	AV01252-SS	c*a*ccagcuUgUuUgugaaac*a	615	AV01252-AS	u*G*uuu(cUNA)AcaaaCaAgCugg *u*g	646
AV01253	AV01253-SS	c*a*ccagcuUgUuUgugaaac*a	616	AV01253-AS	u*G*uuuc(aUNA)caaaCaAgCugg* u*g	647
AV01254	AV01254-SS	c*a*ccagcuUGUuugugaaac*a	617	AV01254-AS	u*G*uuuCacaaacaAgCugg*u*g	648
AV01255	AV01255-SS	c*a*ccagcuUgUuUguaaaac*a	618	AV01255-AS	u*G*uuucAcaaaCaAgCugg*u*g	649
AV01256	AV01256-SS	c*a*ccagcuUgUuUgugaaaau*a	619	AV01256-AS	u*A*uuucAcaaaCaAgCugg*u*g	650
AV01257	AV01257-SS	c*a*ccagcuUgUuUgugaaa*c*a	620	AV01257-AS	u*G*uuucAcaaaCaAgCugg*u*g	651

La Tabla 3 muestra ciertas secuencias de hebra antisentido y hebra sentido del agente AGT RNAi modificadas químicamente de la invención. En algunas modalidades de los métodos de la invención, los agentes RNAi mostrados en la Tabla 3 se administran a una célula y/o sujeto. En algunas modalidades de los métodos de la invención, se administra a un sujeto un agente RNAi con una secuencia de polinucleótidos que se muestra en la Tabla 3. En algunas modalidades de la invención, un agente RNAi administrado a un sujeto comprende un dúplex identificado en una fila en la columna uno de la Tabla 3 e incluye las modificaciones de secuencia y/o compuesto de administración que se exhiben en las secuencias de hebras sentido y antisentido en la misma fila de la Tabla 3, columnas tres y seis, respectivamente. Las secuencias se utilizaron en algunos estudios de pruebas in vivo descritos en otras partes del presente documento. En algunas modalidades de métodos de la invención, una secuencia mostrada en la Tabla 3 puede adjuntarse (también denominada en el presente documento "conjugada a") un compuesto para su administración, un ejemplo no limitativo del cual es un Compuesto que contiene GalNAc, con un compuesto de liberación identificado en la Tabla 3 como "GLX-n" en las hebras de detección de la columna tres. Tal como se utiliza en el presente documento, "GLX" es usado para representar el compuesto de administración "GLS" o "GLO" ("X" puede ser "S" u "O"), y GLX-n puede ser cualquier GLS y GLO que se pueda unir durante el proceso de síntesis al extremo 3' o 5' del oligonucleótido del compuesto de administración. Por ejemplo, pero sin limitarse: GLX-13 y GLX-14 se pueden conectar al extremo 3'- del oligonucleótido de la presente invención durante el proceso de síntesis, GLX-5 y GLX-15 se pueden conectar uniéndose al extremo 5' del oligonucleótido de la presente invención durante la síntesis. En algunas modalidades, como se usa en este documento y se muestra en la Tabla 3, "GLX-n" se usa para indicar que el compuesto que contiene GalNAc unido es cualquiera de los compuestos GLS-1, GLS-2, GLS-3, GLS-4, GLS-5, GLS-6, GLS-7, GLS-8, GLS-9, GLS-10, GLS-11, GLS-12, GLS-13, GLS-14, GLS-15, GLS-16, GLO-1, GLO-2, GLO-3, GLO-4, GLO-5, GLO-6, GLO-7, GLO-8, GLO-9, GLO-10, GLO-11, GLO-12, GLO-13, GLO-14, GLO-15, y GLO-16. En algunas implementaciones, GLO-0 se expresa como un compuesto que contiene GalNAc que se ha divulgado en el estado de la técnica para la conexión, por ejemplo, pero sin limitarse, como los compuestos para adherirse a los que contienen

GalNAc divulgados en Jayaprakash , et al., (2014) J. Am. Chem. Soc., 136, 16958–16961, los cuales están completamente incorporados en este documento. En algunas implementaciones, un experto en la materia será capaz de fabricar y utilizar compuestos de dsRNA de la invención con compuestos de administración adjuntos que incluyen, entre otros: GLS-1, GLS-2, GLS-3, GLS-4, GLS-5, GLS-6, GLS-7, GLS-8, GLS-9, GLS-10, GLS-11, GLS-12, GLS-13, GLS-14, GLS-15, GLS-16, GLO-1, GLO-2, GLO-3, GLO-4, GLO-5, GLO-6, GLO-7, GLO-8, GLO-9, GLO-10, GLO-11, GLO-12, GLO-13, GLO-14, GLO-15 y GLO-16. La estructura de cada uno de ellos se proporciona en otra parte del presente documento. La primera columna de la Tabla 3 proporciona el AD# dúplex del dúplex asignado a las secuencias sentido y antisentido de esa fila de la tabla. Por ejemplo, el dúplex AD# AD00052 es un dúplex compuesto por AD00052-SS y AD00052-AS. Cada fila de la Tabla 3 proporciona una hebra sentido y una hebra antisentido y revela los dúplex formados por las hebras sentido y antisentido indicadas. La "hebra sentido SS#" en la segunda columna de la Tabla 3 es el identificador asignado para la secuencia sentido (incluidas las modificaciones) que se muestra en la columna 3 de la misma fila. La "hebra antisentido AS#" en la quinta columna de la Tabla 3 es el identificador asignado para la secuencia antisentido (incluidas las modificaciones) que se muestra en la sexta columna. El identificador de ciertos compuestos GLO que contienen GalNAc adjunto se muestra como GLO-0, y se entiende que el compuesto que se muestra como GLO-0 puede ser sustituido por otro de los compuestos GLO-n o GLS-n compuestos, y el compuesto también incluye una modalidad de los métodos y/o composiciones de la invención.

En la Tabla 3 se presentan las secuencias de hebras antisentido y sentido de los agentes AGT RNAi modificados químicamente utilizados para los ensayos in vivo. Todas las secuencias se muestran de 5' a 3'. Estas secuencias se utilizaron en algunos de los estudios de prueba in vivo descritos en otras partes del presente documento. Las moléculas de administración utilizadas en los estudios in vivo se indican como "GLO-0" en el extremo 3' de cada hebra sentido. Las modificaciones químicas se expresan como: mayúsculas: 2'-fluoro; minúsculas: 2'-OMe; Tiofosfato: *; ácido nucleico desbloqueado: UNA (Nota: AD00052, AD00113-AD00260: no UNA; AD00282-AD00301: versión UNA)

Dúplex AD#	Hebra sentido SS#	Secuencia sentido	SEQ ID NO	Hebra antisentido AS#	Secuencia antisentido	SEQ ID NO
AD00052	AD00052-SS	g*u*cauccaCaAuGagaguac*a(GLO-0)	295	AD00052-AS	u*G*uacuCucauUgUgGaug *a*c	344
AD00113	AD00113-SS	g*u*gggcuuCcGuAuauaugg*a(GLO-0)	296	AD00113-AS	u*C*cauaUauacGgAaGccc* a*c	345
AD00114	AD00114-SS	g*c*uguuugCuGuGuaugauc*a(GLO-0)	297	AD00114-AS	u*G*aucaUacacAgCaAaca* g*c	346
AD00115	AD00115-SS	g*g*uuugcuGgGuUuauuuua*a(GLO-0)	298	AD00115-AS	u*U*aaaaUaaacCcAgCaaa* c*c	347
AD00116	AD00116-SS	g*c*cagcuuGuUuGugaaaca*a(GLO-0)	299	AD00116-AS	u*U*guuuCacaaAcAaGcug* g*c	348
AD00122	AD00122-SS	g*u*cccaccUuUuCuucuaau*a(GLO-0)	300	AD00122-AS	u*A*uuagAagaaAaGgUggg* a*c	349

AD00123	AD00123-SS	g*c*cuuuucUuCuAaugaguc*a(GLO-0)	301	AD00123-AS	u*G*acucAuuagAaGaAaag* g*c	350
AD00124	AD00124-SS	g*g*gguuuaUuUuAgagaaug*a(GLO-0)	302	AD00124-AS	u*C*auucUcuaaAaUaAacc* c*c	351
AD00125	AD00125-SS	g*g*uuccaaAaAgAauuccaa*a(GLO-0)	303	AD00125-AS	u*U*uggaAuucuUuUuGgaa* c*c	352
AD00126	AD00126-SS	g*u*uccaaaAaGaAuuccaac*a(GLO-0)	304	AD00126-AS	u*G*uuggAauucUuUuUgga* a*c	353
AD00154	AD00154-SS	c*a*uccacaAuGaGaguaccu*a(GLO-0)	305	AD00154-AS	u*A*gguaCucucAuUgUgga* u*g	354
AD00155	AD00155-SS	c*u*ucuuggGcUuCcguauau*a(GLO-0)	306	AD00155-AS	u*A*uauaCggaaGcCcAaga* a*g	355
AD00156	AD00156-SS	c*a*ugcaggCuGuGacaggau*a(GLO-0)	307	AD00156-AS	u*A*uccuGucacAgCcUgca* u*g	356
AD00157	AD00157-SS	g*c*ugaaccUgCaAaaauuga*a(GLO-0)	308	AD00157-AS	u*U*caauUuuugCaGgUuca* g*c	357
AD00158	AD00158-SS	c*a*ccuuuCuUcUaaugagu*a(GLO-0)	309	AD00158-AS	u*A*cucaUuagaAgAaAagg* u*g	358
AD00159	AD00159-SS	c*c*guuucuCcUuGgucuaag*a(GLO-0)	310	AD00159-AS	u*C*uuagAccaaGgAgAaac* g*g	359
AD00160	AD00160-SS	a*c*uguuccAaAaAgaauucc*a(GLO-0)	311	AD00160-AS	u*G*gaauUcuuuUuGgAaca* g*c	360

					g*u	
AD00161	AD00161-SS	c*a*aaaagaAuUcCaaccgac*a(GLO-0)	312	AD00161-AS	u*G*ucggUuggaAuUcUuuu*	361
					u*g	
AD00162	AD00162-SS	c*g*accagcUuGuUugugaaa*a(GLO-0)	313	AD00162-AS	u*U*uucaCaaacAaGcUggg*	362
					c*g	
AD00163	AD00163-SS	g*a*ccagcuUgUuUgugaaac*a(GLO-0)	314	AD00163-AS	u*G*uuucAcaaaCaAgCugg*	363
					u*c	
AD00252	AD00252-SS	u*c*gucaucCaCaAugagagu*a(GLO-0)	315	AD00252-AS	u*A*cucuCauugUgGaUgac*	364
					g*a	
AD00253	AD00253-SS	g*u*ccacaaUgAgAguaccug*a(GLO-0)	316	AD00253-AS	u*C*agguAcucuCaUuGugg*	365
					a*c	
AD00254	AD00254-SS	a*g*ggucucAcUuUccagcaa*a(GLO-0)	317	AD00254-AS	u*U*ugcuGgaaaGuGaGacc	366
					*c*u	
AD00255	AD00255-SS	c*u*guuugcUgUgUaugauca*a(GLO-0)	318	AD00255-AS	u*U*gaucAuacaCaGcAaac*	367
					a*g	
AD00256	AD00256-SS	u*u*ugcuguGuAuGaucaaag*a(GLO-0)	319	AD00256-AS	u*C*uuugAucAuAcAcAgca*	368
					a*a	
AD00257	AD00257-SS	g*u*uucuccUuGgUcuaagug*a(GLO-0)	320	AD00257-AS	u*C*acuuAgaccAaGgAgaa*	369
					a*c	
AD00258	AD00258-SS	g*c*aagaacCaGuGuuuagcg*a(GLO-0)	321	AD00258-AS	u*C*gcuaAacacUgGuUcuu*	370

					g*c	
AD00259	AD00259-SS	c*c*aaaaagAaUuCcaaccga*a(GLO-0)	322	AD00259-AS	u*U*cggUggaaUuCuUuuu* g*g	371
AD00260	AD00260-SS	c*a*accgacCaGcUuguuuugu*a(GLO-0)	323	AD00260-AS	u*A*caaaCaagcUgGuCggU* u*g	372
AD00282	AD00282-SS	g*u*cccaccUuUuCuucuaau*a(GLO-0)	324	AD00282-AS	u*A*uuAg(aUNA)agaaAaGg Uggg*a*c	373
AD00283	AD00283-SS	g*u*uccaaaAaGaAuuccaac*a(GLO-0)	325	AD00283-AS	u*G*uuGg(aUNA)auucUuU uUgga*a*c	374
AD00284	AD00284-SS	g*c*cuuuucUuCuAaugaguc*a(GLO-0)	326	AD00284-AS	u*G*acUc(aUNA)uuagAaGa Aaag*g*c	375
AD00285	AD00285-SS	g*c*cagcuuGuUuGugaaaca*a(GLO-0)	327	AD00285-AS	u*U*guUu(cUNA)acaaAcAa Gcug*g*c	376
AD00286	AD00286-SS	g*g*uuccaaAaAgAauuccaa*a(GLO-0)	328	AD00286-AS	u*U*ugGa(aUNA)uucuUuU uGgaa*c*c	377
AD00287	AD00287-SS	g*g*uuugcuGgGuUuauuuua*a(GLO-0)	329	AD00287-AS	u*U*aaAa(uUNA)aaacCcAg Caaa*c*c	378
AD00288	AD00288-SS	c*a*ccuuuuCuUcUaaugagu*a(GLO-0)	330	AD00288-AS	u*A*cuCa(uUNA)uagaAgAa Aagg*u*g	379
AD00289	AD00289-SS	g*a*ccagcuUgUuUgugaaac*a(GLO-0)	331	AD00289-AS	u*G*uuUc(aUNA)caaaCaAg	380

					Cugg*u*c	
AD00290	AD00290-SS	c*c*guuucuCcUuGgucuaag*a(GLO-0)	332	AD00290-AS	u*C*uuAg(aUNA)ccaaGgAg Aaac*g*g	381
AD00291	AD00291-SS	c*g*accagcUuGuUugugaaa*a(GLO-0)	333	AD00291-AS	u*U*uuCa(cUNA)aaacAaGc Uggg*c*g	382
AD00292	AD00292-SS	c*a*aaaagaAuUcCaaccgac*a(GLO-0)	334	AD00292-AS	u*G*ucGg(uUNA)uggaAuUc Uuuu*u*g	383
AD00293	AD00293-SS	u*c*gucaucCaCaAugagagu*a(GLO-0)	335	AD00293-AS	u*A*cuCu(cUNA)auugUgGa Ugac*g*a	384
AD00294	AD00294-SS	g*u*ccacaaUgAgAguaccug*a(GLO-0)	336	AD00294-AS	u*C*agGu(aUNA)cucuCaUu Gugg*a*c	385
AD00295	AD00295-SS	a*g*ggucucAcUuUccagcaa*a(GLO-0)	337	AD00295-AS	u*U*ugCu(gUNA)gaaaGuG aGacc*c*u	386
AD00296	AD00296-SS	c*u*guuugcUgUgUaugauca*a(GLO-0)	338	AD00296-AS	u*U*gaUc(aUNA)uacaCaGc Aaac*a*g	387
AD00297	AD00297-SS	u*u*ugcuguGuAuGaucaaag*a(GLO-0)	339	AD00297-AS	u*C*uuUg(aUNA)ucauAcAc Agca*a*a	388
AD00298	AD00298-SS	g*u*uucuccUuGgUcuaagug*a(GLO-0)	340	AD00298-AS	u*C*acUu(aUNA)gaccAaGg Aga*a*c	389
AD00299	AD00299-SS	g*c*aagaacCaGuGuuuagcg*a(GLO-0)	341	AD00299-AS	u*C*gcUa(aUNA)acacUgGu	390

					Ucuu*g*c	
AD00300	AD00300-SS	c*c*aaaaagAaUuCcaaccga*a(GLO-0)	342	AD00300-AS	u*U*cgGu(uUNA)ggaaUuC uUuuu*g*g	391
AD00301	AD00301-SS	c*a*accgacCaGcUuguuuugu*a(GLO-0)	343	AD00301-AS	u*A*caAa(cUNA)aagcUgGu Cggu*u*g	392
AD00302	AD00302-SS	c*c*aaccgaCcAgCuuguuug*a(GLO-0)	524	AD00302-AS	u*C*aaAc(aUNA)agcuggUc Gguu*g*g	525

La Tabla 4 muestra las secuencias de hebras antisentido y sentido de ciertos agentes de AGT RNAi modificados químicamente de la invención. En algunas modalidades de los métodos de la invención, se administra al sujeto un agente RNAi que tiene la secuencia de polinucleótidos mostrada en la Tabla 4. En algunas modalidades de la invención, un agente RNAi administrado a un sujeto comprende un dúplex identificado en una fila en la columna uno de la Tabla 4 e incluye las modificaciones de secuencia y/o el compuesto de administración que se muestran en las secuencias de hebras sentido y antisentido en la misma fila de la Tabla 4, columnas tres y seis, respectivamente. En algunas modalidades de los métodos de la invención, las secuencias mostradas en la Tabla 4 pueden estar vinculadas a compuestos capaces de administrar el agente RNAi a las células y/o tejidos de un sujeto. Ejemplos no limitativos de compuestos de administración que pueden utilizarse en ciertas modalidades de la presente invención son compuestos que contienen GalNAc. En la Tabla 4, el término "GLX-n" denota un compuesto que contiene GalNAc en la hebra sentido indicada. Por ejemplo, los términos "GLO-0" y "GLS-5" denotan cada uno un compuesto diferente que contiene GalNAc unido a la hebra sentido. Debe entenderse que un compuesto mostrado como GLO-0 puede reemplazarse por otro de los compuestos GLO-n o GLS-n y los compuestos resultantes también se incluyen en las modalidades del método y/o composición de la presente invención. Un compuesto mostrado como GLS-5 también puede reemplazarse por otro de los compuestos GLS-n o GLO-n, y los compuestos resultantes se incluyen en las modalidades del método y/o composición de la presente invención. En la Tabla 4, el compuesto "GLX-n" utilizado para indicar el compuesto que contiene GalNAC adjunto es el compuesto GLS-1, GLS-2, GLS-3, GLS-4, GLS-5, GLS-6, GLS-7, GLS- 8, GLS-9, GLS-10, GLS-11, GLS-12, GLS-13, GLS-14, GLS-15, GLS-16, GLO-1, GLO-2, GLO-3, GLO-4, GLO-5, GLO-6, GLO-7, GLO-8, GLO-9, GLO-10, GLO-11, GLO-12, GLO-13, GLO-14, GLO-15 y GLO-16, cuya estructura se proporciona en otra parte del presente documento. La primera columna de la Tabla 4 indica el número de AD# dúplex correspondiente al dúplex mostrado en la Tabla 3. El dúplex AD# ha identificado la secuencia dúplex correspondiente a la Tabla 3, lo que indica que las secuencias sentido, antisentido y dúplex en la Tabla 4 son idénticas a la secuencia de bases con el mismo dúplex AD# en la Tabla 3, pero las secuencias y dúplex en la Tabla 4 tienen diferentes

modificaciones químicas y/o compuestos de administración en comparación con las secuencias y dúplex correspondientes mostrados en la Tabla 3. Por ejemplo, como se muestra en la Tabla 4, las secuencias de AD00113-1-SS, AD00113-1-AS y sus dúplex AD#AD00113 -1 y AD00113-SS (sentido), AD00113-AS (antisentido) que se muestran en la Tabla 3, respectivamente, y AD00113 bicatenario tienen la misma secuencia de bases, mientras que los compuestos de modificación química y/o administración son como se indica en cada tabla. La primera columna de la Tabla 4 identifica el número de AD# del dúplex; los dúplex identificados por los números en cada fila contienen las hebras sentido y antisentido que se muestran en las columnas tercera y sexta, respectivamente, en la misma fila, contienen modificaciones y tienen GLO-o GLS- compuesto de administración unidos en el extremo 3' o 5' de la hebra sentido.

En la Tabla 4 se presentan las secuencias de hebras antisentido y sentido de los agentes AGT RNAi modificados químicamente. Estas secuencias se utilizaron en ciertos estudios in vivo descritos en otras partes del presente documento. Todas las secuencias se muestran de 5' a 3'. Las modificaciones químicas se indican como: mayúsculas: 2'-fluoro; minúsculas: 2'-OMe; Tiofosfato: *; Invab = abásico invertido.

Dúplex AD#	Hebra sentido SS#	Secuencia sentido 5' -> 3'	SEQ ID NO	Hebra antisentido AS#	Secuencia antisentido 5' -> 3'	SEQ ID NO
AD00113-1	AD00113-1-SS	(GLS-5)*(Invab)*gugggcuuCcGuAuauaugga*(Invab)	393	AD00113-1-AS	u*C*cauaUauacG gAaGccc*a*c	456
AD00114-1	AD00114-1-SS	(GLS-5)*(Invab)*gcuguuugCuGuGaugauca*(Invab)	394	AD00114-1-AS	u*G*aucaUacacAg CaAca*g*c	457
AD00115-1	AD00115-1-SS	(GLS-5)*(Invab)*gguuugcuGgGuUuauuuuaa*(Invab)	395	AD00115-1-AS	u*U*aaaaUaaacC cAgCaaa*c*c	458
AD00116-1	AD00116-1-SS	(GLS-5)*(Invab)*gccagcuuGuUuGugaaacaa*(Invab)	396	AD00116-1-AS	u*U*guuuCacaaAc AaGcug*g*c	459
AD00122-1	AD00122-1-SS	(GLS-5)*(Invab)*gucccaccUuUuCuucuaaua*(Invab)	397	AD00122-1-AS	u*A*uuagAagaaAa GgUggg*a*c	460
AD00123-1	AD00123-1-SS	(GLS-5)*(Invab)*gccuuuucUuCuAaugaguca*(Invab)	398	AD00123-1-AS	u*G*acucAuuagAa GaAag*g*c	461
AD00124-1	AD00124-1-SS	(GLS-5)*(Invab)*gggguuuaUuUuAgagaauga*(Invab)	399	AD00124-1-AS	u*C*auucUcuaaAa	462

1					UaAacc*c*c	
AD00125-1	AD00125-1-SS	(GLS-5)*(Invab)*gguuccaaAaAgAauuccaaa*(Invab)	400	AD00125-1-AS	u*U*uggaAuucuU uUuGgaa*c*c	463
AD00126-1	AD00126-1-SS	(GLS-5)*(Invab)*guuccaaaAaGaAuuccaaca*(Invab)	401	AD00126-1-AS	u*G*uuggAauucU uUuUgga*a*c	464
AD00154-1	AD00154-1-SS	(GLS-5)*(Invab)*cauccacaAuGaGaguaccua*(Invab)	402	AD00154-1-AS	u*A*gguaCucucAu UgUgga*u*g	465
AD00155-1	AD00155-1-SS	(GLS-5)*(Invab)*cuucuuggGcUuCcguauaua*(Invab)	403	AD00155-1-AS	u*A*uauaCggaaG cCcAaga*a*g	466
AD00156-1	AD00156-1-SS	(GLS-5)*(Invab)*caugcaggCuGuGacaggaua*(Invab)	404	AD00156-1-AS	u*A*uccuGucacAg CcUgca*u*g	467
AD00157-1	AD00157-1-SS	(GLS-5)*(Invab)*gcugaaccUgCaAaaauugaa*(Invab)	405	AD00157-1-AS	u*U*caauUuuugC aGgUuca*g*c	468
AD00160-1	AD00160-1-SS	(GLS-5)*(Invab)*acuguuccAaAaAgaauucca*(Invab)	406	AD00160-1-AS	u*G*gaauUcuuuU uGgAaca*g*u	469
AD00161-1	AD00161-1-SS	(GLS-5)*(Invab)*caaaaagaAuUcCaaccgaca*(Invab)	407	AD00161-1-AS	u*G*ucggUuggaA uUcUuuu*u*g	470
AD00162-1	AD00162-1-SS	(GLS-5)*(Invab)*cgaccagcUuGuUugugaaaa*(Invab)	408	AD00162-1-AS	u*U*uucaCaaacAa GcUggu*c*g	471
AD00252-1	AD00252-1-SS	(GLS-5)*(Invab)*ucgucaucCaCaAugagagua*(Invab)	409	AD00252-1-AS	u*A*cucuCauugUg GaUgac*g*a	472

AD00253-1	AD00253-1-SS	(GLS-5)*(Invab)*guccacaaUgAgAguaccuga*(Invab)	410	AD00253-1-AS	u*C*agguAcucuCaUuGugg*a*c	473
AD00254-1	AD00254-1-SS	(GLS-5)*(Invab)*agggucucAcUuUccagcaaa*(Invab)	411	AD00254-1-AS	u*U*ugcuGgaaaG uGaGacc*c*u	474
AD00255-1	AD00255-1-SS	(GLS-5)*(Invab)*cuguuugcUgUgUaugaucaa*(Invab)	412	AD00255-1-AS	u*U*gaucAuacaCaGcAaac*a*g	475
AD00256-1	AD00256-1-SS	(GLS-5)*(Invab)*uuugcuguGuAuGaucaaaga*(Invab)	413	AD00256-1-AS	u*C*uuugAucAuAcAcAgca*a*a	476
AD00257-1	AD00257-1-SS	(GLS-5)*(Invab)*guuucuccUuGgUcuaaguga*(Invab)	414	AD00257-1-AS	u*C*acuuAgaccAaGgAgaa*a*c	477
AD00258-1	AD00258-1-SS	(GLS-5)*(Invab)*gcaagaacCaGuGuuuagcga*(Invab)	415	AD00258-1-AS	u*C*gcuaAacacUgGuUcuu*g*c	478
AD00259-1	AD00259-1-SS	(GLS-5)*(Invab)*ccaaaaagAaUuCcaaccgaa*(Invab)	416	AD00259-1-AS	u*U*cgguUggaaUuCuUuuu*g*g	479
AD00260-1	AD00260-1-SS	(GLS-5)*(Invab)*caaccgacCaGcUuguuugua*(Invab)	417	AD00260-1-AS	u*A*caaaCaagcUgGuCggu*u*g	480
AD00282-1	AD00282-1-SS	(GLS-5)*(Invab)*gucccaccUuUuCuucuaaua*(Invab)	418	AD00282-1-AS	u*A*uuAg(aUNA)agaaAaGgUggg*a*c	481
AD00283-1	AD00283-1-SS	(GLS-5)*(Invab)*guuccaaaAaGaAuuccaaca*(Invab)	419	AD00283-1-AS	u*G*uuGg(aUNA)auucUuUuUgga*a	482

					*c	
AD00284-1	AD00284-1-SS	(GLS-5)*(Invab)*gccuuuucUuCuAaugaguca*(Invab)	420	AD00284-1-AS	u*G*acUc(aUNA)u uagAaGaAaag*g* c	483
AD00285-1	AD00285-1-SS	(GLS-5)*(Invab)*gccagcuuGuUuGugaaacaa*(Invab)	421	AD00285-1-AS	u*U*guUu(cUNA)a caaAcAaGcug*g*c	484
AD00286-1	AD00286-1-SS	(GLS-5)*(Invab)*gguuccaaAaAgAauuccaaa*(Invab)	422	AD00286-1-AS	u*U*ugGa(aUNA) uucuUuUuGgaa*c *c	485
AD00287-1	AD00287-1-SS	(GLS-5)*(Invab)*gguuugcuGgGuUuauuuuaa*(Invab)	423	AD00287-1-AS	u*U*aaAa(uUNA)a aacCcAgCaaa*c*c	486
AD00288-1	AD00288-1-SS	(GLS-5)*(Invab)*caccuuuuCuUcJaaugagua*(Invab)	424	AD00288-1-AS	u*A*cuCa(uUNA)u agaAgAaAagg*u*g	487
AD00289-1	AD00289-1-SS	(GLS-5)*(Invab)*gaccagcuUgUuUgugaaaca*(Invab)	425	AD00289-1-AS	u*G*uuUc(aUNA)c aaaCaAgCugg*u* c	488
AD00290-1	AD00290-1-SS	(GLS-5)*(Invab)*ccguuucuCcUuGgucuaaga*(Invab)	426	AD00290-1-AS	u*C*uuAg(aUNA)c caaGgAgAaac*g*g	489
AD00291-1	AD00291-1-SS	(GLS-5)*(Invab)*cgaccagcUuGuUugugaaaa*(Invab)	427	AD00291-1-AS	u*U*uuCa(cUNA)a aacAaGcUggu*c*g	490

AD00292-1	AD00292-1-SS	(GLS-5)*(Invab)*caaaaagaAuUcCaaccgaca*(Invab)	428	AD00292-1-AS	u*G*ucGg(uUNA)uggaAuUcUuuu*u*g	491
AD00293-1	AD00293-1-SS	(GLS-5)*(Invab)*ucgucaucCaCaAugagagua*(Invab)	429	AD00293-1-AS	u*A*cuCu(cUNA)auugUgGaUgac*g*a	492
AD00294-1	AD00294-1-SS	(GLS-5)*(Invab)*guccacaaUgAgAguaccuga*(Invab)	430	AD00294-1-AS	u*C*agGu(aUNA)ucucuCaUuGugg*a*c	493
AD00295-1	AD00295-1-SS	(GLS-5)*(Invab)*agggucucAcUuUccagcaaa*(Invab)	431	AD00295-1-AS	u*U*ugCu(gUNA)gaaaGuGaGacc*c*u	494
AD00296-1	AD00296-1-SS	(GLS-5)*(Invab)*cuguuugcUgUgUaugaucaa*(Invab)	432	AD00296-1-AS	u*U*gaUc(aUNA)uacaCaGcAaac*a*g	495
AD00297-1	AD00297-1-SS	(GLS-5)*(Invab)*uuugcuguGuAuGaucaaaga*(Invab)	433	AD00297-1-AS	u*C*uuUg(aUNA)ucauAcAcAgca*a*a	496
AD00298-1	AD00298-1-SS	(GLS-5)*(Invab)*guuucuccUuGgUcuaaguga*(Invab)	434	AD00298-1-AS	u*C*acUu(aUNA)gaccAaGgAgaa*a*c	497
AD00299-1	AD00299-1-SS	(GLS-5)*(Invab)*gcaagaacCaGuGuuuagcga*(Invab)	435	AD00299-1-AS	u*C*gcUa(aUNA)acacUgGuUcuu*g*c	498
AD00301-	AD00301-1-SS	(GLS-5)*(Invab)*caaccgacCaGcUuguuugua*(Invab)	436	AD00301-1-AS	u*A*caAa(cUNA)a	499

1					agcUgGuCggu*u* g	
AD00302-1	AD00302-1-SS	(GLS-5)*(Invab)*ccaaccgaCcAgCuuguuuga*(Invab)	437	AD00302-1-AS	u*C*aaAc(aUNA)a gcuggUcGguu*g*g	500
AD00158-1	AD00158-1-SS	(GLS-5)*(Invab)*gaccuuuuCuUcUaaugagua*(Invab)	438	AD00158-1-AS	u*A*cucaUuagaAg AaAagg*u*c	501
AD00158-2	AD00158-2-SS	(GLS-5)*(Invab)*gaccuuucUuUcUagcgagua*(Invab)	439	AD00158-2-AS	u*A*cucaUuagaAg AaAagg*u*c	502
AD00158-3	AD00158-3-SS	g*a*ccuuuuCuUcUaaugagu*a(GLO-0)	440	AD00158-3-AS	u*A*cucaUuagaAg AaAagg*u*c	503
AD00163-1	AD00163-1-SS	(GLS-5)*(Invab)*caccagcuUgUuUgugaaaca*(Invab)	441	AD00163-1-AS	u*G*uuucAcaaaC aAgCugg*u*g	504
AD00163-2	AD00163-2-SS	c*a*ccagcuUgUuUgugaaac*a(GLO-0)	442	AD00163-2-AS	u*G*uuucAcaaaC aAgCugg*u*g	505
AD00159-1	AD00159-1-SS	(GLS-5)*(Invab)*gcguuucuCcUuGgucuaaga*(Invab)	443	AD00159-1-AS	u*C*uuagAccaaG gAgAaac*g*c	506
AD00159-2	AD00159-2-SS	g*c*guuucuCcUuGgucuaag*a(GLO-0)	444	AD00159-2-AS	u*C*uuagAccaaG gAgAaac*g*c	507
AD00300-1	AD00300-1-SS	(GLS-5)*(Invab)*gcaaaaagAaUuCcaaccgaa*(Invab)	445	AD00300-1-AS	u*U*cgGu(uUNA)g gaaUuCuUuuu*g* c	508

AD00158-19-1	AD00158-19-1-SS	(GLS-5)*(Invab)* ccuuuCuUcUaaugagua*(Invab)	446	AD00158-19-1-AS	u*A*cucaUuagaAgAaAa*g*g	509
AD00163-19-1	AD00163-19-1-SS	(GLS-5)*(Invab)* ccagcuUgUuUgugaaaca*(Invab)	447	AD00163-19-1-AS	u*G*uuucAcaaaCaAgCu*g*g	510
AD00159-19-1	AD00159-19-1-SS	(GLS-5)*(Invab)* guuucuCcUuGgucuaaga*(Invab)	448	AD00159-19-1-AS	u*C*uuagAccaaGgAgAa*a*c	511
AD00300-19-1	AD00300-19-1-SS	(GLS-5)*(Invab)* aaaaagAaUuCcaaccgaa*(Invab)	449	AD00300-19-1-AS	u*U*cgGu(uUNA)ggaaUuCuUu*u*u	512
AD00122-19-1	AD00122-19-1-SS	(GLS-5)*(Invab)* cccaccUuUuCuucuaaua*(Invab)	450	AD00122-19-1-AS	u*A*uuagAagaaAaGgUg*g*g	513

AD00158-19-2	AD00158-19-2-SS	(GLS-5)*(Invab)* ccuuuCuUcUaaugaguu*(Invab)	451	AD00158-19-2-AS	a*A*cucaUuagaAgAaAa*g*g	514
AD00163-19-2	AD00163-19-2-SS	(GLS-5)*(Invab)* ccagcuUgUuUgugaaacu*(Invab)	452	AD00163-19-2-AS	a*G*uuucAcaaaCaAgCu*g*g	515
AD00159	AD00159-19-2-	(GLS-5)*(Invab)* guuucuCcUuGgucuaagu*(Invab)	453	AD00159-19-2-	a*C*uuagAccaaG	516

- 19-2	SS			AS	gAgAa*a*c	
AD00300-19-2	AD00300-19-2-SS	(GLS-5)*(Invab)* aaaaagAaUuCcaaccgau*(Invab)	454	AD00300-19-2-AS	a*U*cgGu(uUNA)g gaaUuCuUu*u*u	517
AD00122-19-2	AD00122-19-2-SS	(GLS-5)*(Invab)* cccaccUuUuCuucuaauu*(Invab)	455	AD00122-19-2-AS	a*A*uuagAagaaAa GgUg*g*g	518
AD00163-3	AD00163-3-SS	(GLS-15)*(Invab)*caccagcuUgUuUgugaaaca*(Invab)	526	AD00163-3-AS	u*G*uuucAcaaaC aAgCugg*u*g	527
AD00159-3	AD00159-3-SS	(GLS-15)*(Invab)*gcguuucuCcUuGgucuaaga*(Invab)	654	AD00159-3-AS	u*C*uuagAccaaG gAgAaac*g*c	655

DISCORDANCIAS

Los expertos en la técnica saben que los errores de coincidencia se toleran en cuanto a eficacia en el dsRNA, especialmente si las discordancias están dentro de la región terminal del dsRNA. Ciertas discordancias se toleran mejor en el dsRNA, por ejemplo, las discordancias con pares de bases de bamboleo G:U y A:C se toleran mejor respecto de su eficacia (Du et al., A systematic analysis of the silencing effects of an active siRNA at all single-nucleotide mismatched target sites. *Nucleic Acids Res.* 2005 Mar 21;33(5):1671-7. Doi: 10.1093/nar/gki312. *Nucleic Acids Res.* 2005;33(11):3698). En algunas modalidades de métodos y compuestos de la invención, un agente AGT dsRNA puede contener una o más discordancias con la secuencia diana AGT. En algunas modalidades, el agente AGT dsRNA de la invención no incluye discordancias con la secuencia diana AGT. En ciertas modalidades, el agente AGT dsRNA de la invención incluye no más de 1 discordancia con la secuencia diana AGT. En ciertas modalidades, el agente AGT dsRNA de la invención incluye no más de 2 discordancias con la secuencia diana AGT. En ciertas modalidades, el agente AGT dsRNA de la invención incluye no más de 3 discordancias con la secuencia diana AGT. En algunas modalidades de la invención, una hebra antisentido de un agente AGT dsRNA contiene discordancias con una secuencia diana AGT que no están situadas en el centro de la región de complementariedad. En algunas modalidades, la hebra antisentido del agente AGT dsRNA incluye 1, 2, 3, 4 o más discordancias que se encuentran dentro de los últimos 5, 4, 3, 2 o 1 nucleótidos de uno o ambos del extremo 5' y el extremo 3' de la región de complementariedad. Los métodos descritos en el presente documento y/o los métodos conocidos en la técnica pueden utilizarse para determinar si un agente AGT dsRNA que contiene una discordancia con una secuencia diana AGT es eficaz para inhibir la expresión del gen AGT.

COMPLEMENTARIEDAD

Tal como se utiliza en el presente documento, a menos que se indique lo contrario, el término "complementario", cuando se utiliza para describir una primera secuencia de nucleótidos (por ejemplo, hebra de detección del agente AGT dsRNA o AGT mRNA dirigido) en relación con una

segunda secuencia de nucleótidos (por ejemplo, hebra antisentido del agente AGT dsRNA o un polinucleótido antisentido monocatenario), significa la capacidad de un oligonucleótido o polinucleótido, incluida la primera secuencia de nucleótidos, en hibridarse [formar enlaces de hidrógeno de pares de bases en condiciones fisiológicas de mamíferos (o condiciones similares *in vitro*)] y formar una estructura dúplex o doble helicoidal en determinadas condiciones con un oligonucleótido o polinucleótido, incluida la segunda secuencia de nucleótidos. Pueden aplicarse otras condiciones, como las condiciones fisiológicamente relevantes que se pueden encontrar dentro de un organismo. Un técnico será capaz de determinar el conjunto de condiciones más apropiadas para una prueba de complementariedad de dos secuencias de acuerdo con la aplicación final de los nucleótidos hibridados. Las secuencias complementarias incluyen pares de bases de Watson-Crick o pares de bases que no son de Watson-Crick e incluyen nucleótidos naturales o modificados o imitadores de nucleótidos, al menos en la medida en que se cumplan los requisitos de hibridación anteriores. La identidad o complementariedad de la secuencia es independiente de la modificación.

Las secuencias complementarias, por ejemplo, dentro de un AGT dsRNA como se describe en este documento, incluyen el emparejamiento de bases del oligonucleótido o polinucleótido que comprende una primera secuencia de nucleótidos con un oligonucleótido o polinucleótido que comprende una segunda secuencia de nucleótidos en toda la longitud de una o ambas secuencias de nucleótidos. Dichas secuencias pueden denominarse "totalmente complementarias" entre sí en el presente documento. Se entenderá que en modalidades en las que dos oligonucleótidos están diseñados para formar, en el momento de la hibridación, uno o más salientes monocatenarios, tales salientes no se consideran en el presente documento como discordancias con respecto a la determinación de la complementariedad. Por ejemplo, un agente AGT dsRNA que comprende un oligonucleótido de 19 nucleótidos de longitud y otro oligonucleótido de 20 nucleótidos de longitud, en el que el oligonucleótido más largo comprende una secuencia de 19 nucleótidos que es totalmente complementaria al oligonucleótido más corto, puede denominarse "totalmente complementario" para los fines descritos en el presente documento. Por lo tanto, tal como se utiliza en el presente documento,

"plenamente complementario" significa que todas (100%) las bases en una secuencia contigua de un primer polinucleótido se hibridarán con el mismo número de bases en una secuencia contigua de un segundo polinucleótido. La secuencia contigua puede comprender toda o una parte de una primera o segunda secuencia de nucleótidos.

El término "sustancialmente complementario" como se usa en el presente documento significa que en un par hibridado de secuencias de nucleobases, al menos aproximadamente el 85 % (pero no todas) de las bases en una secuencia contigua de un primer polinucleótido se hibridarán con el mismo número de bases en una secuencia contigua de un segundo polinucleótido. El término "sustancialmente complementario" puede usarse en referencia a una primera secuencia con respecto a una segunda secuencia si las dos secuencias incluyen uno o más pares de bases no coincidentes, por ejemplo, al menos 1, 2, 3, 4 o 5 pares de bases no coincidentes tras la hibridación para un dúplex de hasta 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 pares de bases (bp), conservando al mismo tiempo la capacidad de hibridarse en las condiciones más relevantes para su aplicación final, por ejemplo, la inhibición de la expresión del gen AGT a través de una vía RISC. El término "parcialmente complementario" puede usarse en el presente documento en referencia a un par hibridado de secuencias de nucleobases, en el que al menos el 75% (pero no todas) las bases en una secuencia contigua de un primer polinucleótido se hibridarán con el mismo número de bases en una secuencia contigua de un segundo polinucleótido. En algunas modalidades, "parcialmente complementario" significa al menos el 76 %, 77 %, 78 %, 79 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o el 99% de las bases en una secuencia contigua de un primer polinucleótido se hibridarán con el mismo número de bases en una secuencia contigua de un segundo polinucleótido.

Los términos "complementario", "completamente complementario", "sustancialmente complementario" y "parcialmente complementario" se utilizan en el presente documento en referencia a la coincidencia de bases entre la hebra sentido y la hebra antisentido de un agente de AGT dsRNA, entre la hebra antisentido de un agente de AGT dsRNA y una secuencia de un AGT mRNA diana, o entre un oligonucleótido antisentido monocatenario y una

secuencia de un AGT mRNA diana. Se entenderá que el término "hebra antisentido de un agente de AGT dsRNA" puede referirse a la misma secuencia de un "agente polinucleotídico antisentido AGT".

Como se usa en el presente documento, el término "sustancialmente idéntico" o "identidad sustancial" utilizado en referencia a una secuencia de ácido nucleico significa una secuencia de ácido nucleico que comprende una secuencia con al menos aproximadamente 85% de identidad de secuencia o más, preferiblemente al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos el 98%, o al menos el 99%, en comparación con una secuencia de referencia. El porcentaje de identidad de secuencia se determina comparando dos secuencias óptimamente alineadas en una ventana de comparación. El porcentaje se calcula determinando el número de posiciones en las que aparece la base de ácido nucleico idéntica en ambas secuencias para obtener el número de posiciones coincidentes, dividiendo el número de posiciones coincidentes por el número total de posiciones en la ventana de comparación y multiplicando el resultado por 100 para obtener el porcentaje de identidad de secuencia. Las invenciones descritas en el presente documento abarcan secuencias de nucleótidos sustancialmente idénticas a las descritas en el presente documento. por ejemplo, en las Tablas 1-5. En algunas modalidades, la secuencia de nucleótidos en cuestión es idéntica a la divulgada en este documento (por ejemplo, en las Tablas 1-4) o tiene al menos aproximadamente 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "hebra que comprende una secuencia" significa un oligonucleótido que comprende una hebra de nucleótidos que se describe mediante la secuencia a la que se hace referencia utilizando la nomenclatura estándar de nucleótidos. El término "RNA bicatenario" o "dsRNA", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a un RNAi que incluye una molécula de RNA o un complejo de moléculas que tiene una región dúplex hibridada que comprende dos hebras de ácido nucleico antiparalelas y sustancial o totalmente complementarias, que se denominan orientaciones "sentido" y "antisentido" con respecto a un RNA AGT diana. La región dúplex puede ser de cualquier longitud que permita la degradación

específica de un AGT RNA diana deseado a través de una vía RISC, pero normalmente oscilará entre 9 y 30 pares de bases de longitud, por ejemplo, 15-30 pares de bases de longitud. Considerando un dúplex entre 9 y 30 pares de bases, el dúplex puede tener cualquier longitud en este rango, por ejemplo, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30, y cualquier subrango en el mismo, incluidos, entre otros, 15-30 pares de bases, 15-26 pares de bases, 15-23 pares de bases, 15-22 pares de bases, 15-21 pares de bases, 15-20 pares de bases, 15-19 pares de bases, 15-18 pares de bases, 15-17 pares de bases, 18-30 pares de bases, 18-26 pares de bases, 18-23 pares de bases, 18-22 pares de bases, 18-21 pares de bases, 18-20 pares de bases, 19-30 pares de bases, 19-26 pares de bases, 19-23 pares de bases, 19-22 pares de bases, 19-21 pares de bases, 19-20 pares de bases, 20-30 pares de bases, 20-26 pares de bases, 20-25 pares de bases, 20-24 pares de bases, 20-23 pares de bases, 20-22 pares de bases, 20-21 pares de bases, 21-30 pares de bases, 21-26 pares de bases, 21-25 pares de bases, 21-24 pares de bases, 21-23 pares de bases o 21-22 pares de bases. Los agentes AGT dsRNA generados en la célula mediante el procesamiento con Dicer y enzimas similares generalmente se encuentran en el rango de 19-22 pares de bases de longitud. Una hebra de la región dúplex de un agente AGT dsDNA comprende una secuencia que es sustancialmente complementaria a una región de un RNA AGT diana. Las dos hebras que forman la estructura dúplex pueden ser de una sola molécula de RNA que tenga al menos una región autocomplementaria, o pueden formarse a partir de dos o más moléculas de RNA separadas. Cuando la región dúplex se forma a partir de dos hebras de una sola molécula, la molécula puede tener una región dúplex separada por una hebra de nucleótidos de una sola hebra (en lo sucesivo denominada "bucle de horquilla") entre el extremo 3' de una hebra y el extremo 5' de la otra hebra respectiva que forma la estructura dúplex. En algunas modalidades de la invención, un aspecto de horquilla comprende al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más nucleótidos desapareados. Cuando las dos hebras sustancialmente complementarias de un agente AGT dsRNA están compuestas por moléculas de RNA separadas, esas moléculas no necesitan estar conectadas covalentemente, pero pueden estar conectadas covalentemente. Cuando las dos hebras están conectadas

covalentemente por medios distintos de un bucle de horquilla, la estructura de conexión se denomina "enlazador". El término "siRNA" también se utiliza aquí para referirse a un agente dsRNA como se describe en este documento.

En algunas modalidades de la invención, un agente AGT dsRNA puede incluir una secuencia sentido y antisentido que tienen nucleótidos no apareados o análogos de nucleótidos en uno o ambos extremos terminales del agente dsRNA. Un extremo sin nucleótidos desapareados se denomina "extremo romo" y no tiene saliente de nucleótidos. Si ambos extremos de un agente de dsRNA son romos, el dsRNA se conoce como "extremo romo". En algunas modalidades de la invención, un primer extremo de un agente de dsRNA es romo, en algunas modalidades un segundo extremo de un agente de dsRNA es romo, y en ciertas modalidades de la invención, ambos extremos de un agente de AGT dsRNA son romos.

En algunas modalidades de agentes dsRNA de la invención, el dsRNA no tiene uno o dos extremos romos. En tales casos, hay al menos un nucleótido desapareado al final de una hebra de un agente dsRNA. Por ejemplo, cuando un extremo 3' de una hebra de un dsRNA se extiende más allá del extremo 5' de la otra hebra, o viceversa, hay un saliente de nucleótidos. Un dsRNA puede comprender un saliente de al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más nucleótidos. Un saliente de nucleótido puede comprender o consistir en un análogo de nucleótido/nucleósido, incluido un desoxinucleótido/nucleósido. Se entenderá que en algunas modalidades un saliente de nucleótido está en una hebra sentido de un agente dsRNA, en una hebra antisentido de un agente dsRNA, o en ambos extremos de un agente dsRNA y los nucleótidos de un saliente pueden estar presentes en el extremo 5', en el extremo 3' o en ambos extremos de una hebra antisentido o sentido de un dsRNA. En ciertas modalidades de la invención, uno o más de los nucleótidos en un saliente se reemplazan con un nucleósido tiofosfato.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "hebra antisentido" o "hebra guía" se refiere a la hebra de un agente AGT dsRNA que incluye una región que es sustancialmente complementaria a una secuencia diana AGT. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "hebra sentido" o "hebra pasajera" se refiere a la hebra de un agente AGT dsRNA que incluye una región que es sustancialmente complementaria a una región de la

hebra antisentido del agente AGT dsRNA.

MODIFICACIONES

En algunas modalidades de la invención, el RNA de un agente de AGT RNAi se modifica químicamente para mejorar la estabilidad y/o una o más características beneficiosas. Los ácidos nucleicos en ciertas modalidades de la invención pueden sintetizarse y/o modificarse mediante métodos bien establecidos en la técnica, por ejemplo, véase "Current protocols in Nucleic Acid Chemistry", Beaucage, S. L. et al. (Eds.), John Wiley & Sons, Inc., New York, N.Y. USA, que se incorpora aquí como referencia. Las modificaciones que pueden estar presentes en ciertas modalidades de agentes AGT dsRNA de la invención incluyen, por ejemplo, (a) modificaciones de los extremos, por ejemplo, modificaciones del extremo 5' (fosforilación, conjugación, enlaces invertidos, etc.) modificaciones del extremo 3' (conjugación, nucleótidos de ADN, enlaces invertidos, etc.), (b) modificaciones de las bases, por ejemplo, reemplazo con bases estabilizadoras, bases desestabilizadoras o bases que se emparejan con un repertorio ampliado de parejas, eliminación de bases (nucleótidos básicos) o bases conjugadas, (c) modificaciones de azúcar (por ejemplo, en la posición 2' o 4') o reemplazo del azúcar, así como (d) modificaciones del esqueleto, incluida la modificación o sustitución de los enlaces fosfodiéster. Ejemplos específicos de compuestos RNA útiles en determinadas modalidades de agentes AGT dsRNA, polinucleótidos antisentido AGT y polinucleótidos sentido AGT de la invención incluyen, entre otros, RNA que comprende esqueletos modificados o que no tienen enlaces internucleosídicos naturales. Como ejemplo no limitante, un RNA que tiene un esqueleto modificado puede no tener un átomo de fósforo en el esqueleto. RNA que no tienen un átomo de fósforo en su estructura internucleosídica pueden denominarse oligonucleósidos. En determinadas modalidades de la invención, un RNA modificado tiene un átomo de fósforo en su esqueleto internucleósido.

Se entenderá que el término "molécula de RNA" o "RNA" o "molécula de ácido ribonucleico" abarca no solo las moléculas de RNA expresadas o encontradas en la naturaleza, sino también los análogos y derivados del RNA que comprenden uno o más análogos o derivados de ribonucleótidos/ribonucleósidos como se describe en este documento o como se conoce en la técnica. Los términos "ribonucleósido" y "Ribonucleótido" se

pueden utilizar indistintamente en este documento. Una molécula de RNA puede modificarse en la estructura de la nucleobase o en la estructura del esqueleto de ribosa-fosfato, por ejemplo, como se describe a continuación, y las moléculas que comprenden análogos o derivados de ribonucleósidos deben conservar la capacidad de formar un dúplex. Como ejemplos no limitativos, una molécula de RNA también puede incluir al menos un ribonucleósido modificado, incluido, entre otros, un nucleósido modificado con 2'-O-metilo, un nucleósido que comprende un grupo fosforotioato 5', un nucleósido terminal unido a un derivado de colesterol o a un grupo bisdecilamida del ácido dodecanoico, un nucleósido bloqueado, un nucleósido abásico, un nucleósido 2'-desoxi-2'-fluoromodificado, un nucleósido 2'-amino-modificado, un nucleósido 2'-alquil modificado, un nucleósido morfolino, un fosforamidato o una base no natural que comprende nucleósido, o cualquier combinación de los mismos. En algunas modalidades de la invención, una molécula de RNA comprende al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, o hasta la longitud total de los ribonucleósidos de la molécula del agente AGT dsRNA que son ribonucleósidos modificados. No es necesario que las modificaciones sean las mismas para cada uno de dicha pluralidad de ribonucleósidos modificados en una molécula de RNA.

Los agentes de DsRNA, polinucleótidos antisentido AGT y/o polinucleótidos con sentido AGT de la invención pueden comprender, en algunas modalidades, uno o más nucleótidos modificados seleccionados independientemente y/o uno o más enlaces no fosfodiéster seleccionados independientemente. Como se utiliza en el presente documento, el término "seleccionado independientemente" usado en referencia a un elemento seleccionado, tal como un nucleótido modificado, un enlace no fosfodiéster, etc., significa que dos o más elementos seleccionados pueden, pero no necesariamente, ser iguales entre sí.

Como se utiliza en el presente documento, una "base nucleotídica", "nucleótido" o "nucleobase" es un compuesto heterocíclico de pirimidina o purina, que es un constituyente estándar de todos los ácidos nucleicos e incluye las bases que forman los nucleótidos adenina (a), guanina. (g), citosina (c), timina (t) y uracilo (u). Una nucleobase puede modificarse además para incluir (aunque no pretende ser limitante): bases universales, bases hidrófobas,

bases promiscuas, bases de tamaño expandido y bases fluoradas. El término "ribonucleótido" o "nucleótido" puede usarse en el presente documento para referirse a un nucleótido no modificado, un nucleótido modificado o un resto de reemplazo sustituto. Los expertos en la técnica reconocerán que la guanina, la citosina, la adenina y el uracilo pueden usarse en el presente documento. ser reemplazado por otras fracciones sin alterar sustancialmente las propiedades de emparejamiento de bases de un oligonucleótido que comprende un nucleótido que porta dicho resto de reemplazo.

En una modalidad, los RNA modificados contemplados para su uso en los métodos y composiciones descritos en el presente documento son ácidos peptídicos nucleicos (PNA) que tienen la capacidad de formar la estructura dúplex requerida y que permiten o median la degradación específica de un RNA diana a través de una vía RISC. En determinadas modalidades de la invención, un agente de interferencia de AGT RNA incluye un RNA monocatenario que interactúa con una secuencia de AGT RNA diana para dirigir la escisión del AGT RNA diana.

Los esqueletos de RNA modificados pueden incluir, por ejemplo, fosforotioatos, quirales, fosforotioatos, fosforoditioatos, fosfotriésteres, aminoalquilfosfotriésteres, metilo y otros fosfonatos de alquilo (incluidos los fosfonatos de 3'-alquileo) y los fosfonatos quirales, fosfinatos, fosforamidatos, (incluidos los fosforamidatos de 3'-amino) y los aminoalquilfosforamidatos, los tionoforofosforamidatos, los tionoalquilfosfonatos, los tionoalquilfosfotriésteres y los boranofosfatos (con enlaces normales de 3'-5', enlazados con 2'-5' análogos de estos, y aquellos) que tienen polaridad invertida en la que los pares adyacentes de unidades de nucleósidos están unidos de 3'-5' a 5'-3' o de 2'-5' a 5'-2'). También se incluyen varias sales, sales mixtas y formas ácidas libres. Los medios para preparar enlaces que contienen fósforo se practican rutinariamente en la técnica y dichos métodos se pueden usar para preparar ciertos agentes de AGT dsRNA modificados, ciertos polinucleótidos antisentido AGT modificados y/o ciertos polinucleótidos sentido AGT modificados de la invención.

Los esqueletos de RNA modificados que no incluyen un átomo de fósforo tienen esqueletos formados por enlaces internucleósidos alquilo o cicloalquilo de hebra corta, heteroátomos mixtos y enlaces internucleósidos

alquilo o cicloalquilo, o uno o más enlaces internucleósidos heteroatómicos o heterocíclicos de hebra corta. Estos incluyen aquellos que tienen vínculos con morfolinos (formado en parte a partir de la porción de azúcar de un nucleósido); esqueletos de siloxano; esqueletos de sulfuro, esqueletos de sulfóxido y sulfona; esqueletos de formacetilo y tioformacetilo; esqueletos de metileno formacetil y tioformacetilo; alquenos que contienen esqueletos; esqueletos de sulfamato; esqueletos de metilenino y metilenohidrazino; esqueletos de sulfonato y sulfonamida; esqueletos de amida; y otros que tienen componentes mixtos de N, O, S y CH₂. Los medios de preparación de esqueletos de RNA modificado que no incluyen un átomo de fósforo se practican rutinariamente en la técnica y dichos métodos se pueden utilizar para preparar ciertos agentes AGT dsRNA modificados, ciertos polinucleótidos antisentido AGT modificados y/o ciertos polinucleótidos sentido AGT modificados de la invención.

En ciertas modalidades de la invención, los miméticos de RNA se incluyen en los AGT dsRNA, los polinucleótidos antisentido AGT y/o los polinucleótidos sentido AGT, tales como, pero no limitados a: sustitución del azúcar y el enlace internucleósido, es decir, el esqueleto de las unidades de nucleótidos con nuevos grupos. En tales modalidades, las unidades de base se mantienen para la hibridación con un compuesto diana de ácido nucleico AGT apropiado. Uno de estos compuestos oligoméricos, un RNA mimético que ha demostrado tener excelentes propiedades de hibridación, se conoce como ácido nucleico peptídico (PNA). En los compuestos de PNA, el esqueleto de azúcar de un RNA se reemplaza con un esqueleto que contiene amida, en particular un esqueleto de aminoetilglicina. Las nucleobases se retienen y se unen directa o indirectamente a los átomos de nitrógeno aza de la porción amida del esqueleto. Los medios de preparación de miméticos de RNA se practican rutinariamente en la técnica y dichos métodos se pueden utilizar para preparar ciertos agentes AGT dsRNA modificados de la invención.

Algunas modalidades de la invención incluyen RNA con esqueleto de fosforotioato y oligonucleósidos con esqueleto de heteroátomos, y en particular -CH₂--NH--CH₂--, --CH₂-- N(CH₃)--O--CH₂--[conocido como esqueleto de metileno (metilimino) o MMI], --CH₂--O-- N(CH₃)--CH₂--, --CH₂--N(CH₃)--N(CH₃)--CH₂-- y --N(CH₃)--CH₂---- [en el que el esqueleto de fosfodiéster nativo se representa como --O--P--O--CH₂--]. Los medios para

preparar RNA con esqueletos de fosforodios y oligonucleósidos con esqueletos de heteroátomos se practican rutinariamente en la técnica y dichos métodos se pueden utilizar para preparar ciertos agentes de AGT dsRNA modificados, ciertos polinucleótidos antisentido AGT y/o ciertos polinucleótidos sentido AGT de la invención.

RNA modificados también pueden contener uno o más restos de azúcar sustituidos. AGT dsRNA, los polinucleótidos antisentido AGT y/o los polinucleótidos sentido AGT la invención pueden comprender uno de los siguientes en la posición 2': OH; F; O--, S--, o N-alquilo; O--, S--, o N-alquénil; O--, S- o N-alquínil; o O-alquilo-O-alquilo, en el que el alquilo, el alquénil y el alquínil pueden ser sustituidos o no por alquilo C₁ a C₁₀ o C₂ por alquénil y alquilo C₁₀. Entre los ejemplos de modificaciones adecuadas se encuentran O[(CH₂)_nO]_mCH₃, O(CH₂)_nOCH₃, O(CH₂)_nNH₂, O(CH₂)_nCH₃, O(CH₂)_nONH₂ y O(CH₂)_nON[(CH₂)_nCH₃]₂, donde n y m son de 1 a aproximadamente 10. En otras modalidades, dsRNA incluye uno de los siguientes en la posición 2': alquilo inferior C₁ a C₁₀, alquilo inferior sustituido, 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 RNA, un grupo reportero, un intercalador, un grupo para mejorar las propiedades farmacocinéticas de un agente AGT dsRNA, o un grupo para mejorar las propiedades farmacodinámicas de un agente AGT dsRNA, un polinucleótido antisentido AGT y/o un polinucleótido sentido AGT, y otros sustituyentes que tengan propiedades similares. En algunas modalidades, la modificación incluye un 2'-metoxi-metoxi (2'-O--CH₂CH₂OCH₃, también conocido como 2'-O-(2-metoxietil) o 2'-MOE) (Martin et al., *Helv. Chim. Acta*, 1995, 78:486-504) es decir, un grupo alcoxi-alcoxi. Otra modificación ejemplar es la 2'-dimetilaminooxietoxi, es decir, un grupo O(CH₂)₂ON(CH₃)₂, también conocido como 2'-DMAOE, tal como se muestra en los ejemplos que se describen a continuación, y 2'-dimetilaminoetoxietoxi (también conocido en la técnica como 2'-O-dimetilaminoetoxietilo o 2'-DMAEOE), es decir, 2'-O--CH₂--O--CH₂--N(CH₂)₂. Los medios de preparación de RNA modificados, como los descritos, se practican habitualmente en la técnica y dichos métodos pueden utilizarse para preparar ciertos agentes de AGT dsRNA modificados de la invención.

Otras modificaciones incluyen 2'-metoxi (2'-OCH₃), 2'-aminopropoxi (2'-OCH₂CH₂CH₂NH₂) y 2'-fluoro (2'-F). También se pueden realizar modificaciones similares en otras posiciones en RNA de un agente AGT dsRNA, polinucleótido antisentido AGT y/o polinucleótido sentido AGT de la invención, particularmente la posición 3' del azúcar en el nucleótido terminal 3' o en AGT dsRNA unidos en 2'-5', polinucleótidos antisentido AGT o polinucleótidos sentido AGT, y la posición 5' del nucleótido terminal 5'. Los agentes AGT dsRNA, polinucleótidos antisentido AGT y/o polinucleótidos sentido AGT también pueden tener miméticos de azúcar tales como restos de ciclobutilo en lugar del azúcar pentofuranosilo. Los medios para preparar RNA modificados tales como los descritos se practican habitualmente en la técnica y dichos métodos pueden usarse para preparar ciertos agentes AGT dsRNA modificados, polinucleótidos antisentido AGT y/o polinucleótidos con sentido AGT de la invención.

Un agente AGT dsRNA, un polinucleótido antisentido AGT y/o un polinucleótido sentido AGT pueden, en algunas modalidades, incluir modificaciones o sustituciones de nucleobases (a menudo denominadas en la técnica simplemente como "base"). Como se usa en el presente documento, las nucleobases "no modificadas" o "naturales" incluyen las bases purínicas adenina (A) y guanina (G), y las bases pirimidínicas timina (T), citosina (C) y uracilo (U). Las nucleobases modificadas incluyen otras nucleobases sintéticas y naturales tales como 5-metilcitosina (5-me-C), 5-hidroximetilcitosina, xantina, hipoxantina, 2-aminoadenina, 6-metilo y otros derivados alquílicos de adenina y guanina, 2-propilo y otros derivados alquílicos de adenina y guanina, 2-tiouracilo, 2-tiotimina y 2-tiocitosina, 5-halouracilo y citosina, 5-propinil uracilo y citosina, 6-azouracilo, citosina y timina, 5-uracilo (pseudouracilo), 4-tiouracilo, 8-halo, 8-amino, 8-tiol, 8-tioalquilo, 8-hidroxil anal otras adeninas y guaninas 8-sustituidas, 5-halo, particularmente 5-bromo, 5-trifluorometilo y otros uracilos 5-sustituidos y citosinas, 7-metilguanina y 7-metiladenina, 8-azaguanina y 8-azaadenina, 7-desazaguanina y 7-daazaadenina y 3-desazaguanina y 3-desazaadenina. En la técnica se conocen nucleobases adicionales que pueden incluirse en determinadas modalidades de agentes AGT dsRNA de la invención, véase, por ejemplo: *Modified Nucleosides in Biochemistry, Biotechnology and Medicine*, Herdewijn, P. Ed. Wiley-VCH,

2008; The Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering, pages 858-859, Kroschwitz, J. L, Ed. John Wiley & Sons, 1990, English et al., Angewandte Chemie, International Edition, 1991, 30, 613, Sanghvi, Y S., Capítulo 15, dsRNA Research and Applications, páginas 289-302, Crooke, S. T. y Lebleu, B ., Ed., CRC Press, 1993. Los medios para preparar dsRNA, polinucleótidos de hebra antisentido AGT y/o polinucleótidos de hebra sentido AGT que comprenden modificaciones y/o sustituciones de nucleobases tales como las descritas en el presente documento se practican de forma rutinaria en la técnica y tales métodos pueden ser se usa para preparar ciertos agentes AGT dsRNA modificados, polinucleótidos sentido AGT y/o polinucleótidos antisentido AGT de la invención.

Ciertas modalidades de agentes AGT dsRNA, polinucleótidos antisentido AGT y/o polinucleótidos sentido AGT de la invención incluyen RNA modificado para incluir uno o más ácidos nucleicos bloqueados (LNA). Un ácido nucleico bloqueado es un nucleótido con un resto ribosa modificado que comprende un puente adicional que conecta los carbonos 2' y 4'. Esta estructura "bloquea" efectivamente la ribosa en la conformación estructural endo 3'. La adición de ácidos nucleicos bloqueados en un agente AGT dsRNA, polinucleótidos antisentido AGT y/o polinucleótidos sentido AGT de la invención puede aumentar la estabilidad en el suero y reducir los efectos no deseados (Elmen, J. et al., (2005) Nucleic Acids Research 33(1):439-447; Mook, O R. et al., (2007) Mol Canc Ther 6(3):833-843; Grunweller, A. et al., (2003) Nucleic Acids Research; 31(12):3185-3193). En la técnica se practican de forma rutinaria medios para preparar agentes de DsRNA, polinucleótidos antisentido AGT y/o polinucleótidos sentido AGT que comprenden ácido nucleico bloqueado y tales métodos pueden usarse para preparar ciertos agentes AGT dsRNA modificados de la invención. Ciertas modalidades de compuestos AGT dsRNA, polinucleótidos sentido y/o polinucleótidos antisentido de la invención incluyen al menos un nucleótido modificado, en donde el al menos un nucleótido modificado comprende: un 2'-O-metil nucleótido, 2'-fluoronucleótido, 2'-desoxinucleótido, 2'3'-seco imitador de nucleótido, nucleótido bloqueado, 2'-F-Arabino nucleótido, 2'-metoixietil nucleótido, 2'-amino-modificado nucleótido, 2'-alquil-modificado nucleótido, mofolino nucleótido , y nucleótido 3'-Ome, un nucleótido que comprende un

grupo 5'-fosforotioato, o un nucleótido terminal unido a un derivado de colesterilo o un grupo bisdecilamida del ácido dodecanoico, un nucleótido modificado con 2'-amino, un fosforamidato o un nucleótido no-base natural que comprende nucleótidos. En algunas modalidades, un compuesto AGT dsRNA incluye un nucleótido de E-vinilfosfonato en el extremo 5' de la hebra antisentido, también denominada en el presente documento hebra guía.

Ciertas modalidades de compuestos AGT dsRNA, polinucleótidos de extremo 3' y 5' sentido, y/o polinucleótidos de extremo 3' de antisentido de la invención, incluyen al menos un nucleótido modificado, en donde el al menos un nucleótido modificado comprende: nucleótido abásico, ribitol, nucleótido invertido, nucleótido abásico invertido, nucleótido 2'-OMe invertido, 2'-desoxi nucleótido invertido. Los expertos en la técnica saben que incluir un nucleótido abásico o abásico invertido en el extremo del oligonucleótido mejora la estabilidad (Czauderna et al. *Structural variations and stabilizing modifications of Synthetic siRNAs in mamífero cell*. *Nucleic Acids Res.* 2003;31(11): 2705-2716.doi:10.1093/nar/gkg393).

Ciertas modalidades de compuestos AGT dsRNA, polinucleótidos antisentido de la invención, incluyen al menos un nucleótido modificado, en donde al menos un nucleótido modificado comprende un nucleótido de ácido nucleico desbloqueado (UNA) o/y un nucleótido de ácido nucleico de glicol (GNA). Los expertos en la técnica saben que UNA y GNA son modificaciones químicas térmicamente desestabilizadoras y pueden mejorar significativamente el perfil fuera del objetivo de un compuesto de siRNA (Janas, et al., *Selection of GalNAc-conjugated siRNAs with limited off-target-driven rat hepatotoxicity* *Nat Commun* 2018;9(1):723 doi:10.1038/s41467-018-02989-4; Laursen et al., *Utilization of unlocked nucleic acid (UNA) to enhance siRNA performance in vitro and in vivo*. *Mol BioSyst.* 2010;6:862–70).

Otra modificación que puede incluirse en el RNA de ciertas modalidades de agentes AGT dsRNA, polinucleótidos antisentido AGT y/o polinucleótidos sentido AGT de la invención, comprende unir químicamente al RNA uno o más ligandos, restos o conjugados que mejoran uno o más características del agente AGT dsRNA, polinucleótido antisentido AGT y/o polinucleótido sentido AGT, respectivamente. Ejemplos no limitantes de características que pueden mejorarse son: agente AGT dsRNA, polinucleótido

antisentido AGT y/o actividad de polinucleótido sentido AGT, distribución celular, administración de un agente AGT dsRNA, propiedades farmacocinéticas de un agente AGT dsRNA y absorción celular del agente AGT dsRNA. En algunas modalidades de la invención, un agente AGT dsRNA comprende uno o más grupos diana o grupos de enlace, que en ciertas modalidades de agentes AGT dsRNA de la invención están conjugados con la hebra sentido. Un ejemplo no limitante de un grupo diana es un compuesto que comprende N-acetil-galactosamina (GalNAc). Los términos "grupo diana", "agente diana", "agente de enlace", "compuesto diana" y "ligando diana" pueden usarse indistintamente en el presente documento. En determinadas modalidades de la invención, un agente AGT dsRNA comprende un compuesto de direccionamiento que está conjugado con el extremo 5'-terminal de la hebra sentido. En determinadas modalidades de la invención, un agente AGT dsRNA comprende un compuesto de direccionamiento que está conjugado con el extremo 3'-terminal de la hebra sentido. En algunas modalidades de la invención, un agente AGT dsRNA comprende un grupo diana que comprende GalNAc. En ciertas modalidades de la invención, un agente AGT dsRNA no incluye un compuesto de direccionamiento conjugado con uno o ambos del extremo 3'-terminal y el extremo 5'-terminal de la hebra sentido. En ciertas modalidades de la invención, un agente AGT dsRNA no incluye un compuesto diana que contiene GalNAc conjugado con uno o ambos del extremo 5'-terminal y el extremo 3'-terminal de la hebra sentido.

Los agentes de enlace y dirección adicionales son bien conocidos en la técnica, por ejemplo, los agentes de enlace y dirección que se pueden usar en ciertas modalidades de la invención incluyen, entre otros, restos lipídicos tales como un resto de colesterol (Letsinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, 86: 6553-6556), ácido cólico (Manoharan et al., *Biorg. Med. Chem. Lett.*, 1994, 4:1053-1060), un tioéter, por ejemplo, berilo. 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 hebra alifática, por ejemplo, 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, por ejemplo, di-hexadecil-rac-glicerol o trietil-amonio 1 ,2-

di-O-hexadecil-rac-glicerol-3-fosfonato (Manoharan et al., *Tetrahedron Lett.*, 1995, 36:3651-3654; Shea y col., *Nucl. Acids Res.*, 1990, 18:3777-3783), una poliamina o una hebra de polietilenglicol (Manoharan et al., *Nucleosides & Nucleotides*, 1995, 14:969-973), o ácido adamantano acético (Manoharan et al., *Tetrahedron Lett.*, 1995, 36:3651-3654), un resto palmitilo (Mishra et al., *Biochim. Biophys. Acta*, 1995, 1264:229-237), o un resto octadecilamina o hexilaminocarboniloxicolesterol (Crooke et al., *J. Pharmacol Exp. Ther.*, 1996, 277:923-937).

Ciertas modalidades de una composición que comprende un agente AGT dsRNA, un polinucleótido antisentido AGT y/o un polinucleótido sentido AGT pueden comprender un ligando que altera la distribución, el direccionamiento, etc., del agente AGT dsRNA. En algunas modalidades de una composición que comprende un agente AGT dsRNA de la invención, el ligando aumenta la afinidad por una diana seleccionada, por ejemplo, molécula, célula o tipo de célula, compartimento, por ejemplo, un compartimento celular u orgánico, tejido, órgano o región del cuerpo, como, por ejemplo, en comparación con una especie que carece de dicho ligando. Un ligando útil en una composición y/o método de la invención puede ser una sustancia natural, tal como una proteína (por ejemplo, albúmina sérica humana (HSA), lipoproteína de baja densidad (LDL) o globulina); un carbohidrato (por ejemplo, dextrano, pululano, quitina, quitosano, inulina, ciclodextrina o ácido hialurónico); o un lípido. Un ligando también puede ser una molécula recombinante o sintética, tal como un polímero sintético, por ejemplo, un poliaminoácido o poliamina sintéticos. Ejemplos de poliaminoácidos son polilisina (PLL), poliácido L-aspartico, poliácido L-glutámico, copolímero de estireno-anhídrido de ácido maleico, copolímero de poli(L-lactida-co-glicolizado), copolímero de éter divinílico-anhídrido maleico, N -copolímero de (2-hidroxipropil)metacrilamida (HMPA), polietilenglicol (PEG), alcohol polivinílico (PVA), poliuretano, poli(ácido 2-etilacrílico), polímeros de N-isopropilacrilamida o polifosfazina. Ejemplos de poliaminas incluyen: polietilenimina, polilisina (PLL), espermina, espermidina, poliamina, pseudopéptido-poliamina, poliamina peptidomimética, poliamina dendrímica, arginina, amidina, protamina, lípido catiónico, porfirina catiónica, sal cuaternaria de una poliamina o un péptido alfa-helicoidal.

Un ligando incluido en una composición y/o método de la invención puede comprender un grupo diana, ejemplos no limitantes del cual son un agente dirigido a células o tejidos, por ejemplo, una lectina, glicoproteína, lípido o proteína, por ejemplo, un anticuerpo que se une a un tipo de célula específico, como una célula de riñón o una célula de hígado. Un grupo diana puede ser tirotropina, melanotropina, lectina, glicoproteína, proteína tensioactiva A, carbohidrato de mucina, lactosa multivalente, galactosa multivalente, N-acetil-galactosamina, N-acetil-gulucosamina manosa multivalente, fucosa multivalente, poliaminoácidos glicosilados, galactosa multivalente, transferrina, bifosfonato, poliglutamato, poliaspartato, lípido, colesterol, esteroide, ácido biliar, folato, vitamina B12, vitamina A, biotina o un péptido RGD o mimético de péptido RGD.

Otros ejemplos de ligandos incluyen colorantes, agentes intercalantes (por ejemplo, acridinas), reticulantes (por ejemplo, psoraleno, mitomicina C), porfirinas (TPPC4, texaphyrin, Sapphyrin), hidrocarburos aromáticos policíclicos (por ejemplo, fenazina, dihidrofenazina), endonucleasas artificiales (por ejemplo, EDTA.), moléculas lipófilas, por ejemplo, colesterol, ácido cólico, ácido adamantano acético, ácido 1-pirenobutírico, 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 de péptidos (por ejemplo, péptido de antenapedia, péptido Tat), agentes alquilantes, fosfato, amino, mercapto, PEG (por ejemplo, PEG-40K), MPEG, [MPEG]₂, poliamino, alquilo, alquilo sustituido, marcadores radiomarcados, enzimas, haptenos (por ejemplo, biotina), facilitadores de transporte/absorción (por ejemplo, aspirina, vitamina E, ácido fólico), ribonucleasas sintéticas (por ejemplo, imidazol, bisimidazol, histamina, grupos de imidazol, conjugados de acridina-imidazol, complejos Eu³⁺ de tetraazamacrociclos), dinitrofenilo, HRP o AP.

Un ligando incluido en una composición y/o método de la invención puede ser una proteína, por ejemplo, una glicoproteína o un péptido, por ejemplo una molécula con una afinidad específica por un co-ligando, o un anticuerpo, por ejemplo un anticuerpo que se une a un tipo de célula específico, como una célula cancerosa, una célula endotelial, una célula cardíaca o una

célula ósea. Un ligando útil en una modalidad de una composición y/o método de la invención puede ser una hormona o un receptor hormonal. Un ligando útil en una modalidad de una composición y/o método de la invención puede ser un lípido, lectina, carbohidratos, vitamina, cofactos, lactosa multivalente, galactosa multivalente, N-acetil-galactosamina, N-acetil-gulucosamina manosa multivalente, o fucosa multivalente. Un ligando útil en una modalidad de una composición y/o método de la invención puede ser una sustancia que puede aumentar la absorción del agente AGT dsRNA en la célula, por ejemplo, alterando el citoesqueleto de la célula, por ejemplo, alterando los microtúbulos de la célula, microfilamentos y/o filamentos intermedios. Ejemplos no limitantes de este tipo de agentes son: taxón, vincristina, vinblastina, citocalasina, nocodazol, japlakinolide, latrunculin A, faloidina, swinholide A, indanocine y mioservin.

En algunas modalidades, un ligando unido a un agente AGT dsRNA de la invención funciona como un modulador farmacocinético (PK). Un ejemplo de un modulador de PK que puede usarse en composiciones y métodos de la invención incluye, entre otros: un lipófilo, un ácido biliar, un esteroide, un análogo de fosfolípido, un péptido, un agente de unión a proteínas, PEG, una vitamina, colesterol, un ácido graso, ácido cólico, ácido litocólico, dialquilglicéridos, diacilglicérido, un fosfolípido, un esfingolípido, naproxeno, ibuprofeno, vitamina E, biotina, un aptámero que se une a una proteína sérica, etc. También se sabe que los oligonucleótidos que comprenden varios enlaces fosforotioato se unen a la proteína sérica, por lo que también se pueden usar oligonucleótidos cortos, por ejemplo, oligonucleótidos de aproximadamente 5 bases, 10 bases, 15 bases o 20 bases, que comprenden múltiples enlaces fosforotioato en la hebra principal. composiciones y/o métodos de la invención como ligandos.

COMPOSICIONES DEL AGENTE AGT DSRNA

En algunas modalidades de la invención, el agente de AGT dsRNA se encuentra en una composición. Una composición de la invención puede incluir uno o más agentes AGT dsRNA y opcionalmente uno o más de un vehículo farmacéuticamente aceptable, un agente de administración, un agente diana, un marcador detectable, etc. Un ejemplo no limitante de un agente diana que puede ser útil según algunas modalidades de los métodos

de la invención, es un agente que dirige un agente de AGT dsRNA de la invención hacia y/o dentro de una célula que se va a tratar. El agente de elección dependerá de elementos tales como: la naturaleza de la enfermedad o condición asociada a AGT y del tipo de célula a la que se dirige. En un ejemplo no limitante, en algunas modalidades de la invención puede ser deseable dirigir un agente de AGT dsRNA hacia y/o dentro de una célula hepática. Se entenderá que, en algunas modalidades de los métodos de la invención, un agente terapéutico comprende un agente de AGT dsRNA con solo un agente de administración, tal como un agente de administración que comprende N-acetilgalactosamina (GalNAc), sin ningún elemento adjunto adicional. Por ejemplo, en algunos aspectos de la invención, un agente AGT dsRNA puede unirse a un compuesto de administración que comprende GalNAc e incluirse en una composición que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y administrarse a una célula o sujeto sin ningún marcador detectable, ni agentes de direccionamiento, etc. unido al agente AGT dsRNA.

En los casos en los que un agente AGT dsRNA de la invención se administra con y/o se une a uno o más agentes de administración, agentes diana, agentes de etiquetado, etc., un experto en la técnica conocerá y podrá seleccionar y utilizar agentes adecuados para su uso en métodos de la invención. Se pueden usar agentes de etiquetado en ciertos métodos de la invención para determinar la ubicación de un agente AGT dsRNA en células y tejidos y se pueden usar para determinar la ubicación de una célula, tejido u órgano de una composición de tratamiento que comprende un agente AGT dsRNA que ha sido administrado en métodos de la invención. Los procedimientos para unir y utilizar agentes marcadores tales como marcadores enzimáticos, tintes, radiomarcadores, etc. son bien conocidos en la técnica. Se entenderá que, en algunas modalidades de las composiciones y métodos de la invención, un agente marcador está unido a uno o ambos de un polinucleótido sentido y un polinucleótido antisentido incluido en un agente AGT dsRNA.

ADMINISTRACIÓN DE AGENTES AGT DSRNA Y AGENTES POLINUCLEÓTIDOS ANTISENTIDO AGT

Ciertas modalidades de los métodos de la invención incluyen la administración de un agente AGT dsRNA en una célula. Tal como se utiliza en

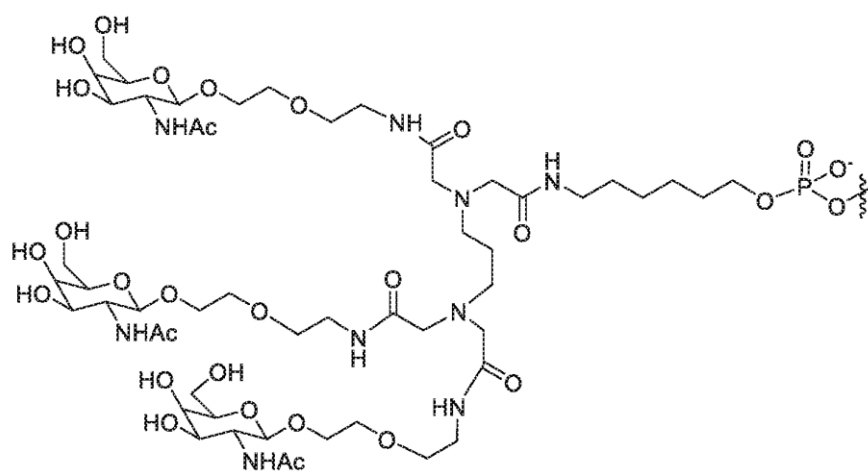
este documento, el término "administración" significa facilitar o efectuar la captación o absorción en la célula. La absorción o captación de un agente AGT dsRNA puede ocurrir a través de procesos celulares activos o de difusión sin ayuda, o mediante el uso de agentes de administración, agentes diana, etc. que pueden estar asociados con un agente AGT dsRNA de la invención. Los medios de administración que son adecuados para su uso en los métodos de la invención incluyen, entre otros: administración in vivo, en la que se inyecta un agente AGT dsRNA en un sitio de tejido o se administra sistémicamente. En algunas modalidades de la invención, un agente AGT dsRNA está unido a un agente de administración.

Los ejemplos no limitantes de métodos que se pueden usar para administrar agentes AGT dsRNA a células, tejidos y/o sujetos incluyen: conjugados AGT dsRNA-GalNAc, tecnología SAMiRNA, métodos de administración basados en LNP y administración de RNA desnudo. Estos y otros métodos de administración se han utilizado con éxito en la técnica para administrar agentes RNAi terapéuticos para el tratamiento de diversas enfermedades y afecciones, tales como, entre otras: enfermedades hepáticas, porfiria aguda intermitente (AIP), hemofilia, fibrosis pulmonar, etc. Detalles de diversos medios de administración se encuentran en publicaciones tales como: Nikam, R.R. & K. R. Gore (2018) *Nucleic Acid Ther*, 28 (4), 209-224 Aug 2018; Springer A.D. & S.F. Dowdy (2018) *Nucleic Acid Ther*. Jun 1; 28(3): 109–118; Lee, K. et al., (2018) *Arch Pharm Res*, 41(9), 867-874; and Nair, J.K. et al., (2014) *J. Am. Chem. Soc.* 136:16958-16961, cuyo contenido se incorpora aquí como referencia.

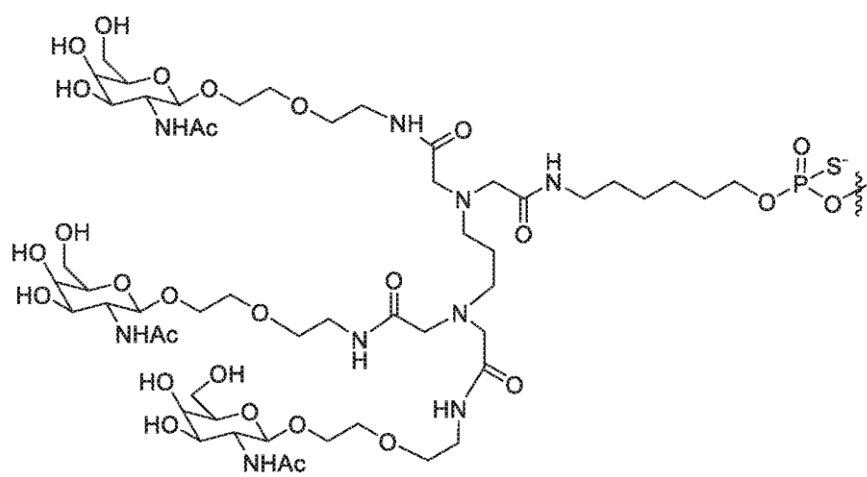
Algunas modalidades de la invención comprenden el uso de nanopartículas lipídicas (LNP) para administrar un agente AGT dsRNA de la invención a una célula, tejido y/o sujeto. LNP se utiliza habitualmente para la administración in vivo de agentes AGT dsRNA, incluidos agentes terapéuticos AGT dsRNA. Un beneficio de usar LNP u otro agente de administración es una mayor estabilidad del agente de RNA AGT cuando se administra a un sujeto usando LNP u otro agente de administración. En algunas modalidades de la invención, un LNP comprende un LNP catiónico que está cargado con una o más moléculas de AGT RNAi de la invención. El LNP que comprende la(s) molécula(s) de AGT RNAi se administra a un sujeto, los LNP y sus moléculas

de AGT RNAi unidas son absorbidos por las células mediante endocitosis, su presencia da como resultado la liberación de moléculas desenhebrantes de RNAi, que median el RNAi.

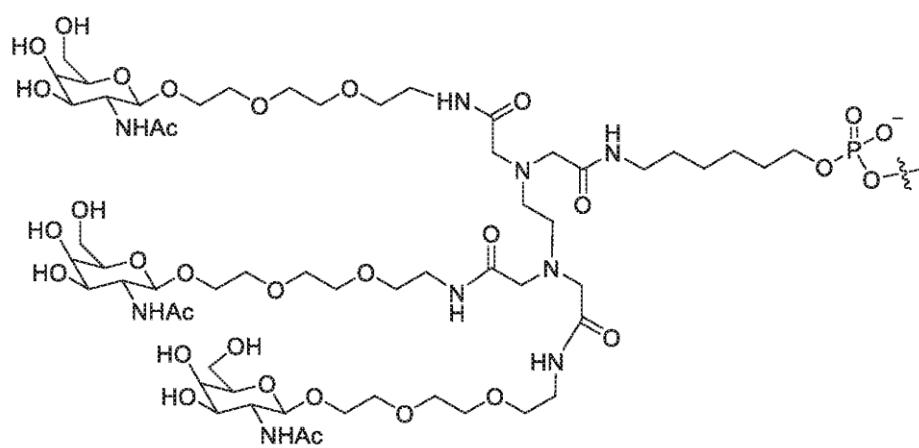
Otro ejemplo no limitante de un agente de administración que puede usarse en modalidades de la invención para administrar un agente AGT dsRNA de la invención a una célula, tejido y/o sujeto es un agente que comprende GalNAc que está unido a un agente AGT dsRNA de la invención y administra el agente AGT dsRNA a una célula, tejido y/o sujeto. En la solicitud PCT: WO2020191183A1 se describen ejemplos de ciertos agentes de administración adicionales que comprenden GalNAc que se pueden usar en ciertas modalidades de los métodos y la composición de la invención. Un ejemplo no limitante de un ligando diana GalNAc que se puede usar en composiciones y métodos de la invención para administrar un agente AGT dsRNA a una célula es un grupo de ligandos diana. Los ejemplos de grupos diana que se presentan en el presente documento se denominan: Ligando GalNAc con enlace fosfodiéster (GLO) y Ligando GalNAc con enlace fosforotioato (GLS). El término "GLX-n" puede usarse en el presente documento para indicar que el compuesto que contiene GalNAC adjunto es cualquiera de los compuestos GLS-1, GLS-2, GLS-3, GLS-4, GLS-5, GLS-6, GLS-7, GLS-8, GLS-9, GLS-10, GLS-11, GLS-12, GLS-13, GLS-14, GLS-15, GLS-16, GLO-1, GLO-2, GLO-3, GLO-4, GLO-5, GLO-6, GLO-7, GLO-8, GLO-9, GLO-10, GLO-11, GLO-12, GLO-13, GLO-14, GLO-15 y GLO-16, cuya estructura se muestra a continuación. En la figura a continuación, la ubicación de la unión del ligando dirigido a GalNAc a un agente RNAi de la invención se encuentra en el extremo derecho de cada uno. Se entenderá que cualquier molécula de RNAi y DsRNA de la invención puede unirse a GLS-1, GLS-2, GLS-3, GLS-4, GLS-5, GLS-6, GLS-7, GLS-8, GLS-9, GLS-10, GLS-11, GLS-12, GLS-13, GLS-14, GLS-15, GLS-16, GLO-1, GLO-2, GLO-3, GLO-4, GLO-5, GLO-6, GLO-7, GLO-8, GLO-9, GLO-10, GLO-11, GLO-12, GLO-13, GLO-14, GLO-15 y GLO-16, GLO-1 a través de estructuras GLO-16 y GLS-1 a través de estructuras GLS-16.



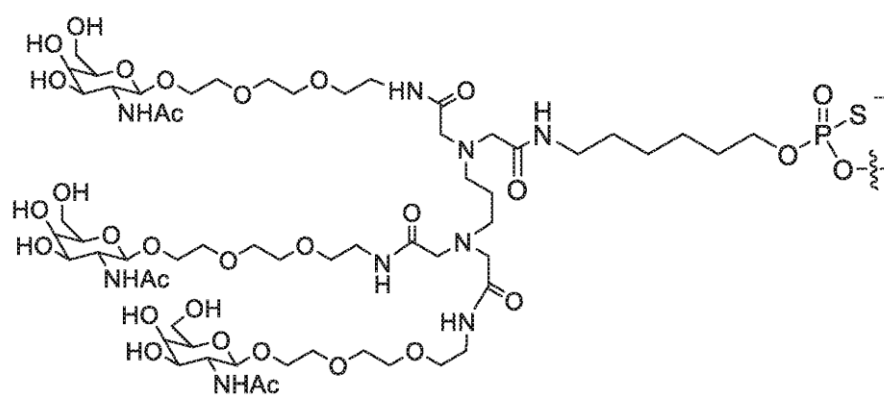
GLO-1



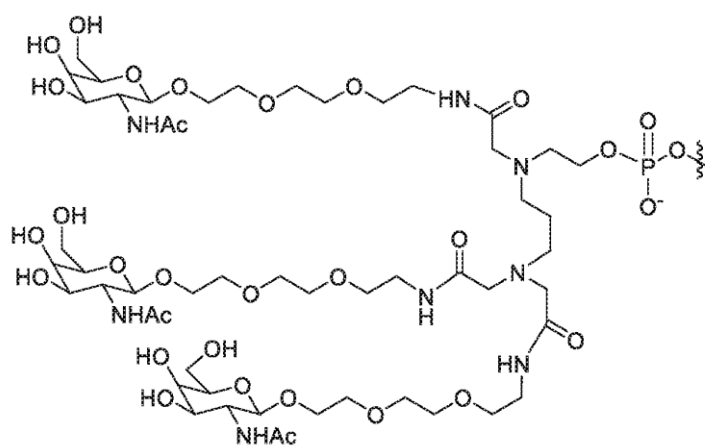
GLS-1



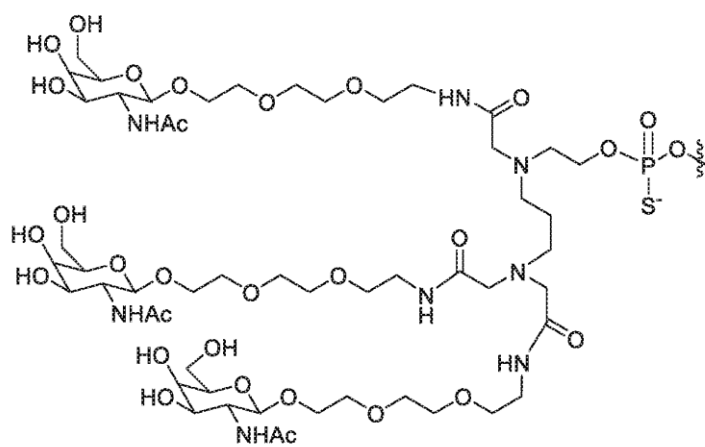
GLO-2



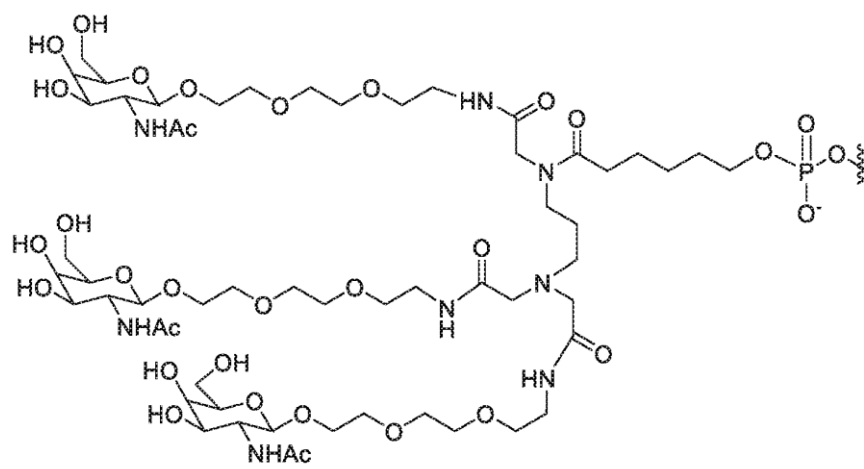
GLS-2



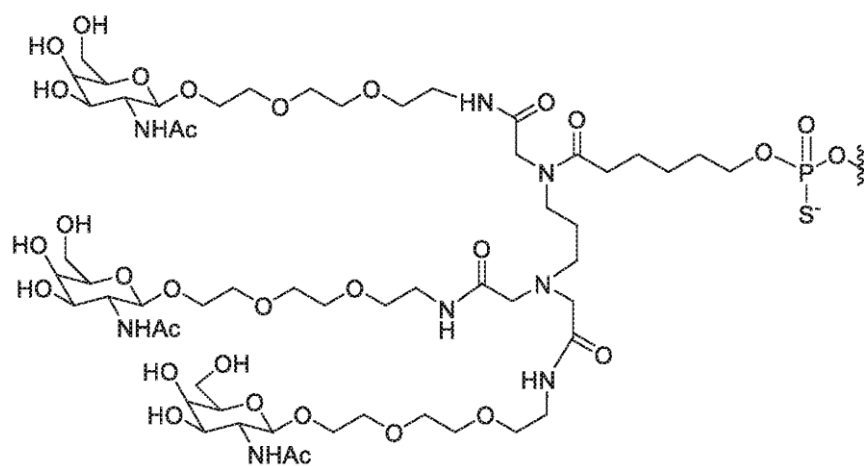
GLO-3



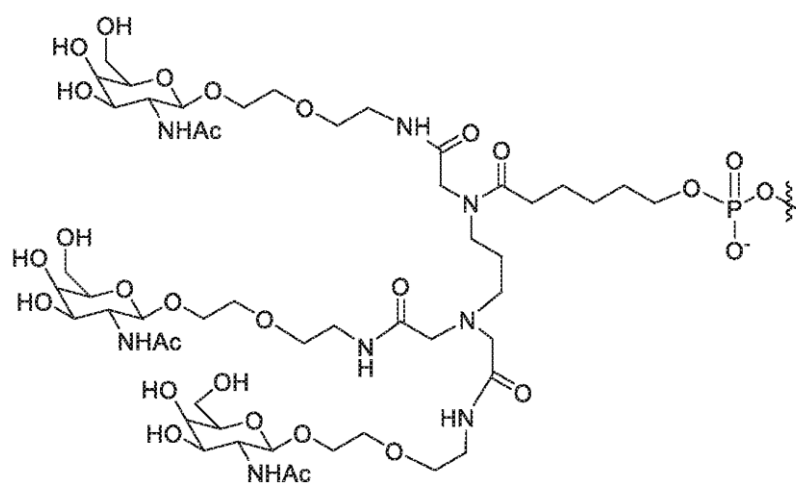
GLS-3



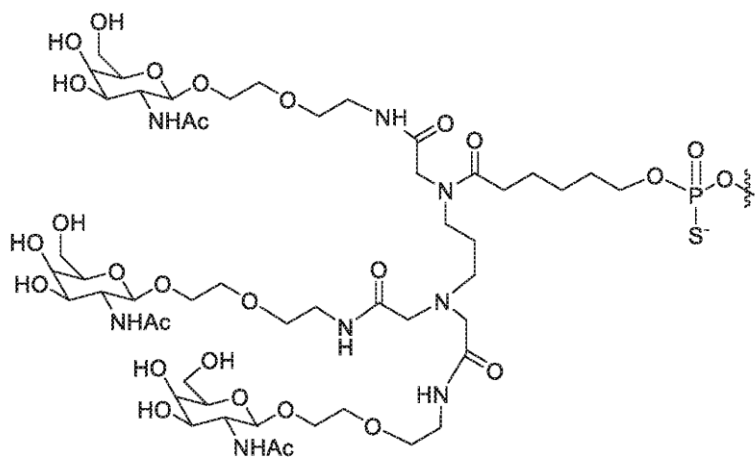
GLO-4



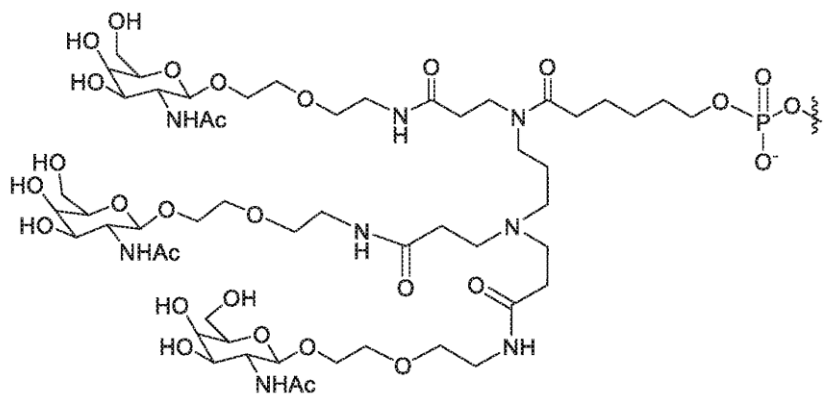
GLS-4



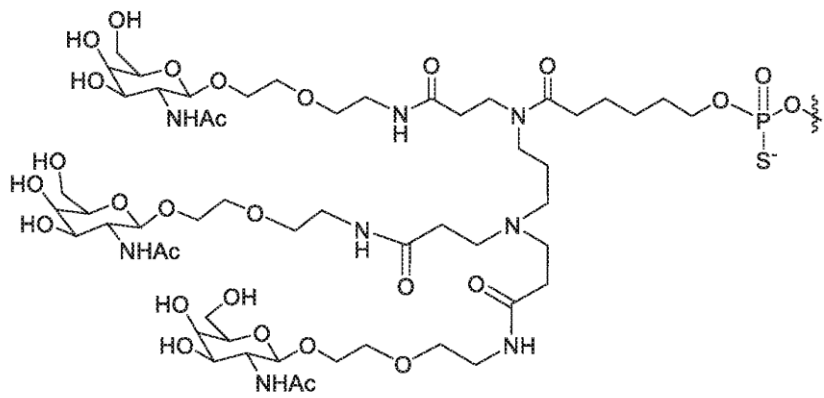
GLO-5



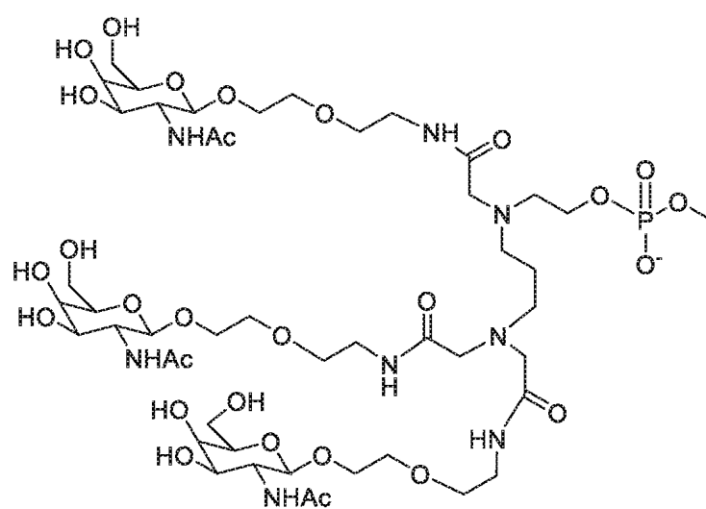
GLS-5



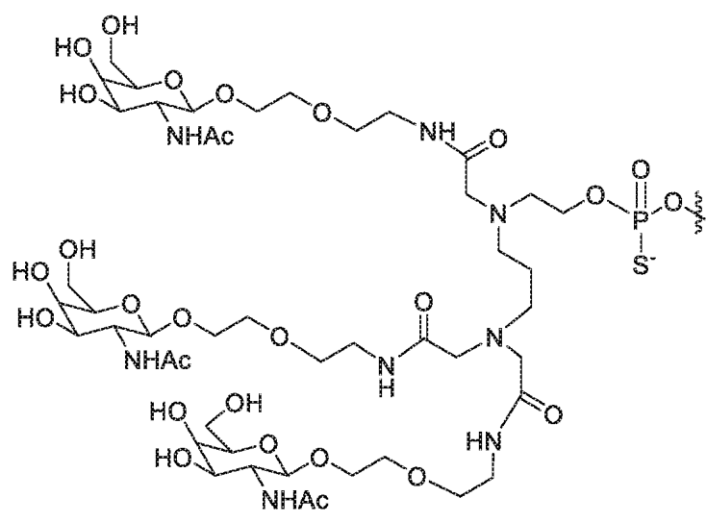
GLO-6



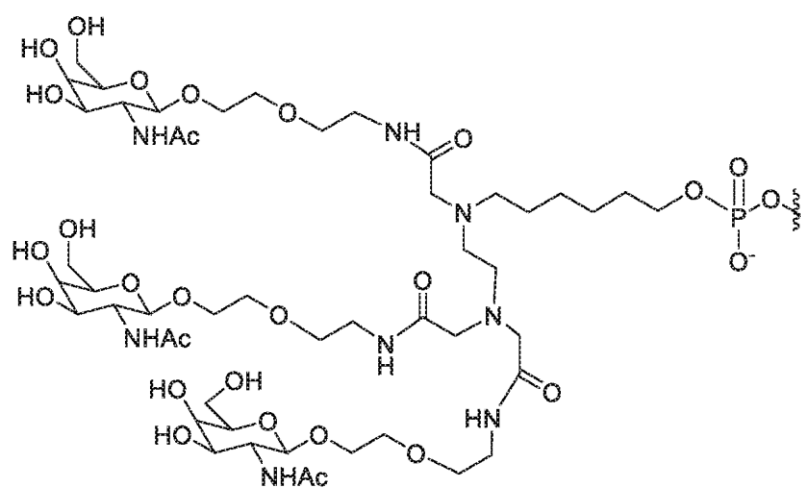
GLS-6



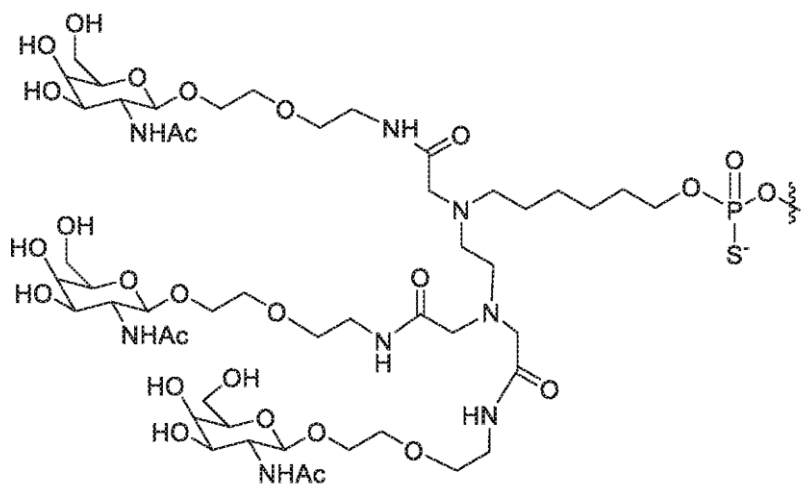
GLO-7



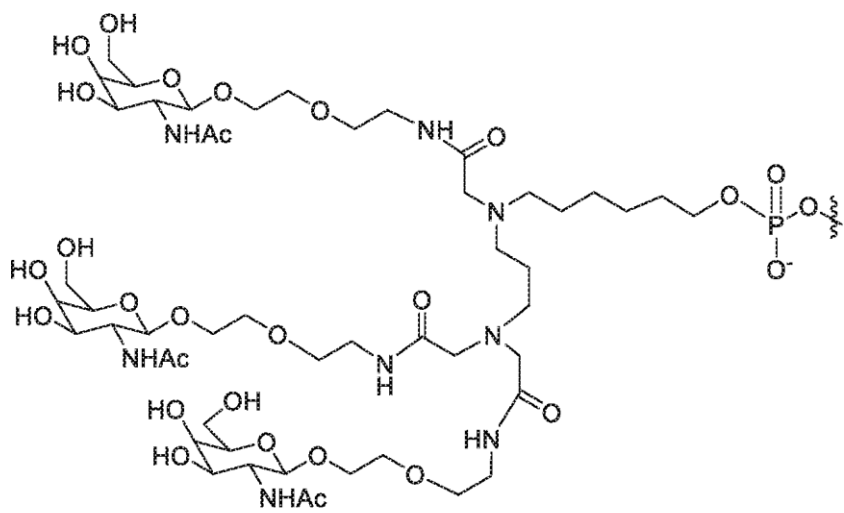
GLS-7



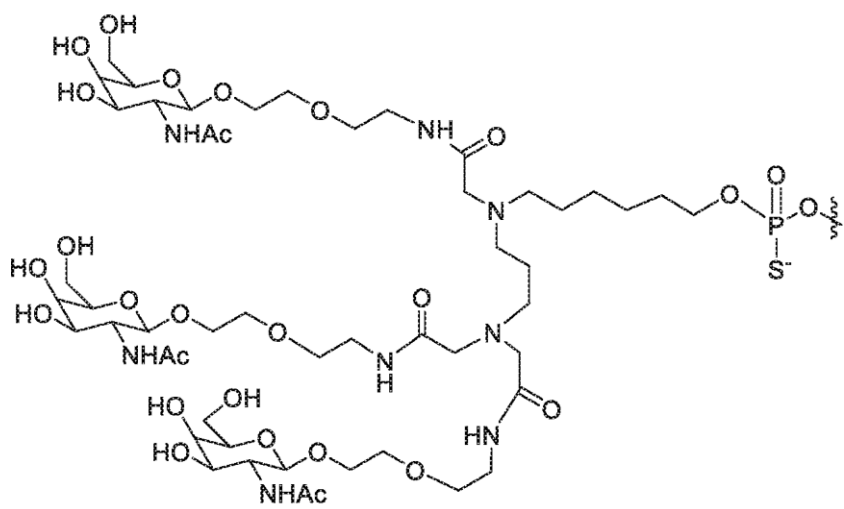
GLO-8



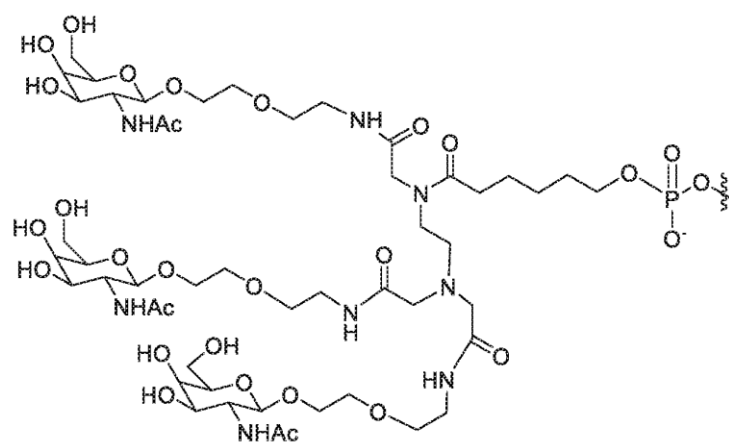
GLS-8



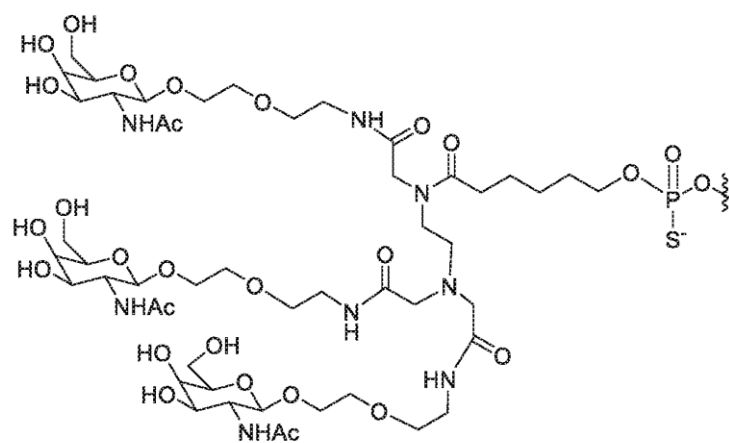
GLO-9



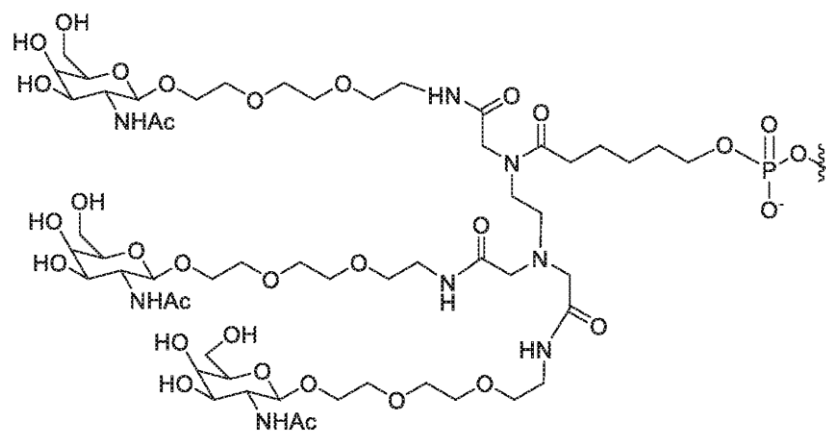
GLS-9



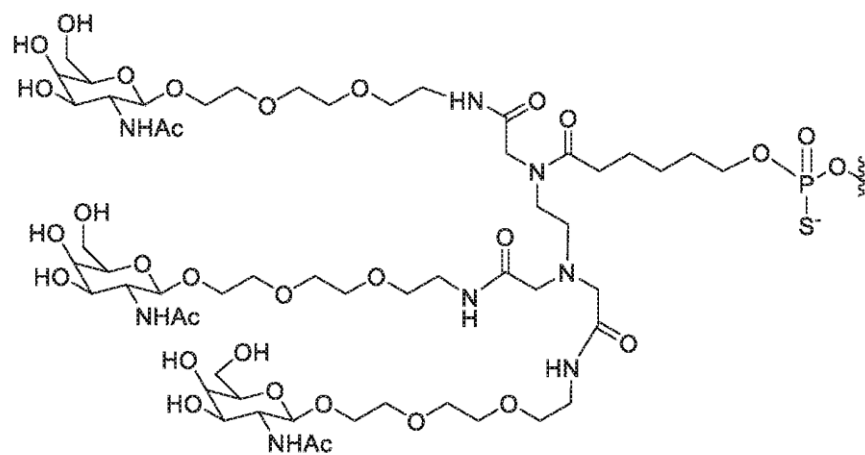
GLO-10



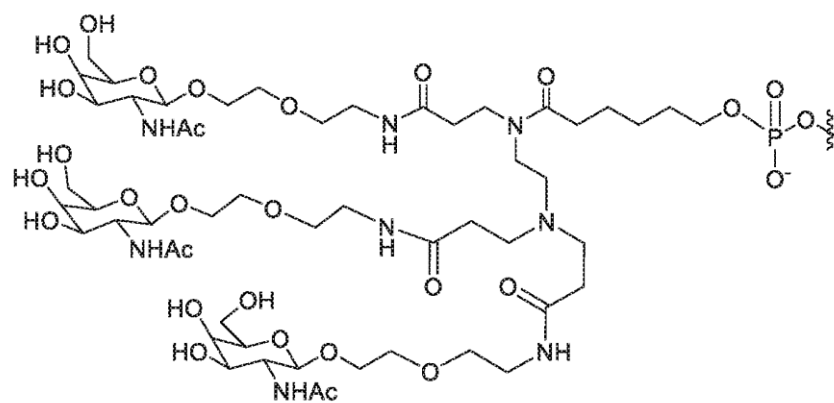
GLS-10



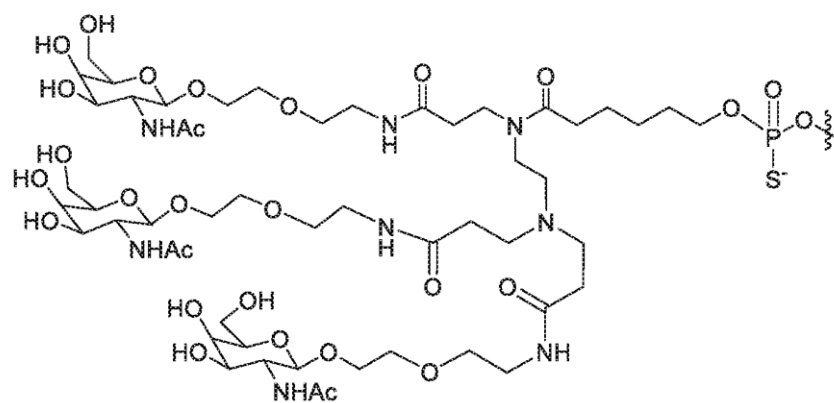
GLO-11



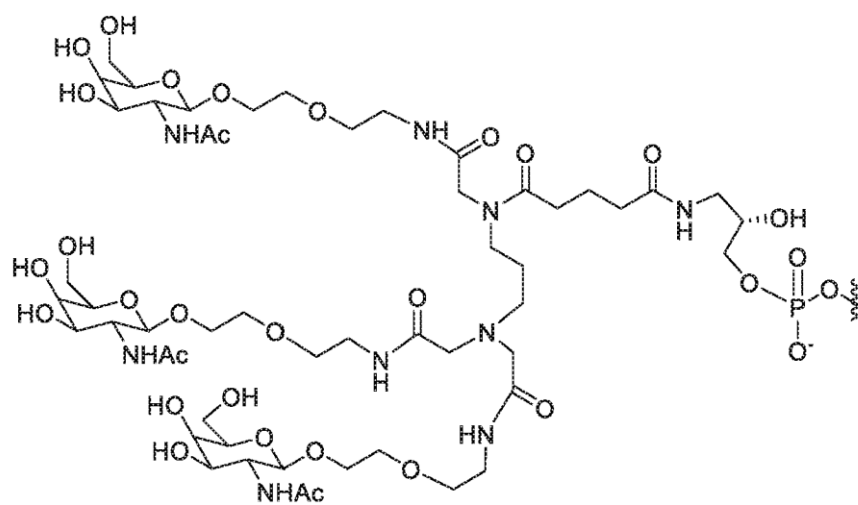
GLS-11



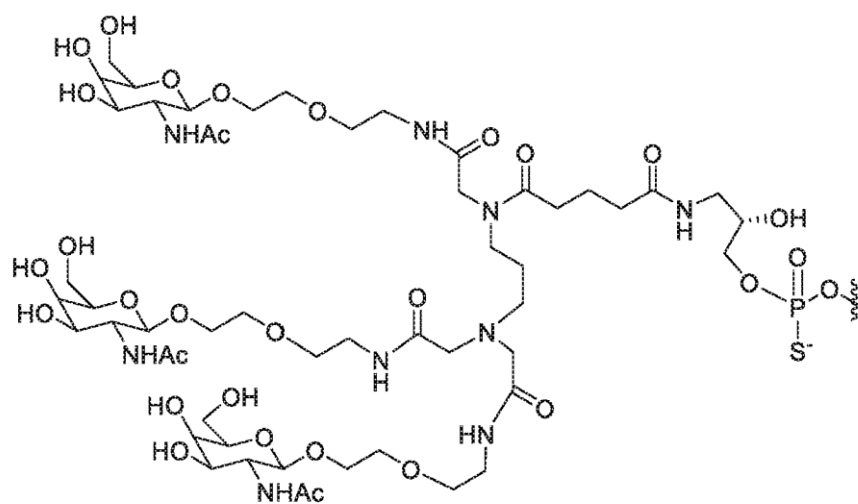
GLO-12



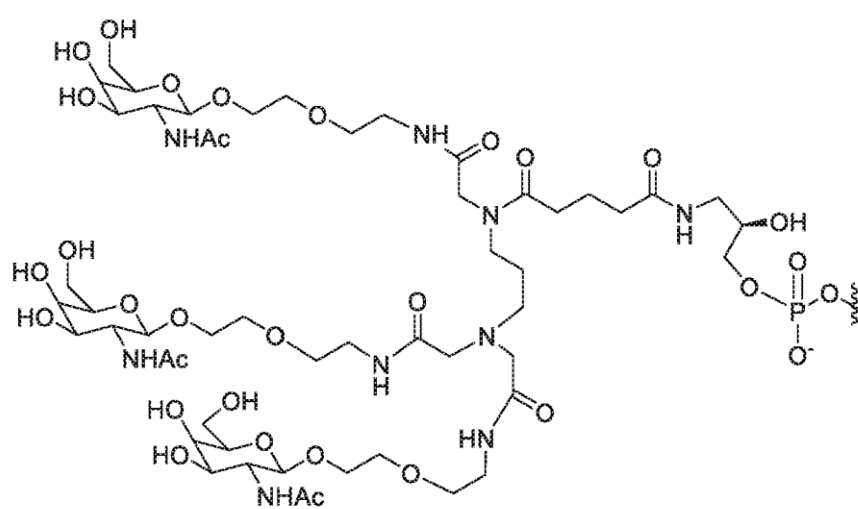
GLS-12



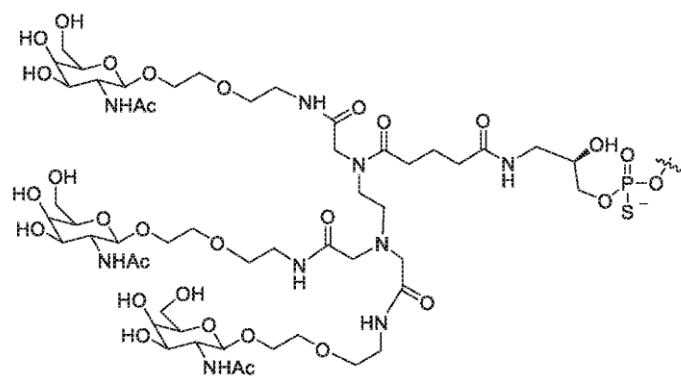
GLO-13



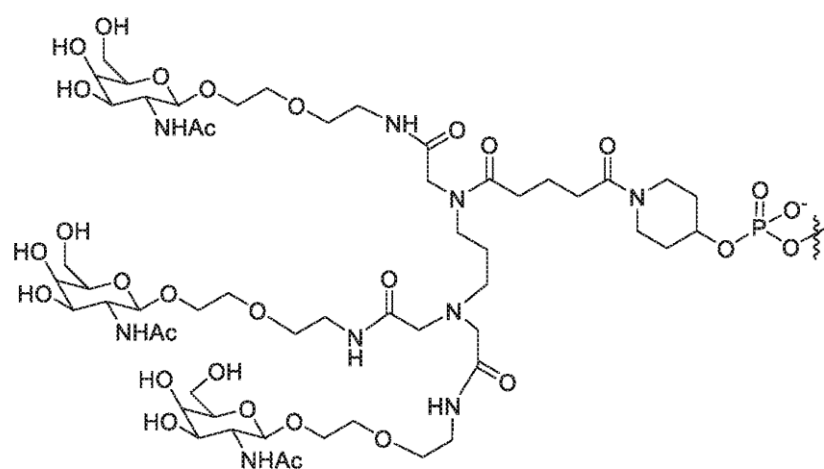
GLS-13



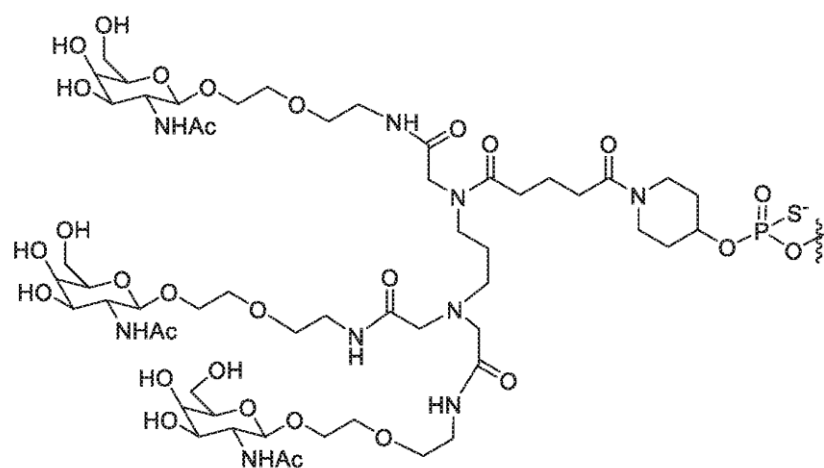
GLO-14



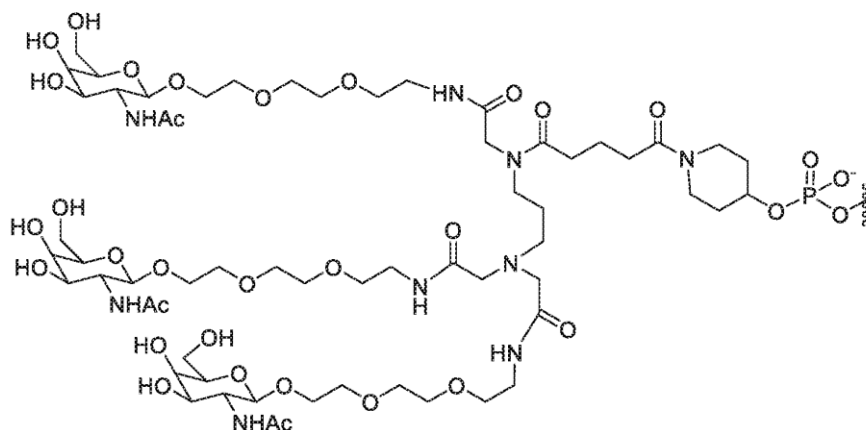
GLS-14



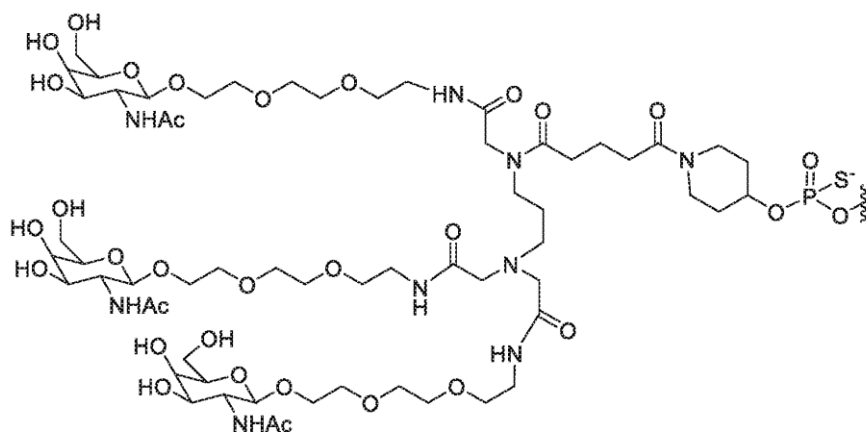
GLO-15



GLS-15



GLO-16



GLS-16.

En algunas modalidades de la invención, la administración in vivo también puede realizarse mediante un sistema de administración de beta-glucano, tal como los descritos en las patentes de EE.UU. Nos. 5.032.401 y 5.607.677, y la Publicación de EE.UU. N° 2005/0281781, que se incorporan en la presente como referencia en su totalidad. La introducción in vitro de un agente AGT RNAi en una célula también se puede realizar usando métodos conocidos en la técnica tales como electroporación y lipofección. En determinadas modalidades de los métodos de la invención, se administra un AGT dsRNA sin un agente diana. Estos RNA pueden administrarse como moléculas de RNA "desnudas". Como ejemplo no limitante, se puede administrar un AGT dsRNA de la invención a un sujeto para tratar una enfermedad o condición asociada a AGT en el sujeto, tal como una enfermedad hipertensiva, en una composición farmacéutica que comprende el agente RNAi, pero sin incluir un agente diana tal como un compuesto diana GalNAc.

Además de ciertos medios de administración descritos en el presente documento, se entenderá que los medios de administración de RNAi, tales como, entre otros, los descritos en el presente documento y los utilizados en la técnica, se pueden usar junto con modalidades de agentes de AGT RNAi y métodos de tratamiento descritos en el presente documento.

Los agentes de AGT dsRNA de la invención se pueden administrar a un sujeto en una cantidad y manera efectiva para reducir el nivel y la actividad del polipéptido AGT en una célula y/o sujeto. En algunas modalidades de los métodos de la invención, uno o más agentes AGT dsRNA se administran a una célula y/o se someten a tratar una enfermedad o condición asociada con la expresión y actividad AGT. Los métodos de la invención, en algunas modalidades, incluyen la administración de uno o más agentes AGT dsRNA a un sujeto que necesita dicho tratamiento para reducir una enfermedad o condición asociada con la expresión AGT en el sujeto. Los agentes AGT dsRNA o los agentes polinucleótidos antisentido AGT de la invención pueden administrarse para reducir la expresión y/o actividad AGT en más células in vitro, ex vivo e in vivo.

En algunas modalidades de la invención, un nivel, y por lo tanto una actividad, del polipéptido AGT en una célula se reduce mediante la administración (por ejemplo, la introducción) de un agente AGT dsRNA o un agente polinucleótido antisentido AGT en una célula. Los agentes y métodos dirigidos se pueden utilizar para ayudar en la administración de un agente AGT dsRNA o un agente polinucleótido antisentido AGT a un tipo específico de célula, subtipo celular, órgano, región espacial dentro de un sujeto y/o a una región subcelular dentro de una célula. Un agente AGT dsRNA puede administrarse en ciertos métodos de la invención individualmente o en combinación con uno o más agentes AGT dsRNA adicionales. En algunas modalidades, se administran 2, 3, 4 o más agentes AGT dsRNA seleccionados independientemente a un sujeto. En ciertas modalidades de la invención, se administra un agente AGT dsRNA a un sujeto para tratar una enfermedad o condición asociada a AGT junto con uno o más regímenes terapéuticos adicionales para tratar la enfermedad o condición asociada a AGT. Ejemplos no limitativos de regímenes terapéuticos adicionales son: la administración de uno o más polinucleótidos antisentido AGT de la invención, la administración

de un agente terapéutico dsRNA no AGT y una modificación del comportamiento. Un régimen terapéutico adicional puede administrarse en un momento que corresponda a uno o más de los siguientes: antes, simultáneamente y después de la administración de un agente AGT dsRNA de la invención. Se entenderá como "simultáneamente" en los usos del presente documento, a dentro de los cinco minutos del tiempo cero, dentro de los 10 minutos del tiempo cero, dentro de los 30 minutos del tiempo cero, dentro de los 45 minutos del tiempo cero, y dentro de los 60 minutos del tiempo cero, correspondiendo "tiempo cero" al tiempo de administración del agente AGT dsRNA de la invención al sujeto. Ejemplos no limitativos de agentes terapéuticos de dsRNA no AGT son: agentes terapéuticos adicionales como diuréticos, inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ACE), antagonistas de los receptores de angiotensina II, beta-bloqueantes, vasodilatadores, bloqueadores de los canales de calcio, antagonistas de la aldosterona, agonistas α_2 , inhibidores de la renina, bloqueantes de la α , agentes adrenérgicos de acción periférica, agonistas parciales selectivos del receptor D1, antagonistas α -adrenérgicos no selectivos, sintéticos, antimineralocorticoides esteroideos o combinaciones de cualquiera de los anteriores, y agentes terapéuticos para la hipertensión formulados como combinaciones farmacéuticas. Ejemplos no limitativos de modificación de la conducta son: regímenes dietéticos, asesoramiento y regímenes de ejercicio. Estos y otros agentes terapéuticos y modificaciones conductuales son conocidos en la técnica y se pueden usar para tratar una enfermedad o condición de AGT en un sujeto, y también se pueden administrar a un sujeto en combinación con uno o más agentes AGT dsRNA de la invención para tratar la enfermedad o condición del AGT. Un agente AGT dsRNA de la invención administrado a una célula o a un sujeto para tratar una enfermedad o condición asociada a AGT puede actuar de manera sinérgica con uno o más agentes terapéuticos o ingredientes activos, aumentando así uno o más agentes terapéuticos o la eficacia del principio activo y/o aumentando la eficacia del agente AGT dsRNA en el tratamiento de una enfermedad o condición asociada a AGT.

El método de tratamiento de la presente invención consiste en la administración de un reactivo AGT dsRNA que puede utilizarse antes y/o

cuando se produzca una enfermedad o condición relacionada con AGT y/o cuando la enfermedad o condición relacionada con AGT está presente, incluyendo en las etapas tempranas, medias y tardías de la enfermedad o condición y en todo momento antes y después de cualquiera de estas etapas. Los métodos de la invención también pueden tratar sujetos que han recibido tratamiento previamente por una enfermedad o condición asociada a AGT con uno o más agentes terapéuticos y/o ingredientes terapéuticamente activos, en los que uno o más otros agentes terapéuticos y/o ingredientes terapéuticos activos no tuvieron éxito, tuvieron un éxito mínimo y/o ya no tuvieron éxito en el tratamiento de la enfermedad o condición asociada a AGT del sujeto.

dsRNA CODIFICADO POR VECTOR

En ciertas modalidades de la invención, un agente AGT dsRNA puede ser administrado en una célula usando un vector. Las unidades de transcripción del agente AGT dsRNA se pueden incluir en un vector de DNA o RNA. La preparación y el uso de estos vectores que codifican transgenes para introducir secuencias en una célula o en un sujeto son bien conocidos en la técnica. Los vectores pueden utilizarse en métodos de la invención que den lugar a la expresión transitoria AGT dsRNA, por ejemplo, durante al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más horas, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más semanas. La longitud de la expresión transitoria puede determinarse utilizando métodos rutinarios basados en elementos tales como, entre otros, la construcción específica del vector seleccionada y la célula y/o tejido diana. Dichos transgenes pueden introducirse como una construcción 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).

Se puede transcribir una o varias hebras individuales de un agente AGT dsRNA a partir de un promotor en un vector de expresión. Cuando se van a expresar dos hebras separadas para generar, por ejemplo, un dsRNA, se pueden co-introducir dos vectores de expresión separados en una célula utilizando medios como la transfección o la infección. En ciertas modalidades, cada hebra individual de un agente AGT dsRNA de la invención puede ser

transcrita por promotores que estén ambos incluidos en el mismo vector de expresión. En ciertas modalidades de la invención, un agente AGT dsRNA se expresa como polinucleótidos repetidos invertidos unidos por una secuencia de polinucleótidos enlazadores tal que el agente AGT dsRNA tiene una estructura de vástago y bucle.

Ejemplos no limitativos de vectores de expresión de RNA son los plásmidos de ADN o los vectores virales. Los vectores de expresión útiles en modalidades de la invención pueden ser compatibles con células eucariotas. Los vectores de expresión de células eucariotas se utilizan de forma rutinaria en la técnica y están disponibles en varias fuentes comerciales. La administración de vectores que expresan AGT dsRNA puede ser sistémica, por ejemplo, por administración intravenosa o intramuscular, por administración a células diana explantadas de un sujeto seguido de reintroducción en el sujeto, o por cualquier otro medio que permita la introducción en una célula diana deseada.

Los sistemas de vectores virales que pueden incluirse en modalidades de este método abarcan, entre otros: (a) vectores de adenovirus; b) vectores de retrovirus, incluidos, entre otros, los vectores lentivirales, el virus de la leucemia murina de Moloney, etc.; c) vectores virales adenoasociados; d) vectores del virus del herpes simple; e) Vectores SV40; f) vectores del virus del polio; g) vectores del virus del papiloma; h) vectores de picornavirus; i) vectores del virus de la viruela, como un ortopox, por ejemplo, vectores del virus vaccinia o avipox, por ejemplo, viruela canaria o viruela aviar; y (j) un adenovirus dependiente de un ayudante o sin intestino. Las construcciones para la expresión recombinante de un agente AGT dsRNA pueden incluir elementos reguladores, como promotores, potenciadores, etc., que pueden seleccionarse para proporcionar una expresión constitutiva o regulada/inducible. Los sistemas de vectores virales, y el uso de promotores y potenciadores, etc., son rutinarios en la técnica y pueden usarse junto con los métodos y composiciones descritos en este documento.

Ciertas modalidades de la invención incluyen el uso de vectores virales para la administración de agentes AGT dsRNA en las células. Numerosos sistemas de administración basados en adenovirus se utilizan de

forma rutinaria en la técnica para administrar, por ejemplo, los pulmones, el hígado, el sistema nervioso central, las células endoteliales y los músculos. Ejemplos no limitativos de vectores virales que pueden utilizarse en los métodos de la invención son: vectores AAV, virus de la viruela como el virus vaccinia, virus ankara modificado (MVA), NYVAC, viruela avipolar como la viruela aviar o la viruela canaria.

Ciertas modalidades de la invención incluyen métodos de administración de agentes AGT dsRNA en células utilizando un vector y dichos vectores pueden estar en un portador farmacéuticamente aceptable que puede, pero no es necesario, incluir una matriz de liberación lenta en la que está incrustado el vehículo de administración de genes. En algunas modalidades, se puede producir un vector para la administración de un AGT dsRNA a partir de una célula recombinante, y una composición farmacéutica de la invención puede incluir una o más células que produjeron el sistema de administración AGT dsRNA.

COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS QUE CONTIENEN AGT dsRNA O ssRNA

Ciertas modalidades de la invención incluyen el uso de composiciones farmacéuticas que contengan un agente AGT dsRNA o un agente polinucleótido antisentido AGT y un portador farmacéuticamente aceptable. La composición farmacéutica que contiene el agente AGT dsRNA o el agente polinucleótido antisentido AGT se puede utilizar en métodos de la invención para reducir la expresión génica y la actividad AGT en una célula y es útil para tratar una enfermedad o condición asociada a AGT. Dichas composiciones farmacéuticas pueden formularse en función del modo de administración. Ejemplos no limitativos de formulaciones para modos de administración son: una composición formulada para la administración subcutánea, una composición formulada para la administración sistémica a través de la administración parenteral, una composición formulada para la administración intravenosa (IV), una composición formulada para la administración intratecal, una composición formulada para la administración directa en el cerebro, etc. Administración de una composición farmacéutica de la invención para administrar un agente AGT dsRNA o el agente polinucleótido

antisentido AGT en una célula se puede hacer utilizando uno o más medios, tales como: tópico (por ejemplo, mediante un parche transdérmico), pulmonar, por ejemplo, por inhalación o insuflación de polvos o aerosoles, incluso por nebulizador; intratraqueal, intranasal, epidérmico y transdérmico, oral o parenteral. La administración parenteral incluye inyección o infusión intravenosa (IV), intraarterial, subcutánea, intraperitoneal o intramuscular; subdérmico, por ejemplo, a través de un dispositivo implantado; o intracraneal, por ejemplo, por administración intraparenquimatosa, intratecal o intraventricular. Un agente AGT dsRNA o un agente polinucleótido antisentido AGT también se puede administrar directamente a un tejido diana, por ejemplo, directamente al hígado, directamente a un riñón, etc. Se entenderá que la "administración de un agente AGT dsRNA" o "la administración de un agente polinucleótido antisentido AGT" en una célula abarca la administración de un agente AGT dsRNA o un agente polinucleótido antisentido AGT, respectivamente, la expresión de agentes AGT DdsRNA directamente en las células, así como expresión de agentes AGT DdsRNA a partir de vectores codificantes administrados a las células, o por cualquier medio adecuado con el que el agente polinucleótido AGT dsRNA o AGT antisentido se hace presente en una célula. La preparación y el uso de formulaciones y medios para administrar RNA inhibidores son comúnmente conocidos y se utilizan de forma rutinaria en la técnica.

Tal como se utiliza en el presente documento, una "composición farmacéutica" comprende una cantidad farmacológicamente efectiva de un agente AGT dsRNA o un agente polinucleótido antisentido AGT de la invención y un portador farmacéuticamente aceptable. El término "portador farmacéuticamente aceptable" se refiere a un portador para la administración de un agente terapéutico. Dichos portadores incluyen, pero no se limitan a: solución salina, solución salina tamponada, dextrosa, agua, glicerol, etanol y combinaciones de los mismos. El término excluye específicamente el medio de cultivo celular. En el caso de los medicamentos administrados por vía oral, los portadores farmacéuticamente aceptables incluyen, entre otros, excipientes farmacéuticamente aceptables, como diluyentes inertes, agentes desintegrantes, agentes aglutinantes, agentes lubricantes, agentes edulcorantes, agentes aromatizantes, colorantes y conservantes. Los

diluyentes inertes adecuados incluyen sodio y carbonato de calcio, fosfato de sodio y calcio y lactosa, mientras que el almidón de maíz y el ácido algínico son agentes desintegradores adecuados. Los agentes aglutinantes pueden incluir almidón y gelatina, mientras que el agente lubricante, si está presente, generalmente será estearato de magnesio, ácido esteárico o talco. Si se desea, los comprimidos pueden recubrirse con un material como el monoestearato de glicerilo o el estearato de glicerilo, para retrasar la absorción en el tracto gastrointestinal. Los agentes incluidos en las formulaciones de medicamentos se describen con más detalle a continuación. Tal y como se utiliza en el presente documento, términos tales como: "cantidad farmacológicamente eficaz", "cantidad terapéuticamente eficaz" y "cantidad efectiva" se refiere a la cantidad de un agente AGT dsRNA o un agente polinucleótido antisentido AGT de la invención para producir el resultado farmacológico, terapéutico o preventivo previsto. Por ejemplo, si un tratamiento clínico determinado se considera eficaz cuando hay al menos una reducción del 10% en un parámetro medible asociado con una enfermedad o trastorno, una cantidad terapéuticamente eficaz de un fármaco para el tratamiento de esa enfermedad o trastorno es la cantidad necesaria para efectuar al menos una reducción del 10% en ese parámetro. Por ejemplo, una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente AGT dsRNA o un agente polinucleótido antisentido AGT puede reducir los niveles de polipéptidos AGT en al menos un 10%. La composición farmacéutica puede abarcar agentes dsRNAi, incluidos dúplex tales como AD00051 a AD00122-19-2, AD00163-3, AV01227 a AV01257, AV01711 exhibidos en la Tabla 1. En algunas modalidades, los agentes dsRNAi preferidos incluyen, por ejemplo, dúplex AD00158, AD00163, AD00159, AD00290, AD00300 o AD00122. En otras modalidades, los agentes dsRNAi preferidos incluyen, por ejemplo, AD00158-1, AD00158-2, AD00163-1, AD00159-1 o AD00300-1. En otras modalidades, tales agentes dsRNAi incluyen variantes dúplex, por ejemplo, variantes de AD00158 dúplex, AD00163, AD00163-3, AD00159, AD00290, AD00300 o AD00122.

CANTIDADES EFECTIVAS

Los métodos de la invención, en algunos aspectos, comprenden el contacto de una célula con un agente AGT dsRNA o un agente polinucleótido antisentido AGT en una cantidad efectiva para reducir la expresión del gen AGT

en la célula contactada. Ciertas modalidades de los métodos de la invención comprenden la administración de un agente AGT dsRNA o un agente polinucleótido antisentido AGT a un sujeto en una cantidad efectiva para reducir la expresión génica AGT y tratar una enfermedad o condición asociada a AGT en el sujeto. Una "cantidad efectiva" utilizada en términos de reducción de la expresión AGT y/o para el tratamiento de una enfermedad o condición asociada a AGT, es una cantidad necesaria o suficiente para lograr un efecto biológico deseado. Por ejemplo, una cantidad efectiva de un agente AGT dsRNA o un agente polinucleótido antisentido AGT para tratar una enfermedad o condición asociada a AGT podría ser la cantidad necesaria para (i) ralentizar o detener la progresión de la enfermedad o condición; o (ii) revertir, reducir o eliminar uno o más síntomas de la enfermedad o condición. En algunos aspectos de la invención, una cantidad efectiva es aquella cantidad de un agente AGT dsRNA o un agente polinucleótido antisentido AGT que, cuando se administra a un sujeto que necesita un tratamiento de una enfermedad o condición asociada a AGT, da lugar a una respuesta terapéutica que previene y/o trata la enfermedad o condición. De acuerdo con algunos aspectos de la invención, una cantidad efectiva es aquella cantidad de un agente AGT dsRNA o un agente polinucleótido antisentido AGT de la invención que, cuando se combina o coadministra con otro tratamiento terapéutico para una enfermedad o condición asociada a AGT, da lugar a una respuesta terapéutica que previene y/o trata la enfermedad o condición. En algunas modalidades de la invención, un efecto biológico del tratamiento de un sujeto con un agente AGT dsRNA o un agente polinucleótido antisentido AGT de la invención puede resultar en la mejoría y/o eliminación absoluta de los síntomas resultantes de la enfermedad o condición asociada a AGT. En algunas modalidades de la invención, un efecto biológico es la abrogación completa de la enfermedad o condición asociada a AGT, como se evidencia, por ejemplo, por una prueba diagnóstica que indica que el sujeto está libre de la enfermedad o condición asociada a AGT. Un ejemplo no limitativo de un síntoma fisiológico que puede detectarse incluye una reducción de la acumulación de lípidos en el hígado de un sujeto tras la administración de un agente de la invención. Se pueden utilizar medios adicionales conocidos en la técnica para evaluar el estado de una enfermedad o condición asociada al AGT para determinar el efecto de un agente y/o

métodos de la invención sobre una enfermedad o condición asociada al AGT.

Por lo general, en los ensayos clínicos se determina una cantidad efectiva de un agente AGT dsRNA o un agente polinucleótido antisentido AGT para disminuir la actividad del polipéptido AGT a un nivel para tratar una enfermedad o condición asociada a AGT, estableciendo una dosis efectiva para una población de prueba frente a una población de control en un estudio ciego. En algunas modalidades, una cantidad efectiva será la que da lugar a una respuesta deseada, por ejemplo, una cantidad que disminuye una enfermedad o condición asociada a AGT en células, tejidos y/o sujetos con la enfermedad o condición. Por lo tanto, una cantidad efectiva de un agente AGT dsRNA o un agente polinucleótido antisentido AGT para tratar una enfermedad o condición asociada a AGT que puede tratarse reduciendo la actividad del polipéptido AGT puede ser la cantidad que, cuando se administra, disminuye la cantidad de actividad polipeptídica AGT en el sujeto a una cantidad menor que la cantidad que estaría presente en la célula, tejido y/o sujeto sin la administración del agente AGT dsRNA o del agente polinucleótido antisentido AGT. En ciertos aspectos de la invención, el nivel de actividad polipeptídica AGT y/o la expresión génica AGT presente en una célula, tejido y/o sujeto que no ha sido contactado o administrado con un agente AGT dsRNA o un agente polinucleótido antisentido AGT de la invención se denomina cantidad de "control". En algunas modalidades de los métodos de la invención, una cantidad de control para un sujeto es una cantidad de pretratamiento para el sujeto, en otras palabras, un nivel en un sujeto antes de la administración de un agente AGT puede ser un nivel de control para ese sujeto y compararse con un nivel de actividad polipeptídica AGT y/o expresión génica AGT en el sujeto después de la administración de siRNA al sujeto. En el caso del tratamiento de una enfermedad o condición asociada a AGT, la respuesta deseada puede ser reducir o eliminar uno o más síntomas de la enfermedad o condición en la célula, tejido y/o sujeto. La reducción o eliminación puede ser temporal o permanente. Se entenderá que el estado de una enfermedad o condición asociada a AGT puede ser monitoreado utilizando métodos para determinar la actividad polipeptídica AGT, la expresión génica AGT, la evaluación de síntomas, pruebas clínicas, etc. En algunos aspectos de la invención, una respuesta deseada al tratamiento de una enfermedad o condición asociada a

AGT es retrasar la aparición o incluso prevenir la aparición de la enfermedad o condición.

También se puede determinar una cantidad efectiva de un compuesto que reduce la actividad de un polipéptido AGT mediante la evaluación de los efectos fisiológicos de la administración de un agente AGT dsRNA o un agente polinucleótido antisentido AGT en una célula o sujeto, como la reducción de la enfermedad o condición asociada a AGT después de la administración. Los ensayos y/o la monitorización de síntomas en sujetos pueden utilizarse para determinar la eficacia de los agentes AGT dsRNA o de los agentes polinucleótidos antisentido AGT de la invención, que pueden administrarse en los compuestos farmacéuticos de la invención, y para determinar la respuesta al tratamiento. Un ejemplo no limitativo es una o más pruebas de presión arterial conocidas en la técnica. Como otro ejemplo no limitativo, una o más pruebas de presión arterial conocidas en la técnica pueden utilizarse para determinar el estado de un trastorno asociado a AGT en un sujeto antes y después del tratamiento del sujeto con un agente AGT dsRNA de la invención. En otro ejemplo no limitativo, el estado de una enfermedad asociada a AGT en un sujeto se determina utilizando una o más pruebas conocidas en la técnica para reducir los niveles de presión arterial. En este ejemplo, la enfermedad incluye la hipertensión, y la prueba se utiliza para determinar el nivel de presión arterial reducida en un sujeto antes y después del tratamiento del sujeto con un agente AGT dsRNA de la invención.

Algunas modalidades de la invención incluyen métodos para determinar la eficacia de un agente dsRNA o un agente polinucleótido antisentido AGT de la invención administrado a un sujeto para tratar una enfermedad o condición asociada a AGT mediante la evaluación y/o monitorización de una o más "características fisiológicas" de la enfermedad o condición asociada a AGT en el sujeto. Ejemplos no limitativos de las características fisiológicas de una enfermedad o condición asociada a AGT son los niveles séricos AGT, la presión arterial media y la presión arterial diastólica en un sujeto. Los métodos estándar para determinar tales características fisiológicas son conocidos en la técnica e incluyen, entre otros, análisis de sangre, estudios de imagen, examen físico, etc.

Se entenderá que la cantidad de un agente AGT dsRNA o un agente polinucleótido antisentido AGT administrado a un sujeto puede modificarse basándose, al menos en parte, en las determinaciones del estado de la enfermedad y/o condición y/o las características fisiológicas determinadas para un sujeto. La cantidad de un tratamiento puede variarse, por ejemplo, aumentando o disminuyendo la cantidad de un agente AGT-dsRNA o un agente polinucleótido antisentido AGT, cambiando la composición en la que se administra el agente AGT dsRNA o el agente polinucleótido antisentido AGT, respectivamente, cambiando la vía de administración, cambiando el momento de la dosis, etc. La cantidad efectiva de un agente AGT dsRNA o un agente polinucleótido antisentido AGT variará según la condición particular que se esté tratando, la edad y la condición física del sujeto que se esté tratando; la gravedad de la condición, la duración del tratamiento, la naturaleza de la terapia concurrente (si la hubiera), la vía específica de administración y factores adicionales dentro del conocimiento y la experiencia del profesional de la salud. Por ejemplo, una cantidad efectiva puede depender del nivel deseado de actividad polipeptídica AGT y/o de la expresión del gen AGT que sea eficaz para tratar la enfermedad o condición asociada a AGT. Un técnico experto puede determinar empíricamente una cantidad efectiva de un determinado agente AGT dsRNA o agente polinucleótido antisentido AGT de la invención para su uso en métodos de la invención sin necesidad de una experimentación indebida. En combinación con las enseñanzas proporcionadas en el presente documento, mediante la selección de entre varios agentes AGT dsRNA o agentes polinucleótidos antisentido AGT de la invención, y sopesando factores tales como la potencia, la biodisponibilidad relativa, el peso corporal del paciente, la gravedad de los efectos secundarios adversos y el modo de administración preferido, se puede planificar un régimen de tratamiento profiláctico o terapéutico eficaz que sea efectivo para tratar al sujeto en particular.

Tal como se utiliza en modalidades de la invención, una cantidad efectiva de un agente AGT dsRNA o un agente polinucleótido antisentido AGT de la invención puede ser aquella cantidad que al entrar en contacto con una célula da lugar a un efecto biológico deseado en la célula.

Se reconocerá que el silenciamiento del gen AGT puede

determinarse en cualquier célula que exprese AGT, ya sea constitutivamente o mediante ingeniería genómica, y mediante cualquier ensayo apropiado. En algunas modalidades de la invención, la expresión del gen AGT se reduce en al menos un 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o 100% mediante la administración de un agente AGT dsRNA de la invención. En algunas modalidades de la invención, la expresión del gen AGT se reduce entre un 5% y un 10%, un 5% y un 25%, un 10% y un 50%, un 10% y un 75%, un 25% y un 75%, un 25% y un 100%, o un 50% y un 100% mediante la administración de un agente AGT dsRNA de la invención.

DOSIS DE MEDICACIÓN:

Los agentes AGT dsRNA y los agentes polinucleótidos antisentido AGT se administran en composiciones farmacéuticas en dosis suficientes para inhibir la expresión de los genes AGT. En ciertas modalidades de la invención, una dosis de agente AGT dsRNA o agente polinucleótido antisentido AGT está en un rango de 0,01 a 200,0 miligramos por kilogramo de peso corporal del receptor por día, generalmente en el rango de 1 a 50 mg por kilogramo de peso corporal, de 5 a 40 mg/kg de peso corporal, de 10 a 30 mg/kg de peso corporal, de 1 a 20 mg/kg de peso corporal, de 1 a 10 mg/kg de peso corporal, de 4 a 15 mg/kg de peso corporal al día, incluyendo el valor final. Por ejemplo, el agente AGT dsRNA o el agente polinucleótido antisentido AGT se pueden administrar en una cantidad que va desde aproximadamente 0.01 mg/kg, 0.05 mg/kg, 0.1 mg/kg, 0.2 mg/kg, 0.3 mg/kg, 0.4 mg/kg, 0.5 mg/kg, 1 mg/kg, 1.1 mg/kg, 1.2 mg/kg, 1.3 mg/kg, 1.4 mg/kg, 1.5 mg/kg, 1.6 mg/kg, 1.7 mg/kg, 1.8 mg/kg, 1.9 mg/kg, 2 mg/kg, 2.1 mg/kg, 2.2 mg/kg, 2.3 mg/kg, 2.4 mg/kg, 2.5 mg/kg, 2.6 mg/kg, 2.7 mg/kg, 2.8 mg/kg, 2.9 mg/kg, 3.0 mg/kg, 3.1 mg/kg, 3.2 mg/kg, 3.3 mg/kg, 3.4 mg/kg, 3.5 mg/kg, 3.6 mg/kg, 3.7 mg/kg, 3.8 mg/kg, 3.9 mg/kg, 4 mg/kg, 4.1 mg/kg, 4.2 mg/kg, 4.3 mg/kg, 4.4 mg/kg, 4.5 mg/kg, 4.6 mg/kg, 4.7 mg/kg, 4.8 mg/kg, 4.9 mg/kg, 5 mg/kg, 5.1 mg/kg, 5.2 mg/kg, 5.3 mg/kg, 5.4 mg/kg, 5.5 mg/kg, 5.6 mg/kg, 5.7 mg/kg, 5.8 mg/kg, 5.9 mg/kg, 6 mg/kg, 6.1 mg/kg, 6.2 mg/kg, 6.3 mg/kg, 6.4 mg/kg, 6.5 mg/kg, 6.6 mg/kg, 6.7 mg/kg, 6.8 mg/kg, 6.9 mg/kg, 7 mg/kg, 7.1 mg/kg, 7.2 mg/kg, 7.3 mg/kg, 7.4 mg/kg, 7.5 mg/kg, 7.6 mg/kg, 7.7 mg/kg, 7.8 mg/kg, 7.9 mg/kg, 8 mg/kg, 8.1 mg/kg, 8.2 mg/kg, 8.3 mg/kg, 8.4 mg/kg, 8.5 mg/kg, 8.6 mg/kg, 8.7 mg/kg, 8.8 mg/kg, 8.9

mg/kg, 9 mg/kg, 9.1 mg/kg, 9.2 mg/kg, 9.3 mg/kg, 9.4 mg/kg, 9.5 mg/kg, 9.6 mg/kg, 9.7 mg/kg, 9.8 mg/kg, 9.9 mg/kg, 10 mg/kg, 11 mg/kg, 12 mg/kg, 13mg/kg, 14 mg/kg, 15 mg/kg, 16 mg/kg, 17 mg/kg, 18 mg/kg, 19 mg/kg, 20 mg/kg, 21 mg/kg, 22 mg/kg, 23mg/kg, 24 mg/kg, 25 mg/kg, 26 mg/kg, 27 mg/kg, 28 mg/kg, 29 mg/kg, 30 mg/kg, 31 mg/kg, 32 mg/kg, 33mg/kg, 34 mg/kg, 35 mg/kg, 36 mg/kg, 37 mg/kg, 38 mg/kg, 39 mg/kg, 40 mg/kg, 41 mg/kg, 42 mg/kg, 43mg/kg, 44 mg/kg, 45 mg/kg, 46 mg/kg, 47 mg/kg, 48 mg/kg, 49 mg/kg, hasta 50 mg/kg de peso corporal por dosis única.

Pueden considerarse varios factores en la determinación de la dosis y el momento de la administración de un agente AGT dsRNA de la invención. La cantidad absoluta de un agente AGT dsRNA o un agente polinucleótido antisentido AGT administrado dependerá de una variedad de factores, incluido un tratamiento concurrente, el número de dosis y los parámetros individuales del sujeto, incluida la edad, la condición física, el tamaño y el peso. Estos son factores públicamente conocidos por los que tienen una habilidad ordinaria en la técnica y pueden abordarse con nada más que la experimentación rutinaria. En algunas modalidades, se puede utilizar una dosis máxima, es decir, la dosis segura más alta de acuerdo con el buen juicio médico.

Los métodos de la invención pueden incluir en algunas modalidades la administración a un sujeto de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más dosis de un agente AGT dsRNA o un agente polinucleótido antisentido AGT. En algunos casos, un compuesto farmacéutico (por ejemplo, que comprende un agente AGT dsRNA o que comprende un agente polinucleótido antisentido AGT) se puede administrar a un sujeto al menos una vez al día, cada dos días, semanalmente, cada dos semanas, mensualmente, etc. Las dosis se pueden administrar una vez al día o más de una vez al día, por ejemplo, 2, 3, 4, 5 o más veces en un período de 24 horas. Una composición farmacéutica de la invención puede administrarse una vez al día, o el agente AGT dsRNA o el agente polinucleótido antisentido AGT puede administrarse como dos, tres o más subdosis a intervalos apropiados a lo largo del día o incluso utilizando la infusión continua o la administración a través de una formulación de liberación controlada. En algunas modalidades de métodos de la invención, una composición farmacéutica de la invención se administra a un sujeto una o más veces al día, una o más veces a la semana, una o más veces al mes, o una o

más veces al año.

Los métodos de la invención, en algunos aspectos, incluyen la administración de un compuesto farmacéutico solo, en combinación con uno o más agentes d AGT dsRNA o agentes polinucleótidos antisentido AGT, y/o en combinación con otras terapias farmacológicas o actividades o regímenes de tratamiento que se administran a sujetos con una enfermedad o condición asociada a AGT. Los compuestos farmacéuticos pueden administrarse en composiciones farmacéuticas. Las composiciones farmacéuticas utilizadas en los métodos de la invención pueden ser estériles y contener una cantidad de un agente AGT dsRNA o un agente polinucleótido antisentido AGT que reducirá la actividad de un polipéptido AGT a un nivel suficiente para producir la respuesta deseada en una unidad de peso o volumen adecuada para su administración a un sujeto. Una dosis administrada a un sujeto de una composición farmacéutica que incluya un agente AGT dsRNA o un agente polinucleótido antisentido AGT para reducir la actividad de la proteína AGT puede elegirse de acuerdo con diferentes parámetros, en particular de acuerdo con el modo de administración utilizado y el estado del sujeto. Otros factores incluyen el período deseado de tratamiento. En el caso de que la respuesta de un sujeto sea insuficiente con las dosis iniciales aplicadas, se pueden emplear dosis más altas (o dosis efectivamente más altas por una vía de administración diferente y más localizada) en la medida en que la tolerancia del paciente lo permita.

TRATAMIENTO

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "prevenir" o "prevención", cuando se utiliza en referencia a una enfermedad, trastorno o condición que se beneficiaría de la reducción de la expresión del gen AGT, significa que el sujeto tiene menos probabilidades de desarrollar síntomas asociados a dicha enfermedad, y los síntomas asociados a dicha enfermedad, trastorno o condición son causados o asociados a la activación del sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA), como la hipertensión. La probabilidad de desarrollar presión arterial alta se reduce en situaciones en las que, por ejemplo, una persona tiene uno o más factores de riesgo de presión arterial alta pero no desarrolla presión arterial alta o solo desarrolla una

hipertensión menos grave que no desarrolla la enfermedad, trastorno o condición asociada, o una reducción en el desarrollo de síntomas asociados con dicha enfermedad, trastorno o condición (por ejemplo, clínicamente se considera que la profilaxis es eficaz al reducir al menos alrededor del 10% en una escala para tener la enfermedad o condición), o al retrasar la manifestación de los síntomas (por ejemplo, por días, semanas, meses o años).

Sobre la base del promedio de lecturas de presión arterial sentadas tomadas correctamente durante dos o más visitas, un sujeto normotenso tiene una presión arterial sistólica de aproximadamente 90-119 mmHg (alrededor de 12-15,9 kPa (kN/m²)) y una presión arterial diastólica de aproximadamente 60-79 mmHg (aproximadamente 8,0-10,5 kPa (kN/m²)); presión arterial sistólica alrededor de 120-139 mmHg (alrededor de 16,1-18,5 kPa (kN/m²)) en sujetos con prehipertensión, presión arterial sistólica diastólica alrededor de 60-79 mmHg (alrededor de 8,0-10,5 kPa (kN/m²)); sujetos con presión arterial alta (por ejemplo, hipertensión en etapa I) de unos 140-159 mmHg (unos 18,7-21,2 kPa (kN/m²)), una presión arterial diastólica de unos 90-99 mmHg (unos 12,0-13,2 kPa (kN/m²)); una presión arterial sistólica de aproximadamente ≥ 160 mmHg (aproximadamente $\geq 21,3$ kPa (kN/m²)), la presión arterial diastólica es de aproximadamente ≥ 100 mmHg (aproximadamente $\geq 13,3$ kPa (kN/m²)).

En ciertas modalidades, la enfermedad relacionada con el angiotensinógeno es hipertensión esencial. La "hipertensión esencial" es el resultado de factores ambientales o genéticos (por ejemplo, el resultado de una causa médica subyacente aparente).

En ciertas modalidades, el trastorno relacionado con el angiotensinógeno es la hipertensión secundaria. La "hipertensión secundaria" tiene una condición subyacente identificable que puede tener una variedad de etiologías, incluidas causas renales, vasculares y endocrinas, por ejemplo, enfermedad del parénquima renal (por ejemplo, enfermedad renal poliquística renal, glomerular o intersticial), enfermedad vascular renal (por ejemplo, estenosis de la arteria renal, displasia fibromuscular), trastornos endocrinos (por ejemplo, exceso de adrenocorticoides o mineralocorticoides, feocromocitoma, hipertiroidismo o hipotiroidismo, exceso de hormona del crecimiento, paratiroides hipertiroidismo), la coartación de la aorta o el uso de

anticonceptivos orales.

En determinadas modalidades, la enfermedad relacionada con el angiotensinógeno es una emergencia hipertensiva, tal como hipertensión maligna e hipertensión acelerada. "Hipertensión acelerada" se refiere a un aumento grave de la presión arterial (es decir, igual o superior a 180 mmHg sistólica o 110 mmHg diastólica) con daño inmediato a uno o más órganos terminales. La presión arterial debe reducirse inmediatamente para evitar mayores daños a los órganos. "Hipertensión maligna" se refiere a una elevación grave de la presión arterial (es decir, igual o superior a 180 mmHg sistólica o 110 mmHg diastólica) asociada con lesión directa de uno o más órganos terminales y papiledema. La presión arterial debe reducirse inmediatamente para evitar mayores daños a los órganos. El daño a los órganos nerviosos debido a una presión arterial no controlada puede incluir encefalopatía hipertensiva, accidente cerebrovascular/infarto; hemorragia subaracnoidea y/o hemorragia intracraneal. La lesión cardiovascular de órganos terminales puede incluir isquemia/infarto de miocardio, disfunción aguda del ventrículo izquierdo, edema pulmonar agudo y/o disección aórtica. Otros sistemas de órganos también pueden verse afectados por la hipertensión no controlada, que puede provocar insuficiencia o insuficiencia renal aguda, retinopatía, eclampsia o anemia hemolítica microangiopática.

En determinadas modalidades, el trastorno relacionado con el angiotensinógeno es hipertensión aguda. "Hipertensión aguda" significa un aumento severo de la presión arterial (es decir, igual o superior a 180 mmHg sistólica o 110 mmHg diastólica) sin daño directo a uno o más órganos. La presión arterial se puede reducir de forma segura en cuestión de horas.

En determinadas modalidades, el trastorno asociado al angiotensinógeno es hipertensión asociada al embarazo, por ejemplo, hipertensión crónica en el embarazo, hipertensión gestacional, preeclampsia, eclampsia, preeclampsia superpuesta a hipertensión crónica, síndrome de HELLP e hipertensión gestacional (también denominada hipertensión gestacional transitoria, hipertensión crónica). encontrada en la segunda mitad del embarazo y la hipertensión inducida por el embarazo (PIH)). Un sujeto con "hipertensión crónica del embarazo" es un sujeto cuya presión arterial excede

140/90 mmHg antes del embarazo o antes de las 20 semanas de embarazo. La "hipertensión gestacional" o "hipertensión inducida por el embarazo" se refiere a la hipertensión que comienza al final del embarazo (>20 semanas de gestación), sin otras características de preeclampsia, y con normalización posparto de la presión arterial. La "preeclampsia leve" se definió como dos episodios de hipertensión (presión arterial $\geq$ 140/90 mmHg) separados por al menos seis horas en una mujer normotensa antes de las 20 semanas de gestación, pero sin evidencia de daño en los órganos terminales. En sujetos con hipertensión esencial previa, se realizó un diagnóstico de preeclampsia si la presión arterial sistólica aumentaba 30 mm Hg o la presión arterial diastólica aumentaba 15 mm Hg. La "preeclampsia grave" se define como la presencia de uno de los siguientes síntomas o signos en la preeclampsia: dos episodios de presión arterial sistólica de 160 mm Hg o más o presión arterial diastólica de 110 mm Hg o más con al menos 6 horas de diferencia; proteinuria superior a 5 g en 24 horas o superior a 3+ en dos muestras de orina aleatorias recolectadas con al menos 4 horas de diferencia, edema pulmonar o cianosis, oliguria (<400 ml en 24 horas), dolor de cabeza persistente, dolor epigástrico y/o alteración de la función hepática, trombocitopenia, oligohidramnios, crecimiento fetal lento o desprendimiento de placenta. La "eclampsia" se definió como convulsiones no atribuibles a otras causas en mujeres con preeclampsia. El "síndrome HELLP" (también conocido como edema-proteinuria-toxicidad del embarazo hipertensivo tipo B) se refiere a hemólisis, niveles elevados de enzimas hepáticas y niveles reducidos de plaquetas en una embarazada.

En determinadas modalidades, la enfermedad relacionada con el angiotensinógeno es hipertensión refractaria. "Hipertensión refractaria" se refiere a la presión arterial por encima del objetivo (por ejemplo, 140/90 mmHg) a pesar del uso simultáneo de tres clases diferentes de fármacos antihipertensivos, uno de los cuales es un diurético tiazídico. También se consideró que los sujetos cuya presión arterial estaba controlada con cuatro o más medicamentos tenían hipertensión refractaria. Para enfermedades y afecciones asociadas a AGT, donde la reducción del nivel y/o actividad del polipéptido AGT es eficaz en el tratamiento de la enfermedad o condición, los métodos de la invención y los agentes AGT dsRNA se pueden usar para el

tratamiento para inhibir la expresión AGT.

Ejemplos de enfermedades y afecciones que pueden tratarse con los agentes AGT dsRNA o los agentes polinucleótidos antisentido AGT de la invención y los métodos de tratamiento de la invención incluyen, pero no se limitan a: enfermedades de hipertensión, hipertensión, hipertensión límite, hipertensión esencial, hipertensión secundaria, hipertensión sistólica o diastólica aislada, hipertensión asociada al embarazo, hipertensión diabética, hipertensión resistente, hipertensión refractaria, hipertensión paroxística, hipertensión renovascular, hipertensión de Goldblatt, hipertensión ocular, glaucoma, hipertensión pulmonar, hipertensión portal, hipertensión venosa sistémica, hipertensión sistólica, hipertensión inestable; cardiopatía hipertensiva, nefropatía hipertensiva, aterosclerosis, arteriosclerosis, enfermedad vascular, nefropatía diabética, retinopatía diabética, insuficiencia cardíaca crónica, miocardiopatía, miocardiopatía diabética, glomeruloesclerosis, estenosis aórtica, aneurisma aórtico, fibrosis ventricular, insuficiencia cardíaca, infarto de miocardio, angina, accidente cerebrovascular, enfermedad renal, insuficiencia renal, esclerosis sistémica, retraso del crecimiento intrauterino (IUGR), restricción del crecimiento fetal. Dichas enfermedades y afecciones pueden denominarse en el presente documento "enfermedades y afecciones asociadas a AGT". " y "Enfermedades y afecciones causadas y/o moduladas por AGT".

En algunos aspectos de la invención, se puede administrar a un sujeto un agente de AGT dsRNA o un agente polinucleótido antisentido AGT de la invención en una o más ocasiones antes o después del diagnóstico de una enfermedad o condición asociada a AGT. En algunos aspectos de la invención, el sujeto está en riesgo de tener o desarrollar una enfermedad o condición asociada a AGT. Un sujeto en riesgo de desarrollar una enfermedad o condición asociada a AGT es aquel que tiene una mayor probabilidad de desarrollar una enfermedad o condición asociada a AGT en comparación con un riesgo de control de desarrollar una enfermedad o condición asociada a AGT. En algunas realizaciones de la invención, el nivel de riesgo es estadísticamente significativo en comparación con un nivel de control de riesgo. Un sujeto en riesgo puede incluir, por ejemplo: a un sujeto que tiene o tendrá una enfermedad preexistente y/o una anomalía genética que lo hace más

susceptible a una enfermedad o afección asociada a AGT que un sujeto de control sin una enfermedad preexistente o una anomalía genética; a sujetos con antecedentes familiares y/o personales de una enfermedad o afección asociada a AGT; y a sujetos que han sido tratados previamente por una enfermedad o afección asociada a AGT. Debe entenderse que una enfermedad preexistente y/o anomalía genética que hace que un sujeto sea más susceptible a una enfermedad o trastorno relacionado con AGT puede ser una enfermedad o anomalía genética que, cuando está presente, existe una correlación con una mayor probabilidad de que se haya identificado previamente como una enfermedad o afección relacionada con AGT predesarrollada.

Debe entenderse que se puede administrar a un sujeto un agente AGT dsRNA o un agente polinucleótido antisentido AGT en función de la condición médica del sujeto individual. Por ejemplo, un proveedor de atención médica de un sujeto puede evaluar el nivel AGT medido en una muestra obtenida del sujeto y determinar que es deseable reducir el nivel AGT en el sujeto mediante la administración de un agente AGT dsRNA o un agente polinucleótido antisentido AGT de la invención. En un ejemplo no limitativo, se puede obtener una muestra biológica como una muestra de sangre o suero de un sujeto y determinar el nivel AGT del sujeto en la muestra, administrar el agente AGT dsRNA o el agente polinucleótido antisentido AGT al sujeto, obtener una muestra de sangre o suero del sujeto después de la administración, y usar la muestra para determinar los niveles AGT y comparar los resultados con los resultados de la muestra previa a la dosis (anterior) del sujeto. Una disminución posterior en el nivel AGT del sujeto en la muestra en comparación con el nivel anterior a la dosis indica la eficacia del agente AGT dsRNA administrado o del agente polinucleótido antisentido AGT en la reducción del nivel AGT del sujeto. En un ejemplo no limitativo, la presión arterial puede considerarse una característica fisiológica de un trastorno asociado a AGT, incluso si el sujeto no ha sido diagnosticado con un trastorno asociado a AGT, como las enfermedades descritas en este documento. Un proveedor de asistencia sanitaria puede monitorizar los cambios en la presión arterial de un sujeto como medida de la eficacia de un agente AGT dsRNA administrado o un agente polinucleótido antisentido AGT de la invención.

Ciertas modalidades de los métodos de la presente invención incluyen modificar el tratamiento, comprendiendo el tratamiento administrar la presente invención al sujeto basándose al menos en parte en una evaluación de cambios en una o más características fisiológicas de la enfermedad o condición relacionada con AGT en el sujeto resultante del tratamiento reactivo de dsRNA o reactivo de polinucleótido antisentido AGT. Por ejemplo, en algunas modalidades de la presente invención, el efecto del reactivo dsRNA de la presente invención o del agente polinucleótido antisentido AGT administrado al sujeto puede determinarse y utilizarse para ayudar a regular la cantidad del reactivo dsRNA o del agente polinucleótido antisentido AGT de la presente invención administrado al sujeto posteriormente. En un ejemplo no limitativo, a un sujeto se le administra un agente dsRNA o un agente polinucleótido antisentido AGT de la invención y, tras la administración, se mide la presión arterial del sujeto; y basado, al menos en parte, en los niveles determinados, se confirma si se requiere una mayor cantidad de agente dsRNA o un agente polinucleótido antisentido AGT para mejorar el efecto fisiológico del agente administrado, como reducir o disminuir aún más la presión arterial de un sujeto. En otro ejemplo no limitativo, se administra a un sujeto un agente de dsRNA o un agente polinucleótido antisentido AGT de la invención y la presión arterial del sujeto se determina después de la administración, basándose, al menos en parte, en los niveles determinados y el efecto deseado en el sujeto es que se administren cantidades menores de agentes dsRNA o agentes polinucleótidos antisentido AGT.

En consecuencia, algunas modalidades de la invención incluyen la evaluación de los cambios en una o más características fisiológicas resultantes del tratamiento previo de un sujeto para ajustar la cantidad de un agente dsRNA o un agente polinucleótido antisentido AGT de la invención administrado posteriormente al sujeto. Algunas modalidades de los métodos de la invención comprenden 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más determinaciones de las características fisiológicas de una enfermedad o condición asociada a AGT; evaluar y/o monitorizar la eficacia de la administración de un agente AGT dsRNA o agentes polinucleótidos antisentido AGT de la invención; y, opcionalmente, utilizar los resultados determinados para ajustar uno o más de los siguientes: el agente dsRNA o el agente polinucleótido antisentido AGT de

la invención trata la eficacia de una enfermedad o condición asociada a AGT en una dosificación, régimen de dosificación y/o frecuencia de dosificación de un sujeto. En algunas modalidades de los métodos de la invención, el resultado deseado de administrar a un sujeto una cantidad efectiva de un agente dsRNA o un agente polinucleótido antisentido AGT de la invención es: una disminución de la presión arterial del sujeto en comparación con la presión arterial previa determinada para el sujeto; la presión sanguínea del sujeto está dentro del rango normotenso.

Tal como se utilizan en el presente documento, los términos "tratar", "tratado" o "tratando" cuando se utilizan con respecto a una enfermedad o condición asociada a AGT pueden referirse a un tratamiento profiláctico que disminuye la probabilidad de que un sujeto desarrolle la enfermedad o condición asociada a AGT, y también pueden referirse a un tratamiento con posterioridad a que el sujeto haya desarrollado una enfermedad o condición asociada a AGT con el fin de eliminar o reducir el nivel de la enfermedad o condición asociada a AGT, prevenir que la enfermedad o condición asociada a AGT se vuelva más avanzado (por ejemplo, más grave) y/o retardar la progresión de la enfermedad o condición asociada a AGT en un sujeto en comparación con el sujeto en ausencia de la terapia para reducir la actividad en el sujeto del polipéptido AGT.

Ciertas modalidades de agentes, composiciones y métodos de la invención pueden utilizarse para inhibir la expresión génica AGT. Tal como se utilizan en el presente documento en referencia a la expresión de un gen AGT, los términos "inhibir", "silenciar", "reducir", "disminuir" y "eliminar" significan la expresión del gen AGT, medida por uno o más de: un nivel de RNA transcrito del gen, un nivel de actividad AGT expresado y un nivel de polipéptido, proteína o subunidad proteica AGT traducida del mRNA en una célula, grupo de células, tejidos, órganos o sujetos en los que se transcribe el gen AGT, se reduce cuando la célula, grupo de células, tejido, órgano o sujeto entra en contacto (por ejemplo, siendo tratado) con un agente AGT dsRNA de la invención, en comparación con un nivel de control de RNA transcrito del gen AGT, un nivel de actividad AGT expresado, o un nivel AGT traducido del mRNA, respectivamente. En algunas modalidades, un nivel de control es un nivel en una célula, tejido, órgano o sujeto que no ha sido contactado (por ejemplo,

siendo tratado) con el agente AGT dsRNA o el agente polinucleótido antisentido AGT.

MÉTODOS DE ADMINISTRACIÓN

Se dispone de una variedad de vías de administración para un agente AGT dsRNA o un agente polinucleótido antisentido AGT para su uso en los métodos de la invención. El modo de administración particular seleccionado dependerá, al menos en parte, de la condición particular que se esté tratando y de la dosis requerida para la eficacia terapéutica. Los métodos de esta invención, en términos generales, pueden practicarse utilizando cualquier modo de administración que sea médicamente aceptable, es decir, cualquier modo que produzca niveles efectivos de tratamiento de una enfermedad o condición asociada a AGT sin causar efectos adversos clínicamente inaceptables. En algunas modalidades de la invención, se puede administrar un agente AGT dsRNA o un agente polinucleótido antisentido AGT por vía oral, enteral, mucosa, subcutánea y/o parenteral. El término "parenteral" incluye técnicas de inyección o infusión subcutáneas, intravenosas, intratecales, intramusculares, intraperitoneales e intraesternales. Otras vías incluyen, entre otras, nasal (por ejemplo, a través de un tubo gastronasal), dérmica, vaginal, rectal, sublingual e inhalación. Las vías de administración de la invención pueden incluir intratecal, intraventricular o intracraneal. En algunas modalidades de la invención, un agente AGT dsRNA o un agente polinucleótido antisentido AGT puede colocarse dentro de una matriz de liberación lenta y administrarse mediante la colocación de la matriz en el sujeto. En algunos aspectos de la invención, un agente AGT dsRNA o un agente polinucleótido antisentido AGT puede ser administrado a una célula sometida utilizando nanopartículas recubiertas con un agente de liberación que se dirige a una célula u orgánulo específico. En la técnica se conocen varios medios de administración, métodos y agentes. Además, en otras partes del presente documento se proporcionan ejemplos no limitativos de métodos de administración y agentes de administración. En algunos aspectos de la invención, el término "administración" en referencia a un agente AGT dsRNA o un agente polinucleótido antisentido AGT puede significar la administración a una célula o sujeto de una o más secuencias "desnudas" de agente AGT dsRNA o agente polinucleótido antisentido AGT y en ciertos aspectos de la

invención "administración" significa la administración a una célula o sujeto a través de medios de transfección, la administración de una célula que comprende un agente AGT dsRNA o un agente polinucleótido antisentido AGT a un sujeto, la administración de un vector que codifica un agente AGT dsRNA o un agente polinucleótido antisentido AGT en una célula y/o sujeto, etc. La administración de un agente AGT dsRNA o un agente polinucleótido antisentido AGT utilizando un medio de transfección puede incluir la administración de un vector a una célula y/o sujeto.

En algunas modalidades de la presente invención, uno o más agentes AGT dsRNA o agentes polinucleótidos antisentido AGT pueden administrarse en formulaciones, también pueden administrarse en soluciones farmacéuticamente aceptables, pudiendo contener rutinariamente concentraciones farmacéuticamente aceptables de sal, agentes tampón, conservantes, portadores compatibles, adyuvantes y, opcionalmente, otros ingredientes terapéuticos. En algunas modalidades de la invención, un agente AGT dsRNA o un agente polinucleótido antisentido AGT puede formularse con otro agente terapéutico para la administración simultánea. De acuerdo con los métodos de la invención, se puede administrar un agente AGT dsRNA o un agente polinucleótido antisentido AGT en una composición farmacéutica. En general, una composición farmacéutica comprende un agente AGT dsRNA o un agente polinucleótido antisentido AGT y, opcionalmente, un portador farmacéuticamente aceptable. Los portadores farmacéuticamente aceptables son bien conocidos por aquellos con habilidades ordinarias en la técnica. Tal como se utiliza en el presente documento, un portador farmacéuticamente aceptable significa un material no tóxico que no interfiere con la eficacia de la actividad biológica de los ingredientes activos, por ejemplo, la capacidad del agente AGT dsRNA o del agente polinucleótido antisentido AGT para inhibir la expresión del gen AGT en una célula o sujeto. En la técnica se conocen numerosos métodos para administrar y entregar agentes de DsRNA o agentes polinucleótidos antisentido AGT para uso terapéutico y pueden utilizarse en los métodos de la invención.

Los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen diluyentes, cargas, sales, tampones, estabilizadores, solubilizantes y otros materiales que son bien conocidos en la técnica. Se describen vehículos farmacéuticamente

aceptables ejemplares en las patentes de EE.UU. Los expertos en la técnica conocen las patentes de EE.UU. 5.211.657 y otras. Tales preparaciones pueden contener habitualmente sal, agentes tampón, conservantes, vehículos compatibles y opcionalmente otros agentes terapéuticos. Cuando se usan en medicina, las sales deben ser farmacéuticamente aceptables, pero pueden usarse convenientemente sales no farmacéuticamente aceptables para preparar sales farmacéuticamente aceptables de las mismas y no están excluidas del alcance de la invención. Dichas sales farmacológica y farmacéuticamente aceptables incluyen, entre otras, aquellas preparadas a partir de los siguientes ácidos: clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico, nítrico, fosfórico, maleico, acético, salicílico, cítrico, fórmico, malónico, succínico y similares. Además, se pueden preparar sales farmacéuticamente aceptables como sales de metales alcalinos o alcalinotérreos, tales como sales de sodio, potasio o calcio.

Algunas modalidades de los métodos de la invención incluyen la administración de uno o más agentes AGT dsRNA o agentes polinucleótidos antisentido AGT directamente a un tejido. En algunas modalidades, el tejido al que se administra el compuesto es un tejido en el que la enfermedad o condición asociada a AGT está presente o es probable que surja, ejemplos no limitantes de los cuales son el hígado o el riñón. La administración directa al tejido se puede lograr mediante inyección directa u otros medios. Muchos compuestos administrados por vía oral viajan naturalmente hacia y a través del hígado y los riñones y algunas modalidades de los métodos de tratamiento de la invención incluyen la administración oral de uno o más agentes AGT dsRNA a un sujeto. Los agentes AGT dsRNA o agentes polinucleótidos antisentido AGT, solos o junto con otros agentes terapéuticos, se pueden administrar una vez o, alternativamente, se pueden administrar en una pluralidad de administraciones. Si se administra varias veces, el agente AGT dsRNA o el agente de polinucleótido antisentido AGT se pueden administrar a través de diferentes vías. Por ejemplo, aunque no se pretende que sea limitante, una primera (o varias primeras) administraciones pueden realizarse por medios subcutáneos y una o más administraciones adicionales pueden ser administraciones orales y/o sistémicas.

Para modalidades de la invención en las que es deseable administrar

sistémicamente un agente AGT dsRNA o un agente de polinucleótido antisentido AGT, el agente AGT dsRNA o el agente de polinucleótido antisentido AGT se pueden formular para administración parenteral mediante inyección, por ejemplo, mediante inyección en bolo o infusión continua. Las formulaciones para inyección pueden presentarse en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, en ampollas o en envases multidosis, con o sin conservante añadido. Las formulaciones de agentes AGT dsRNA (también denominadas composiciones farmacéuticas) pueden tomar formas tales como suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos, y pueden contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes.

Las preparaciones para administración parenteral incluyen soluciones, suspensiones y emulsiones acuosas o no acuosas estériles. Ejemplos de disolventes no acuosos son propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales como el aceite de oliva y ésteres orgánicos inyectables como el oleato de etilo. Los vehículos acuosos incluyen agua, soluciones, emulsiones o suspensiones alcohólicas/acuosas, incluidos medios salinos y tamponados. Los vehículos parenterales incluyen solución de cloruro de sodio, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro de sodio, Ringer lactato o aceites fijos. Los vehículos intravenosos incluyen reponedores de líquidos y nutrientes, reponedores de electrolitos (tales como los basados en dextrosa de Ringer) y similares. También pueden estar presentes conservantes y otros aditivos tales como, por ejemplo, antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes y gases inertes y similares. Se obtendrán dosis más bajas con otras formas de administración, como la administración intravenosa. En el caso de que una respuesta en un sujeto sea insuficiente a las dosis iniciales aplicadas, se pueden emplear dosis más altas (o dosis efectivamente más altas por una vía de administración diferente y más localizada) en la medida que lo permita la tolerancia del paciente. Se pueden usar múltiples dosis por día según sea necesario para lograr niveles sistémicos o locales apropiados de uno o más agentes AGT dsRNA o agentes polinucleótidos antisentido AGT y para lograr una reducción apropiada en la actividad de la proteína AGT.

Aún en otras modalidades, los métodos de la invención incluyen el uso de un vehículo de administración tal como una micropartícula,

nanopartícula o implante biocompatible adecuado para su implantación en un receptor, por ejemplo, un sujeto. Implantes bioerosionables ejemplares que pueden ser útiles de acuerdo con este método se describen en la publicación PCT número WO 95/24929 (incorporada aquí como referencia), que describe una matriz polimérica biodegradable y biocompatible para contener una macromolécula biológica.

En los métodos de la invención se pueden usar matrices poliméricas tanto biodegradables como no biodegradables para administrar uno o más agentes AGT dsRNA o agentes polinucleótidos antisentido AGT a un sujeto. En algunas modalidades, una matriz puede ser biodegradable. Los polímeros de matriz pueden ser polímeros naturales o sintéticos. Se puede seleccionar un polímero basándose en el período de tiempo durante el cual se desea la liberación, generalmente del orden de unas pocas horas a un año o más. Normalmente, se puede utilizar la liberación durante un período que oscila entre unas pocas horas y tres a doce meses. El polímero opcionalmente está en forma de un hidrogel que puede absorber hasta aproximadamente el 90% de su peso en agua y, además, opcionalmente está reticulado con iones multivalentes u otros polímeros.

En general, los agentes AGT dsRNA o los agentes polinucleótidos antisentido AGT pueden administrarse en algunas modalidades de la invención utilizando el implante bioerosionable por medio de difusión o por degradación de la matriz polimérica. Los polímeros sintéticos ejemplares para tal uso son bien conocidos en la técnica. Los polímeros biodegradables y los polímeros no biodegradables se pueden utilizar para la administración de agentes AGT dsRNA o agentes polinucleótidos antisentido AGT utilizando métodos conocidos en la técnica. Los polímeros bioadhesivos, como los hidrogeles bioerosionables (H. S. Sawhney, C. P. Pathak and J. A. Hubell in *Macromolecules*, 1993, 26, 581-587) también pueden utilizarse para administrar agentes AGT dsRNA o agentes polinucleótidos antisentido AGT para el tratamiento de una enfermedad o condición asociada a AGT. Otros sistemas de administración adecuados pueden incluir sistemas de liberación prolongada, liberación retardada o liberación sostenida. Dichos sistemas pueden evitar la administración repetida de un agente AGT dsRNA o un agente polinucleótido antisentido AGT, lo que aumenta la comodidad para el sujeto y

el profesional de la atención médica. Hay muchos tipos de sistemas de liberación disponibles y conocidos por aquellos con habilidades ordinarias en la técnica. Véase, por ejemplo: Patentes de EE.UU. Nos. 5.075.109; 4.452.775; 4.675.189; 5.736.152; 3.854.480; 5.133.974; y 5.407.686. Además, se pueden utilizar sistemas de suministro de hardware basados en bombas, algunos de los cuales están adaptados para la implantación.

El uso de un implante de liberación sostenida a largo plazo puede ser adecuado para el tratamiento profiláctico de sujetos y para sujetos con riesgo de desarrollar una enfermedad o condición recurrente asociada a AGT. La liberación a largo plazo, tal como se utiliza en el presente documento, significa que el implante se construye y organiza para administrar un nivel terapéutico de un agente AGT dsRNA o un agente polinucleótido antisentido AGT durante al menos 10 días, 20 días, 30 días, 60 días, 90 días, seis meses, un año o más. Los implantes de liberación sostenida a largo plazo son comúnmente conocidos por aquellos con habilidades ordinarias en la técnica e incluyen algunos de los sistemas de liberación descritos anteriormente.

Las formulaciones terapéuticas de agentes AGT dsRNA o agentes polinucleótidos antisentido AGT pueden prepararse para su almacenamiento mezclando la molécula o el compuesto que tenga el grado deseado de pureza con portadores, excipientes o estabilizadores opcionales farmacéuticamente aceptables [Remington's Pharmaceutical Sciences 21st edition, (2006)], en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Los portadores, excipientes o estabilizadores aceptables no son tóxicos para los receptores en las dosis y concentraciones empleadas, e incluyen tampones como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes como el ácido ascórbico y la metionina; conservantes (como cloruro de octadecildimetilbencil amonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio; fenol, butílico o alcohol bencílico; alquilparabenos como metilo o propilparabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de 10 residuos); proteínas, como la albúmina sérica, la gelatina o las inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos como la polivinilpirrolidona; aminoácidos como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros hidratos de carbono, como la glucosa, la manosa o las dextrinas; agentes quelantes como el EDTA;

azúcares como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sal, como el sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos de proteínas Zn); y/o tensioactivos no iónicos como TWEEN®, PLURONICS® o polietilenglicol (PEG).

CÉLULAS, SUJETOS Y CONTROLES

Los métodos de la invención pueden utilizarse conjuntamente con células, tejidos, órganos y/o sujetos. En algunos aspectos de la invención, un sujeto es un mamífero humano o vertebrado, incluidos, entre otros, un perro, un gato, un caballo, una vaca, una cabra, un ratón, una rata y un primate, por ejemplo, un mono. Por lo tanto, la invención se puede utilizar para tratar enfermedades o afecciones asociadas a AGT en sujetos humanos y no humanos. En algunos aspectos de la invención, un sujeto puede ser un animal de granja, un animal de zoológico, un animal domesticado o un animal no domesticado, y los métodos de la invención pueden utilizarse en regímenes de prevención y tratamiento veterinarios. En algunas modalidades de la invención, el sujeto es un ser humano y los métodos de la invención pueden utilizarse en regímenes humanos de prevención y tratamiento.

Ejemplos no limitativos de sujetos a los que se puede aplicar la presente invención son sujetos diagnosticados, sospechosos de tener o en riesgo de tener una enfermedad o condición asociada con una expresión y/o actividad AGT superior a la deseable, también denominada "niveles elevados de expresión AGT". En otra parte del presente documento se describen ejemplos no limitativos de enfermedades y afecciones asociadas con niveles de expresión y/o actividad AGT superiores a los deseables. Los métodos de la invención pueden aplicarse a un sujeto que, en el momento del tratamiento, ha sido diagnosticado con la enfermedad o condición asociada con una expresión y/o actividad AGT superior a la deseable, o a un sujeto que se considera en riesgo de tener o desarrollar una enfermedad o condición asociada con una expresión y/o actividad AGT superior a la deseable. En algunos aspectos de la invención, una enfermedad o condición asociada con un nivel de expresión y/o actividad AGT superior al deseable es una enfermedad o condición aguda, y en ciertos aspectos de la invención una enfermedad o condición asociada con un nivel de expresión y/o actividad AGT más alto de lo deseable es una

enfermedad o condición crónica.

En un ejemplo no limitante, un agente AGT dsRNA de la invención se administra a un paciente diagnosticado con hipertensión, incluyendo hipertensión esencial, hipertensión secundaria, emergencias hipertensivas tales como hipertensión maligna y presión arterial hipertensiva acelerada, hipertensión aguda, hipertensión relacionada con el embarazo, e hipertensión refractaria. Los métodos de la invención son aplicables a sujetos a los que se les ha diagnosticado, o se considera que están en riesgo de tener o desarrollar, la enfermedad o condición en el momento del tratamiento.

En otro ejemplo no limitante, el reactivo AGT dsRNA de la presente invención se administra para tratar una enfermedad o trastorno causado por o relacionado con la activación del sistema renina-angiotensina-aldosterona (RAAS), o una enfermedad o trastorno cuyos síntomas o progresión son en respuesta a la inactivación del RAAS. El término "enfermedad relacionada con angiotensinógenos" incluye enfermedades, trastornos o afecciones que se benefician de la expresión reducida AGT. Estos trastornos se asocian a menudo con presión arterial alta. Ejemplos no limitantes de enfermedades relacionadas con angiotensinógenos incluyen hipertensión, por ejemplo, hipertensión límite (también conocida como prehipertensión), hipertensión esencial (también conocida como hipertensión nativa o hipertensión esencial), hipertensión secundaria (también conocida como hipertensión no nativa), hipertensión sistólica o diastólica aislada, hipertensión asociada al embarazo (por ejemplo, preeclampsia, eclampsia y preeclampsia posparto), hipertensión diabética, hipertensión resistente, hipertensión refractaria, hipertensión paroxística, hipertensión renovascular (también conocida como hipertensión renal), hipertensión de Goldblatt, hipertensión ocular, glaucoma, hipertensión pulmonar, hipertensión portal, hipertensión venosa sistémica, hipertensión sistólica, hipertensión inestable, enfermedad cardíaca hipertensiva, nefropatía hipertensiva, aterosclerosis, arteriosclerosis, enfermedad vascular (incluida la enfermedad vascular periférica), nefropatía diabética, retinopatía diabética, insuficiencia cardíaca crónica, miocardiopatía, miocardiopatía diabética, glomeruloesclerosis, coartación de la aorta, aneurisma aórtico, fibrosis ventricular, apnea del sueño, insuficiencia cardíaca (por ejemplo, disfunción sistólica del ventrículo izquierdo), infarto de miocardio, angina de pecho,

accidente cerebrovascular, enfermedad renal (por ejemplo, enfermedad renal crónica o nefropatía diabética, opcionalmente en el caso del embarazo), insuficiencia renal (por ejemplo, insuficiencia renal crónica), trastornos cognitivos (por ejemplo, enfermedad de Alzheimer) y esclerosis sistémica (por ejemplo, crisis renal por esclerodermia). En algunos casos, el trastorno asociado a la AGT comprende el retraso del crecimiento intrauterino (IUGR) o restricción del crecimiento fetal.

Una célula a la que se pueden aplicar métodos de la invención incluye células que son células in vitro, in vivo, ex vivo. Las células pueden estar en un sujeto, en cultivo y/o en suspensión, o en cualquier otro estado o condición adecuada. Las células a las que se puede aplicar el método de la presente invención pueden ser: células hepáticas (liver cell), hepatocitos (hepatocyte), células cardíacas, células pancreáticas, células cardiovasculares, células renales u otros tipos de células de vertebrados, incluidas células animales de mamíferos humanos y no humanos. En ciertos aspectos de la invención, las células a las que se aplican los métodos de la invención son células normales sanas que no se sabe que sean células enfermas. En ciertas modalidades de la invención, los métodos y composiciones de la invención se aplican a células del hígado, hepatocitos, células cardíacas, células del páncreas, células cardiovasculares y/o células renales. En algunos aspectos de la presente invención, las células de control son células normales, pero debe entenderse que las células con enfermedades o afecciones también pueden utilizarse como células de control en casos específicos, como en el caso de que las células tratadas con enfermedad o dolencia sean el resultado de células no tratadas con enfermedad o condición, etc.

De acuerdo con los métodos de la invención, el nivel de actividad polipeptídica AGT puede determinarse y compararse con un nivel de control de actividad polipeptídica AGT. Un control puede ser un valor predeterminado, el cual puede adoptar diversas formas. Puede ser un punto de corte único, como el mediano o el promedio. Se puede establecer a partir de la comparación de grupos, por ejemplo, en un grupo con niveles normales de polipéptidos AGT y/o actividad polipeptídica AGT y un grupo con niveles aumentados de polipéptidos AGT y/o actividad polipeptídica AGT. Otro ejemplo no limitativo de

un grupo de comparación puede ser una población con uno o más síntomas o diagnóstico de una enfermedad o condición asociada a AGT frente a una población sin uno o más síntomas o diagnóstico de una enfermedad o condición; un grupo de sujetos a los cuales se les administró el tratamiento de siRNA de la presente invención y un grupo de sujetos a los cuales no se les administró el tratamiento de siRNA de la presente invención. Por lo general, los controles pueden basarse en individuos normales aparentemente sanos o en células aparentemente sanas en un grupo de edad apropiado. Debe entenderse que, además de los valores predeterminados, un control de acuerdo con la invención puede ser una muestra de material ensayado en paralelo con el material experimental. Algunos ejemplos son las muestras de una población de control o las muestras de control producidas por la fabricación para realizar pruebas paralelas con muestras experimentales. En algunas modalidades de la presente invención, los controles pueden incluir células o controles que no han sido tocados o tratados con el reactivo AGT dsRNA de la presente invención, en cuyo caso se pueden comparar los niveles de control del polimorfismo AGT y/o la actividad polipeptídica AGT y los niveles de polimorfismo AGT y/o actividad polipeptídica AGT en células o controles en contacto con el reactivo AGT dsRNA o el reactivo polinucleótido antisentido AGT de la presente invención.

En algunas modalidades de la invención, el nivel de control puede ser un nivel de polipéptido AGT determinado para un sujeto, en el que el nivel de polipéptido AGT determinado para el mismo sujeto en diferentes momentos se compara con el nivel de control. En un ejemplo no limitativo, el nivel AGT se determina en una muestra biológica obtenida de un sujeto que no ha recibido el tratamiento AGT de la presente invención. En algunas modalidades, la muestra biológica es una muestra de suero. Los niveles de polipéptidos AGT determinados en una muestra obtenida de un sujeto pueden servir como valor de referencia o de control para el sujeto. Después de una o más administraciones de un agente AGT dsRNA a un sujeto en los métodos de tratamiento de la invención, se pueden obtener una o más muestras de suero adicionales del sujeto, y los niveles de polipéptidos AGT en una o más muestras subsiguientes se pueden comparar con el nivel de control/basal del sujeto. Estas comparaciones pueden utilizarse para evaluar la aparición,

progresión o regresión de una enfermedad o condición asociada a AGT en un sujeto. Por ejemplo, un nivel de polipéptido AGT en una muestra de referencia obtenida de un sujeto que es superior al nivel obtenido del mismo sujeto después de la administración de un agente AGT dsRNA o un agente polinucleótido antisentido AGT de la invención al sujeto indica la regresión de la enfermedad o condición asociada a AGT e indica la eficacia del agente AGT dsRNA administrado de la presente invención en el tratamiento de una enfermedad o condición asociada a AGT.

En algunos aspectos de la invención, los valores de uno o más niveles de actividad del polipéptido AGT y/o del polipéptido AGT determinados para un sujeto pueden servir como valores de control para la comparación posterior de los niveles del polipéptido AGT y/o de la actividad AGT, en ese mismo sujeto, permitiendo así la evaluación de los cambios a partir de una actividad polipeptídica AGT "basal" en un sujeto. Por lo tanto, un nivel inicial de polipéptido AGT y/o un nivel inicial de actividad polipeptídica AGT pueden estar presentes y/o determinados en un sujeto y los métodos y compuestos de la invención pueden utilizarse para disminuir el nivel de actividad del polipéptido AGT y/o del polipéptido AGT en el sujeto, sirviendo el nivel inicial como nivel de control para ese sujeto.

Utilizando los métodos de la invención, se puede administrar a un sujeto un agente AGT dsRNA y/o un agente polinucleótido antisentido AGT de la invención. Dichos agentes dsRNAi incluyen, por ejemplo, los dúplex AD00051 a AD00122-19-2, AD00163-3, AV01227 a AV01257, AV01711 exhibidos en la Tabla 1. En algunas modalidades, los agentes dsRNAi preferidos incluyen, por ejemplo, dúplex AD00158, AD00163, AD00163-3, AD00159, AD00290, AD00300 o AD00122. En otras modalidades, los agentes dsRNAi preferidos incluyen, por ejemplo, AD00158-1, AD00158-2, AD00163-1, AD00159-1 o AD00300-1. En otras modalidades, tales agentes dsRNAi incluyen variantes dúplex, por ejemplo, variantes de AD00158 dúplex, AD00163, AD00163-3, AD00159, AD00290, AD00300 o AD00122. La eficacia de la administración y el tratamiento de la invención puede evaluarse en comparación con el nivel previo a la dosis del polipéptido AGT en una muestra de suero obtenida de un sujeto en un momento anterior, o con el nivel de un control sin contacto (por ejemplo, el nivel de polipéptido AGT en una muestra

de suero de control). Por el contrario, cuando se administra y trata, el nivel del polipéptido AGT en una muestra de suero obtenida del sujeto se reduce en al menos un 0,5%, 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o más. Se entiende que tanto el nivel de polipéptido AGT como el nivel de actividad polipeptídica AGT se correlacionan con el nivel de expresión génica AGT. Ciertas modalidades de los métodos de la invención comprenden la administración a un sujeto de un AGT dsRNA y/o un agente antisentido AGT de la invención en una cantidad eficaz para inhibir la expresión del gen AGT, reduciendo así el nivel de polipéptido AGT y reduciendo el nivel de actividad polipeptídica AGT en el sujeto.

Algunas modalidades de la invención incluyen la determinación de la presencia, ausencia y/o cantidad (también denominada en el presente como nivel) de un polipéptido AGT en una o más muestras biológicas obtenidas de uno o más sujetos. Este ensayo puede utilizarse para evaluar la eficacia de los métodos terapéuticos de la invención. Por ejemplo, los métodos y composiciones de la invención pueden utilizarse para determinar el nivel de un polipéptido AGT en una muestra biológica obtenida de un sujeto previamente tratado con la administración de un agente AGT dsRNA y/o un agente antisentido AGT de la invención. Después de la administración y el tratamiento, se compara con el nivel previo a la administración del polipéptido AGT en una muestra de suero obtenida del sujeto en un momento anterior, o se compara con el nivel de un control sin contacto (por ejemplo, el nivel de polipéptido AGT en una muestra de suero de control). El nivel de polipéptido AGT en la muestra de suero se reduce en al menos un 0,5%, 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o más, lo que indica el nivel de eficacia del tratamiento administrado al sujeto.

En algunas modalidades de la invención, las características fisiológicas de una enfermedad o condición asociada a AGT determinada para un sujeto se pueden utilizar como resultado de control, y la determinación de las características fisiológicas del mismo sujeto en diferentes momentos se puede comparar con los resultados de control. En un ejemplo no limitativo, la presión arterial (y/u otras características fisiológicas de una enfermedad o condición AGT) se mide a partir de un sujeto al que nunca se le ha administrado un tratamiento AGT de la invención, pudiendo utilizarse como valor de

referencia o de control para el sujeto. Tras la administración de uno o más agentes AGT dsRNA a un sujeto en los métodos de tratamiento de la invención, se mide la presión arterial y se compara con los niveles de control/basales del sujeto, respectivamente. Estas comparaciones pueden utilizarse para evaluar la aparición, progresión o regresión de una enfermedad o condición asociada a AGT en un sujeto. Por ejemplo, una presión arterial basal obtenida de un sujeto que es más alta que la presión arterial medida del mismo sujeto después de la administración de un agente AGT dsRNA o un agente polinucleótido antisentido AGT de la invención al sujeto indica una regresión de la enfermedad o condición asociada a AGT y representa la eficacia del agente AGT dsRNA administrado de la invención en el tratamiento de la enfermedad o trastorno relacionado con AGT.

En algunos aspectos de la invención, el valor determinado para un sujeto para una o más características fisiológicas de una enfermedad o condición asociada a AGT puede servir como un valor de control para la comparación posterior de las características fisiológicas del mismo sujeto, permitiendo así la evaluación de los cambios de "línea base" de un sujeto en las características fisiológicas. Por lo tanto, se puede obtener un perfil fisiológico inicial en un individuo, el ensayo del perfil fisiológico inicial se usa como control para ese sujeto, y se muestra y/o se determina que los métodos y compuestos de la invención son útiles para reducir el nivel de polipéptido AGT y/o el efecto de la actividad polipeptídica AGT en el sujeto. Utilizando los métodos de la invención, los agentes AGT dsRNA y/o los agentes polinucleótidos antisentido AGT de la invención se pueden administrar a un sujeto en una cantidad eficaz para tratar una enfermedad o condición AGT. La eficacia de las administraciones y tratamientos de la invención se pueden evaluar determinando cambios en una o más características fisiológicas de una enfermedad o condición AGT. En un ejemplo no limitante, la presión arterial del sujeto se reduce en al menos 0,5 mmHg, 1 mmHg, 2 mmHg, 3 mmHg, 4 mmHg, 5 mmHg, 6 mmHg, 7 mmHg, 8 mmHg, 9 mmHg, 10 mmHg, 11 mmHg, 12 mmHg, 13 mmHg, 14 mmHg, 15 mmHg, 16 mmHg, 17 mmHg, 18 mmHg, 19 mmHg, 20 mmHg o más hasta que la presión arterial del sujeto esté dentro del rango normal.

Algunas modalidades de la invención incluyen determinar la

presencia, ausencia y/o cambios en las características fisiológicas de una enfermedad o condición asociada a AGT utilizando métodos tales como, entre otros: (1) medir la presión arterial de un sujeto; (2) Características fisiológicas de una o más muestras biológicas obtenidas de múltiples sujetos; (3) o examen físico de los sujetos. Este ensayo se puede utilizar para evaluar la eficacia de los métodos terapéuticos de la invención.

KITS

También dentro del alcance de la invención se encuentran los kits que comprenden uno o más agentes AGT dsRNA y/o agentes polinucleótidos antisentido AGT y las instrucciones para su uso en métodos de la invención. Los kits de la invención pueden incluir uno o más de un agente AGT dsRNA, un polinucleótido sentido AGT y un agente polinucleótido antisentido AGT que pueden utilizarse para tratar una enfermedad o condición asociada a AGT. Los kits que contienen uno o más agentes AGT dsRNA, polinucleótidos sentido AGT y agentes polinucleótidos antisentido AGT pueden prepararse para su uso en los métodos de tratamiento de la invención. Los componentes de los kits de la invención pueden envasarse en un medio acuoso o en forma liofilizada. Un kit de la invención puede comprender un portador compartimentado para recibir en estrecho confinamiento en el mismo, uno o más medios recipientes o series de medios recipientes tales como tubos de ensayo, viales, matraces, frascos, jeringas o similares. Un primer medio contenedor o una serie de medios contenedores puede contener uno o más compuestos, como un agente AGT dsRNA y/o un agente polinucleótido antisentido o antisentido AGT. Un segundo medio contenedor o una serie de medios contenedores puede contener un agente de orientación, un agente de etiquetado, un agente de administración, etc. que puede incluirse como una porción de un agente AGT dsRNA y/o un polinucleótido antisentido AGT para ser administrado en una modalidad de un método de tratamiento de la invención.

Un kit de la invención también puede incluir instrucciones. Por lo general, las instrucciones se darán por escrito y proporcionarán orientación para llevar a cabo un tratamiento incorporado en el kit y para tomar una determinación basada en ese tratamiento.

Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar casos

específicos de la práctica de la presente invención y no pretenden limitar el alcance de la invención. Como será evidente para alguien con habilidad ordinaria en la técnica, la presente invención encontrará aplicación en una variedad de composiciones y métodos.

EJEMPLOS DE IMPLEMENTACIÓN

EJEMPLO DE IMPLEMENTACIÓN 1. SÍNTESIS DEL AGENTE RNAI

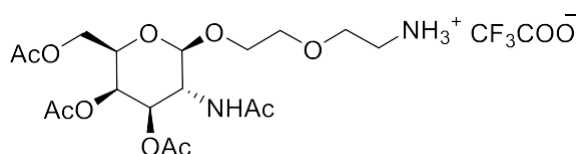
Los dúplex del agente AGT RNAi que se muestran en las Tablas 2-4 que anteceden se sintetizaron de acuerdo con el siguiente procedimiento general:

Las secuencias de hebras sentido y antisentido de siRNA se sintetizaron en sintetizadores de oligonucleótidos utilizando un método de síntesis en fase sólida bien establecido basado en la química de fosforamidita. La propagación de la hebra de oligonucleótidos se logra a través de ciclos de 4 pasos: desprotección, condensación, taponamiento y una etapa de oxidación o sulfuración para la adición de cada nucleótido. Las síntesis se realizaron sobre un soporte sólido de vidrio de poro controlado (CPG, 1000 Å). Los monómeros fosforamiditos se adquirieron en fuentes comerciales. Las fosforamiditas con el grupo de ligandos GalNAc (GLPA1 y GLPA2 como ejemplos no limitativos) se sintetizaron de acuerdo con los procedimientos de los ejemplos de implementación 2-3 del presente documento. En el caso de los siRNAs utilizados para el cribado in vitro (Tabla 2), las síntesis se llevaron a cabo a una escala de 2 µmol, y en el caso de los siRNAs utilizados para las pruebas in vivo (Tabla 3, 4), las síntesis se llevaron a cabo a una escala de 5 µmol o mayor. En el caso de que el ligando de GalNAc (GLO-0 como ejemplo no limitativo) se adhiriera al extremo 3' de la hebra sentido, se utilizó un soporte sólido de CPG unido al ligando de GalNAc. En el caso de que el ligando GalNAc (GLS-1 o GLS-2 como ejemplo no limitativo) se adhiriera al extremo 5' de la hebra sentido, se utilizó una fosforamidita de GalNAc (GLPA1 o GLPA2 como ejemplo no limitativo) para la última reacción de acoplamiento. Se utilizó ácido tricloroacético (TCA) al 3% en diclorometano para la desprotección del grupo protector 4,4'-dimetoxitritilo (DMT). Se utilizó 5-etiltio-1H-tetrazol como activador. Para las reacciones de oxidación y sulfuración se utilizaron I₂ en THF/Py/H₂O y fenilacetil disulfuro (PADS) en piridina/MeCN, respectivamente.

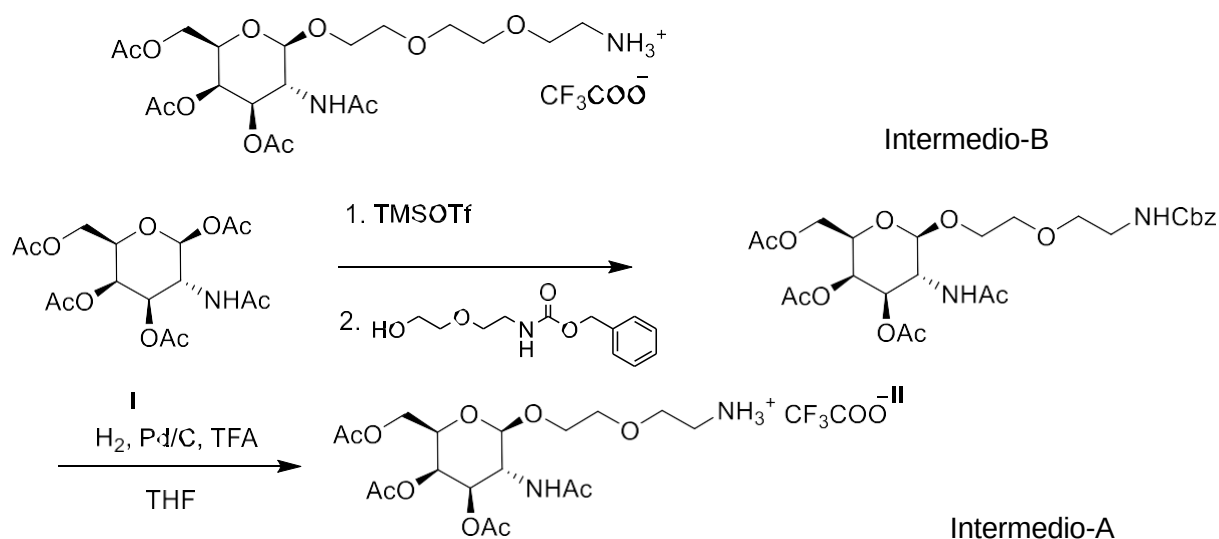
Después del paso final de síntesis en fase sólida, se escindió el oligómero unido al soporte sólido y se eliminaron los grupos protectores mediante el tratamiento con una solución de volumen 1:1 de 40 wt. % de metilamina en agua y solución de hidróxido de amonio al 28%. Para la síntesis de siRNAs utilizados para el tamizaje in vitro, se concentró la mezcla cruda. El sólido restante se disolvió en 1.0 M NaOAc y se agregó EtOH helado para precipitar el producto de una sola hebra como sal de sodio, que se utilizó para el recocido sin más purificación. Para la síntesis de siRNAs utilizados para pruebas in vivo, el producto crudo de una sola hebra se purificó aún más mediante HPLC de fase reversa de emparejamiento iónico (IP-RP-HPLC). El producto oligonucleótido purificado de una sola hebra de IP-RP-HPLC se convirtió en sal de sodio mediante la disolución en 1.0 M NaOAc y la precipitación mediante la adición de EtOH helado. Se realizó el recocido del soporte sentido complementario equimolar y el oligonucleótido de hebra antisentido en agua para formar el producto de siRNA de doble hebra, que se liofilizó para proporcionar un resultado esponjoso blanco sólido.

EJEMPLO DE IMPLEMENTACIÓN 2. PREPARACIÓN DE INTERMEDIO-A **E INTERMEDIO-B**

Como se muestra en el Esquema 1 a continuación, el Intermedio-A se sintetizó mediante el tratamiento de pentaacetato de galactosamina disponible comercialmente con trimetilsilil trifluorometanosulfonato (TMSOTf) en diclorometano (DCM). A esto le siguió la glicosilación con 2-(2-aminoetoxi)etano-1-ol protegido por Cbz para dar el Compuesto II. El grupo protector de Cbz se eliminó por hidrogenación para proporcionar Intermedio-A como sal de trifluoroacetato (TFA). El intermedio B se sintetizó con base en el mismo esquema, excepto que se utilizó 2-(2-(2-aminoetoxi)etoxi)etano-1-ol protegido por Cbz como material de partida.



Intermedio-A



Esquema 1

A una solución de Compuesto I (20,0 g, 51,4 mmol) en 100 mL de 1,2-dicloroetano (DCE) se le añadió TMSOTf (17,1 g, 77,2 mmol). La solución de reacción resultante se agitó a 60 °C durante 2 horas y luego a 25 °C durante 1 hora. Se añadió 2-(2-(aminoetoxi)etano-1-ol (13,5 g, 56,5 mmol) protegido con Cbz (13,5 g, 56,5 mmol) en DCE (100 mL) secado a lo largo de tamices moleculares en polvo de 4 Å (10 g) a la solución de reacción mencionada anteriormente a 0 °C bajo N₂ atmósfera. La mezcla de reacción resultante se agitó a 25 °C durante 16 horas bajo atmósfera de N₂. La mezcla de reacción se filtró y se lavó con NaHCO₃ saturado (200 mL), agua (200 mL) y salmuera saturada (200 mL). La capa orgánica se secó sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se concentró a presión reducida para obtener un producto crudo, que se trituroó con 2-metiltetrahidrofurano/heptano (5/3, v/ v, 1.80 L) durante 2 hrs. La mezcla resultante se filtró y secó para obtener el Compuesto II (15,0 g, 50,3% de rendimiento) como un sólido blanco.

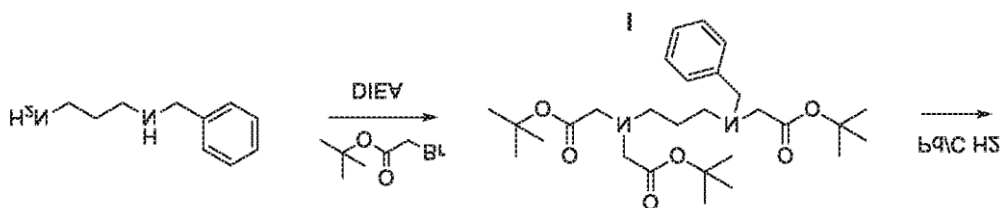
A un frasco de hidrogenación seco y purgado con argón se le añadió cuidadosamente un 10% de Pd/C (1,50 g), seguido de 10 mL de tetrahidrofurano (THF) y luego una solución de Compuesto II (15,0 g, 26,4 mmol) en THF (300 mL) y TFA (ácido trifluoroacético, 3,00 g, 26,4 mmol). La mezcla resultante se desgasificó y purgó con H₂ tres veces y se agitó a 25 °C durante 3 horas bajo una atmósfera de H₂ (45 psi). La cromatografía en capa fina (TLC, disolvente: DCM:MeOH = 10:1) indicó que el Compuesto II se consumió por completo. La mezcla de reacción se filtró y concentró a presión reducida. El residuo se disolvió en DCM anhidro (500 mL) y se concentró. Este proceso se repitió 3 veces para

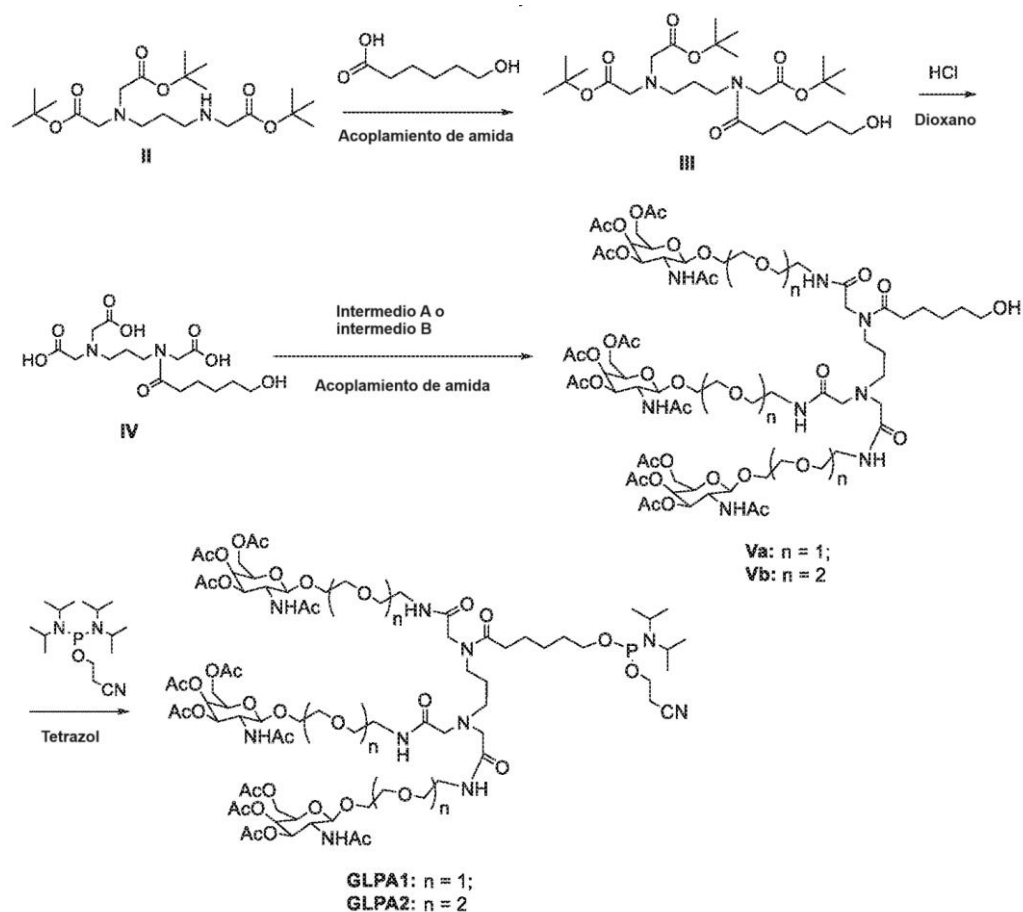
obtener Intermedio-A (14,0 g, 96,5% de rendimiento) como un sólido blanco espumoso. ¹H NMR (400 MHz DMSO-d₆): δ ppm 7,90 (d, J = 9,29 Hz, 1 H), 7,78 (br s, 3 H), 5,23 (d, J = 3,26 Hz, 1 H), 4,98 (dd, J = 11,29, 3,26 Hz, 1 H), 4,56 (d, J = 8,53 Hz, 1 H), 3,98 - 4,07 (m, 3 H), 3,79 - 3,93 (m, 2 H), 3,55 - 3,66 (m, 5 H), 2,98 (br d, J = 4,77 Hz, 2 H), 2,11 (s, 3 H), 2,00 (s, 3 H), 1,90 (s, 3 H), 1,76 (s, 3 H).

El intermedio-B se sintetizó utilizando procedimientos similares para la síntesis del intermedio A. ^1H NMR (400 MHz DMSO- d_6): δ ppm 7,90 (br d, J = 9,03 Hz, 4 H), 5,21 (d, J = 3,51 Hz, 1 H), 4,97 (dd, J = 11,1 Hz, 1 H), 4,54 (d, J = 8,53 Hz, 1 H), 3,98 - 4,06 (m, 3 H), 3,88 (dt, J = 10,9 Hz, 1 H), 3,76 - 3,83 (m, 1 H), 3,49 - 3,61 (m, 9 H), 2,97 (br s, 2 H), 2,10 (s, 3 H), 1,99 (s, 3 H), 1,88 (s, 3 H), 1,78 (s, 3 H). Cálculo de masas para $\text{C}_{20}\text{H}_{34}\text{N}_2\text{O}_{11}$: 478,22; detectados efectivamente: 479.3 ($\text{M}+\text{H}^+$).

EJEMPLO DE IMPLEMENTACIÓN 3. SÍNTESIS DEL GRUPO DE LIGANDOS
GALNAC FOSFORAMIDITA GLPA1, GLPA2 Y GLPA15.

Se siguió el esquema 2 que figura a continuación para preparar GLPA1 y GLPA2. A partir de propano-1,3-diamina protegido contra bencilo, se alquiló con terc-butil 2-bromoacetato para proporcionar el compuesto I de triéster. La eliminación del grupo protector bencilo mediante hidrogenación proporcionó el compuesto de amoníaco secundario II. El acoplamiento de amida con ácido 6-hidroxihexanoico proporcionó el Compuesto III. A continuación, se eliminaron los grupos protectores de terc-butilo tras el tratamiento con HCl en dioxano para generar el compuesto IV triácido. El acoplamiento de amida entre el compuesto triácido IV y el intermedio-A o el intermedio-B se realizó para obtener el compuesto Va o Vb. La fosforamidita GLPA1 o GLPA2 se sintetizó mediante la fosfitilación de Compuesto Va o Vb con 2-cianoetilo N,N-diisopropilclorofosforamidita y una cantidad catalítica de 1H-tetrazol.





Esquema 2:

A una solución de N-bencil-1,3-propanodiamina (5,00 g, 30,4 mmol) en dimetilformamida (DMF, 100 mL) se le añadió terc-butil 2-bromoacetato (23,7 g, 121 mmol), seguido de la adición de diisopropiletilamina (DIEA, 23,61 g, 182 mmol) gota a gota. La mezcla de reacción resultante se agitó a 25-30 °C durante 16 horas. LCMS mostró que la N-bencil-1,3-propanodiamina se consumió por completo. La mezcla de reacción se diluyó con H₂O (500 mL) y se extrajo con EtOAc (500 mL x 2). Los orgánicos combinados se lavaron con salmuera saturada (1 L), secado sobre Na₂SO₄ anhidro, filtrado y concentrado a presión reducida para dar producto crudo, el cual se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (gradiente: petróleo éter: acetato de etilo de 20:1 a 5:1). El compuesto I (12,1 g, 78,4% de rendimiento) se obtuvo como aceite incoloro. ¹H NMR (400 MHz CDCl₃): δ ppm 7,26 - 7,40 (m, 5 H), 3,79 (s, 2 H), 3,43 (s, 4 H), 3,21 (s, 2 H), 2,72 (dt, J = 16,9, 7,34 Hz, 4 H), 1,70 (quin, J = 7,2 Hz, 2 H), 1,44 - 1,50 (m, 27 H).

Se purgó una botella de hidrogenación seca con argón tres veces. Se añadió Pd/C (200 mg, 10%), seguido de MeOH (5 ml) y luego una solución del Compuesto I (1,00 g, 1,97 mmol) en MeOH (5 ml). La mezcla de reacción se desgasificó al vacío y se rellenó con H₂. Este proceso se repitió tres veces. La mezcla se agitó a 25°C durante 12 horas en una atmósfera de H₂ (15 psi). LCMS mostró que el Compuesto I se consumió por completo. La mezcla de reacción se filtró a presión reducida bajo atmósfera de N₂. El filtrado se concentró a presión reducida para dar el Compuesto II (655 mg, 79,7% de rendimiento) como aceite amarillo, que se utilizó para el siguiente paso sin más purificación. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ ppm 3,44 (s, 4 H), 3,31 (s, 2 H), 2,78 (t, J = 7,1 Hz, 2 H), 2,68 (t, J = 6,9 Hz, 2 H), 1,88 (br s, 1 H), 1,69 (quin, J = 7,03 Hz, 2 H), 1,44 - 1,50 (s, 27 H).

Una mezcla de Compuesto II (655 mg, 1,57 mmol), ácido 6-hidroxihexanoico (249 mg, 1,89 mmol), DIEA (1,02 g, 7,86 mmol), clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDCI, 904 mg, 4,72 mmol) y 1-hidroxibenzotriazol (HOBt, 637 mg, 4,72 mmol) en DMF (6 ml) se desgasificó y se purgó con N₂ tres veces y luego se agitó a 25°C durante 3 horas en una atmósfera de N₂. LCMS indicó el producto deseado. La mezcla de reacción se diluyó con H₂O (10 mL) y se extrajo con 20 mL de EtOAc (10 mL x 2). Los orgánicos se combinaron y se lavaron con salmuera saturada (20 ml), se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtraron, y se concentraron para obtener el producto bruto, que se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (gradiente: éter de petróleo: acetato de etilo de 5:1 a 1:1) para obtener el Compuesto III (650 mg, rendimiento del 77,8%) como un aceite amarillo ¹H. NMR(400 MHz, CDCl₃): δ ppm 3,90 - 3,95 (s, 2 H), 3,63 (t, J = 6,40 Hz, 2 H), 3,38 - 3,45 (m, 6 H), 2,72 (t, J = 6,65 Hz, 2 H), 2,40 (t, J = 7,28 Hz, 2 H), 1,55 - 1,75 (m, 8 H), 1,44 (s, 27 H). Masa calculada para C₂₇H₅₀N₂O₈: 530,36; Medición efectiva: 531,3 (M + H⁺).

Una mezcla del Compuesto III (5,5 g, 10,3 mmol) en HCl/dioxano (2 M, 55 ml) se agitó a 25 °C durante 3 horas. LCMS mostró un consumo completo del Compuesto III. La mezcla de reacción se filtró, se lavó con EtOAc (50 ml) y se secó a presión reducida para obtener el producto bruto. Se disolvió en CH₃CN (50 ml), los volátiles se eliminaron al vacío. Este proceso se repitió tres veces para obtener el Compuesto IV (2,05 g, rendimiento del 54,5%) como un

sólido blanco. ^1H NMR (400 MHz, D_2O): δ ppm 4,21 (s, 1 H), 4,07 (d, $J = 4,5$ Hz, 4 H), 3,99 (s, 1 H), 3,45 - 3,52 (m, 3 H), 3,42 (t, $J = 6,5$ Hz, 1 H), 3,32 - 3,38 (m, 1 H), 3,24 - 3,31 (m, 1 H), 2,37 (t, $J = 7,4$ Hz, 1 H), 2,24 (t, $J = 7,4$ Hz, 1 H), 1,99 (dt, $J = 15,5, 7,53$ Hz, 1 H), 1,85 - 1,94 (m, 1 H), 1,85 - 1,94 (m, 1H), 1,39 - 1,56 (m, 4H), 1,19 - 1,31 (m, 2H).

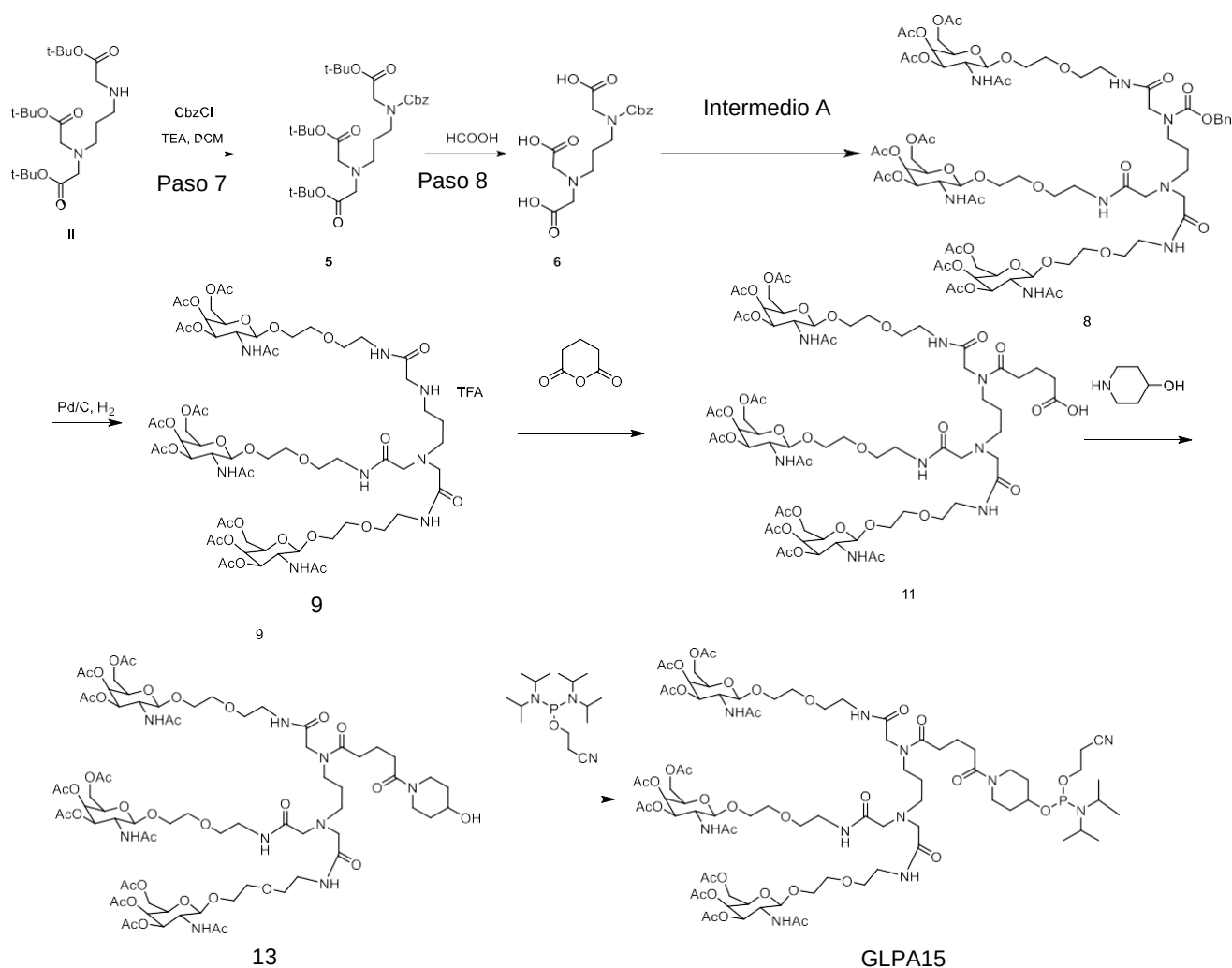
Una mezcla de Compuesto IV (500 mg, 1,05 mmol), Intermedio-A (2,02g, 3,67 mmol), DIEA (813 mg, 6,30 mmol), EDCI (704 mg, 3,67 mmol) y HOBt (496 mg, 3,67 mmol) en DMF (10 ml) se desgasificó y se purgó con N_2 3 veces, y luego la mezcla se agitó a 25°C durante 3 horas en una atmósfera de N_2 . LCMS indicó el producto deseado. La mezcla de reacción se inactivó mediante la adición de H_2O (10 ml) y se extrajo con DCM (10 ml x 2). Los compuestos orgánicos combinados se extrajeron con ácido cítrico al 10 % (20 ml). La fase acuosa se neutralizó con una solución saturada de NaHCO_3 y se volvió a extraer con DCM (10 ml x 2), se secaron sobre sulfato de sodio, se filtraron y se concentraron a presión reducida para dar el Compuesto Va (570 mg, 0,281 mmol, rendimiento del 26,8%) como un sólido blanco ^1H NMR: (400 MHz, CDCl_3) ppm δ 7,84 - 8,12 (m, 3. H), 6,85 - 7,15 (m, 2 H), 6,66 - 6,81 (m, 1 H), 5,36 (br d, $J = 2,7$ Hz, 3 H), 5,11 - 5,27 (m, 3 H), 4,63 - 4,85 (m, 3 H), 3,90 - 4,25 (m, 18 H), 3,37 - 3,75 (m, 28 H), 3,15 - 3,28 (m, 4 H), 2,64 (br d, $J = 6,53$ Hz, 2 H), 2,30 - 2,46 (m, 2 H), 2,13 - 2,18 (m, 9 H), 2,05 (s, 9 H), 1,94 - 2,03 (m, 18 H), 1,68 (br s, 2 H), 1,45 (br s, 2 H), 1,12 (br t, $J = 7,0$ Hz, 2 H).

A una solución del Compuesto Va (260 mg, 0,161 mmol) en DCM anhidro (5 ml) se le añadió tetrazolida de diisopropilamonio (30,3 mg, 0,177 mmol), seguido de la adición gota a gota de 3-bis(diisopropilamino)fosfaniloxipropanonitrilo (194 mg, 0,645 mmol) a temperatura ambiente en atmósfera de N_2 . La mezcla de reacción se agitó a $20 \sim 25^\circ\text{C}$ durante 2 horas. LCMS indicó que el compuesto Va se consumió por completo. Después de enfriar a -20°C , la mezcla de reacción se añadió a una solución agitada de salmuera/ NaHCO_3 acuoso saturado (1:1,5 mL) a 0°C . Después de agitar durante 1 min, se añadió DCM (5 mL). Las capas se separaron. Las capas orgánicas se lavaron con salmuera/solución acuosa saturada NaHCO_3 (1:1,5 mL), se secaron sobre Na_2SO_4 , se filtraron y se concentraron hasta aproximadamente 1 ml de volumen. La solución residual se añadió gota a gota a 20 ml de metil terc-butil éter (MTBE) con agitación.

Esto dio como resultado la precipitación de un sólido blanco. La mezcla se centrifugó y el sólido se redisolvió en 1 ml de DCM y se precipitó mediante la adición de MTBE (20 ml). El sólido recogido se disolvió en CH₃CN anhidro. El proceso se repitió dos veces más para producir el compuesto de fosforamidita del ligando de GalNAc GLPA1 (153 mg, 84,4 μ mol) como un sólido blanco ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): ppm δ 7,71 - 8,06 (m, 2 H), 6,60 - 7,06. (m, 3 H), 5,37 (br d, J = 3,0 Hz, 3 H), 5,18 - 5,32 (m, 3 H), 4,70 - 4,86 (m, 3 H), 3,92 - 4,25 (m, 18 H), 3,42 - 3,85 (m, 30 H), 3,25 (m, 4 H), 2,59 - 2,75 (m, 4 H), 2,27 - 2,44 (m, 2 H), 2,15 - 2,20 (s, 9 H) 2,07 (s, 9 H), 1,96 - 2,03 (m, 18 H), 1,65 (br s, 4 H), 1,44 (br d, J = 7,28 Hz, 2 H), 1,14 - 1,24 (m, 12 H). ³¹P NMR (CDCl₃): ppm δ . 147.15.

El compuesto GLPA2 de fosforamidita del ligando de GalNAc se sintetizó usando el mismo procedimiento excepto que se usó en el Intermedio-B. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): ppm δ 7,94 - 8,18 (m, 1 H), 7,69 (br s, 1 H), 6,66 - 7,10 (m, 3 H), 5,35 (d, J = 3,5 Hz, 3 H), 5,07 - 5,25 (m, 3 H), 4,76 - 4,86 (m, 3 H), 4,01 - 4,31 (m, 10 H) , 3,91 - 4,01 (m, 8 H), 3,74 - 3,86 (m, 4 H), 3,52 - 3,71 (m, 30 H), 3,42 - 3,50 (m, 6 H), 3,15 - 3,25 (m, 4 H) , 2,52 - 2,70 (m, 4 H), 2,22 - 2,45 (m, 2 H), 2,15 - 2,22 (s, 9 H), 2,06 (s, 9 H), 1,95 - 2,03 (m, 18 H), 1,77 (br s, 2 H), 1,58 - 1,66 (m, 4 H), 1,40 (m, 2 H), 1,08 - 1,24 (m, 12 H) ³¹P NMR (CDCl₃): ppm δ 147,12.

Se siguió el esquema 3 que figura a continuación para preparar GLPA15.



A una solución de compuesto intermedio II (275 g, 660 mmol, 1,00 eq.) en diclorometano (2,75 L) se le añadió trietilamina (133 g, 1,32 mol, 2,00 eq.), seguida de la adición gota a gota de Cbz-Cl (169 g, 990 mmol, 1,50 eq.). La solución de reacción se agitó a 25 °C durante 2 horas, y LCMS mostró que el compuesto II se convirtió por completo. La solución de reacción se lavó sucesivamente con solución saturada de NaHCO₃ (800 ml) y salmuera saturada (500 ml), y la fase orgánica se secó con Na₂SO₄ anhidro. Después de eliminar el desecante por filtración, el filtrado se concentró hasta la sequedad. El producto crudo se sometió a cromatografía en columna (SiO₂, PE/EA =100/1 a 5/1) para obtener un compuesto oleoso incoloro 5 (290 g, 527 mmol, rendimiento 75,7 %). ¹H NMR (400 MHz en DMSO-d₆): δ ppm 7,23 - 7,40 (m, 5 H), 5,00 - 5,12 (m, 2 H), 3,86 - 3,95 (m, 2 H), 3,23 - 3,39 (m, 6 H), 2,55 - 2,67 (m, 2 H), 1,56 - 1,64 (m, 2 H),

1,31 - 1,46 (m, 27 H). MS (ESI) $[M+H]^+$ m/z: 551,6.

Se agregó HCOOH (2.9L) al compuesto 5 (145 g, 263 mmol, 1.00 eq) y la solución se agitó a 60 °C durante 12 horas. LCMS mostró que la conversión del compuesto 5 se encontraba completa. Se agregaron 1,5 L de tolueno y 1,5 L de acetonitrilo a la solución de reacción, concentrándola a presión reducida a aproximadamente 500 ml, luego se agregó tolueno / acetonitrilo (1: 1, ~ 750 ml) y se concentraron aproximadamente 500 ml, luego se agregó acetonitrilo (~1000 ml) y se concentró hasta la sequedad, el producto crudo se pulverizó a 60 °C durante 2 horas con 700 ml de acetonitrilo y se filtró. El sólido se recolectó y secó para obtener el compuesto sólido blanco 6 (105 g, cuantitativo). ^1H NMR (400 MHz en DMSO- d_6): δ ppm 7,26 - 7,40 (m, 5 H), 5,02 - 5,10 (m, 2 H), 3,89 - 4,00 (m, 2 H), 3,36- 3,45 (m, 4 H), 3,24 - 3,34 (m, 2 H), 2,59 - 2,72 (m, 2 H), 1,40 (s, 2 H). MS (ESI) $[M+H]^+$ m/z:383.0.

A una solución de DMF (1,0 L) de compuesto 6 (100 g, 261 mmol) e intermedio-A (502 g, 915 mmol, 3,50 eq.) se añadió TBTU (327 g, 1,02 mol, 3,90 eq.), trietilamina (212 g, 2,09 mol, 8,00 eq.), la reacción se llevó a cabo a 25°C durante 1 hora, LCMS mostró que el compuesto 6 se convirtió en acabado. La solución de reacción se agregó a 4000 ml de agua y se extrajo con metil terc-butil éter (2000 ml dos veces) para eliminar las impurezas, y la fase acuosa restante se extrajo con diclorometano (3000 ml dos veces). La fase de diclorometano se lavó sucesivamente con una solución acuosa de ácido cítrico al 10% (2000 ml divididos en dos tiempos), NaHCO_3 saturado (2,0 L dividido en dos tiempos), salmuera saturada (2,0 L) y se secó sobre Na_2SO_4 anhidro. El filtrado se filtró y se concentró a presión reducida para obtener el compuesto 8 sólido blanco (260 g, 159 mmol, rendimiento del 60,9%). ^1H NMR (400 MHz en DMSO- d_6): δ ppm 7,99 - 8,08 (m, 2 H), 7,93 (br d, $J=5,50$ Hz, 1 H), 7,79 - 7,86 (m, 3 H), 7,26 - 7,39 (m, 5 H), 5,22 (d, $J=3,13$ Hz, 3 H), 4,95 - 5,08 (m, 5 H), 4,54 (br d, $J=8,38$ Hz, 3 H), 4,03 (s, 9 H), 3,81 - 3,93 (m, 5 H), 3,76 (br d, $J=4,88$ Hz, 3 H), 3,44 - 3,62 (m, 10 H), 3,34 - 3,43 (m, 6 H), 3,24 (br d, $J=6.13$ Hz, 7 H), 3,02 - 3,09 (m, 4 H), 2,40 - 2,47 (m, 2 H), 2,10 (s, 9 H), 1,99 (s, 9 H), 1,89 (s, 9 H), 1,77 (s, 9 H), 1,57 - 1,68 (m, 2 H). MS (ESI) $[M+H]^+$ m/z: **816,4**.

Se inertizó el hervidor de hidrogenación de 2 L con argón y se agregó cuidadosamente Pd/C seco (9 g), se agregó MeOH (50 ml) a Pd/C húmedo, luego se agregó lentamente el compuesto 8 (90 g, 55,1 mmol, 1,00 eq.) en una

atmósfera de argón y ácido trifluoroacético (6,29 g, 55,1 mmol, 1,00 eq.) en MeOH (850 ml). La mezcla se desgasificó/reemplazó añadiendo H_2 tres veces a una atmósfera de hidrógeno y se agitó a 25 °C durante 10 h. LCMS mostró que la conversión del compuesto 8 se encontraba completa, el Pd/C se eliminó mediante filtración, y el filtrado se concentró a presión reducida para obtener el compuesto 9 (80 g, rendimiento 90,2%). ^1H NMR (400 MHz en DMSO- d_6): δ ppm 9,12 (br s, 2 H), 8,50 (br t, $J=5,19$ Hz, 1 H), 8,10 (br t, $J=5,50$ Hz, 2 H), 7,85 - 7,91 (m, 3 H), 5,22 (d, $J=3,25$ Hz, 3 H), 4,95 - 5,01 (m, 3 H), 4,52 - 4,58 (m, 3 H), 4,03 (s, 9 H), 3,84 - 3,93 (m, 3 H), 3,75 - 3,83 (m, 3 H), 3,39 - 3,61 (m, 16 H), 3,23 - 3,32 (m, 6 H), 3,15 - 3,18 (m, 3 H), 2,97 - 3,05 (m, 2 H), 2,54 - 2,61 (m, 2 H), 2,10 (s, 9 H), 2,00 (s, 9 H), 1,89 (s, 9 H), 1,77 - 1,80 (m, 9 H), 1,70 - 1,76 (m, 2 H). MS (ESI) $[M+H]^+$ m/z: **749,3**.

A una solución en diclorometano (2,7 l) del compuesto 9 (270 g, 168 mmol, 1,00 eq.) y anhídrido glutárico (28,6 g, 252 mmol, 1,50 eq.) se le añadió trietilamina (67,8 g, 672 mmol, 4,00 eq.), la solución se agitó a 25 °C durante 1 hora y LCMS mostró que el compuesto 9 se convirtió completamente en el compuesto 11. Se añadieron 4-hidroxipiperidina (42,4 g, 420 mmol, 2,50 eq.) y TBTU (107 g, 335 mmol, 2,00 eq.) a la solución de reacción y se continuó la agitación a 25 °C durante 1 hora. LCMS mostró una conversión completa del compuesto 11. La reacción se detuvo añadiendo lentamente NH_4Cl saturado (3,0 L), las capas se separaron, la fase acuosa se extrajo con diclorometano (2 x 1000 mL) y se combinó con la fase orgánica anterior. Las fases orgánicas combinadas se lavaron con una mezcla 1:1 (3,0 L) de $NaHCO_3(aq)$ saturado y salmuera saturada, se secaron sobre Na_2SO_4 anhidro, se filtraron y se concentraron a presión reducida. El producto bruto se disolvió en 1,5 L de diclorometano y se añadió gota a gota a metil terc-butil éter (7,5 L). Se formó gradualmente un precipitado blanco translúcido durante la adición gota a gota. El precipitado se filtró al vacío, el sólido se recogió y se secó al vacío para obtener el compuesto 13 (207 g, rendimiento 72,8%) como un sólido blanco. ^1H NMR (400 MHz en DMSO- d_6): δ ppm 8,05 (br d, $J=2,00$ Hz, 2 H), 7,82 (br d, $J=7,38$ Hz, 3 H), 5,21 (br s, 3 H), 4,98 (br d, $J=10,26$ Hz, 3 H), 4,72 (br s, 1 H), 4,54 (br d, $J=7,88$ Hz, 3 H), 4,03 (br s, 9 H), 3,74 - 3,94 (m, 9 H), 3,45 - 3,71 (m, 12 H), 3,40 (br s, 6 H), 3,24 (br s, 7 H), 3,07 (br d, $J=14,13$ Hz, 5 H), 2,91 - 3,01 (m, 1 H), 2,24 - 2,44 (m, 5 H), 2,20 (br s, 1 H), 2,10 (s, 9 H), 1,96 - 2,04 (m, 9 H), 1,89 (br s, 9 H), 1,74 - 1,81 (m, 9 H), 1,51

- 1,73 (m, 6 H), 1,07 - 1,36 (m, 3 H). EM (ESI) $[M+H]^+$ m/z: 848,0.

A la solución en diclorometano (2,0 L) del compuesto 13 (200 g, 118 mmol, 1,00 eq.) y tetrazol diisopropilamonio (8,08 g, 47,2 mmol, 0,40 eq.) se le añadió 3-doble (diisopropil amino) fosfonil oxipropionitrilo (53,3 g, 177 mmol), 1,50 eq.), la solución de reacción se agitó a 40 °C durante 2 horas y LCMS mostró que la conversión del compuesto 13 se encontraba completa. La solución de reacción se lavó con una mezcla 1:1 (2,0 L) de NaHCO₃ saturado y salmuera saturada, se secó sobre Na₂SO₄ anhidro y el producto bruto obtenido después de concentrar el filtrado se disolvió en diclorometano (1,2 l) y se añadió gota a gota al Metil terc-butil éter agitado (6,0 l), se filtró la suspensión, se lavó la torta de filtración con éter terc-butílico, se recogió el sólido y se secó al vacío, se disolvió el producto en diclorometano (1,0 l) y se concentró hasta la sequedad, se repitió la operación 4 veces para eliminar el éter terc-butílico residual para obtener GLPA15 (164 g, rendimiento 73,3 %). ¹H NMR (400 MHz en DMSO-d₆): δ ppm 8,05 (br d, J = 6,50 Hz, 2 H), 7,81 (br d, J = 9,01 Hz, 3 H), 5,22 (d, J = 3,25 Hz), 3 H), 4,98 (dd, J=11,26, 3,25 Hz, 3 H), 4,55 (br d, J=8,50 Hz, 3 H), 4,03 (s, 9 H), 3,64 - 3,97 (m, 12 H), 3,55 - 3,63 (m, 6 H), 3,50 (br s, 5 H), 3,40 (br d, J= 6,13 Hz, 6 H), 3,17 - 3,30 (m, 9 H), 3,07 (br d, J=14,26 Hz, 4 H), 2,76 (t, J=5,82 Hz, 2 H), 2,18 - 2,47 (m, 6 H), 2,10 (s, 9 H), 1,99 (s, 9 H), 1,89 (s, 9 H), 1,78 (s, 9 H), 1,52 - 1,74 (m, 6 H), 1,12 - 1,19 (m, 12 H) ³¹P NMR (DMSO-d₆): ppm δ 145,25 (ESI) $[M+H]^+$ m/z: 1895,7.

En ciertos estudios, se proporcionan métodos para unir un grupo diana que comprende GalNAc (también denominado en el presente documento compuesto de administración de GalNAc) al extremo 5' de la hebra sentido, lo que implica que se use fosforamidita de GalNAc (GLPA1) en el paso de acoplamiento, utilizando un proceso sintético tal como el usado en el alargamiento de hebras de oligonucleótidos (es decir, adición de nucleótidos en el extremo 5' de la hebra sentido) para ligarlos al extremo 5' de la hebra sentido.

En algunos estudios, un método para unir un grupo diana que comprende GalNAc al extremo 3' de una hebra sentido comprendió el uso de un soporte sólido (CPG) que incluía un GLO-n. En algunos estudios, el método de unión de un grupo diana que comprendía GalNAc al extremo 3' de una hebra sentido incluía: vincular el grupo diana GalNAc a un soporte sólido de CPG a través de un enlace éster, y sintetizar la hebra sentido cuando se utiliza la CPG

resultante con un grupo de orientación de GalNAc adjunto, esto da como resultado que el grupo de orientación de GalNAc se adhiera en el extremo 3'- de la hebra sentido. Otros compuestos de fosforamidita de GalNAc (GLPAn) también se pueden obtener utilizando un intermediario correspondiente razonable, utilizando un método similar al de este documento o comunmente conocido en la técnica, y conectado a una posición adecuada del dúplex de siRNA como grupo diana.

EJEMPLO DE IMPLEMENTACIÓN 4. CRIBADO IN VITRO DE DÚPLEX DE AGT SIRNA

Las células Hep3B se digirieron con tripsina y se ajustaron a una densidad adecuada, y luego se sembraron en placas de 96 pocillos. Simultáneamente con la siembra, las células se transfectaron con siRNA de prueba o siRNA de control utilizando Lipofectamine RNAiMax (Invitrogen-13778-150) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Los siRNAs se probaron por triplicado a dos concentraciones (0,2 nM a 1,0 nM), mientras que los siRNAs de control se probaron a ocho concentraciones de diluciones secuenciales de 3 veces de 4,6 pM a 10 nM por triplicado.

24 horas después de la transfección, se retiró el medio y se recolectaron células para la extracción de RNA. El RNA total se extrajo utilizando el agente TRIzol™ (Invitrogen-15596018) de acuerdo con el manual.

El cDNA se sintetizó utilizando PrimeScript™ RT Kit y gDNA Eraser (Perfect Real Time) (TaKaRa-RR047A) de acuerdo con el manual. El cDNA AGT se detectó mediante qPCR. El cDNA de GAPDH se probó en paralelo como control interno. La PCR se realizó de la siguiente manera: 30 segundos a 95 °C, seguidos de 40 ciclos entre 10 segundos a 95 °C y 30 segundos a 60 °C.

ANÁLISIS DE DATOS

La expresión del gen AGT en cada muestra se determinó mediante cuantificación relativa (RQ) utilizando el método de Ct comparativo ($\Delta\Delta Ct$); este método mide la diferencia en Ct (ΔCt) entre el gen diana y el gen de mantenimiento (GAPDH).

Las ecuaciones se enumeran a continuación:

$$\Delta Ct = Ct \text{ media del gen diana} - Ct \text{ media de GAPDH}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ (muestra)} - \Delta Ct \text{ (control aleatorio o control de$$

Lipofectamine RNAiMax);

Cuantificación relativa del mRNA del gen diana = $2^{(-\Delta\Delta CT)}$

% de inhibición = (Cuantificación relativa de los controles –
Cuantificación relativa de las muestras)/Cuantificación relativa de los controles x
100%.

En la Tabla 5 se presentan los resultados experimentales de estudios in vitro sobre la inhibición de la expresión AGT utilizando diversos agentes de AGT RNAi; las secuencias bicatenarias utilizadas corresponden a los compuestos mostrados en la Tabla 2.

Dúplex AD#	% de inhibición media			
	1 nM		0,2 nM	
	Promedio	SD	Promedio	SD
AD00051	63,49	5,27	57,80	4,84
AD00053	82,93	1,46	60,04	3,22
AD00054	81,76	0,05	27,18	12,85
AD00055	63,11	2,61	27,67	13,05
AD00056	44,67	3,42	-10,57	8,88
AD00057	38,36	1,00	6,39	2,89
AD00058	-6,34	7,17	-10,93	13,00
AD00059	40,95	2,41	-15,25	11,41
AD00060	41,58	1,21	1,71	1,62
AD00061	34,74	7,07	-52,46	7,61
AD00062	11,16	3,26	-27,82	22,96
AD00063	25,99	1,34	-28,28	34,49
AD00064	48,56	10,83	-22,86	4,06
AD00065	17,68	12,71	-19,42	11,46
AD00066	74,76	0,61	32,99	9,82
AD00067	-15,01	11,39	-70,58	12,60
AD00068	48,42	7,31	10,85	3,85
AD00070	14,21	6,91	-41,65	19,32
AD00071	71,20	0,94	40,90	9,35
AD00072	58,69	3,25	-30,13	4,78
AD00073	23,87	7,61	-10,98	10,03
AD00074	78,21	3,00	-13,57	4,32
AD00075	38,92	2,08	20,51	2,14
AD00076	73,89	1,40	52,43	1,99
AD00077	73,85	1,28	56,13	1,41
AD00078	51,59	4,46	-24,43	20,40

AD00079	90,61	0,61	76,62	5,02
AD00080	88,44	1,14	16,00	15,09
AD00081	88,79	1,96	29,91	20,77
AD00082	77,98	0,45	60,15	10,15
AD00083	-25,46	6,04	-24,08	6,71
AD00084	29,29	3,07	-19,97	13,61
AD00085	54,82	2,64	6,94	4,85
AD00086	61,17	2,03	26,87	16,50
AD00087	52,12	5,08	-42,78	64,89
AD00088	17,16	13,36	-25,66	4,89
AD00090	72,23	5,81	14,30	6,12
AD00091	27,41	2,11	-53,58	26,95
AD00092	78,93	0,53	29,92	2,95
AD00093	80,84	0,97	30,70	14,04
AD00094	57,64	7,56	35,89	9,00
AD00095	63,51	1,25	28,95	12,77
AD00097	81,91	2,26	37,49	7,94
AD00098	74,20	0,29	57,41	2,59
AD00099	53,49	2,05	1,42	22,51
AD00100	88,90	0,91	62,84	5,16
AD00101	66,98	2,39	11,83	13,72

EJEMPLO DE IMPLEMENTACIÓN 5. PRUEBAS IN VIVO DE DÚPLEX DE
AGT siRNA

Para evaluar la actividad in vivo del AGT siRNA, se utilizaron ratones infectados con AAV que codifica el gen AGT humano (4 ratones por grupo). Catorce días antes de la administración de siRNA, los ratones hembra C57BL/6J se infectaron mediante inyección intravenosa de 1×10^{11} *viral particle of* adenovectores asociados del virus 8 (AAV8) que codifican el gen AGT humano. En el día 0, los ratones fueron inyectados por vía subcutánea con una dosis única de 2,5 mg/kg o 3 mg/kg de agente AGT siRNA o PBS. Las muestras de sangre se recogieron el día 0, antes de la administración de siRNA y al final del día 7. La concentración de la proteína AGT humana se midió mediante el ensayo ELISA de acuerdo con el protocolo recomendado por el fabricante (IBL America, Kit ELISA

de angiotensinógeno humano). El porcentaje de reducción se calculó comparando los niveles de AGT mRNA humano en hígados de ratón (determinados por qPCR) o los niveles de proteína AGT humana en muestras de plasma en el día 7 entre los tratados con siRNA y los grupos tratados con PBS. Los resultados se muestran en las Tablas 6-9.

Tabla 6. Selección de dosis única de 3 mpk AGT en ratones transducidos con AAV-AGT humana. Se utiliza GalNAc correspondiente a la secuencia, modificación química y administración que se exhiben en la Tabla 3, el GLO-0 en dichos compuestos en la Tabla 3 se refiere al compuesto GalNAc3 en Jayaprakash; , et al., (2014) J. Am Chem. Soc., 136, 16958-16961.

ID#	Porcentaje de reducción del AGT mRNA humano en hígado de ratón medido por qPCR	Porcentaje de reducción del AGT humano en plasma de ratón medido por ELISA
AD00052	86%	67%
AD00113	39%	20%
AD00114	78%	NA
AD00115	81%	NA
AD00116	88%	NA
AD00122	95%	83%
AD00123	89%	76%
AD00124	68%	NA
AD00125	86%	NA
AD00126	92%	62%

NA significa no medido.

Tabla 7. Cribado de dosis única AGT de 3 mpk en ratones transducidos con AGT humano AAV; utilizando compuestos correspondientes a la secuencia, modificación química y administración que se exhiben en la Tabla 3, en la que el GLO-0 se refiere al compuesto de administración GalNAc3 en Jayaprakash , et al., (2014) J. Am.5 Chem. Soc., 136, 16958–16961.

ID#	Porcentaje de reducción del AGT mRNA humano en hígado de ratón medido por qPCR	Porcentaje de reducción del AGT humano en plasma de ratón medido por ELISA
AD00052	72%	65%
AD00154	37%	NA
AD00155	51%	NA
AD00156	48%	NA
AD00157	71%	NA
AD00158	96%	87%
AD00159	94%	80%
AD00160	68%	NA
AD00161	77%	NA
AD00162	85%	NA
AD00163	94%	81%

NA significa no medido.

Tabla 8. Cribado de dosis única AGT de 2,5 mpk en ratones transducidos con AGT humano AAV; utilizando compuestos correspondientes a la secuencia, modificación química y administración que se exhiben en la Tabla 3, en la que el GLO-0 se refiere al compuesto de administración GalNAc3 en Jayaprakash , et al., (2014) J. Am. Chem. Soc., 136, 16958–16961.

AD#	Porcentaje de reducción del AGT mRNA humano en hígado de ratón medido por qPCR
AD00052	73,2%
AD00252	25,9%
AD00257	39,1%
AD00260	42,2%
AD00123	74,2%
AD00284	79,6%
AD00158	92,7%
AD00288	86,9%
AD00163	88,9%

AD00289	66,3%
AD00159	85,7%
AD00290	85,2%
AD00285	26,4%
AD00286	54,1%
AD00287	0,5%
AD00256	72,3%
AD00282	81,5%
AD00283	59,8%
AD00291	-29,9%
AD00292	78,1%
AD00293	17,9%
AD00294	60,8%
AD00298	-14,0%
AD00299	53,2%
AD00300	89,4%
AD00301	-47,3%
AD00302	62,1%

Tabla 9. Cribado de dosis única AGT de 2,5 mpk en ratones transducidos con AGT humano AAV; utilizando compuestos correspondientes a la secuencia, modificación química y administración que se exhiben en la Tabla 3 o la Tabla 4, en la que el GLO-0 se refiere al compuesto de administración GalNAc3 en Jayaprakash , et al., (2014) J. Am. Chem. SOC., 136, 16958–16961.

ID#	Porcentaje de reducción del AGT humano en plasma de ratón medido por ELISA	Porcentaje de reducción del AGT mRNA humano en hígado de ratón medido por qPCR
		NA
AD00158	86%	NA
AD00158-1	85%	NA
AD00158-2	68%	NA
AD00122	83%	84%

AD00159	77%	NA
AD00159-1	77%	90%
AD00163	81%	76%
AD00163-1	89%	90%
AD00300	66%	NA
AD00300-1	69%	69%

NA significa no medido.

EJEMPLO DE IMPLEMENTACIÓN 6. PRUEBAS IN VIVO DE DÚPLEX DE AGT siRNA

Con el fin de evaluar la actividad in vivo del AGT siRNA, se reclutaron en este estudio un total de 15 monos cynomolgus machos (de 13 a 22 años de edad, con un peso de 7 a 9 kg). Los animales se dividieron aleatoriamente en 5 grupos, 3 en cada grupo, y a cada animal se le administró una inyección subcutánea de 2 mg/kg de artículo de prueba, el artículo de prueba utilizado corresponde a los compuestos en la Tabla 4 (AD00158-1, AD00158-2, AD00163-1, AD00159-1, AD00300-1).

Después de un ayuno nocturno, los días -14 (pre-dosis), -7 (pre-dosis), 1 (pre-dosis) y post-dosis de los días 8, 15, 22, 29, 43, 57, 64, 71, 78, 85 y 92 se llevó a cabo la extracción de sangre. Las muestras de sangre recogidas se dejaron a temperatura ambiente durante al menos 30 minutos para que coagularan, y luego se centrifugaron a 350 rpm durante 10 minutos a 4 °C. Se transfirió el suero recolectado (aproximadamente 1,0 ml) a dos viales de polipropileno con tapón de rosca preetiquetados (0,5 ml/vial, uno para el ensayo ELISA y el otro para el de repuesto) y se guardó en un congelador a -80 °C hasta el ensayo.

El nivel de proteína AGT en suero se determinó por el método Elisa. Los resultados del porcentaje restante en comparación con el nivel AGT en el plasma de los monos el primer día se exhiben en la figura 1.

EJEMPLO DE IMPLEMENTACIÓN 7. CRIBADO IN VITRO DE DÚPLEX DE AGT siRNA

La investigación in vitro se llevó a cabo de acuerdo con el método del Ejemplo 4, y los resultados experimentales se exhiben en la Tabla 10.

En la Tabla 10 se presentaron los resultados experimentales de los

estudios in vitro de inhibición de la expresión AGT utilizando diversos agentes de AGT RNAi; las secuencias bicatenarias utilizadas corresponden a los compuestos mostrados en la Tabla 2.

Dúplex AD#	% de inhibición media			
	1 nM		0,2 nM	
	Promedio	SD	Promedio	SD
AV01227	93,57	0,03	85,93	0,60
AV01228	91,34	3,40	82,13	0,53
AV01229	80,82	3,46	56,60	1,35
AV01230	78,49	1,26	39,11	0,04
AV01231	49,54	6,13	0,54	6,09
AV01232	80,88	1,05	53,41	1,59
AV01233	89,59	1,75	75,97	2,40
AV01234	89,20	1,86	73,90	1,12
AV01235	86,81	0,00	70,59	3,93
AV01236	90,40	0,66	79,11	2,11
AV01237	82,94	0,71	67,31	2,28
AV01238	84,52	0,63	71,77	1,19
AV01239	81,62	2,26	65,69	2,63
AV01240	87,57	1,05	73,71	1,72
AV01241	88,57	0,37	75,29	1,65
AV01242	88,03	1,08	76,62	1,46
AV01243	90,29	0,30	82,39	1,85
AV01244	86,57	0,96	75,39	2,98
AV01245	81,30	3,09	68,25	4,27
AV01246	74,37	3,11	55,34	6,77
AV01247	63,44	8,48	39,83	6,91
AV01248	73,97	1,99	48,68	2,50
AV01249	64,97	6,78	12,91	15,95
AV01250	88,45	0,15	70,96	0,83
AV01251	89,94	0,35	72,82	2,77
AV01252	87,26	1,72	65,79	2,21

AV01253	86,71	2,13	66,42	0,25
AV01254	90,45	0,53	81,11	1,59
AV01255	89,78	0,42	83,48	2,51
AV01256	89,36	0,69	78,84	0,72
AV01257	92,88	0,13	85,27	0,49

EJEMPLO DE IMPLEMENTACIÓN 8. PRUEBAS IN VIVO DE AD00163-3 EN UN MODELO DE RATÓN AAV:

Tras el periodo de adaptación, 12 ratones hembra C57BL/6J se dividieron aleatoriamente en dos grupos según el peso corporal: grupo modelo (vehículo) y grupo AD00163-3 (1 mg/kg). A cada ratón se le inyectó 1×10^{11} vg del virus AAV-AGT a través de la vena de la cola el primer día para establecer el modelo animal, y el volumen de inyección fue de 100 μ L/ratón. Al día 15, los ratones de cada grupo recibieron PBS o AD00163-3 de la Tabla 4 por inyección subcutánea, y el volumen de administración fue de 5 mL/kg. Antes de la administración del día 15, se recolectó sangre de cada ratón a través de la vena submandibular y se recolectaron muestras de suero después de la centrifugación. En el día 22, todos los ratones fueron sacrificados por CO₂, se recolectó sangre total por punción cardíaca y se recolectaron muestras de suero después de la centrifugación. La concentración de la proteína AGT humana se midió mediante el ensayo ELISA de acuerdo con el protocolo recomendado por el fabricante (IBL America, Kit ELISA de angiotensinógeno humano). El porcentaje de reducción se calculó comparando los niveles de proteína AGT de origen humano en muestras de plasma de ratón el día 7 (después de la administración) del grupo tratado con siRNA y el grupo tratado con PBS. Los datos mostraron que el tratamiento con AD00163-3 (1 mg/kg) podría reducir significativamente la expresión de la proteína AGT humana en suero de ratón en un 91%.

EJEMPLO DE IMPLEMENTACIÓN 9 PRUEBA DE AD00163-3 EN UN MODELO DE HIPERTENSIÓN ESPONTÁNEA DE MONOS CYNOMOLGUS.

Diez monos cynomolgus con presión arterial elevada se dividieron aleatoriamente en dos grupos (5 monos cada uno) para recibir solución salina de 4 a 10 mg/kg o AD00163-3 de la Tabla 4. Se recogieron muestras los días -6 y -2 (antes de la dosis) y los días 2, 7, 14, 21, 28 y 35 (después de la dosis). Las concentraciones séricas AGT se midieron mediante ELISA de acuerdo con el

protocolo recomendado por el fabricante, y en sangre. La presión se midió usando un dispositivo de manguito en la cola, como se muestra en las Figuras 2 y 3, respectivamente, mientras que la AGT sérica disminuye (reducción del 98% el día 35 después de la administración), una dosis subcutánea única de 10 mg/kg de AD00163-3 dio como resultado. una disminución significativa de la PAS de 28 mmHg (PAS desde el valor inicial de 147 mmHg a 119 mmHg) el día 35 después de la administración, mientras que la PAS del grupo de control no cambió significativamente durante el mismo período (PAS desde el valor inicial de 144 mmHg a 145 mmHg). Reducciones significativas en la media y la diastólica. (MBP y DBP) también se observaron como se muestra en las Figuras 4 y 5, respectivamente.

EQUIVALENTES

Aunque en el presente documento se han descrito e ilustrado varias modalidades de la presente invención, los expertos en la técnica imaginarán fácilmente una variedad de otros medios y/o estructuras para realizar las funciones y/u obtener los resultados y/o uno o más de las ventajas descritas en el presente documento, y cada una de dichas variaciones y/o modificaciones se considera que está dentro del alcance de la presente invención. De manera más general, los expertos en la materia apreciarán fácilmente que todos los parámetros, dimensiones, materiales y configuraciones descritos en este documento están destinados a ser ejemplares y que los parámetros, dimensiones, materiales y/o configuraciones reales dependerán de la aplicación o aplicaciones específicas para las que se utilizan las enseñanzas de la presente invención. Los expertos en la técnica reconocerán, o podrán determinar utilizando únicamente experimentación rutinaria, muchos equivalentes a las modalidades específicas de la invención descritas en el presente documento. Por lo tanto, debe entenderse que las modalidades siguientes se presentan a modo de ejemplo únicamente y que, dentro del alcance de las reclamaciones adjuntas y sus equivalentes, la invención se puede practicar de otra manera que la descrita y reivindicada específicamente. La presente invención está dirigida a cada característica individual, sistema, artículo, material y/o método descrito en este documento. Además, cualquier combinación de dos o más de dichas características, sistemas,

artículos, materiales y/o métodos, si tales características, sistemas, artículos, materiales y/o métodos no son mutuamente inconsistentes, se incluye dentro del alcance de la presente invención.

Todas las definiciones tal como se definen y utilizan en este documento deben entenderse como referencias a definiciones de diccionarios, definiciones de los documentos incorporados por referencia y/o significados corrientes de los términos definidos.

Cuando no se utilice una limitación cuantitativa en la descripción y en las reivindicaciones, deberá entenderse como "al menos una" a menos que se indique explícitamente lo contrario.

Tal como se utiliza en las especificaciones y en las reivindicaciones, se debe entender que la frase "y/o" significa "uno o ambos" de los elementos combinados de manera que en algunos casos dichos elementos aparecen combinados y en otros casos por separado. Además de los elementos específicamente identificados por "y/o", opcionalmente pueden estar presentes otros elementos, ya sean relacionados o no con esos elementos específicamente identificados, a menos que se indique expresamente lo contrario.

Todas las referencias, patentes, solicitudes de patentes y publicaciones citadas o a las que se hace referencia en esta solicitud se incorporan en el presente documento como referencia en su totalidad.