

COMPOSICIONES Y MÉTODOS PARA INHIBIR LA EXPRESIÓN DE SERINA PROTEASA TRANSMEMBRANA 6 (TMPRSS6)

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

5 El hierro es un micronutriente que es un componente biológicamente esencial de cada organismo vivo. Se requiere para una función eritropoyética adecuada, metabolismo oxidativo, respuesta inmunitaria celular y muchos otros procesos celulares. En su forma libre, el hierro participa en las reacciones de oxidación-reducción, lo que conduce a la formación de radicales libres, estrés oxidativo que puede provocar daño orgánico. Los organismos vivos
10 han desarrollado sistemas de proteínas para transportar hierro libre a través de las membranas celulares y los fluidos biológicos y almacenarlo de forma no tóxica y fácilmente movilizable para evitar la toxicidad del hierro. En el cuerpo humano, el hierro existe principalmente en forma de complejos unido a proteínas como compuestos hemo, enzimas hemo o compuestos no hemo. La absorción de hierro se produce por los enterocitos mediante el transporte de metales divalentes 1 y tiene lugar en el duodeno y el yeyuno superior. A continuación, el hierro se transfiere a través de la mucosa duodenal hacia la sangre, donde se transporta mediante la transferrina a las células o la médula ósea para la eritropoyesis. Dado que el hierro se requiere para diversas funciones celulares, se requiere un equilibrio constante entre la captación, el transporte, el almacenamiento y la utilización del hierro para mantener la
15 homeostasis del hierro. La hepcidina, una hormona peptídica circulante codificada por el gen *HAMP*, se secreta por el hígado que desempeña un papel crucial en el mantenimiento de la homeostasis del hierro. La expresión de la hepcidina está regulada directamente por variaciones en la ingesta de hierro y su represión conduce a un aumento del nivel de hierro sérico biodisponible. La hepcidina bloquea el flujo de hierro hacia el plasma por su unión directa a la ferroportina, el principal exportador de hierro que se localiza en la membrana
20 celular de los enterocitos duodenales, que absorben el hierro de la dieta, y los macrófagos, que reciclan el hierro de los eritrocitos senescentes. La unión de la hepcidina a la ferroportina activa su internalización y subsecuente degradación lisosómica, bloqueando de esta manera la exportación de hierro al sistema circulatorio. La expresión hepática de la hepcidina está regulada por tres vías independientes, donde la inflamación (citocinas inflamatorias) y los niveles altos de hierro sérico dan lugar a una regulación al alza de la hepcidina, mientras que está regulada a la baja por una eritropoyesis elevada que facilita una alta demanda de hierro para la producción de eritrocitos. Dicho de otra manera, cuando los niveles de hepcidina son altos, los niveles de hierro sérico disminuyen, lo que puede provocar anemia. Cuando los
25 niveles de hepcidina son bajos, en estados de enfermedad tales como la hemocromatosis, se pueden producir aumentos y sobrecargas de los niveles de hierro.

En situaciones patológicas, la represión prolongada de la hepcidina a menudo conduce a una sobrecarga de hierro primaria, debido a su expresión disfuncional como resultado de la pérdida de función en la vía de señalización plasmática de detección de hierro (por ejemplo, hemocromatosis hereditaria). En situaciones de eritropoyesis elevada pero disfuncional (por
40

ejemplo, betatalasemia), la hepcidina se regula a la baja, lo que provoca una sobrecarga de hierro secundaria. Las consecuencias fisiopatológicas de la sobrecarga de hierro primaria y secundaria son comunes, lo que provoca la acumulación de hierro libre en plasma, acumulación en los órganos que provoca daños en la progresión de la enfermedad.

- 5 La *TMPRSS6* (serina proteasa transmembrana 6) codifica una serina proteasa de tipo II y se expresa principalmente en el hígado. La *TMPRSS6* participa en una vía de señalización de transmembrana que se activa por la deficiencia de hierro y suprime diversas vías de activación del *HAMP*, el gen que codifica la hepcidina.

Los estudios demuestran que la regulación al alza de la hepcidina mejora la eritropoyesis anormal y previene o limita la sobrecarga de hierro en modelos de ratón de β -talasemia intermedia y hemocromatosis hereditaria (Gardenghi y otros. *J. Clin. Invest.*, 2010; Guo y otros. *J. Clin. Invest.*, 2013, Schmidt y otros. *Blood* 2013; Casu y otros. *Blood* 2016; Ramos y otros. *Blood* 2012).

La hemocromatosis hereditaria asociada a HFE es el tipo de trastorno hereditario más común por sobrecarga de hierro, con una alta prevalencia de la mutación p.C282Y en poblaciones del norte de Europa (Alexander y Kowdley, *Genetics in Medicine*, 2009). Se cree que el deterioro de la producción de hepcidina en el hígado provoca una sobrecarga de hierro en la hemocromatosis asociada a HFE. La sobrecarga de hierro en este contexto a menudo provoca complicaciones tales como la cirrosis hepática y la diabetes, así como también insuficiencia de otros órganos afectados.

En consonancia con su papel en la supresión de la expresión de la hepcidina, las mutaciones en *TMPRSS6* provocan trastornos tales como anemia ferropénica resistente al hierro. La expresión de la hepcidina está significativamente elevada en ratones *TMPRSS6* $-/-$ y la reducción de *TMPRSS6* en ratones *Hfe* $-/-$ podría mejorar el fenotipo de sobrecarga de hierro (Du y otros. *Science* 2008; Folgueras y otros. *Blood* 2008; Finberg KE y otros. *Blood*, 2011). Dichas evidencias sugieren un papel para dirigirse a *TMPRSS6* en el tratamiento de enfermedades asociadas con la sobrecarga de hierro. Las opciones de tratamiento actuales para estas enfermedades son limitadas. En consecuencia, actualmente se necesitan métodos para el tratamiento efectivo de trastornos asociados con la sobrecarga de hierro y la presente invención aborda esta necesidad.

RESUMEN DE LA DESCRIPCIÓN

La presente descripción se basa, en parte, en el descubrimiento de oligonucleótidos (por ejemplo, oligonucleótidos de ARNi) que reducen la expresión de *TMPRSS6* *in vitro* e *in vivo*. Se ha demostrado que la expresión aberrante de *TMPRSS6* se asocia con la expresión alterada de *hepcidina* y los niveles de hierro sérico. Como se demuestra en la presente descripción, el hierro sérico y la saturación de hierro sérico se reducen *in vivo* después de la administración de oligonucleótidos de ARNi de *TMPRSS6*. Sin estar limitado por la teoría, la inhibición de *TMPRSS6* aumenta la expresión de la hepcidina y, subsecuentemente, reduce los niveles de hierro sérico, lo que previene la sobrecarga de hierro. Por lo tanto, sin desear unirse a la

teoría, los oligonucleótidos dirigidos a *TMPRSS6* son útiles para tratar enfermedades o trastornos asociados con la deficiencia o supresión de hepcidina.

En consecuencia, en algunos aspectos, la presente descripción proporciona, un oligonucleótido de ARNi para reducir la expresión de serina proteasa transmembrana 6 (*TMPRSS6*), el oligonucleótido comprende una hebra sentido y una hebra antisentido, en donde la hebra sentido y la hebra antisentido forman una región híbrida, en donde la hebra antisentido comprende una región de complementariedad con una secuencia diana de ARNm de *TMPRSS6* de cualquiera de las SEQ ID NO: 661-852, y en donde la región de complementariedad es de al menos 15 nucleótidos contiguos de longitud.

En algunas modalidades, la hebra sentido es de 15 a 50 nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, la hebra sentido es de 18 a 36 nucleótidos de longitud.

En algunas modalidades, la hebra antisentido es de 15 a 30 nucleótidos de longitud.

En algunas modalidades, la hebra antisentido es de 22 nucleótidos de longitud y la hebra antisentido y la hebra sentido forman una región híbrida de al menos 19 nucleótidos de longitud, opcionalmente de al menos 20 nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, la región de complementariedad es de al menos 19 nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, la región de complementariedad es de al menos 20 nucleótidos de longitud.

En algunos aspectos, la descripción proporciona un oligonucleótido de ARNi bicatenario para reducir la expresión de *TMPRSS6*, el oligonucleótido comprende:

(i) una hebra antisentido de 19-30 nucleótidos de longitud, en donde la hebra antisentido comprende una secuencia de nucleótidos que comprende una región de complementariedad con una secuencia diana de ARNm de *TMPRSS6*, en donde la región de complementariedad se selecciona de SEQ ID NO: 1-192, y

(ii) una hebra sentido de 19-50 nucleótidos de longitud que comprende una región de complementariedad con la hebra antisentido, en donde las hebras antisentido y sentido son hebras separadas que forman una región híbrida asimétrica que tiene un saliente de 1-4 nucleótidos en el extremo terminal 3' de la hebra antisentido.

En algunos aspectos, la descripción proporciona un oligonucleótido de ARNi bicatenario para reducir la expresión de *TMPRSS6*, el oligonucleótido comprende:

(i) una hebra antisentido de 19-30 nucleótidos de longitud, en donde la hebra antisentido comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada de las SEQ ID NO: 1-192, y en donde la hebra antisentido es complementaria con una secuencia diana de ARNm de *TMPRSS6*, y

(ii) una hebra sentido de 19-50 nucleótidos de longitud que comprende una región de complementariedad con la hebra antisentido, en donde las hebras antisentido y sentido son hebras separadas que forman una región híbrida asimétrica que tiene un saliente de 1-4 nucleótidos en el extremo terminal 3' de la hebra antisentido.

En algunas modalidades, el extremo 3' de la hebra sentido comprende un tallo-lazo establecido como S1-Lp-S2, en donde S1 es complementario con S2 y en donde Lp forma un lazo entre S1 y S2 de 3-5 nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, Lp es un trilazo o un tetralazo. En algunas modalidades, Lp es un tetralazo. En algunas modalidades,

el tetralazo comprende la secuencia 5'-GAAA-3'. En algunas modalidades, S1 y S2 tienen de 1-10 nucleótidos de longitud y tienen la misma longitud. En algunas modalidades, S1 y S2 tienen 1 nucleótido, 2 nucleótidos, 3 nucleótidos, 4 nucleótidos, 5 nucleótidos, 6 nucleótidos, 7 nucleótidos, 8 nucleótidos, 9 nucleótidos o 10 nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, S1 y S2 tienen 6 nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, el tallo-lazo comprende la secuencia 5'-GCAGCCGAAAGGCUGC-3' (SEQ ID NO: 856).

En algunas modalidades, la hebra sentido, cerca del extremo 3' de la hebra sentido comprende un tallo-lazo establecido como S1-Lp-S2, en donde S1 es complementario con S2 y en donde Lp forma un lazo entre S1 y S2 de 3-5 nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, Lp es un trilazo o un tetralazo. En algunas modalidades, Lp es un tetralazo. En algunas modalidades, el tetralazo comprende la secuencia 5'-GAAA-3'. En algunas modalidades, S1 y S2 tienen de 1-10 nucleótidos de longitud y tienen la misma longitud. En algunas modalidades, S1 y S2 tienen 1 nucleótido, 2 nucleótidos, 3 nucleótidos, 4 nucleótidos, 5 nucleótidos, 6 nucleótidos, 7 nucleótidos, 8 nucleótidos, 9 nucleótidos o 10 nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, S1 y S2 tienen 6 nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, el tallo-lazo comprende la secuencia 5'-GCAGCCGAAAGGCUGC-3' (SEQ ID NO: 856).

En algunas modalidades, la hebra antisentido comprende una secuencia saliente en 3' de uno o más nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, el saliente comprende nucleótidos de purina. En algunas modalidades, la secuencia saliente en 3' es de 2 nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, el saliente en 3' se selecciona de AA, GG, AG y GA. En algunas modalidades, el saliente es GG o AA. En algunas modalidades, el saliente es GG. En algunas modalidades, el oligonucleótido comprende al menos un nucleótido modificado. En algunas modalidades, el nucleótido modificado comprende una modificación en 2'. En algunas modalidades, la modificación en 2' es una modificación que se selecciona de 2'-aminoetilo, 2'-flúor, 2'-O-metilo, 2'-O-metoxietilo y ácido 2'-desoxi-2'-fluoro-β-d-arabinonucleico. En algunas modalidades, la modificación es una modificación en 2' que se selecciona de 2'-flúor y 2'-O-metilo. En algunas modalidades, aproximadamente el 10-15 %, 10 %, 11 %, 12 %, 13 %, 14 % o 15 % de los nucleótidos de la hebra sentido comprenden una modificación 2'-flúor. En algunas modalidades, aproximadamente el 25-35 %, 25 %, 26 %, 27 %, 28 %, 29 %, 30 %, 31 %, 32 %, 33 %, 34 % o 35 % de los nucleótidos de la hebra antisentido comprenden una modificación 2'-flúor. En algunas modalidades, aproximadamente el 25-35 %, 25 %, 26 %, 27 %, 28 %, 29 %, 30 %, 31 %, 32 %, 33 %, 34 % o 35 % de los nucleótidos del oligonucleótido comprenden una modificación 2'-flúor. En algunas modalidades, la hebra sentido comprende 36 nucleótidos con las posiciones 1-36 de 5' a 3', en donde las posiciones 8-11 comprenden una modificación 2'-flúor. En algunas modalidades, la hebra antisentido comprende 22 nucleótidos con las posiciones 1-22 de 5' a 3', y en donde las posiciones 2, 3, 4, 5, 7, 10 y 14 comprenden una modificación 2'-flúor. En algunas modalidades, el oligonucleótido comprende al menos un enlace internucleotídico modificado. En algunas modalidades, al menos un enlace internucleotídico modificado es un

enlace fosforotioato. En algunas modalidades, la hebra antisentido comprende un enlace fosforotioato (i) entre las posiciones 1 y 2, y entre las posiciones 2 y 3; o (ii) entre las posiciones 1 y 2, entre las posiciones 2 y 3, y entre las posiciones 3 y 4, en donde las posiciones están numeradas 1-4 de 5' a 3'. En algunas modalidades, la hebra antisentido es de 22 nucleótidos de longitud, y en donde la hebra antisentido comprende un enlace fosforotioato entre las posiciones 20 y 21 y entre las posiciones 21 y 22, en donde las posiciones están numeradas 1-22 de 5' a 3'. En algunas modalidades la hebra antisentido es de 22 nucleótidos de longitud, y en donde la hebra antisentido comprende un enlace fosforotioato entre las posiciones 1 y 2, entre las posiciones 2 y 3, posiciones 3 y 4, posiciones 20 y 21 y posiciones 21 y 22. En algunas modalidades, la hebra sentido comprende un enlace fosforotioato entre las posiciones 1 y 2, en donde las posiciones están numeradas de 5' a 3'. En algunas modalidades, el carbono 4' del azúcar del nucleótido 5' de la hebra antisentido comprende un análogo de fosfato. En algunas modalidades, el análogo de fosfato es oximetilfosfonato, vinilfosfonato o malonilfosfonato, opcionalmente en donde el análogo de fosfato es un análogo de 4'-fosfato que comprende 4'-oximetoxifosfonato.

En algunas modalidades, al menos un nucleótido del oligonucleótido se conjuga con uno o más ligandos de direccionamiento. En algunas modalidades, cada ligando de direccionamiento comprende un carbohidrato, un aminoazúcar, colesterol, o un polipéptido. En algunas modalidades, el tallo-lazo comprende uno o más ligandos de direccionamiento conjugados con uno o más nucleótidos del tallo-lazo. En algunas modalidades, el uno o más ligandos de direccionamiento se conjugan con uno o más nucleótidos del lazo. En algunas modalidades, el lazo comprende 4 nucleótidos numerados 1-4 de 5' a 3', en donde cada uno de los nucleótidos en las posiciones 2, 3 y 4 comprende uno o más ligandos de direccionamiento, en donde los ligandos de direccionamiento son iguales o diferentes. En algunas modalidades, cada ligando de direccionamiento comprende un resto de N-acetilgalactosamina (GalNAc). En algunas modalidades, el resto de GalNAc es un resto de GalNAc monovalente, un resto de GalNAc bivalente, un resto de GalNAc trivalente o un resto de GalNAc tetravalente. En algunas modalidades, hasta 4 nucleótidos de Lp del tallo-lazo se conjugan cada uno con un resto de GalNAc monovalente.

En algunas modalidades, la región de complementariedad es totalmente complementaria a una secuencia diana de ARNm. En algunas modalidades, la región de complementariedad es parcialmente complementaria a una secuencia diana de ARNm. En algunas modalidades, la región de complementariedad comprende no más de cuatro errores de apareamiento con la secuencia diana de ARNm.

En algunas modalidades, la región de complementariedad es totalmente complementaria a la secuencia diana del ARNm de *TMPRSS6* en las posiciones de nucleótidos 2-8 de la hebra antisentido, en donde las posiciones de nucleótidos se numeran de 5' a 3'. En algunas modalidades, la región de complementariedad es totalmente complementaria a la secuencia diana del ARNm de *TMPRSS6* en las posiciones de nucleótidos 2-11 de la hebra antisentido, en donde las posiciones de nucleótidos se numeran de 5' a 3'.

En algunas modalidades, la hebra sentido comprende una secuencia de nucleótidos de cualquiera de las SEQ ID NO: 579-580, 585-587, 590 y 595-597. En algunas modalidades, la hebra antisentido comprende una secuencia de nucleótidos de cualquiera de las SEQ ID NO: 600-601, 606-608, 611 y 616-618.

5 En algunas modalidades, la hebra sentido y las hebras antisentido comprenden secuencias de nucleótidos que se seleccionan del grupo que consiste en:

- a) SEQ ID NO: 579 y 600, respectivamente;
- b) SEQ ID NO: 580 y 601, respectivamente;
- c) SEQ ID NO: 595 y 616, respectivamente;
- 10 d) SEQ ID NO: 590 y 611, respectivamente;
- e) SEQ ID NO: 596 y 617, respectivamente;
- f) SEQ ID NO: 597 y 618, respectivamente;
- g) SEQ ID NO: 585 y 606, respectivamente;
- h) SEQ ID NO: 586 y 607, respectivamente; y,

15 i) SEQ ID NO: 587 y 608, respectivamente.

En algunas modalidades, la hebra sentido y las hebras antisentido comprenden secuencias de nucleótidos que se seleccionan del grupo que consiste en:

- a) SEQ ID NO: 579 y 600, respectivamente;
- b) SEQ ID NO: 580 y 601, respectivamente;
- 20 c) SEQ ID NO: 590 y 611, respectivamente;
- d) SEQ ID NO: 597 y 618, respectivamente; y,
- e) SEQ ID NO: 586 y 607, respectivamente.

En algunas modalidades, la hebra sentido comprende una secuencia de nucleótidos como se establece en la SEQ ID NO: 579, y la hebra antisentido comprende una secuencia de nucleótidos como se establece en la SEQ ID NO: 600. En algunas modalidades, la hebra sentido comprende una secuencia de nucleótidos como se establece en la SEQ ID NO: 580, y la hebra antisentido comprende una secuencia de nucleótidos como se establece en la SEQ ID NO: 601. En algunas modalidades, la hebra sentido comprende una secuencia de nucleótidos como se establece en la SEQ ID NO: 590, y la hebra antisentido comprende una secuencia de nucleótidos como se establece en la SEQ ID NO: 611. En algunas modalidades, la hebra sentido comprende una secuencia de nucleótidos como se establece en la SEQ ID NO: 597, y la hebra antisentido comprende una secuencia de nucleótidos como se establece en la SEQ ID NO: 618. En algunas modalidades, la hebra sentido comprende una secuencia de nucleótidos como se establece en la SEQ ID NO: 586, y la hebra antisentido comprende una secuencia de nucleótidos como se establece en la SEQ ID NO: 607.

En algunas modalidades, la hebra antisentido es de 22 nucleótidos de longitud.

En algunas modalidades, la hebra antisentido comprende una secuencia de nucleótidos que se selecciona de las SEQ ID NO: 600-601, 606-608, 611, y 616-618.

En algunas modalidades, la hebra sentido de 36 nucleótidos de longitud.

En algunas modalidades, la hebra sentido comprende una secuencia de nucleótidos seleccionadas de las SEQ ID NO: 579-580, 585-587, 590, y 595-597.

En algunas modalidades, la hebra sentido y las hebras antisentido comprenden secuencias de nucleótidos que se seleccionan del grupo que consiste en:

- 5 a) SEQ ID NO: 621 y 642, respectivamente;
- b) SEQ ID NO: 622 y 643, respectivamente;
- c) SEQ ID NO: 637 y 658, respectivamente;
- d) SEQ ID NO: 632 y 653, respectivamente;
- e) SEQ ID NO: 638 y 659, respectivamente;
- 10 f) SEQ ID NO: 639 y 660, respectivamente;
- g) SEQ ID NO: 627 y 648, respectivamente;
- h) SEQ ID NO: 628 y 649, respectivamente; y,
- i) SEQ ID NO: 629 y 650, respectivamente.

En algunas modalidades, la hebra sentido y las hebras antisentido comprenden secuencias de nucleótidos que se seleccionan del grupo que consiste en:

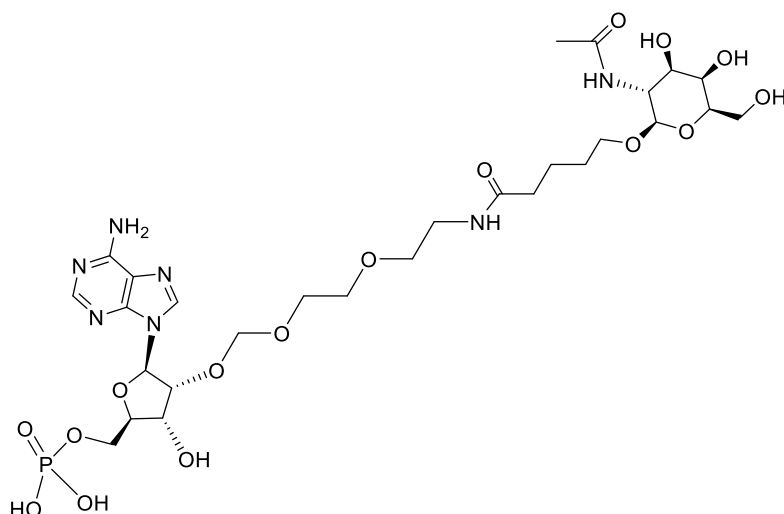
- 15 a) SEQ ID NO: 621 y 642, respectivamente;
- b) SEQ ID NO: 622 y 643, respectivamente;
- c) SEQ ID NO: 632 y 653, respectivamente;
- d) SEQ ID NO: 639 y 660, respectivamente; y,
- 20 e) SEQ ID NO: 628 y 649, respectivamente.

En algunas modalidades, la hebra sentido comprende una secuencia de nucleótidos como se establece en la SEQ ID NO: 621, y la hebra antisentido comprende una secuencia de nucleótidos como se establece en la SEQ ID NO: 642. En algunas modalidades, la hebra sentido comprende una secuencia de nucleótidos como se establece en la SEQ ID NO: 622, y la hebra antisentido comprende una secuencia de nucleótidos como se establece en la SEQ ID NO: 643. En algunas modalidades, la hebra sentido comprende una secuencia de nucleótidos como se establece en la SEQ ID NO: 632, y la hebra antisentido comprende una secuencia de nucleótidos como se establece en la SEQ ID NO: 653. En algunas modalidades, la hebra sentido comprende una secuencia de nucleótidos como se establece en la SEQ ID NO: 639, y la hebra antisentido comprende una secuencia de nucleótidos como se establece en la SEQ ID NO: 660. En algunas modalidades, la hebra sentido comprende una secuencia de nucleótidos como se establece en la SEQ ID NO: 628, y la hebra antisentido comprende una secuencia de nucleótidos como se establece en la SEQ ID NO: 649.

En algunos aspectos, la descripción proporciona un oligonucleótido de ARNi para reducir la expresión de *TMPRSS6*, el oligonucleótido comprende una hebra sentido y una hebra antisentido, en donde la hebra sentido comprende la secuencia y todas las modificaciones de 5'

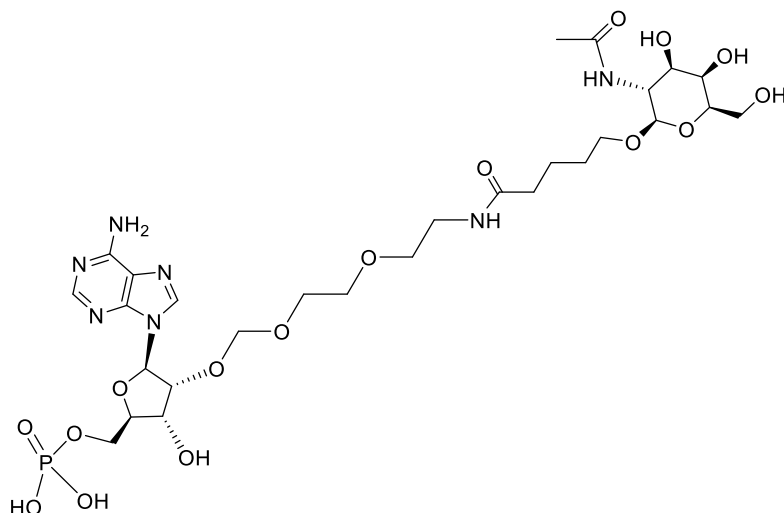
[mGs][mG][mU][mG][mC][mU][mA][fC][fU][fC][fU][mG][mG][mU][mA][mU][mU][mU][mC][mA][mG][mC][mA][mG][mC][mC][mG][ademA-GalNAc][ademA-GalNAc][ademA-GalNAc][mG][mG][mC][mU][mG][mC]-3' (SEQ ID NO: 621), y en

donde la hebra antisentido comprende la secuencia y todas las modificaciones de 5'
 [MeFosfonatu-4O-
 mUs][fGs][fAs][fA][fA][mU][fA][mC][mC][fA][mG][mA][mG][fU][mA][mG][mC][mA]
 [mC][mCs][mGs][mG]-3' (SEQ ID NO: 642), en donde mC, mA, mG, mU=ribonucleósidos
 2'-OMe; fA, fC, fG, fU=ribonucleósidos 2'-F; s=fosforotioato, y en donde ademA-GalNAc
 5 =



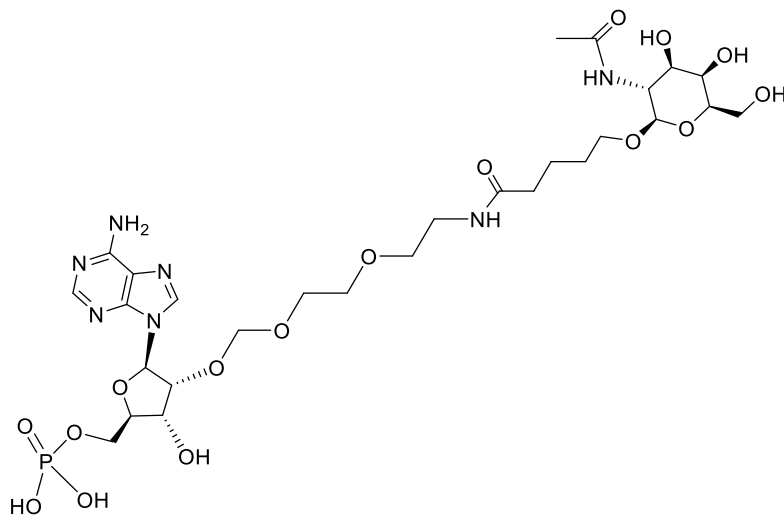
En algunos aspectos, la descripción proporciona un oligonucleótido de ARNi para reducir la
 expresión de *TMPRSS6*, el oligonucleótido comprende una hebra sentido y una hebra
 10 antisentido, en donde la hebra sentido comprende la secuencia y todas las modificaciones de
 5'

[mGs][mC][mU][mA][mC][mU][mC][fU][fG][fG][fU][mA][mU][mU][mU][mC][mC][m
 U][mA][mA][mG][mC][mA][mG][mC][mC][mG][ademA-GalNAc][ademA-
 GalNAc][ademA-GalNAc][mG][mG][mC][mU][mG][mC]-3' (SEQ ID NO: 622), y en
 15 donde la hebra antisentido comprende la secuencia y todas las modificaciones de 5'
 [MeFosfonato-4O-
 mUs][fUs][fAs][fG][fG][mA][fA][mA][mU][fA][mC][mC][mA][fG][mA][mG][mU][mA]
 [mG][mCs][mGs][mG]-3' (SEQ ID NO: 643), en donde mC, mA, MG, mU=ribonucleósidos
 2'-OMe; fA, fC, fG, fU=ribonucleósidos 2'-F; s=fosforotioato, y en donde ademA-GalNAc
 20 =



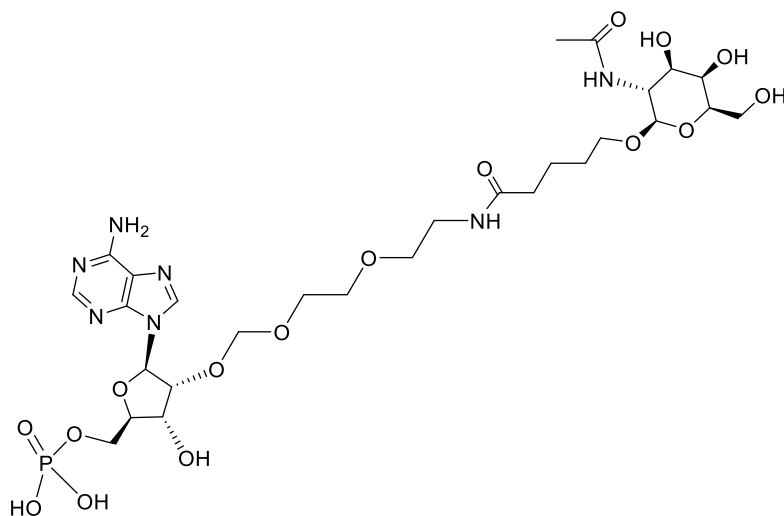
En algunos aspectos, la descripción proporciona un oligonucleótido de ARNi para reducir la expresión de *TMPRSS6*, el oligonucleótido comprende una hebra sentido y una hebra antisentido, en donde la hebra sentido comprende la secuencia y todas las modificaciones de 5'

- 5 [mCs][mU][mC][mA][mC][mC][mU][fG][fC][fU][fU][mC][mU][mU][mC][mU][mG][mG][mU][mA][mG][mC][mA][mG][mC][mC][mG][ademA-GalNAc][ademA-GalNAc][ademA-GalNAc][mG][mG][mC][mU][mG][mC]-3' (SEQ ID NO: 632), y en donde la hebra antisentido comprende la secuencia y todas las modificaciones de 5' - [MeFosfonato-4O-mUs][fAs][fCs][fC][fA][mG][fA][mA][mG][fA][mA][mG][mC][fA]
- 10 [mG][mG][mU][mG][mA][mGs][mGs][mG]-3' (SEQ ID NO: 653), en donde mC, mA, mG, mU=ribonucleósidos 2'-OMe; fA, fC, fG, fU=ribonucleósidos 2'-F; s=fosforotioato, y en donde ademA-GalNAc =

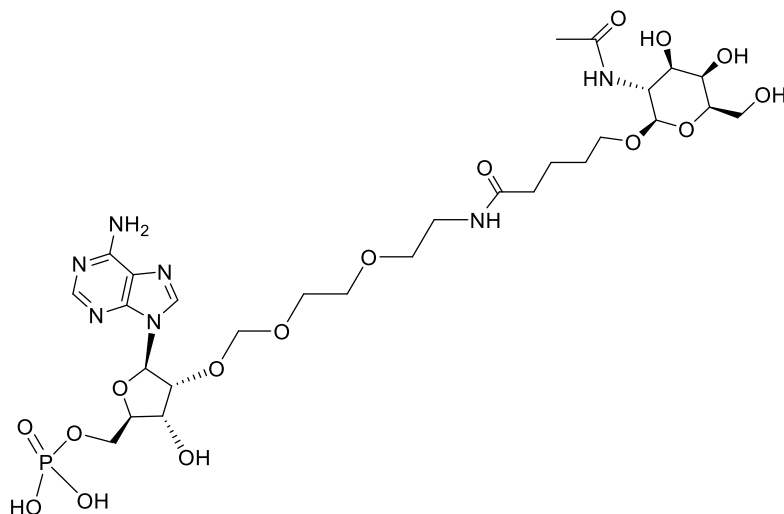


- En algunos aspectos, la descripción proporciona un oligonucleótido de ARNi para reducir la expresión de *TMPRSS6*, el oligonucleótido comprende una hebra sentido y una hebra antisentido, en donde la hebra sentido comprende la secuencia y todas las modificaciones de 5'

- 15 [mAs][mG][mU][mG][mU][mG][mA][fA][fA][fG][fA][mC][mA][mU][mA][mG][mC][mU][mG][mA][mG][mC][mA][mG][mC][mC][mG][ademA-GalNAc][ademA-GalNAc][ademA-GalNAc][mG][mG][mC][mU][mG][mC]3' (SEQ ID NO: 639), y en donde la hebra antisentido comprende la secuencia y todas las modificaciones de 5'- [MeFosfonato-4O-
- 20 mUs][fCs][fAs][fG][fC][mU][fA][mU][mG][fU][mC][mU][mU][fU][mC][mA][mC][mA][mC][mUs][mGs][mG]-3' (SEQ ID NO: 660), en donde mC, mA, mG, mU=ribonucleósidos 2'-OMe; fA, fC, fG, fU=ribonucleósidos 2'-F; s=fosforotioato, y en donde ademA-GalNAc =
- 25 =



En algunos aspectos, la descripción proporciona un oligonucleótido de ARNi para reducir la expresión de *TMPRSS6*, el oligonucleótido comprende una hebra sentido y una hebra antisentido, en donde la hebra sentido comprende la secuencia y todas las modificaciones de 5' 5' [mGs][mG][mG][mU][mG][mC][mA][fC][fU][fA][fU][mG][mG][mC][mU][mU][mG][mU][mA][mA][mG][mC][mA][mG][mC][mC][mG][ademA-GalNAc][ademA-GalNAc][ademA-GalNAc][mG][mG][mC][mU][mG][mC]3' (SEQ ID NO: 628), y en donde la hebra antisentido comprende la secuencia y todas las modificaciones de 5'- 10 [MeFosfonato-4O-mUs][fUs][fAs][fC][fA][mA][fG][mC][mC][fA][mU][mA][mG][fU][mG][mC][mA][mC][mC][mCs][mGs][mG] -3' (SEQ ID NO: 649), en donde mC, mA, mG, mU=ribonucleósidos 2'-OMe; fA, fC, fG, fU=ribonucleósidos 2'-F; s=fosforotioato, y en donde ademA-GalNAc =



En algunos aspectos, la descripción proporciona un oligonucleótido de ARNi para reducir la expresión de *TMPRSS6*, el oligonucleótido comprende una hebra sentido y una hebra antisentido, en donde la hebra sentido comprende la SEQ ID NO: 621 y la hebra antisentido comprende la SEQ ID NO: 642, la hebra antisentido que comprende una región de complementariedad a un transcripto de ARN de *TMPRSS6*, en donde dicho ARNi tiene forma de un conjugado que tiene la estructura como se muestra en la Figura 14A.

En algunos aspectos, la descripción proporciona un oligonucleótido de ARNi para reducir la expresión de *TMPRSS6*, el oligonucleótido comprende una hebra sentido y una hebra antisentido, en donde la hebra sentido comprende la SEQ ID NO: 632 y la hebra antisentido comprende la SEQ ID NO: 653, la hebra antisentido que comprende una región de complementariedad a un transcripto de ARN de *TMPRSS6*, en donde dicho ARNi tiene forma de un conjugado que tiene la estructura como se muestra en la Figura 14B.

En algunos aspectos, la descripción proporciona un oligonucleótido de ARNi para reducir la expresión de *TMPRSS6*, el oligonucleótido comprende una hebra sentido y una hebra antisentido, en donde la hebra sentido comprende la SEQ ID NO: 639 y la hebra antisentido comprende la SEQ ID NO: 660, la hebra antisentido que comprende una región de complementariedad a un transcripto de ARN de *TMPRSS6*, en donde dicho ARNi tiene forma de un conjugado que tiene la estructura como se muestra en la Figura 14C.

En algunos aspectos, la descripción proporciona un oligonucleótido de ARNi para reducir la expresión de *TMPRSS6*, el oligonucleótido comprende una hebra sentido y una hebra antisentido, en donde la hebra sentido comprende la SEQ ID NO: 628 y la hebra antisentido comprende la SEQ ID NO: 649, la hebra antisentido que comprende una región de complementariedad a un transcripto de ARN de *TMPRSS6*, en donde dicho ARNi tiene forma de un conjugado que tiene la estructura como se muestra en la Figura 14D.

En algunos aspectos, la descripción proporciona un oligonucleótido de ARNi para reducir la expresión de *TMPRSS6*, el oligonucleótido comprende una hebra sentido y una hebra antisentido, en donde la hebra sentido comprende la SEQ ID NO: 621 y la hebra antisentido comprende la SEQ ID NO: 642, la hebra antisentido que comprende una región de complementariedad a un transcripto de ARN de *TMPRSS6*, en donde dicho ARNi tiene forma de un conjugado que tiene la estructura como se muestra en las Figuras. 10A-B.

En algunos aspectos, la descripción proporciona un oligonucleótido de ARNi para reducir la expresión de *TMPRSS6*, el oligonucleótido comprende una hebra sentido y una hebra antisentido, en donde la hebra sentido comprende la SEQ ID NO: 632 y la hebra antisentido comprende la SEQ ID NO: 653, la hebra antisentido que comprende una región de complementariedad a un transcripto de ARN de *TMPRSS6*, en donde dicho ARNi tiene forma de un conjugado que tiene la estructura como se muestra en las Figuras. 11A-B.

En algunos aspectos, la descripción proporciona un oligonucleótido de ARNi para reducir la expresión de *TMPRSS6*, el oligonucleótido comprende una hebra sentido y una hebra antisentido, en donde la hebra sentido comprende la SEQ ID NO: 639 y la hebra antisentido comprende la SEQ ID NO: 660, la hebra antisentido que comprende una región de complementariedad a un transcripto de ARN de *TMPRSS6*, en donde dicho ARNi tiene forma de un conjugado que tiene la estructura como se muestra en las Figuras. 12A-B.

En algunos aspectos, la descripción proporciona un oligonucleótido de ARNi para reducir la expresión de *TMPRSS6*, el oligonucleótido comprende una hebra sentido y una hebra antisentido, en donde la hebra sentido comprende la SEQ ID NO: 628 y la hebra antisentido comprende la SEQ ID NO: 649, la hebra antisentido que comprende una región de

complementariedad a un transcripto de ARN de *TMPRSS6*, en donde dicho ARNi tiene forma de un conjugado que tiene la estructura como se muestra en las Figuras. 13A-B.

En algunas modalidades, la descripción proporciona una composición farmacéutica que comprende un oligonucleótido de ARNi que se describe en la presente descripción y un

5 portador, agente de suministro o excipiente farmacéuticamente aceptables.

En algunas modalidades, la descripción proporciona un método para tratar a un sujeto que tiene una enfermedad, trastorno o afección asociados con la deficiencia o supresión de hepcidina, el método comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de un oligonucleótido de ARNi o una composición farmacéutica que se describe en la

10 presente descripción, para tratar de esta manera al sujeto. En algunas modalidades, la expresión de hepcidina aumenta después de administrar el oligonucleótido de ARNi. En algunas modalidades, los niveles de saturación de hierro en el suero disminuyen después de administrar el oligonucleótido de ARNi. En algunas modalidades, los niveles de hierro sérico disminuyen después de administrar el oligonucleótido de ARNi.

15 En algunas modalidades, la descripción proporciona un método para suministrar un oligonucleótido a un sujeto, el método comprende administrar una composición farmacéutica que se describe en la presente descripción al sujeto.

En algunas modalidades, la descripción proporciona un método para reducir la expresión de *TMPRSS6* en una célula, una población de células o un sujeto, el método comprende la etapa

20 de:

i. poner en contacto la célula o la población de células con un oligonucleótido de ARNi que se describe en la presente descripción, o una composición farmacéutica que se describe en la presente descripción; o

ii. administrar al sujeto un oligonucleótido de ARNi que se describe en la presente

25 descripción, o una composición farmacéutica que se describe en la presente descripción.

En algunas modalidades, la reducción de la expresión de *TMPRSS6* comprende reducir una cantidad o nivel de ARNm de *TMPRSS6*, una cantidad o nivel de proteína matriptasa-2, o ambos. En algunas modalidades, la reducción de la expresión de *TMPRSS6* da como resultado un aumento en la producción de hepcidina. En algunas modalidades, la reducción

30 de la expresión de *TMPRSS6* da como resultado una disminución de los niveles de hierro sérico. En algunas modalidades, la reducción de la expresión de *TMPRSS6* da como resultado una disminución de la saturación de hierro sérico.

En algunas modalidades, el sujeto tiene una enfermedad, trastorno o afección asociada con la deficiencia o supresión de hepcidina. En algunas modalidades, la enfermedad, trastorno o

35 afección asociada con la deficiencia de hepcidina es hemocromatosis o betatalasemia. En algunas modalidades, la enfermedad, trastorno o afección asociada con la supresión de la hepcidina es policitemia vera.

En algunas modalidades, el oligonucleótido de ARNi, o la composición farmacéutica, se administra en combinación con una segunda composición o agente terapéutico.

En algunas modalidades, la descripción proporciona el uso de un oligonucleótido de ARNi o una composición farmacéutica que se describe en la presente descripción, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad, trastorno o afección asociada con la deficiencia o supresión de hepcidina, opcionalmente para el tratamiento de la hemocromatosis (por ejemplo, hemocromatosis hereditaria), policitemia vera o betatalasemia.

En algunas modalidades, la descripción proporciona un oligonucleótido de ARNi o una composición farmacéutica que se describe en la presente descripción, para su uso, o adaptable para su uso, en el tratamiento de una enfermedad, trastorno o afección asociada con la deficiencia o supresión de hepcidina, opcionalmente para el tratamiento de la hemocromatosis (por ejemplo, hemocromatosis hereditaria), policitemia vera o betatalasemia.

En algunas modalidades, la descripción proporciona un kit que comprende un oligonucleótido de ARNi que se describe en la presente descripción, un portador farmacéuticamente aceptable opcional y un prospecto que comprende las instrucciones para la administración a un sujeto que tiene una enfermedad, trastorno o afección asociados con la deficiencia o supresión de hepcidina.

En algunas modalidades, la descripción proporciona un oligonucleótido de ARNi o una composición farmacéutica para su uso, o adaptable para su uso, o un kit que se describe en la presente descripción, en donde la enfermedad, trastorno o afección asociada con la deficiencia o supresión de hepcidina es hemocromatosis (por ejemplo, hemocromatosis hereditaria), policitemia vera o betatalasemia.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Las Figuras 1A y 1B proporcionan gráficos que representan el por ciento (%) de ARNm de *TMPRSS6* humano restante en hígado de ratones que expresan exógenamente *TMPRSS6* humano (modelo de inyección hidrodinámica) después del tratamiento con oligonucleótidos de *TMPRSS6* conjugados con GalNAc. Los ratones CD-1 se dosifican por vía subcutánea con 1 mg/kg o 2 mg/kg del oligonucleótido de *TMPRSS6* conjugado con GalNAc indicado formulado en PBS. Cuatro días después de la dosis, los ratones se inyectaron hidrodinámicamente (HDI) con un plásmido de ADN que codifica *TMPRSS6* humano. El nivel de ARNm de *TMPRSS6* humano se determinó a partir de hígados recogidos 18 horas después mediante el uso de un ensayo de qPCR 3' (Figura 1A) y un ensayo de qPCR 5' (Figura 1B). Hs/Mf= el constructo es específico para *TMPRSS6* humano y de mono; Hs-Mf-Mm = el constructo es específico para *TMPRSS6* humano, de mono y murino.

La Figura 2 proporciona un gráfico que representa el por ciento (%) de ARNm de *TMPRSS6* murino restante en el hígado de ratones de las Figuras 1A-1B.

Las Figuras 3A-3D proporcionan esquemas que representan los patrones de modificación de los oligonucleótidos de *TMPRSS6* conjugados con GalNAc -0416 (Figura 3A), -0651 (Figura 3B), -0831 (Figura 3C) y -1546 (Figura 3D). La hebra sentido incluye una estructura de

tetralazo de nucleótidos 27-30 de la hebra de 36 nucleótidos. La hebra antisentido es complementaria e incluye un saliente de 2 nucleótidos.

Las Figuras 4A-4F proporciona gráficos que representan el por ciento (%) de ARNm endógeno de *TMPRSS6* de mono restante en el hígado de NHP (primates no humanos) después del tratamiento con oligonucleótidos de *TMPRSS6* conjugados con GalNAc. Los *Macaca fascicularis* se dosifican por vía subcutánea con 1 mg/kg o 4 mg/kg del oligonucleótido de *TMPRSS6* conjugado con GalNAc indicado formulado en PBS los días 0, 28, 56, 84 y 112. Las muestras hepáticas se recogen el día -7 (1 semana antes de la administración) (Figura 4A); día 28 (Figura 4B); día 56 (Figura 4C); día 84 (Figura 4D); día 112 (Figura 4E); y, día 168 (Figura 4F) y el nivel de ARNm de *TMPRSS6* de mono se determina mediante el uso de un ensayo de qPCR con relación a animales tratados con PBS. Las Figuras 5A-5F proporcionan gráficos que representan el por ciento (%) de ARNm de *hepcidina* endógena de mono restante en el hígado de NHP (primate no humano) después del tratamiento con oligonucleótidos de *TMPRSS6* conjugados con GalNAc. Los *Macaca fascicularis* se dosifican por vía subcutánea con 1 mg/kg o 4 mg/kg del oligonucleótido de *TMPRSS6* conjugado con GalNAc indicado formulado en PBS los días 0, 28, 56, 84 y 112. Las muestras hepáticas se recogen el día -7 (1 semana antes de la administración) (Figura 5A); día 28 (Figura 5B); día 56 (Figura 5C); día 84 (Figura 5D); día 112 (Figura 5E); y, día 168 (Figura 5F) y el nivel de ARNm de *hepcidina* de mono se determina mediante el uso de un ensayo de qPCR con relación a los animales tratados con PBS.

Las Figuras 6A-6F proporcionan gráficos que representan los niveles de hierro sérico en monos después del tratamiento con oligonucleótidos de *TMPRSS6* conjugados con GalNAc. Los *Macaca fascicularis* se dosifican por vía subcutánea con 1 mg/kg o 4 mg/kg del oligonucleótido de *TMPRSS6* conjugado con GalNAc indicado formulado en PBS el día 0, 28, 56, 84 y 112. Se recogieron muestras de suero el día -7 (1 semana antes de la administración) (Figura 6A); día 28 (Figura 6B); día 56 (Figura 6C); día 84 (Figura 6D); día 112 (Figura 6E); y, día 168 (Figura 6F) y se determinó el nivel de hierro sérico.

Las Figuras 7A-7B proporcionan gráficos que representan los niveles de hierro sérico medidos en las Figuras 6A-6F con relación a los animales tratados con control de PBS para las dosis de 1 mg/kg y 4 mg/kg, respectivamente.

Las Figuras 8A-8F proporcionan gráficos que representan los niveles de saturación de hierro sérico en monos después del tratamiento con oligonucleótidos de *TMPRSS6* conjugados con GalNAc. Los *Macaca fascicularis* se dosifican por vía subcutánea con 1 mg/kg o 4 mg/kg del oligonucleótido de *TMPRSS6* conjugado con GalNAc indicado formulado en PBS el día 0, 28, 56, 84 y 112. Se recogieron muestras de suero el día -7 (1 semana antes de la administración) (Figura 8A); día 28 (Figura 8B); día 56 (Figura 8C); día 84 (Figura 8D); día 112 (Figura 8E); y, día 168 (Figura 8F) y se determinó la saturación de hierro sérico.

Las Figuras 9A-9B proporcionan gráficos que representan la saturación de hierro sérico medida en las Figuras 8A-8F con relación a los animales tratados con control de PBS, para las dosis de 1 mg/kg y 4 mg/kg, respectivamente.

- Las Figuras 10A-B proporciona un dibujo químico del oligonucleótido de *TMPRSS6* conjugado con GalNAc -0416, en donde A y B identifican los enlaces entre las Figuras. 10A y 10B.
- Las Figuras 11A-B proporciona un dibujo químico del oligonucleótido de *TMPRSS6* conjugado con GalNAc -0651, en donde A y B identifican los enlaces entre las Figuras. 11A y 11B.
- Las Figuras 12A-B proporciona un dibujo químico del oligonucleótido de *TMPRSS6* conjugado con GalNAc -0831, en donde A y B identifican los enlaces entre las Figuras. 12A y 12B.
- Las Figuras 13A-B proporciona un dibujo químico del oligonucleótido de *TMPRSS6* conjugado con GalNAc -1546, en donde A y B identifican los enlaces entre las Figuras. 13A y 13B.
- Las Figuras 14A-D proporciona una sustancia química de los oligonucleótidos de *TMPRSS6* conjugados con GalNAc -0416 (Figura 14A), -0651 (Figura. 14B), -0831 (Figura. 14C) y -1546 (Figura 14D).

DESCRIPCIÓN

- La serina proteasa transmembrana 6 (*TMPRSS6*) codifica la serina proteinasa transmembrana de tipo II, la matriptasa-2, que se localiza en la superficie de las células. La proteína matriptasa-2 funciona en la homeostasis del hierro regulando la hepcidina.
- De acuerdo con algunos aspectos, la descripción proporciona oligonucleótidos (por ejemplo, oligonucleótidos de ARNi) que reducen la expresión de *TMPRSS6* en el hígado. En algunas modalidades, los oligonucleótidos que se proporcionan en la presente descripción están diseñados para tratar enfermedades asociadas con la deficiencia o supresión de hepcidina. En algunos aspectos, la descripción proporciona métodos para tratar una enfermedad asociada con la deficiencia o supresión de hepcidina al reducir la expresión de *TMPRSS6* en células específicas (por ejemplo, células del hígado) o en órganos (por ejemplo, el hígado).

Inhibidores oligonucleotídicos de la expresión de *TMPRSS6*

Secuencia diana de *TMPRSS6*

- En algunas modalidades, un oligonucleótido en la presente descripción (por ejemplo, un oligonucleótido de ARNi) se dirige a una secuencia diana que comprende un ARNm de *TMPRSS6*. En algunas modalidades, un oligonucleótido que se describe en la presente descripción se dirige a una secuencia diana dentro de una secuencia de ARNm de *TMPRSS6*. En algunas modalidades, el oligonucleótido que se describe en la presente descripción corresponde a una secuencia diana dentro de una secuencia de ARNm de *TMPRSS6*. En algunas modalidades, el oligonucleótido, o una porción, fragmento o hebra de estos (por ejemplo, una hebra antisentido o una hebra guía de un oligonucleótido de ARNi bicatenario (bc)) se une o hibrida con una secuencia diana que comprende un ARNm de *TMPRSS6*, para inhibir de esta manera la expresión de *TMPRSS6*.

En algunas modalidades, el oligonucleótido se dirige a una secuencia diana de *TMPRSS6* con el propósito de inhibir la expresión de *TMPRSS6 in vivo*. En algunas modalidades, la cantidad o extensión de la inhibición de la expresión de *TMPRSS6* por un oligonucleótido dirigido a una secuencia diana de *TMPRSS6* se correlaciona con la potencia del oligonucleótido. En algunas modalidades, la cantidad o la extensión de la inhibición de la expresión de *TMPRSS6* por un oligonucleótido dirigido a una secuencia diana de *TMPRSS6* se correlaciona con la cantidad o la extensión del beneficio terapéutico en un sujeto o paciente que tiene una enfermedad, trastorno o afección asociados con la deficiencia o supresión de hepcidina que se trata con el oligonucleótido.

A través del examen de la secuencia de nucleótidos de los ARNm que codifican *TMPRSS6*, que incluye ARNm de múltiples especies diferentes (por ejemplo, ser humano, mono cynomolgus y ratón; ver, por ejemplo, el Ejemplo 2) y como resultado de las pruebas *in vitro* e *in vivo* (ver, por ejemplo, los Ejemplos 2 -5), se ha descubierto que determinadas secuencias nucleotídicas del ARNm de *TMPRSS6* son más susceptibles que otras a la inhibición basada en oligonucleótidos y, por lo tanto, son útiles como secuencias diana para los oligonucleótidos en la presente descripción. En algunas modalidades, una secuencia diana de *TMPRSS6* comprende, o consiste de, una secuencia de cualquiera de las SEQ ID NO: 661-852. En algunas modalidades, una secuencia diana de *TMPRSS6* comprende, o consiste de, la secuencia que se establece en la SEQ ID NO: 844, 841, 818, 794 o 762. En algunas modalidades, una secuencia diana de *TMPRSS6* comprende, o consiste de, la secuencia que se establece en la SEQ ID NO: 844. En algunas modalidades, una secuencia diana de *TMPRSS6* comprende, o consiste de, la secuencia que se establece en la SEQ ID NO: 841. En algunas modalidades, una secuencia diana de *TMPRSS6* comprende, o consiste de, la secuencia que se establece en la SEQ ID NO: 818. En algunas modalidades, una secuencia diana de *TMPRSS6* comprende, o consiste de, la secuencia que se establece en la SEQ ID NO: 794. En algunas modalidades, una secuencia diana de *TMPRSS6* comprende, o consiste de, la secuencia que se establece en la SEQ ID NO: 762.

Secuencias de direccionamiento de *TMPRSS6*

En algunas modalidades, los oligonucleótidos en la presente descripción (por ejemplo, oligonucleótidos de ARNi) tienen regiones de complementariedad con el ARNm de *TMPRSS6* (por ejemplo, dentro de una secuencia diana del ARNm de *TMPRSS6*) con el propósito de dirigirse al ARNm de *TMPRSS6* en células e inhibir y/o reducir la expresión de *TMPRSS6*. En algunas modalidades, los oligonucleótidos en la presente descripción comprenden una secuencia de direccionamiento de *TMPRSS6* (por ejemplo, una hebra antisentido o una hebra guía de un oligonucleótido de ARNi) que tiene una región de complementariedad que se une o hibrida con una secuencia diana de *TMPRSS6* mediante apareamiento de bases complementarias (Watson-Crick). La secuencia de direccionamiento o la región de complementariedad generalmente tienen una longitud y un contenido de bases adecuados para permitir la unión o hibridación del oligonucleótido (o una de sus hebras) a un ARNm de *TMPRSS6* con el fin de inhibir y/o reducir la expresión de *TMPRSS6*. En

algunas modalidades, la secuencia de direccionamiento o región de complementariedad es de al menos aproximadamente 12, al menos aproximadamente 13, al menos aproximadamente 14, al menos aproximadamente 15, al menos aproximadamente 16, al menos aproximadamente 17, al menos aproximadamente 18, al menos aproximadamente 19, al menos aproximadamente 20, al menos aproximadamente 21, al menos aproximadamente 22, al menos aproximadamente 23, al menos aproximadamente 24, al menos aproximadamente 25, al menos aproximadamente 26, al menos aproximadamente 27, al menos aproximadamente 28, al menos aproximadamente 29 o al menos aproximadamente 30 nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, la secuencia de direccionamiento o región de complementariedad es de aproximadamente 12 a aproximadamente 30 (*por ejemplo*, 12 a 30, 12 a 22, 15 a 25, 17 a 21, 18 a 27, 19 a 27 o 15 a 30) nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, la secuencia de direccionamiento o región de complementariedad es de aproximadamente 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, la secuencia de direccionamiento o región de complementariedad es de 18 nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, la secuencia de direccionamiento o región de complementariedad es de 19 nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, la secuencia de direccionamiento o región de complementariedad es de 20 nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, la secuencia de direccionamiento o región de complementariedad es de 21 nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, la secuencia de direccionamiento o región de complementariedad es de 22 nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, la secuencia de direccionamiento o región de complementariedad es de 23 nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, la secuencia de direccionamiento o región de complementariedad es de 24 nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, un oligonucleótido comprende una secuencia de direccionamiento o región de complementariedad complementaria a una secuencia de cualquiera de las SEQ ID NO: 661-852, y la secuencia de direccionamiento o región de complementariedad es de 18 nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, un oligonucleótido comprende una secuencia de direccionamiento o región de complementariedad complementaria a una secuencia de cualquiera de las SEQ ID NO: 661-852, y la secuencia de direccionamiento o región de complementariedad es de 19 nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, un oligonucleótido comprende una secuencia de direccionamiento o región de complementariedad complementaria a una secuencia de cualquiera de las SEQ ID NO: 193-384, y la secuencia de direccionamiento o región de complementariedad es de 20 nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, un oligonucleótido comprende una secuencia de direccionamiento o región de complementariedad complementaria a una secuencia de cualquiera de las SEQ ID NO: 193-384, y la secuencia de direccionamiento o región de complementariedad es de 21 nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, un oligonucleótido comprende una secuencia de direccionamiento o región de complementariedad complementaria a una secuencia de cualquiera de las SEQ ID NO: 193-384, y la secuencia de direccionamiento o región de

complementariedad es de 22 nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, un oligonucleótido comprende una secuencia de direccionamiento o región de complementariedad complementaria a una secuencia de cualquiera de las SEQ ID NO: 193-384, y la secuencia de direccionamiento o región de complementariedad es de 23 nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, un oligonucleótido comprende una secuencia de direccionamiento o región de complementariedad complementaria a una secuencia de cualquiera de las SEQ ID NO: 193-384 y la secuencia de direccionamiento o región de complementariedad es de 24 nucleótidos de longitud.

En algunas modalidades, un oligonucleótido en la presente descripción (por ejemplo, un oligonucleótido de ARNi) comprende una secuencia de direccionamiento o una región de complementariedad (por ejemplo, una hebra antisentido o una hebra guía de un oligonucleótido bicatenario) que es totalmente complementaria a una secuencia diana de *TMPRSS6*. En algunas modalidades, la secuencia de direccionamiento o región de complementariedad es parcialmente complementaria a una secuencia diana de *TMPRSS6*. En algunas modalidades, el oligonucleótido comprende una secuencia de direccionamiento o región de complementariedad que es completamente total a una secuencia diana de *TMPRSS6*. En algunas modalidades, el oligonucleótido comprende una secuencia de direccionamiento o región de complementariedad que es parcialmente complementaria a una secuencia diana de *TMPRSS6*.

En algunas modalidades, el oligonucleótido comprende una secuencia de direccionamiento o región de complementariedad que es totalmente complementaria a una secuencia de cualquiera de las SEQ ID NO: 661-852. En algunas modalidades, el oligonucleótido comprende una secuencia de direccionamiento o región de complementariedad que es totalmente complementaria a la secuencia establecida en las SEQ ID NO: 844, 841, 818, 794, y 762. En algunas modalidades, el oligonucleótido comprende una secuencia de direccionamiento o región de complementariedad que es parcialmente complementaria a una secuencia de cualquiera de las SEQ ID NO: 661-852. En algunas modalidades, el oligonucleótido comprende una secuencia de direccionamiento o región de complementariedad que es parcialmente complementaria a la secuencia establecida en las SEQ ID NO: 844, 841, 818, 794, y 762.

En algunas modalidades, un oligonucleótido en la presente descripción (por ejemplo, un oligonucleótido de ARNi) comprende una secuencia de direccionamiento o región de complementariedad que es complementaria a una secuencia contigua de nucleótidos dentro de un ARNm de *TMPRSS6*, en donde la secuencia contigua de nucleótidos es de aproximadamente 12 a aproximadamente 30 nucleótidos de longitud (por ejemplo, de 12 a 30, de 12 a 28, de 12 a 26, de 12 a 24, de 12 a 20, de 12 a 18, de 12 a 16, de 14 a 22, de 16 a 20, de 18 a 20 o de 18 a 19 nucleótidos de longitud). En algunas modalidades, el oligonucleótido comprende una secuencia de direccionamiento o región de complementariedad que es complementaria a una secuencia contigua de nucleótidos dentro de un ARNm de *TMPRSS6*, en donde la secuencia contigua de nucleótidos es de 10, 11, 12,

13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, el oligonucleótido comprende una secuencia de direccionamiento o región de complementariedad que es complementaria a una secuencia contigua de nucleótidos dentro de un ARNm de *TMPRSS6*, en donde la secuencia contigua de nucleótidos es de 19
5 nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, el oligonucleótido comprende una secuencia de direccionamiento o región de complementariedad que es complementaria a una secuencia contigua de nucleótidos dentro de un ARNm de *TMPRSS6*, en donde la secuencia contigua de nucleótidos es de 20 nucleótidos de longitud.

En algunas modalidades, un oligonucleótido en la presente descripción (por ejemplo, un
10 oligonucleótido de ARNi) comprende una secuencia de direccionamiento o una región de complementariedad que es complementaria a una secuencia contigua de nucleótidos de cualquiera de las SEQ ID NO: 661-852, opcionalmente en donde la secuencia contigua de nucleótidos es de 19 nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, el oligonucleótido comprende una secuencia de direccionamiento o una región de complementariedad que es
15 complementaria a una secuencia contigua de nucleótidos de cualquiera de las SEQ ID NO: 844, 841, 818, 794, y 762, en donde la secuencia contigua de nucleótidos es de 19 nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, el oligonucleótido comprende una secuencia de direccionamiento o una región de complementariedad que es complementaria a una secuencia contigua de nucleótidos de cualquiera de las SEQ ID NO: 376, 373, 350, 326, y 294, en donde
20 la secuencia contigua de nucleótidos es de 20 nucleótidos de longitud.

En algunas modalidades, un oligonucleótido en la presente descripción (por ejemplo, un oligonucleótido de ARNi) comprende una secuencia de direccionamiento o región de complementariedad que tiene uno o más errores de apareamiento de pares de bases (pb) con la secuencia diana de *TMPRSS6* correspondiente. En algunas modalidades, la secuencia de
25 direccionamiento o región de complementariedad puede tener hasta aproximadamente 1, hasta aproximadamente 2, hasta aproximadamente 3, hasta aproximadamente 4, hasta aproximadamente 5, *etc.* errores de apareamiento con la secuencia diana de *TMPRSS6* correspondiente siempre y cuando se mantenga la capacidad de la secuencia de direccionamiento o región de complementariedad para unirse o hibridar con el ARNm de
30 *TMPRSS6* bajo condiciones de hibridación apropiadas y/o la capacidad del oligonucleótido para inhibir la expresión de *TMPRSS6*. Alternativamente, la secuencia de direccionamiento o región de complementariedad puede tener no más de 1, no más de 2, no más de 3, no más de 4 o no más de 5 errores de apareamiento con la secuencia diana de *TMPRSS6* correspondiente siempre y cuando se mantenga la capacidad de la secuencia de
35 direccionamiento o región de complementariedad para unirse o hibridar con el ARNm de *TMPRSS6* bajo condiciones de hibridación apropiadas y/o la capacidad del oligonucleótido para inhibir la expresión de *TMPRSS6*. En algunas modalidades, el oligonucleótido comprende una secuencia de direccionamiento o región de complementariedad que tiene 1 error de apareamiento con la secuencia diana correspondiente. En algunas modalidades, el
40 oligonucleótido comprende una secuencia de direccionamiento o región de

complementariedad que tiene 2 errores de apareamiento con la secuencia diana correspondiente. En algunas modalidades, el oligonucleótido comprende una secuencia de direccionamiento o región de complementariedad que tiene 3 errores de apareamiento con la secuencia diana correspondiente. En algunas modalidades, el oligonucleótido comprende una

5 secuencia de direccionamiento o región de complementariedad que tiene 4 errores de apareamiento con la secuencia diana correspondiente. En algunas modalidades, el oligonucleótido comprende una secuencia de direccionamiento o región de complementariedad que tiene 5 errores de apareamiento con la secuencia diana correspondiente. En algunas modalidades, el oligonucleótido comprende una secuencia de

10 direccionamiento o región de complementariedad que tiene más de un error de apareamiento (por ejemplo, 2, 3, 4, 5 o más errores de apareamiento) con la secuencia diana correspondiente, en donde al menos 2 (por ejemplo, todos) de los errores de apareamiento se ubican consecutivamente (por ejemplo, 2, 3, 4, 5 o más errores de apareamiento seguidos), o en donde los errores de apareamiento están intercalados a lo largo de la secuencia de

15 direccionamiento o región de complementariedad. En algunas modalidades, el oligonucleótido comprende una secuencia de direccionamiento o región de complementariedad que tiene más de un error de apareamiento (por ejemplo, 2, 3, 4, 5 o más errores de apareamiento) con la secuencia diana correspondiente, en donde al menos 2 (por ejemplo, todos) de los errores de apareamiento se ubican consecutivamente (por ejemplo, 2,

20 3, 4, 5 o más errores de apareamiento seguidos), o en donde al menos uno o más pares de bases sin error de apareamiento se localizan entre los errores de apareamiento, o combinaciones de estas. En algunas modalidades, el oligonucleótido comprende una secuencia de direccionamiento o una región complementaria que es complementaria a una secuencia contigua de nucleótidos de cualquiera de las SEQ ID NO: 661-852, en donde la

25 secuencia de direccionamiento o región complementaria puede tener hasta aproximadamente 1, hasta aproximadamente 2, hasta aproximadamente 3, hasta aproximadamente 4, hasta aproximadamente 5, *etc.* errores de apareamiento con la secuencia diana de *TMPRSS6* correspondiente. En algunas modalidades, el oligonucleótido comprende una secuencia de direccionamiento o región de complementariedad que es complementaria a una secuencia

30 contigua de nucleótidos de cualquiera de las SEQ ID NO: 661-852, en donde la secuencia de direccionamiento o región de complementariedad puede tener no más de 1, no más de 2, no más de 3, no más de 4 o no más de 5 errores de apareamiento con la secuencia diana de *TMPRSS6* correspondiente. En algunas modalidades, el oligonucleótido comprende una secuencia de direccionamiento o una región complementaria que es complementaria a una

35 secuencia contigua de nucleótidos de cualquiera de las SEQ ID NO: 661-852, en donde la secuencia de direccionamiento o región complementaria puede tener hasta aproximadamente 1, hasta aproximadamente 2, hasta aproximadamente 3, hasta aproximadamente 4, hasta aproximadamente 5, *etc.* errores de apareamiento con la secuencia diana de *TMPRSS6* correspondiente. En algunas modalidades, el oligonucleótido comprende una secuencia de

40 direccionamiento o una región complementaria que es complementaria a una secuencia

contigua de nucleótidos de cualquiera de las SEQ ID NO: 844, 841, 818, 794, y 762, en donde la secuencia de direccionamiento o región de complementariedad puede tener no más de 1, no más de 2, no más de 3, no más de 4 o no más de 5 errores de apareamiento con la secuencia diana de *TMPRSS6* correspondiente.

5 Tipos de oligonucleótidos

Una variedad de tipos y/o estructuras de oligonucleótidos son útiles para dirigirse a *TMPRSS6* en los métodos en la presente descripción que incluyen, pero no se limitan a, oligonucleótidos de ARNi, oligonucleótidos antisentido (ASO), miARN, *etc.* Cualquiera de los tipos de oligonucleótidos que se describen en la presente descripción o en cualquier otro lugar se
10 contempla para su uso como marco para incorporar una secuencia de direccionamiento a *TMPRSS6* en la presente descripción con el propósito de inhibir la expresión de *TMPRSS6*. En algunas modalidades, los oligonucleótidos en la presente descripción inhiben la expresión de *TMPRSS6* mediante el acoplamiento con vías de ARN de interferencia (ARNi) aguas arriba y aguas abajo de la participación de Dicer. Por ejemplo, los oligonucleótidos de ARNi
15 se han desarrollado con cada hebra con tamaños de aproximadamente 19-25 nucleótidos con al menos un saliente en 3' de 1 a 5 nucleótidos (ver, por ejemplo, patente de Estados Unidos núm. 8,372,968). También se han desarrollado oligonucleótidos más largos que Dicer procesa para generar productos de ARNi activos (ver, por ejemplo, patente de Estados Unidos núm. 8,883,996). El trabajo adicional produjo ARNbc extendidos donde al menos un extremo
20 de al menos una hebra se extiende más allá de una región de direccionamiento híbrido, que incluye estructuras donde una de las hebras incluye una estructura de tetralazo termodinámicamente estabilizadora (ver, por ejemplo, patentes de Estados Unidos núm. 8,513,207 y 8,927,705, así como también la publicación de solicitud de patente internacional núm. WO 2010/033225). Dichas estructuras pueden incluir extensiones monocatenarias (mc)
25 (en uno o ambos lados de la molécula) así como también extensiones bicatenarias (bc). En algunas modalidades, los oligonucleótidos en la presente descripción interactúan con la vía de ARNi antes de la participación de Dicer (por ejemplo, escisión de Dicer). En algunas modalidades, los oligonucleótidos que se describen en la presente descripción son sustratos Dicer. En algunas modalidades, tras el procesamiento Dicer endógeno, se producen ácidos
30 nucleicos bicatenarios de 19-23 nucleótidos de longitud capaces de reducir la expresión de *TMPRSS6*. En algunas modalidades, el oligonucleótido tiene un saliente (por ejemplo, de 1, 2 o 3 nucleótidos de longitud) en el extremo 3' de la hebra antisentido. En algunas modalidades, el oligonucleótido (por ejemplo, ARNip) comprende una hebra guía de 21 nucleótidos que es antisentido para un ARN diana y una hebra pasajera complementaria, en
35 la que ambas hebras hibridan para formar un híbrido de 19 pb y salientes de 2 nucleótidos en uno o ambos extremos 3'. También existe disponibilidad de diseños de oligonucleótidos más largos, que incluyen oligonucleótidos que tienen una hebra guía de 23 nucleótidos y una hebra pasajera de 21 nucleótidos, donde existe un extremo romo en el lado derecho de la molécula (extremo 3' de la hebra pasajera/extremo 5' de la hebra guía) y un saliente 3' de dos
40 nucleótidos de la hebra guía en el lado izquierdo de la molécula (extremo 5' de la hebra

pasajera/extremo 3' de la hebra guía). En tales moléculas, existe una región híbrida de 21 pb. Ver, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos núms. 9,012,138; 9,012,621 y 9,193,753. En algunas modalidades, los oligonucleótidos en la presente descripción comprenden hebras sentido y antisentido que están ambas en el intervalo de aproximadamente 17 a 36 (por ejemplo, 17 a 36, 20 a 25 o 21-23) nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, los oligonucleótidos que se describen en la presente descripción comprenden una hebra antisentido de 19-30 nucleótidos de longitud y una hebra sentido de 19-50 nucleótidos de longitud, en donde las hebras antisentido y sentido son hebras separadas que forman una región híbrida asimétrica que tiene un saliente de 1-4 nucleótidos en el extremo 3' terminal de la hebra antisentido. En algunas modalidades, un oligonucleótido en la presente descripción comprende una hebra sentido y antisentido que están ambas en el intervalo de aproximadamente 19-22 nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, las hebras sentido y antisentido tienen la misma longitud. En algunas modalidades, un oligonucleótido comprende hebras sentido y antisentido, de manera que hay un saliente 3' en la hebra sentido o en la hebra antisentido, o tanto en la hebra sentido como en la antisentido. En algunas modalidades, para los oligonucleótidos que tienen hebras sentido y antisentido ambas con longitudes en el intervalo de aproximadamente 21-23 nucleótidos, un saliente 3' en las hebras sentido, antisentido o tanto sentido como antisentido es de 1 o 2 nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, el oligonucleótido tiene una hebra guía de 22 nucleótidos y una hebra pasajera de 20 nucleótidos, donde hay un extremo romo en el lado derecho de la molécula (extremo 3' de la hebra pasajera/extremo 5' de la hebra guía) y un saliente 3' de 2 nucleótidos de la hebra guía en el lado izquierdo de la molécula (extremo 5' de la hebra pasajera/extremo 3' de la hebra guía). En tales moléculas, existe una región híbrida de 20 pb.

Otros diseños de oligonucleótidos para su uso con las composiciones y los métodos en la presente descripción incluyen: ARNip de 16-mer (ver, por ejemplo, Nucleic Acids in Chemistry and Biology, Blackburn (ed.), ROYAL SOCIETY OF CHEMISTRY, 2006), ARNhc (por ejemplo, que tiene 19 pb o tallos más cortos; ver, por ejemplo, Moore y otros. (2010) Methods Mol. Biol. 629:141-158), ARNip romos (por ejemplo, de 19 pb de longitud; ver, por ejemplo, Kraynack y Baker (2006) RNA 12:163-176), ARNip asimétricos (ARNia; ver, por ejemplo, Sun y otros. (2008) Nat. Biotechnol. 26:1379-82), ARNip híbrido más corto asimétrico (ver, por ejemplo, Chang y otros. (2009) Mol. Ther. 17:725-32), ARNip de horquilla (ver, por ejemplo, Hohjoh (2004) FEBS Lett. 557:193-98), ARNip mc (Elsner (2012) Nat. Biotechnol. 30:1063), ARNip circulares en forma de mancuerna (ver, por ejemplo, Abe y otros (2007) J. Am. Chem. Soc. 129:15108-09), y ARN de interferencia, pequeños, segmentados internamente (ARNip; ver, por ejemplo, Bramsen y otros. (2007) Nucleic Acids Res. 35:5886-97). Otros ejemplos de estructuras de oligonucleótidos no limitantes que pueden usarse en algunas modalidades para reducir o inhibir la expresión de *TMPRSS6* son microARN (miARN), ARN de horquilla corta (ARNhc) y ARNip corto (ver, por ejemplo, Hamilton y otros (2002) EMBO J. 21:4671-79; ver además, publicación de solicitud de patente de Estados Unidos núm. 2009/0099115).

Aun así, en algunas modalidades, un oligonucleótido para reducir o inhibir la expresión de *TMPRSS6* en la presente descripción es monocatenario (mc). Tales estructuras pueden incluir, pero no se limitan a, moléculas de ARNi monocatenarias. Esfuerzos recientes han demostrado la actividad de las moléculas de ARNi mc (ver, por ejemplo, Matsui y otros (2016) *Mol. Ther.* 24:946-55). Sin embargo, en algunas modalidades, los oligonucleótidos en la presente descripción son oligonucleótidos antisentido (ASO). Un oligonucleótido antisentido es un oligonucleótido monocatenario que tiene una secuencia de nucleobases que, cuando se escribe en la dirección 5' a 3', comprende el complemento inverso de un segmento diana de un ácido nucleico particular y se modifica adecuadamente (por ejemplo, como un gápmo) para inducir la escisión mediada por ARNasa H de su ARN diana en las células o (por ejemplo, como un oligómero mixto) para inhibir la traducción del ARNm diana en las células. Los ASO para usar en la presente descripción pueden modificarse de cualquier manera adecuada conocida en la técnica que incluye, por ejemplo, como se muestra en la patente de Estados Unidos núm. 9,567,587 (que incluye, por ejemplo, longitud, restos de azúcar de la base nitrogenada (pirimidina, purina) y alteraciones de la porción heterocíclica de la base nitrogenada). Además, los ASO se han usado durante décadas para reducir la expresión de genes diana específicos (ver, por ejemplo, Bennett y otros (2017) *Annu. Rev. Pharmacol.* 57:81-105).

En algunas modalidades, el oligonucleótido antisentido comparte una región de complementariedad con el ARNm de *TMPRSS6*. En algunas modalidades, el oligonucleótido antisentido se dirige a varias áreas del gen *TMPRSS6* humano que se identifica como NM_001289000.2. En algunas modalidades, el oligonucleótido antisentido es de 15-50 nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, el oligonucleótido antisentido es de 15-25 nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, el oligonucleótido antisentido es de 22 nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, el oligonucleótido antisentido es complementario a cualquiera de las SEQ ID NO: 661-852. En algunas modalidades, el oligonucleótido antisentido es de al menos 15 nucleótidos contiguos de longitud. En algunas modalidades, el oligonucleótido antisentido es de al menos 19 nucleótidos contiguos de longitud. En algunas modalidades, el oligonucleótido antisentido es de al menos 20 nucleótidos contiguos de longitud. En algunas modalidades, el oligonucleótido antisentido difiere en 1, 2 o 3 nucleótidos de la secuencia diana.

Oligonucleótidos bicatenarios

En algunos aspectos, la descripción proporciona oligonucleótidos de ARNi bicatenarios (bc) para dirigirse al ARNm de *TMPRSS6* e inhibir la expresión de *TMPRSS6* (por ejemplo, mediante la vía del ARNi) que comprende una hebra sentido (también denominada en la presente descripción hebra pasajera) y una hebra antisentido (también denominada en la presente descripción hebra guía). En algunas modalidades, la hebra sentido y la hebra antisentido son hebras separadas y no están unidas covalentemente. En algunas modalidades, la hebra sentido y la hebra antisentido están unidas covalentemente. En algunas modalidades, la hebra sentido y la hebra antisentido forman una región híbrida, en donde la hebra sentido

y la hebra antisentido, o una porción de estas, se unen entre sí de manera complementaria (por ejemplo, por apareamiento de bases Watson-Crick).

En algunas modalidades, una primera región (R1) de la hebra sentido y la hebra antisentido forman un primer híbrido (D1). En algunas modalidades, D1 es de al menos

5 aproximadamente 15 (por ejemplo, al menos 15, al menos 16, al menos 17, al menos 18, al menos 19, al menos 20 o al menos 21) nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, D1 está en el intervalo de aproximadamente 12 a 30 nucleótidos de longitud (por ejemplo, una longitud de 12 a 30, de 12 a 27, de 15 a 22, de 18 a 22, de 18 a 25, de 18 a 27, de 18 a 30 o de 21 a 30 nucleótidos de longitud). En algunas modalidades, D1 es de al menos 12

10 nucleótidos de longitud (por ejemplo, al menos 12, al menos 15, al menos 20, al menos 25 o al menos 30 nucleótidos de longitud). En algunas modalidades, D1 es de 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, D1 es de 20 nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, D1 que comprende la hebra sentido y la hebra antisentido no abarca la longitud total de la hebra

15 sentido y/o la hebra antisentido. En algunas modalidades, D1 que comprende la hebra sentido y la hebra antisentido abarca toda la longitud de la hebra sentido o la hebra antisentido o ambas. En determinadas modalidades, D1 que comprende la hebra sentido y la hebra antisentido abarca toda la longitud tanto de la hebra sentido como de la hebra antisentido.

En algunas modalidades, la hebra sentido tiene una segunda región (R2), en donde R2

20 comprende una primera subregión (S1), un lazo (Lp), tal como un tetralazo (tetraLp) o trilazo (triLp) y una segunda subregión (S2), en donde Lp se localizan entre S1 y S2, y en donde S1 y S2 forman un segundo híbrido (D2). D2 puede tener varias longitudes. En algunas modalidades, D2 es de aproximadamente 1-6 pb de longitud. En algunas modalidades, D2 es de 2-6, 3-6, 4-6, 5-6, 1-5, 2-5, 3-5 o 4-5 pb de longitud. En algunas modalidades, D2 es de 1,

25 2, 3, 4, 5 o 6 pb de longitud. En algunas modalidades, D2 es de 6 pb de longitud.

En algunas modalidades, un oligonucleótido que se proporciona en la presente descripción comprende una hebra sentido que tiene una secuencia de cualquiera de las SEQ ID NO: 193-384 y una hebra antisentido que comprende una secuencia de cualquiera de las SEQ ID NO: 385-576. En algunas modalidades, un oligonucleótido que se proporciona en la presente

30 descripción comprende una hebra sentido que tiene una secuencia de cualquiera de las SEQ ID NO: 661-852 y una hebra antisentido que comprende una secuencia de cualquiera de las SEQ ID NO: 1-192.

En algunas modalidades, un oligonucleótido que se proporciona en la presente descripción (por ejemplo, un oligonucleótido de ARNi) comprende una hebra sentido que comprende una

35 secuencia de cualquiera de las SEQ ID NO: 577-597 y una hebra antisentido que comprende una secuencia de cualquiera de las SEQ ID NO: 598-618 como se dispone en la Tabla 4.

En algunas modalidades, un oligonucleótido que se proporciona en la presente descripción (por ejemplo, un oligonucleótido de ARNi) comprende una hebra sentido y una hebra antisentido que comprende secuencias de nucleótidos se seleccionan de:

40 a) SEQ ID NO: 579 y 600, respectivamente;

- b) SEQ ID NO: 580 y 601, respectivamente;
- c) SEQ ID NO: 595 y 616, respectivamente;
- d) SEQ ID NO: 590 y 611, respectivamente;
- e) SEQ ID NO: 596 y 617, respectivamente;
- 5 f) SEQ ID NO: 597 y 618, respectivamente;
- g) SEQ ID NO: 585 y 606, respectivamente;
- h) SEQ ID NO: 586 y 607, respectivamente; y,
- i) SEQ ID NO: 587 y 608, respectivamente.

En algunas modalidades, un oligonucleótido que se proporciona en la presente descripción (por ejemplo, un oligonucleótido de ARNi) comprende una hebra sentido y una hebra antisentido que comprende secuencias de nucleótidos se seleccionan de:

- a) SEQ ID NO: 579 y 600, respectivamente;
- b) SEQ ID NO: 580 y 601, respectivamente;
- c) SEQ ID NO: 590 y 611, respectivamente;
- 15 d) SEQ ID NO: 597 y 618, respectivamente; y,
- e) SEQ ID NO: 586 y 607, respectivamente.

En algunas modalidades, la hebra sentido comprende la secuencia de SEQ ID NO: 579 y la hebra antisentido comprende la secuencia de SEQ ID NO: 600. En algunas modalidades, la hebra sentido comprende la secuencia de SEQ ID NO: 580 y la hebra antisentido comprende la secuencia de SEQ ID NO: 601. En algunas modalidades, la hebra sentido comprende la secuencia de SEQ ID NO: 590 y la hebra antisentido comprende la secuencia de SEQ ID NO: 611. En algunas modalidades, la hebra sentido comprende la secuencia de SEQ ID NO: 597 y la hebra antisentido comprende la secuencia de SEQ ID NO: 618. En algunas modalidades, la hebra sentido comprende la secuencia de SEQ ID NO: 586 y la hebra antisentido comprende la secuencia de SEQ ID NO: 607.

Se apreciará que, en algunas modalidades, se puede hacer referencia a las secuencias presentadas en el Listado de secuencias al describir la estructura de un oligonucleótido (por ejemplo, un oligonucleótido de ARNi) u otro ácido nucleico. En tales modalidades, el oligonucleótido real u otro ácido nucleico puede tener uno o más nucleótidos alternativos (por ejemplo, una contraparte de ARN de un nucleótido de ADN o una contraparte de ADN de un nucleótido de ARN) y/o uno o más nucleótidos modificados y/o uno o más enlaces internucleotídicos modificados y/o una o más modificaciones cuando se compara con la secuencia especificada conservando propiedades complementarias esencialmente iguales o similares a las de la secuencia especificada.

En algunas modalidades, un oligonucleótido en la presente descripción (por ejemplo, un oligonucleótido de ARNi) comprende una hebra sentido y una hebra antisentido que, cuando actúa sobre una enzima Dicer, da como resultado una hebra antisentido que se incorpora al RISC maduro. En algunas modalidades, un oligonucleótido en la presente descripción (por ejemplo, un oligonucleótido de ARNi) comprende una hebra sentido de 25 nucleótidos y una hebra antisentido de 27 nucleótidos que cuando actúa sobre una enzima Dicer, da como

resultado una hebra antisentido que se incorpora al RISC maduro. En algunas modalidades, la hebra sentido de 25 nucleótidos comprende una secuencia que se selecciona de las SEQ ID NO: 193-384. En algunas modalidades, la hebra antisentido de 27 nucleótidos comprende una secuencia que se selecciona de las SEQ ID NO: 385-576. En algunas modalidades, la hebra sentido del oligonucleótido tiene más de 27 nucleótidos (por ejemplo, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 o 50 nucleótidos). En algunas modalidades, la hebra sentido del oligonucleótido tiene más de 25 nucleótidos (por ejemplo, 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos). En algunas modalidades, la hebra sentido del oligonucleótido comprende una secuencia de nucleótidos que se selecciona de las SEQ ID NO: 577-597, en donde la secuencia de nucleótidos es más larga que 27 nucleótidos (por ejemplo, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 o 50 nucleótidos). En algunas modalidades, la hebra sentido del oligonucleótido comprende una secuencia de nucleótidos que se selecciona de las SEQ ID NO: 577-597, en donde la secuencia de nucleótidos es más larga que 25 nucleótidos (por ejemplo, 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos).

En algunas modalidades, los oligonucleótidos en la presente descripción (por ejemplo, oligonucleótidos de ARNi) tienen un extremo 5' que es termodinámicamente menos estable en comparación con el otro extremo 5'. En algunas modalidades, se proporciona un oligonucleótido asimétrico que incluye un extremo romo en el extremo 3' de una hebra sentido y un saliente 3' en el extremo 3' de una hebra antisentido. En algunas modalidades, el saliente 3' en la hebra antisentido es de aproximadamente 1-8 nucleótidos de longitud (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 nucleótidos de longitud). En algunas modalidades, el oligonucleótido tiene un saliente que comprende dos (2) nucleótidos en el extremo 3' de la hebra antisentido (guía). Sin embargo, son posibles otros salientes. En algunas modalidades, un saliente es un saliente 3' que comprende una longitud de entre 1 y 6 nucleótidos, opcionalmente de 1 a 5, de 1 a 4, de 1 a 3, de 1 a 2, de 2 a 6, de 2 a 5, de 2 a 4, de 2 a 3, de 3 a 6, de 3 a 5, de 3 a 4, de 4 a 6, de 4 a 5, de 5 a 6 nucleótidos, o 1, 2, 3, 4, 5 o 6 nucleótidos. Sin embargo, en algunas modalidades, el saliente es un saliente 5' que comprende una longitud de entre 1 y 6 nucleótidos, opcionalmente de 1 a 5, de 1 a 4, de 1 a 3, de 1 a 2, de 2 a 6, de 2 a 5, de 2 a 4, de 2 a 3, de 3 a 6, de 3 a 5, de 3 a 4, de 4 a 6, de 4 a 5, de 5 a 6 nucleótidos, o 1, 2, 3, 4, 5 o 6 nucleótidos. En algunas modalidades, el oligonucleótido comprende una secuencia de direccionamiento o una región de complementariedad que es complementaria a una secuencia contigua de nucleótidos de cualquiera de las SEQ ID NO: 661-852, y un saliente 5' que comprende una longitud de entre 1 y 6 nucleótidos. En algunas modalidades, el oligonucleótido comprende una hebra sentido que comprende una secuencia de nucleótidos que se selecciona de las SEQ ID NO: 577-597, en donde el oligonucleótido comprende un saliente 5' que comprende una longitud de entre 1 y 6 nucleótidos. En algunas modalidades, el oligonucleótido comprende una hebra antisentido que comprende una secuencia de nucleótidos que se selecciona de las SEQ ID NO: 598-618, en donde el oligonucleótido comprende un saliente 5' que comprende una longitud de entre 1 y 6

nucleótidos. En algunas modalidades, el oligonucleótido comprende una hebra sentido que comprende una secuencia de nucleótidos que se selecciona de las SEQ ID NO: 577-597 y una hebra antisentido que comprende una secuencia de nucleótidos que se selecciona de las SEQ ID NO: 598-618, en donde el oligonucleótido comprende un saliente 5' que comprende una longitud de entre 1 y 6 nucleótidos.

En algunas modalidades, se modifican dos (2) nucleótidos terminales en el extremo 3' de una hebra antisentido. En algunas modalidades, los dos (2) nucleótidos terminales en el extremo 3' de la hebra antisentido son complementarios con el ARNm diana (por ejemplo, ARNm de *TPRSS6*). En algunas modalidades, los dos (2) nucleótidos terminales en el extremo 3' de la hebra antisentido no son complementarios con el ARNm diana. En algunas modalidades, los dos (2) nucleótidos terminales en el extremo 3' de la hebra antisentido de un oligonucleótido en la presente descripción no están apareados. En algunas modalidades, los dos (2) nucleótidos terminales en el extremo 3' de la hebra antisentido de un oligonucleótido en la presente descripción comprenden una guanina no apareada (por ejemplo, 5'-GG-3').

En algunas modalidades, los dos (2) nucleótidos terminales en el extremo 3' de una hebra antisentido de un oligonucleótido en la presente descripción no son complementarios al ARNm diana. En algunas modalidades, dos (2) nucleótidos terminales en cada extremo 3' de un oligonucleótido son guaninas (GG). En algunas modalidades, uno o ambos de los dos (2) nucleótidos GG terminales en cada extremo 3' de un oligonucleótido en la presente descripción no es complementario con el ARNm diana. En algunas modalidades, el oligonucleótido comprende una secuencia de direccionamiento o una región de complementariedad que es complementaria a una secuencia contigua de nucleótidos de cualquiera de las SEQ ID NO: 661-852, en donde los dos (2) nucleótidos terminales en el extremo 3' de la hebra antisentido del oligonucleótido en la presente descripción comprende una GG no apareada. En algunas modalidades, el oligonucleótido comprende una hebra antisentido que comprende una secuencia de nucleótidos que se selecciona de las SEQ ID NO: 1-192, en donde los dos (2) nucleótidos terminales en el extremo 3' de la hebra antisentido del oligonucleótido comprenden una GG no apareada. En algunas modalidades, el oligonucleótido comprende una hebra sentido que comprende una secuencia de nucleótidos que se selecciona de las SEQ ID NO: 577-597 y una hebra antisentido que comprende una secuencia de nucleótidos que se selecciona de las SEQ ID NO: 598-618, en donde los dos (2) nucleótidos terminales en el extremo 3' de la hebra antisentido del oligonucleótido comprenden una GG no apareada.

En algunas modalidades, existe uno o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4 o 5) error(es) de apareamiento entre una hebra sentido y antisentido que comprende un oligonucleótido en la presente descripción (por ejemplo, un oligonucleótido de ARNi). Si existe más de un error de apareamiento entre una hebra sentido y antisentido, pueden ubicarse consecutivamente (por ejemplo, 2, 3 o más seguidos), o intercalados en toda la región de complementariedad. En algunas modalidades, el extremo 3' de la hebra sentido comprende uno o más errores de apareamiento. En algunas modalidades, se incorporan dos (2) errores de apareamiento en el

extremo 3' de la hebra sentido. En algunas modalidades, los errores de apareamiento de bases o la desestabilización de segmentos en el extremo 3' de la hebra sentido de un oligonucleótido en la presente descripción mejoran o aumentan la potencia del oligonucleótido. En algunas modalidades, las hebras sentido y antisentido de un oligonucleótido en la presente descripción comprenden secuencias de nucleótidos que se seleccionan del grupo que consiste en:

- a) SEQ ID NO: 579 y 600, respectivamente;
 - b) SEQ ID NO: 580 y 601, respectivamente;
 - c) SEQ ID NO: 595 y 616, respectivamente;
 - 10 d) SEQ ID NO: 590 y 611, respectivamente;
 - e) SEQ ID NO: 596 y 617, respectivamente;
 - f) SEQ ID NO: 597 y 618, respectivamente;
 - g) SEQ ID NO: 585 y 606, respectivamente;
 - h) SEQ ID NO: 586 y 607, respectivamente; y,
 - 15 i) SEQ ID NO: 587 y 608, respectivamente,
- en donde existe uno o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4 o 5) error(es) de apareamiento entre las hebras sentido y antisentido.

En algunas modalidades, un oligonucleótido que se proporciona en la presente descripción (por ejemplo, un oligonucleótido de ARNi) comprende una hebra sentido y una hebra antisentido que comprende secuencias de nucleótidos que se seleccionan del grupo que consiste en:

- a) SEQ ID NO: 579 y 600, respectivamente;
 - b) SEQ ID NO: 580 y 601, respectivamente;
 - c) SEQ ID NO: 590 y 611, respectivamente;
 - 25 d) SEQ ID NO: 597 y 618, respectivamente; y,
 - e) SEQ ID NO: 586 y 607, respectivamente,
- en donde existe uno o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4 o 5) error(es) de apareamiento entre las hebras sentido y antisentido.

Hebras antisentido

30 En algunas modalidades, una hebra antisentido de un oligonucleótido en la presente descripción (por ejemplo, un oligonucleótido de ARNi) se denomina “hebra guía”. Por ejemplo, una hebra antisentido que interactúa con el complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC) y se une a una proteína *Argonauto* tal como Ago2, o interactúa o se une a uno o más factores similares, y dirige el silenciamiento de un gen diana, como la hebra antisentido se denomina hebra guía. En algunas modalidades, una hebra sentido que comprende una región de complementariedad a una hebra guía se denomina en la presente descripción “hebra pasajera”.

En algunas modalidades, un oligonucleótido en la presente descripción (por ejemplo, un oligonucleótido de ARNi) comprende una hebra antisentido de hasta aproximadamente 50 nucleótidos de longitud (por ejemplo, hasta 50, hasta 40, hasta 35, hasta 30, hasta 27, hasta

25, hasta 21, hasta 19, hasta 17 o hasta 12 nucleótidos de longitud). En algunas modalidades, un oligonucleótido comprende una hebra antisentido de al menos aproximadamente 12 nucleótidos de longitud (por ejemplo, al menos 12, al menos 15, al menos 19, al menos 21, al menos 22, al menos 25, al menos 27, al menos 30, al menos 35 o al menos 38 nucleótidos de longitud). En algunas modalidades, un oligonucleótido comprende una hebra antisentido en un intervalo de aproximadamente 12 a aproximadamente 40 (por ejemplo, 12 a 40, 12 a 36, 12 a 32, 12 a 28, 15 a 40, 15 a 36, 15 a 32, 15 a 28, 17 a 22, 17 a 25, 19 a 27, 19 a 30, 20 a 40, 22 a 40, 25 a 40 o 32 a 40) nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, un oligonucleótido comprende una hebra antisentido de 15 a 30 nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, una hebra antisentido de cualquiera de los oligonucleótidos descritos en la presente descripción es de 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 o 40 nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, un oligonucleótido comprende una hebra antisentido de 22 nucleótidos de longitud.

En algunas modalidades, un oligonucleótido que se describe en la presente descripción (por ejemplo, un oligonucleótido de ARNi) para dirigirse a *TMPRSS6* comprende una hebra antisentido que comprende o que consiste en una secuencia como se establece en cualquiera de las SEQ ID NO: 385-576. En algunas modalidades, un oligonucleótido en la presente descripción comprende una hebra antisentido que comprende al menos aproximadamente 12 (por ejemplo, al menos 12, al menos 13, al menos 14, al menos 15, al menos 16, al menos 17, al menos 18, al menos 19, al menos 20, al menos 21, al menos 22 o al menos 23) nucleótidos contiguos de una secuencia como se establece en cualquiera de las SEQ ID NO: 385-576. En algunas modalidades, un oligonucleótido que se describe en la presente descripción para dirigirse a *TMPRSS6* comprende una hebra antisentido que comprende o que consiste en una secuencia como se establece en cualquiera de las SEQ ID NO: 598-618. En algunas modalidades, un oligonucleótido en la presente descripción comprende una hebra antisentido que comprende al menos aproximadamente 12 (por ejemplo, al menos 12, al menos 13, al menos 14, al menos 15, al menos 16, al menos 17, al menos 18, al menos 19, al menos 20, al menos 21, al menos 22 o al menos 23) nucleótidos contiguos de una secuencia como se establece en cualquiera de las SEQ ID NO: 598-618. En algunas modalidades, un oligonucleótido que se describe en la presente descripción para dirigirse a *TMPRSS6* comprende una hebra antisentido que comprende o que consiste en una secuencia como se establece en cualquiera de las SEQ ID NO: 598-618. En algunas modalidades, un oligonucleótido en la presente descripción comprende una hebra antisentido que comprende al menos aproximadamente 12 (por ejemplo, al menos 12, al menos 13, al menos 14, al menos 15, al menos 16, al menos 17, al menos 18, al menos 19, al menos 20, al menos 21, al menos 22 o al menos 23) nucleótidos contiguos de una secuencia como se establece en cualquiera de las SEQ ID NO: 600, 601, 611, 618, y 607. En algunas modalidades, un oligonucleótido que se describe en la presente descripción para dirigirse a *TMPRSS6* comprende una hebra

antisentido que comprende o que consiste en una secuencia como se establece en cualquiera de las SEQ ID NO: 600, 601, 611, 618, y 607.

En algunas modalidades, un oligonucleótido en la presente descripción comprende una hebra antisentido que comprende una secuencia de nucleótidos que se selecciona de las SEQ ID NO: 1-192. En algunas modalidades, un oligonucleótido en la presente descripción comprende una hebra antisentido que comprende una secuencia de nucleótidos que se selecciona de las SEQ ID NO: 184, 181, 158, 134, y 102.

Hebras sentido

En algunas modalidades, un oligonucleótido que se describe en la presente descripción (por ejemplo, un oligonucleótido de ARNi) para dirigirse al ARNm de *TMPRSS6* e inhibir la expresión de *TMPRSS6* comprende una secuencia de la hebra sentido como se establece en cualquiera de las SEQ ID NO: 661-852. En algunas modalidades, un oligonucleótido que se describe en la presente descripción (por ejemplo, un oligonucleótido de ARNi) para dirigirse al ARNm de *TMPRSS6* e inhibir la expresión de *TMPRSS6* comprende una secuencia de la hebra sentido como se establece en cualquiera de las SEQ ID NO: 193-384. En algunas modalidades, un oligonucleótido en la presente descripción tiene una hebra sentido compuesta por al menos aproximadamente 12 (por ejemplo, al menos 13, al menos 14, al menos 15, al menos 16, al menos 17, al menos 18, al menos 19, al menos 20, al menos 21, al menos 22 o al menos 23) nucleótidos contiguos de una secuencia como se establece en cualquiera de las SEQ ID NO: 193-384. En algunas modalidades, un oligonucleótido en la presente descripción tiene una hebra sentido compuesta por al menos aproximadamente 12 (por ejemplo, al menos 13, al menos 14, al menos 15, al menos 16, al menos 17, al menos 18, al menos 19) nucleótidos contiguos de una secuencia como se establece en cualquiera de las SEQ ID NO: 661-852. En algunas modalidades, un oligonucleótido que se describe en la presente descripción para dirigirse al ARNm de *TMPRSS6* e inhibir la expresión de *TMPRSS6* comprende una secuencia de la hebra sentido como se establece en cualquiera de las SEQ ID NO: 577-597. En algunas modalidades, un oligonucleótido en la presente descripción tiene una hebra sentido compuesta por al menos aproximadamente 12 (por ejemplo, al menos 13, al menos 14, al menos 15, al menos 16, al menos 17, al menos 18, al menos 19, al menos 20, al menos 21, al menos 22 o al menos 23) nucleótidos contiguos de una secuencia como se establece en cualquiera de las SEQ ID NO: 577-597. En algunas modalidades, un oligonucleótido que se describe en la presente descripción para dirigirse al ARNm de *TMPRSS6* e inhibir la expresión de *TMPRSS6* comprende una secuencia de la hebra sentido como se establece en cualquiera de las SEQ ID NO: 579, 580, 590, 597, y 586. En algunas modalidades, un oligonucleótido en la presente descripción tiene una hebra sentido que comprende al menos aproximadamente 12 (por ejemplo, al menos 13, al menos 14, al menos 15, al menos 16, al menos 17, al menos 18, al menos 19, al menos 20, al menos 21, al menos 22 o al menos 23) nucleótidos contiguos de una secuencia como se establece en cualquiera de las SEQ ID NO: 579, 580, 590, 597, y 586. En algunas modalidades, un oligonucleótido que se describe en la presente descripción para dirigirse al ARNm de

TMPRSS6 e inhibir la expresión de *TMPRSS6* comprende una secuencia de la hebra sentido como se establece en cualquiera de las SEQ ID NO: 844, 841, 818, 794, y 762. En algunas modalidades, un oligonucleótido en la presente descripción tiene una hebra sentido que comprende al menos aproximadamente 12 (por ejemplo, al menos 13, al menos 14, al menos 15, al menos 16, al menos 17, al menos 18, al menos 19) nucleótidos contiguos de una secuencia como se establece en cualquiera de las SEQ ID NO: 844, 841, 818, 794, y 762.

En algunas modalidades, un oligonucleótido que se proporciona en la presente descripción (por ejemplo, un oligonucleótido de ARNi) comprende una hebra sentido (o hebra pasajera) de hasta aproximadamente 50 nucleótidos de longitud (por ejemplo, hasta 50, hasta 40, hasta 36, hasta 30, hasta 27, hasta 25, hasta 21, hasta 19, hasta 17 o hasta 12 nucleótidos de longitud). En algunas modalidades, un oligonucleótido en la presente descripción comprende una hebra sentido de al menos aproximadamente 12 nucleótidos de longitud (por ejemplo, al menos 12, al menos 15, al menos 19, al menos 21, al menos 25, al menos 27, al menos 30, al menos 36 o al menos 38 nucleótidos de longitud). En algunas modalidades, un oligonucleótido en la presente descripción comprende una hebra sentido en un intervalo de aproximadamente 12 a aproximadamente 50 (por ejemplo, 12 a 50, 12 a 40, 12 a 36, 12 a 32, 12 a 28, 15 a 40, 15 a 36, 15 a 32, 15 a 28, 17 a 21, 17 a 25, 19 a 27, 19 a 30, 20 a 40, 22 a 40, 25 a 40 o 32 a 40) nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, un oligonucleótido en la presente descripción comprende una hebra sentido de 15 a 50 nucleótidos de longitud.

En algunas modalidades, un oligonucleótido en la presente descripción comprende una hebra sentido de 18 a 36 nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, un oligonucleótido en la presente descripción comprende una hebra sentido de 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 o 50 nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, un oligonucleótido en la presente descripción comprende una hebra sentido de 36 nucleótidos de longitud.

En algunas modalidades, un oligonucleótido que se proporciona en la presente descripción (por ejemplo, un oligonucleótido de ARNi) comprende una hebra sentido que comprende una estructura de tallo-lazo cerca del extremo 3' de la hebra sentido. En algunas modalidades, un oligonucleótido que se proporciona en la presente descripción (por ejemplo, un oligonucleótido de ARNi) comprende una hebra sentido que comprende una estructura de tallo-lazo cerca del extremo 3' de la primera región (R1) de la hebra sentido. En algunas modalidades, el tallo-lazo está formado por apareamiento de bases intracatenario. En algunas modalidades, una hebra sentido comprende una estructura de tallo-lazo cerca de su extremo 5'. En algunas modalidades, una hebra sentido comprende una estructura de tallo-lazo en el extremo 5' de la primera región (R1). En algunas modalidades, el tallo del tallo-lazo comprende un híbrido de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 o 14 nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, el tallo de la estructura de tallo y lazo comprende un híbrido de 2 nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, el tallo de la estructura de tallo-lazo comprende un híbrido de 3 nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, el tallo de la estructura de tallo-lazo comprende un híbrido de 4 nucleótidos de longitud. En algunas

modalidades, el tallo de la estructura de tallo-lazo comprende un híbrido de 5 nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, el tallo de la estructura de tallo-lazo comprende un híbrido de 6 nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, el tallo de la estructura de tallo-lazo comprende un híbrido de 7 nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, el tallo de la estructura de tallo-lazo comprende un híbrido de 8 nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, el tallo de la estructura de tallo-lazo comprende un híbrido de 9 nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, el tallo de la estructura de tallo-lazo comprende un híbrido de 10 nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, el tallo de la estructura de tallo-lazo comprende un híbrido de 11 nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, el tallo de la estructura de tallo-lazo comprende un híbrido de 12 nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, el tallo de la estructura de tallo-lazo comprende un híbrido de 13 nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, el tallo de la estructura de tallo-lazo comprende un híbrido de 14 nucleótidos de longitud.

En algunas modalidades, un tallo-lazo proporciona la protección del oligonucleótido contra la degradación (por ejemplo, degradación enzimática), facilita o mejora el direccionamiento y/o el suministro a una célula, tejido u órgano diana (por ejemplo, el hígado), o ambos. Por ejemplo, en algunas modalidades, el lazo de un tallo-lazo comprende nucleótidos que comprenden una o más modificaciones que facilitan, mejoran o aumentan el direccionamiento a un ARNm diana (por ejemplo, un ARNm de TMPRSS6), la inhibición de la expresión del gen diana (por ejemplo, la expresión de TMPRSS6), y/o el suministro, la captación y/o la penetración en una célula, tejido u órgano diana (por ejemplo, el hígado), o sus combinaciones. En algunas modalidades, el tallo-lazo en sí o la(s) modificación(es) del tallo-lazo no afectan o no afectan sustancialmente la actividad de inhibición de la expresión génica inherente del oligonucleótido, pero facilitan, mejoran o aumentan la estabilidad (por ejemplo, proporciona protección contra la degradación) y/o el suministro, la captación y/o la penetración del oligonucleótido a una célula, tejido u órgano diana (por ejemplo, el hígado). En determinadas modalidades, un oligonucleótido en la presente descripción comprende una hebra sentido que comprende (por ejemplo, en su extremo 3', cerca de su extremo 3' y/o en el extremo 3' de la primera región (R1) de la hebra sentido) un tallo-lazo establecido como:

S1-Lp-S2, en el que S1 es complementario con S2, y en el que Lp forma un lazo monocatenario de nucleótidos unidos entre S1 y S2 de aproximadamente 10 nucleótidos de longitud (por ejemplo, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 nucleótidos de longitud). En algunas modalidades, el lazo (Lp) tiene 3 nucleótidos de longitud (que se denomina en la presente descripción “trilazo”). En algunas modalidades, el lazo (Lp) tiene 4 nucleótidos de longitud (que se denomina en la presente descripción “tetralazo”). En algunas modalidades, el lazo (Lp) es de 5 nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, el lazo (Lp) es de 6 nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, el lazo (Lp) es de 7 nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, el lazo (Lp) es de 8 nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, el lazo (Lp) es de 9 nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, el lazo (Lp) es de 10 nucleótidos de longitud.

En algunas modalidades, el tetralazo comprende la secuencia 5'-GAAA-3'. En algunas modalidades, el tallo-lazo comprende la secuencia 5'-GCAGCCGAAAGGCUGC-3' (SEQ ID NO: 856).

En algunas modalidades, un oligonucleótido que se proporciona en la presente descripción (por ejemplo, un oligonucleótido de ARNi) comprende una secuencia de direccionamiento o una región de complementariedad que es complementaria a una secuencia contigua de nucleótidos de cualquiera de las SEQ ID NO: 661-852, y el oligonucleótido comprende una hebra sentido que comprende (por ejemplo, en su extremo 3', cerca de su extremo 3' y/o en el extremo 3' de la primera región (R1) de la hebra sentido) un tallo-lazo establecido como: S1-Lp-S2, en el que S1 es complementario con S2, y en el que Lp forma un lazo monocatenario entre S1 y S2 de hasta aproximadamente 10 nucleótidos de longitud (por ejemplo, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 nucleótidos de longitud). En algunas modalidades, el oligonucleótido comprende una secuencia de direccionamiento o una región de complementariedad que es complementaria a una secuencia contigua de nucleótidos de cualquiera de las SEQ ID NO: 661-852, y el oligonucleótido comprende una hebra sentido que comprende (por ejemplo, en su extremo 3', cerca de su extremo 3' y/o en el extremo 3' de la primera región (R1) de la hebra sentido) un tallo-lazo establecido como: S1-Lp-S2, en el que S1 es complementario con S2, y en el que Lp forma un lazo monocatenario entre S1 y S2 de 4 nucleótidos de longitud.

En algunas modalidades, un lazo (Lp) de un tallo-lazo que tiene la estructura S1-Lp-S2 como se describe en la presente descripción es un trilazo (triLp). En algunas modalidades, el oligonucleótido comprende una secuencia de direccionamiento o una región de complementariedad que es complementaria a una secuencia contigua de nucleótidos de cualquiera de las SEQ ID NO: 661-852 y un trilazo. En algunas modalidades, el trilazo comprende ribonucleótidos, desoxirribonucleótidos, nucleótidos modificados, ligandos (por ejemplo, ligandos de suministro) y sus combinaciones.

En algunas modalidades, un lazo (Lp) de un tallo-lazo que tiene la estructura S1-Lp-S2 como se describió anteriormente es un tetralazo (tetraLp) como se describe en la patente de los Estados Unidos núm. 10,131,912, que se incorpora en la presente descripción como referencia. En algunas modalidades, un oligonucleótido en la presente descripción comprende una secuencia de direccionamiento o una región de complementariedad que es complementaria a una secuencia contigua de nucleótidos de cualquiera de las SEQ ID NO: 661-852 y un tetralazo. En algunas modalidades, el tetralazo comprende ribonucleótidos, desoxirribonucleótidos, nucleótidos modificados, ligandos (por ejemplo, ligandos de suministro) y sus combinaciones.

Longitud de híbridos

En algunas modalidades, un híbrido formado entre una hebra sentido y antisentido es de al menos 12 (por ejemplo, al menos 15, al menos 16, al menos 17, al menos 18, al menos 19, al menos 20 o al menos 21) nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, un híbrido formado entre una hebra sentido y antisentido tiene una longitud en el intervalo de 12-30

nucleótidos de longitud (por ejemplo, 12 a 30, 12 a 27, 12 a 22, 15 a 25, 18 a 30, 18 a 22, 18 a 25, 18 a 27, 18 a 30, 19 a 30 o 21 a 30 nucleótidos). En algunas modalidades, un híbrido formado entre una hebra sentido y antisentido es de 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 29, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, un híbrido
5 formado entre una hebra sentido y antisentido es de 12 nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, un híbrido formado entre una hebra sentido y antisentido es de 13 nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, un híbrido formado entre una hebra sentido y antisentido es de 14 nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, un híbrido formado entre una hebra sentido y antisentido es de 15 nucleótidos de longitud. En algunas
10 modalidades, un híbrido formado entre una hebra sentido y antisentido es de 16 nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, un híbrido formado entre una hebra sentido y antisentido es de 17 nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, un híbrido formado entre una hebra sentido y antisentido es de 18 nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, un híbrido formado entre una hebra sentido y antisentido es de 19 nucleótidos
15 de longitud. En algunas modalidades, un híbrido formado entre una hebra sentido y antisentido es de 20 nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, un híbrido formado entre una hebra sentido y antisentido es de 21 nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, un híbrido formado entre una hebra sentido y antisentido es de 22 nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, un híbrido formado entre una hebra sentido y
20 antisentido es de 23 nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, un híbrido formado entre una hebra sentido y antisentido es de 24 nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, un híbrido formado entre una hebra sentido y antisentido es de 25 nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, un híbrido formado entre una hebra sentido y antisentido es de 26 nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, un híbrido formado entre una hebra sentido y antisentido es de 27 nucleótidos de longitud. En algunas
25 modalidades, un híbrido formado entre una hebra sentido y antisentido es de 28 nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, un híbrido formado entre una hebra sentido y antisentido es de 29 nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, un híbrido formado entre una hebra sentido y antisentido es de 30 nucleótidos de longitud. En algunas
30 modalidades, un híbrido formado entre una hebra sentido y antisentido no abarca toda la longitud de la hebra sentido y/o la hebra antisentido. En algunas modalidades, un híbrido entre una hebra sentido y antisentido abarca toda la longitud de las hebras sentido o antisentido. En algunas modalidades, un híbrido entre una hebra sentido y antisentido abarca toda la longitud tanto de la hebra sentido como de la hebra antisentido. En algunas
35 modalidades, las hebras sentido y antisentido de un oligonucleótido comprenden secuencias de nucleótidos que se seleccionan del grupo que consiste en:

- a) SEQ ID NO: 579 y 600, respectivamente;
- b) SEQ ID NO: 580 y 601, respectivamente;
- c) SEQ ID NO: 595 y 616, respectivamente;
- 40 d) SEQ ID NO: 590 y 611, respectivamente;

- e) SEQ ID NO: 596 y 617, respectivamente;
f) SEQ ID NO: 597 y 618, respectivamente;
g) SEQ ID NO: 585 y 606, respectivamente;
h) SEQ ID NO: 586 y 607, respectivamente; y,
5 i) SEQ ID NO: 587 y 608, respectivamente,
en donde un híbrido formado entre una hebra sentido y antisentido está en el intervalo de 12-30 nucleótidos de longitud (por ejemplo, 12 a 30, 12 a 27, 12 a 22, 15 a 25, 18 a 30, 18 a 22, 18 a 25, 18 a 27, 18 a 30, 19 a 30 o 21 a 30 nucleótidos de longitud)
En algunas modalidades, las hebras sentido y antisentido de un oligonucleótido comprenden
10 secuencias de nucleótidos que se seleccionan del grupo que consiste en:
a) SEQ ID NO: 579 y 600, respectivamente;
b) SEQ ID NO: 580 y 601, respectivamente;
c) SEQ ID NO: 590 y 611, respectivamente;
d) SEQ ID NO: 597 y 618, respectivamente; y,
15 e) SEQ ID NO: 586 y 607, respectivamente,
en donde un híbrido formado entre una hebra sentido y antisentido está en el intervalo de 12-30 nucleótidos de longitud (por ejemplo, 12 a 30, 12 a 27, 12 a 22, 15 a 25, 18 a 30, 18 a 22, 18 a 25, 18 a 27, 18 a 30, 19 a 30 o 21 a 30 nucleótidos de longitud)
Extremos terminales de los oligonucleótidos
20 En algunas modalidades, un oligonucleótido descrito en la presente descripción (por ejemplo, un oligonucleótido de ARNi) comprende una hebra sentido y una hebra antisentido, en donde los extremos terminales de una o ambas hebras comprenden un extremo romo. En algunas modalidades, un oligonucleótido en la presente descripción comprende hebras sentido y antisentido que son hebras separadas que forman una región híbrida asimétrica que tiene un
25 saliente en el extremo terminal 3' de la hebra antisentido. En algunas modalidades, un oligonucleótido en la presente descripción comprende una hebra sentido y una hebra antisentido, en donde los extremos terminales de una o ambas hebras comprenden un saliente que comprende uno o más nucleótidos. En algunas modalidades, el uno o más nucleótidos que comprenden el saliente son nucleótidos no apareados. En algunas modalidades, un
30 oligonucleótido en la presente descripción comprende una hebra sentido y una hebra antisentido, en donde los extremos terminales 3' de la hebra sentido y los extremos terminales 5' de la hebra antisentido comprenden un extremo romo. En algunas modalidades, un oligonucleótido en la presente descripción comprende una hebra sentido y una hebra antisentido, en donde los extremos terminales 5' de la hebra sentido y los extremos terminales
35 3' de la hebra antisentido comprenden un extremo romo.
En algunas modalidades, un oligonucleótido en la presente descripción comprende una hebra sentido y una hebra antisentido, en donde el extremo terminal 3' de una o ambas hebras comprende un saliente 3' que comprende uno o más nucleótidos. En algunas modalidades, un oligonucleótido en la presente descripción comprende una hebra sentido y una hebra
40 antisentido, en donde la hebra sentido comprende un saliente 3' que comprende uno o más

nucleótidos. En algunas modalidades, un oligonucleótido en la presente descripción comprende una hebra sentido y una hebra antisentido, en donde la hebra antisentido comprende un saliente 3' que comprende uno o más nucleótidos. En algunas modalidades, un oligonucleótido en la presente descripción comprende una hebra sentido y una hebra antisentido, en donde tanto la hebra sentido como la hebra antisentido comprenden un saliente 3' que comprende uno o más nucleótidos.

En algunas modalidades, el saliente 3' es de aproximadamente uno (1) a veinte (20) nucleótidos de longitud (por ejemplo, aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o aproximadamente 20 nucleótidos de longitud). En algunas modalidades, el saliente 3' es de aproximadamente uno (1) a diecinueve (19), uno (1) a dieciocho (18), uno (1) a diecisiete (17), uno (1) a dieciséis (16), uno (1) a quince (15), uno (1) a catorce (14), uno (1) a trece (13), uno (1) a doce (12), uno (1) a once (11), uno (1) a diez (10), uno (1) a nueve (9), uno (1) a ocho (8), uno (1) a siete (7), uno (1) a seis (6), uno (1) a cinco (5), uno (1) a cuatro (4), uno (1) a tres (3), o aproximadamente uno (1) a dos (2) nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, el saliente 3' es de (1) nucleótido de longitud. En algunas modalidades, el saliente 3' es de dos (2) nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, el saliente 3' es de tres (3) nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, el saliente 3' es de cuatro (4) nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, el saliente 3' es de cinco (5) nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, el saliente 3' es de seis (6) nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, el saliente 3' es de siete (7) nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, el saliente 3' es de ocho (8) nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, el saliente 3' es de nueve (9) nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, el saliente 3' es de diez (10) nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, el saliente 3' es de once (11) nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, el saliente 3' es de doce (12) nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, el saliente 3' es de trece (13) nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, el saliente 3' es de catorce (14) nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, el saliente 3' es de quince (15) nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, el saliente 3' es de dieciséis (16) nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, el saliente 3' es de diecisiete (17) nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, el saliente 3' es de dieciocho (18) nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, el saliente 3' es de diecinueve (19) nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, el saliente 3' es de veinte (20) nucleótidos de longitud.

En algunas modalidades, un oligonucleótido que se describe en la presente descripción (por ejemplo, un oligonucleótido de ARNi) comprende una hebra sentido y una hebra antisentido, en donde las hebras sentido y antisentido del oligonucleótido comprenden secuencias de nucleótidos que se seleccionan del grupo que consiste en:

- a) SEQ ID NO: 579 y 600, respectivamente;
- b) SEQ ID NO: 580 y 601, respectivamente;
- c) SEQ ID NO: 595 y 616, respectivamente;

- d) SEQ ID NO: 590 y 611, respectivamente;
e) SEQ ID NO: 596 y 617, respectivamente;
f) SEQ ID NO: 597 y 618, respectivamente;
g) SEQ ID NO: 585 y 606, respectivamente;
5 h) SEQ ID NO: 586 y 607, respectivamente; y,
i) SEQ ID NO: 587 y 608, respectivamente,
y en donde la hebra antisentido comprende un saliente 3' de aproximadamente uno (1) a veinte (20) nucleótidos de longitud (por ejemplo, aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o aproximadamente 20 nucleótidos de longitud),
10 opcionalmente en donde el saliente 3' es de dos (2) nucleótidos de longitud.
En algunas modalidades, un oligonucleótido que se describe en la presente descripción (por ejemplo, un oligonucleótido de ARNi) comprende una hebra sentido y una hebra antisentido, en donde las hebras sentido y antisentido del oligonucleótido comprenden secuencias de nucleótidos que se seleccionan del grupo que consiste en:
15 a) SEQ ID NO: 579 y 600, respectivamente;
b) SEQ ID NO: 580 y 601, respectivamente;
c) SEQ ID NO: 590 y 611, respectivamente;
d) SEQ ID NO: 597 y 618, respectivamente; y,
e) SEQ ID NO: 586 y 607, respectivamente,
20 y en donde la hebra antisentido comprende un saliente 3' de aproximadamente uno (1) a veinte (20) nucleótidos de longitud (por ejemplo, aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o aproximadamente 20 nucleótidos de longitud),
opcionalmente en donde el saliente 3' es de dos (2) nucleótidos de longitud.
En algunas modalidades, un oligonucleótido en la presente descripción comprende una hebra
25 sentido y una hebra antisentido, en donde el extremo terminal 5' de una o ambas hebras comprende un saliente 5' que comprende uno o más nucleótidos. En algunas modalidades, un oligonucleótido en la presente descripción comprende una hebra sentido y una hebra antisentido, en donde la hebra sentido comprende un saliente 5' que comprende uno o más nucleótidos. En algunas modalidades, un oligonucleótido en la presente descripción
30 comprende una hebra sentido y una hebra antisentido, en donde la hebra antisentido comprende un saliente 5' que comprende uno o más nucleótidos. En algunas modalidades, un oligonucleótido en la presente descripción comprende una hebra sentido y una hebra antisentido, en donde tanto la hebra sentido como la hebra antisentido comprenden un saliente 5' que comprende uno o más nucleótidos.
35 En algunas modalidades, el saliente 5' es de aproximadamente uno (1) a veinte (20) nucleótidos de longitud (por ejemplo, aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o aproximadamente 20 nucleótidos de longitud). En algunas modalidades, el saliente 5' es de aproximadamente uno (1) a diecinueve (19), uno (1) a dieciocho (18), uno (1) a diecisiete (17), uno (1) a dieciséis (16), uno (1) a quince (15), uno
40 (1) a catorce (14), uno (1) a trece (13), uno (1) a doce (12), uno (1) a once (11), uno (1) a diez

(10), uno (1) a nueve (9), uno (1) a ocho (8), uno (1) a siete (7), uno (1) a seis (6), uno (1) a cinco (5), uno (1) a cuatro (4), uno (1) a tres (3), o aproximadamente uno (1) a dos (2) nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, el saliente 5' es de (1) nucleótido de longitud. En algunas modalidades, el saliente 5' es de dos (2) nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, el saliente 5' es de tres (3) nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, el saliente 5' es de cuatro (4) nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, el saliente 5' es de cinco (5) nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, el saliente 5' es de seis (6) nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, el saliente 5' es de siete (7) nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, el saliente 5' es de ocho (8) nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, el saliente 5' es de nueve (9) nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, el saliente 5' es de diez (10) nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, el saliente 5' es de once (11) nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, el saliente 5' es de doce (12) nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, el saliente 5' es de trece (13) nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, el saliente 5' es de catorce (14) nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, el saliente 5' es de quince (15) nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, el saliente 5' es de dieciséis (16) nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, el saliente 5' es de diecisiete (17) nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, el saliente 5' es de dieciocho (18) nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, el saliente 5' es de diecinueve (19) nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, el saliente 5' es de veinte (20) nucleótidos de longitud.

En algunas modalidades, un oligonucleótido que se describe en la presente descripción (por ejemplo, un oligonucleótido de ARNi) comprende una hebra sentido y una hebra antisentido, en donde las hebras sentido y antisentido del oligonucleótido comprenden secuencias de nucleótidos que se seleccionan del grupo que consiste en:

- a) SEQ ID NO: 579 y 600, respectivamente;
- b) SEQ ID NO: 580 y 601, respectivamente;
- c) SEQ ID NO: 595 y 616, respectivamente;
- d) SEQ ID NO: 590 y 611, respectivamente;
- e) SEQ ID NO: 596 y 617, respectivamente;
- f) SEQ ID NO: 597 y 618, respectivamente;
- g) SEQ ID NO: 585 y 606, respectivamente;
- h) SEQ ID NO: 586 y 607, respectivamente; y,
- i) SEQ ID NO: 587 y 608, respectivamente,

y en donde la hebra antisentido comprende un saliente 5' de aproximadamente uno (1) a veinte (20) nucleótidos de longitud (por ejemplo, aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o aproximadamente 20 nucleótidos de longitud), opcionalmente en donde el saliente 5' es de dos (2) nucleótidos de longitud.

En algunas modalidades, un oligonucleótido que se describe en la presente descripción (por ejemplo, un oligonucleótido de ARNi) comprende una hebra sentido y una hebra antisentido,

en donde las hebras sentido y antisentido del oligonucleótido comprenden secuencias de nucleótidos que se seleccionan del grupo que consiste en:

- a) SEQ ID NO: 579 y 600, respectivamente;
- b) SEQ ID NO: 580 y 601, respectivamente;
- 5 c) SEQ ID NO: 590 y 611, respectivamente;
- d) SEQ ID NO: 597 y 618, respectivamente; y,
- e) SEQ ID NO: 586 y 607, respectivamente,

y en donde la hebra antisentido comprende un saliente 5' de aproximadamente uno (1) a veinte (20) nucleótidos de longitud (por ejemplo, aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9,
10 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o aproximadamente 20 nucleótidos de longitud), opcionalmente en donde el saliente 5' es de dos (2) nucleótidos de longitud.

En algunas modalidades, se modifican uno o más (por ejemplo, 2, 3, 4, 5 o más) nucleótidos que comprenden el extremo 3' terminal o el extremo 5' terminal de una hebra sentido y/o antisentido. Por ejemplo, en algunas modalidades, se modifican uno o dos nucleótidos
15 terminales del extremo terminal 3' de la hebra antisentido. En algunas modalidades, se modifica el último nucleótido en el extremo terminal 3' de una hebra antisentido, de manera que, comprende la modificación 2', o comprende, un 2'-O-metoxietilo. En algunas modalidades, el último o los dos últimos nucleótidos terminales en el extremo terminal 3' de una hebra antisentido son complementarios con la diana. En algunas modalidades, el último
20 o los dos últimos nucleótidos en el extremo terminal 3' de la hebra antisentido no son complementarios con la diana.

En algunas modalidades, un oligonucleótido que se describe en la presente descripción (por ejemplo, un oligonucleótido de ARNi) comprende una hebra sentido y una hebra antisentido, en donde el extremo terminal 3' de la hebra sentido comprende una estructura de tallo-lazo
25 que se describe en la presente descripción y el extremo terminal 3' de la hebra antisentido comprende un saliente 3' que se describe en la presente descripción. En algunas modalidades, un oligonucleótido en la presente descripción (por ejemplo, un oligonucleótido de ARNi) comprende una hebra sentido y una hebra antisentido que forman una estructura de tetralazo con muesca que se describe en la presente descripción, en donde el extremo terminal 3' de la
30 hebra sentido comprende una estructura de tallo-lazo, en donde el lazo es un tetralazo que se describe en la presente descripción, y en donde el extremo terminal 3' de la hebra antisentido comprende un saliente 3' que se describe en la presente descripción. En algunas modalidades, el saliente 3' es de dos (2) nucleótidos de longitud. En algunas modalidades, los dos (2) nucleótidos que comprenden el saliente 3' comprenden nucleobases de guanina (G). Uno o
35 ambos nucleótidos que comprenden el saliente 3' de la hebra antisentido pueden no ser complementarios con el ARNm diana. Típicamente, uno o ambos nucleótidos que comprenden el saliente 3' de la hebra antisentido no son complementarios con el ARNm diana.

Modificaciones de los oligonucleótidos

En algunas modalidades, un oligonucleótido que se describe en la presente descripción (por ejemplo, un oligonucleótido de ARNi) comprende una modificación. Los oligonucleótidos (por ejemplo, los oligonucleótidos de ARNi) se pueden modificar de varias maneras para mejorar o controlar la especificidad, la estabilidad, el suministro, la biodisponibilidad, la resistencia a la degradación de nucleasas, la inmunogenicidad, las propiedades de apareamiento de bases, la distribución del ARN y la captación celular y otras características relevantes para el uso terapéutico o de investigación.

En algunas modalidades, la modificación es un azúcar modificado. En algunas modalidades, la modificación es un grupo fosfato en el extremo 5' terminal. En algunas modalidades, la modificación es un enlace internucleotídico modificado. En algunas modalidades, la modificación es una base modificada. En algunas modalidades, un oligonucleótido descrito en la presente descripción puede comprender cualquiera de las modificaciones descritas en la presente descripción o cualquiera de sus combinaciones. Por ejemplo, en algunas modalidades, un oligonucleótido descrito en la presente descripción comprende al menos un azúcar modificado, un grupo fosfato en el extremo 5', al menos un enlace internucleotídico modificado y al menos una base modificada. En algunas modalidades, las hebras sentido y antisentido de un oligonucleótido comprenden secuencias de nucleótidos que se seleccionan del grupo que consiste en:

- a) SEQ ID NO: 579 y 600, respectivamente;
- b) SEQ ID NO: 580 y 601, respectivamente;
- c) SEQ ID NO: 595 y 616, respectivamente;
- d) SEQ ID NO: 590 y 611, respectivamente;
- e) SEQ ID NO: 596 y 617, respectivamente;
- f) SEQ ID NO: 597 y 618, respectivamente;
- g) SEQ ID NO: 585 y 606, respectivamente;
- h) SEQ ID NO: 586 y 607, respectivamente; y,
- i) SEQ ID NO: 587 y 608, respectivamente,

en donde el oligonucleótido comprende al menos un azúcar modificado, un grupo fosfato en el extremo 5' terminal, al menos un enlace internucleotídico modificado y al menos una base modificada.

En algunas modalidades, las hebras sentido y antisentido de un oligonucleótido comprenden secuencias de nucleótidos que se seleccionan del grupo que consiste en:

- a) SEQ ID NO: 579 y 600, respectivamente;
- b) SEQ ID NO: 580 y 601, respectivamente;
- c) SEQ ID NO: 590 y 611, respectivamente;
- d) SEQ ID NO: 597 y 618, respectivamente; y,
- e) SEQ ID NO: 586 y 607, respectivamente,

en donde el oligonucleótido comprende al menos un azúcar modificado, un grupo fosfato en el extremo 5' terminal, al menos un enlace internucleotídico modificado y al menos una base modificada.

La cantidad de modificaciones en un oligonucleótido (por ejemplo, un oligonucleótido de ARNi) y la posición de esas modificaciones del nucleótido pueden influir en las propiedades de un oligonucleótido. Por ejemplo, los oligonucleótidos se pueden suministrar *in vivo* al conjugarlos o incluirlos en una nanopartícula lipídica (LNP) o un portador similar. Sin embargo, cuando un oligonucleótido no está protegido por una LNP o un portador similar, puede ser ventajoso modificar al menos algunos de los nucleótidos. En consecuencia, en algunas modalidades, se modifican todos o sustancialmente todos los nucleótidos de un oligonucleótido. En algunas modalidades, se modifican más de la mitad de los nucleótidos. En algunas modalidades, se modifican menos de la mitad de los nucleótidos. En algunas modalidades, el resto de azúcar de todos los nucleótidos que comprenden el oligonucleótido se modifica en la posición 2'. Las modificaciones pueden ser reversibles o irreversibles. En algunas modalidades, un oligonucleótido como se describe en la presente descripción tiene una cantidad y tipo de nucleótidos modificados suficientes para provocar las características deseadas (por ejemplo, protección contra la degradación enzimática, capacidad para dirigirse a una célula deseada después de la administración *in vivo* y/o estabilidad termodinámica).

Modificaciones del azúcar

En algunas modalidades, un oligonucleótido descrito en la presente descripción (por ejemplo, un oligonucleótido de ARNi) comprende un azúcar modificado. En algunas modalidades, un azúcar modificado (también denominado en la presente descripción un análogo de azúcar) incluye un resto de desoxirribosa o ribosa modificado en el que, por ejemplo, se producen una o más modificaciones en la posición del carbono 2', 3', 4' y/o 5' del azúcar. En algunas modalidades, un azúcar modificado también puede incluir estructuras de carbono alternativas no naturales, tales como las presentes en los ácidos nucleicos bloqueados ("LNA"; ver, por ejemplo, Koshkin y otros (1998) Tetrahedron 54:3607-30), ácidos nucleicos desbloqueados ("UNA"; ver, por ejemplo, Snead y otros (2013) Mol. Ther-Nucl. Acids 2:e103) y ácidos nucleicos con puentes ("BNA"; ver, por ejemplo, Imanishi y Obika (2002) Chem Commun. (Camb) 21:1653-59).

En algunas modalidades, una modificación nucleotídica en un azúcar comprende una modificación en 2'. En algunas modalidades, una modificación en 2' puede ser 2'-O-propargilo, 2'-O-propilamina, 2'-amino, 2'-etilo, 2'-flúor (2'-F), 2'-aminoetilo (EA), 2'-O-metilo (2'-OMe), 2'-O-metoxietilo (2'-MOE), 2'-O-[2-(metilamino)-2-oxoetilo] (2'-O-NMA) o ácido 2'-desoxi-2'-fluoro- β -d-arabinonucleico (2'-FANA). En algunas modalidades, la modificación es 2'-F, 2'-OMe o 2'-MOE. En algunas modalidades, una modificación en un azúcar comprende una modificación del anillo de azúcar, que puede comprender la modificación de uno o más carbonos del anillo de azúcar. Por ejemplo, una modificación de un azúcar de un nucleótido puede comprender un oxígeno 2' de un azúcar enlazado a un carbono 1' o carbono 4' del azúcar, o un oxígeno 2' enlazado a un carbono 1' o carbono 4' mediante un puente etileno o metileno. En algunas modalidades, un nucleótido modificado tiene un azúcar acíclico que carece de un enlace de carbono 2' a carbono 3'. En algunas

modalidades, un nucleótido modificado tiene un grupo tiol, por ejemplo, en la posición 4' del azúcar.

En algunas modalidades, un oligonucleótido (por ejemplo, un oligonucleótido de ARNi) descrito en la presente descripción comprende al menos aproximadamente 1 nucleótido modificado (por ejemplo, al menos 1, al menos 5, al menos 10, al menos 15, al menos 20, al menos 25, al menos 30, al menos 35, al menos 40, al menos 45, al menos 50, al menos 55, al menos 60, o más). En algunas modalidades, la hebra sentido del oligonucleótido comprende al menos aproximadamente 1 nucleótido modificado (por ejemplo, al menos 1, al menos 5, al menos 10, al menos 15, al menos 20, al menos 25, al menos 30, al menos 35 o más). En algunas modalidades, la hebra antisentido del oligonucleótido comprende al menos aproximadamente 1 nucleótido modificado (por ejemplo, al menos 1, al menos 5, al menos 10, al menos 15, al menos 20 o más).

En algunas modalidades, se modifican todos los nucleótidos de la hebra sentido del oligonucleótido. En algunas modalidades, se modifican todos los nucleótidos de la hebra antisentido del oligonucleótido. En algunas modalidades, todos los nucleótidos del oligonucleótido (es decir, tanto la hebra sentido como la hebra antisentido). En algunas modalidades, el nucleótido modificado comprende una modificación en 2' (por ejemplo, un 2'-F o 2'-OMe, 2'-MOE y ácido 2'-desoxi-2'-fluoro-β-d-arabinonucleico).

En algunas modalidades, la descripción proporciona oligonucleótidos que tienen diferentes patrones de modificación. En algunas modalidades, un oligonucleótido en la presente descripción comprende una hebra sentido que tiene un patrón de modificación como se establece en los Ejemplos y el Listado de secuencias y una hebra antisentido que tiene un patrón de modificación como se establece en los Ejemplos y el Listado de secuencias.

En algunas modalidades, un oligonucleótido que se describe en la presente descripción (por ejemplo, un oligonucleótido de ARNi) comprende una hebra antisentido que tiene nucleótidos que están modificados con 2'-F. En algunas modalidades, un oligonucleótido en la presente descripción comprende una hebra antisentido que comprende nucleótidos que están modificados con 2'-F y 2'-OMe. En algunas modalidades, un oligonucleótido que se describe en la presente descripción comprende una hebra sentido que tiene nucleótidos que están modificados con 2'-F. En algunas modalidades, un oligonucleótido descrito en la presente descripción comprende una hebra sentido que comprende nucleótidos que están modificados con 2'-F y 2'-OMe.

En algunas modalidades, un oligonucleótido que se describe en la presente descripción comprende una hebra sentido con aproximadamente 10-15 %, 10 %, 11 %, 12 %, 13 %, 14 % o 15 % de los nucleótidos de la hebra sentido que comprende una modificación 2'-flúor. En algunas modalidades, aproximadamente el 11 % de los nucleótidos de la hebra sentido comprenden una modificación 2'-flúor. En algunas modalidades, un oligonucleótido que se describe en la presente descripción comprende una hebra antisentido con aproximadamente 25-35 %, 25 %, 26 %, 27 %, 28 %, 29 %, 30 %, 31 %, 32 %, 33 %, 34 % o 35 % de los nucleótidos de la hebra antisentido que comprenden una modificación 2'-flúor. En algunas

modalidades, aproximadamente el 32 % de los nucleótidos de la hebra antisentido comprenden una modificación 2'-flúor. En algunas modalidades, el oligonucleótido tiene aproximadamente 15-25 %, 15 %, 16 %, 17 %, 18 %, 19 %, 20 %, 21 %, 22 %, 23 %, 24 % o 25 % de sus nucleótidos que comprenden una modificación 2'-flúor. En algunas
5 modalidades, aproximadamente el 19 % de los nucleótidos en el oligonucleótido comprenden una modificación 2'-flúor.

Como se usa en la presente descripción, la numeración de oligonucleótidos de la hebra sentido y antisentido, respectivamente, comienza en el extremo 5' con "posición 1".

En algunas modalidades, una o más de las posiciones 8, 9, 10 u 11 de la hebra sentido se
10 modifica con un grupo 2'-F. En algunas modalidades, una o más de las posiciones 3, 8, 9, 10, 12, 13 y 17 de la hebra sentido se modifica con un grupo 2'-F. En algunas modalidades, una o más de las posiciones 2, 3, 4, 5, 7, 10 y 14 de la hebra antisentido se modifica con un grupo 2'-F. En algunas modalidades, una o más de las posiciones 2, 3, 4, 5, 7, 8, 10, 14, 16 y 19 se modifican con un grupo 2'-F. En algunas modalidades, el resto de azúcar en cada uno de los
15 nucleótidos en las posiciones 1-7 y 12-20 en la hebra sentido se modifica con un 2'-OMe. En algunas modalidades, el resto de azúcar en cada uno de los nucleótidos en las posiciones 1-7, 12-27 y 31-36 en la hebra sentido se modifica con un 2'-OMe. En algunas modalidades, el resto de azúcar en cada uno de los nucleótidos en las posiciones 6, 9, 11-13, 15, 17, 18 y 20-22 en la hebra sentido se modifica con un 2'-OMe.

20 En algunas modalidades, las hebras sentido y antisentido de un oligonucleótido comprenden secuencias de nucleótidos que se seleccionan del grupo que consiste en:

- a) SEQ ID NO: 579 y 600, respectivamente;
 - b) SEQ ID NO: 580 y 601, respectivamente;
 - c) SEQ ID NO: 595 y 616, respectivamente;
 - 25 d) SEQ ID NO: 590 y 611, respectivamente;
 - e) SEQ ID NO: 596 y 617, respectivamente;
 - f) SEQ ID NO: 597 y 618, respectivamente;
 - g) SEQ ID NO: 585 y 606, respectivamente;
 - h) SEQ ID NO: 586 y 607, respectivamente; y,
 - 30 i) SEQ ID NO: 587 y 608, respectivamente,
- en donde una o más de las posiciones 8, 9, 10 u 11 de la hebra sentido se modifica con un grupo 2'-F.

En algunas modalidades, las hebras sentido y antisentido de un oligonucleótido comprenden secuencias de nucleótidos que se seleccionan del grupo que consiste en:

- 35 a) SEQ ID NO: 579 y 600, respectivamente;
- b) SEQ ID NO: 580 y 601, respectivamente;
- c) SEQ ID NO: 590 y 611, respectivamente;
- d) SEQ ID NO: 597 y 618, respectivamente; y,
- e) SEQ ID NO: 586 y 607, respectivamente,

en donde una o más de las posiciones 8, 9, 10 u 11 de la hebra sentido se modifica con un grupo 2'-F.

En algunas modalidades, un oligonucleótido que se proporciona en la presente descripción comprende una hebra antisentido que tiene el resto de azúcar de cada uno de los nucleótidos en las posiciones 2, 5 y 14 de la hebra antisentido modificado con 2'-F y el resto de azúcar de cada uno de los nucleótidos restantes de la hebra antisentido modificado con una modificación que se selecciona del grupo que consiste en 2'-O-propargilo, 2'-O-propilamina, 2'-amino, 2'-etilo, 2'-aminoetilo (EA), 2'-O-metilo (2'-OMe), 2'-O-metoxietilo (2'-MOE), 2'-O-[2-(metilamino)-2-oxoetilo] (2'-O-NMA) y ácido 2'-desoxi-2'-fluoro-β-d-arabinonucleico (2'-FANA).

En algunas modalidades, un oligonucleótido que se proporciona en la presente descripción comprende una hebra antisentido que tiene el resto de azúcar de cada uno de los nucleótidos en las posiciones 1, 2, 5 y 14 de la hebra antisentido modificado con 2'-F y el resto de azúcar de cada uno de los nucleótidos restantes de la hebra antisentido modificado con una modificación seleccionada del grupo que consiste en 2'-O-propargilo, 2'-O-propilamina, 2'-amino, 2'-etilo, 2'-aminoetilo (EA), 2'-O-metilo (2'-OMe), 2'-O-metoxietilo (2'-MOE), 2'-O-[2-(metilamino)-2-oxoetilo] (2'-O-NMA) y ácido 2'-desoxi-2'-fluoro-β-d-arabinonucleico (2'-FANA).

En algunas modalidades, un oligonucleótido que se proporciona en la presente descripción comprende una hebra antisentido que tiene el resto de azúcar de cada uno de los nucleótidos en las posiciones 2, 4, 5 y 14 de la hebra antisentido modificado con 2'-F y el resto de azúcar de cada uno de los nucleótidos restantes de la hebra antisentido modificado con una modificación seleccionada del grupo que consiste en 2'-O-propargilo, 2'-O-propilamina, 2'-amino, 2'-etilo, 2'-aminoetilo (EA), 2'-O-metilo (2'-OMe), 2'-O-metoxietilo (2'-MOE), 2'-O-[2-(metilamino)-2-oxoetilo] (2'-O-NMA) y ácido 2'-desoxi-2'-fluoro-β-d-arabinonucleico (2'-FANA).

En algunas modalidades, un oligonucleótido que se proporciona en la presente descripción comprende una hebra antisentido que tiene el resto de azúcar de cada uno de los nucleótidos en las posiciones 1, 2, 3, 5, 7 y 14 de la hebra antisentido modificado con 2'-F y el resto de azúcar de cada uno de los nucleótidos restantes de la hebra antisentido modificado con una modificación seleccionada del grupo que consiste en 2'-O-propargilo, 2'-O-propilamina, 2'-amino, 2'-etilo, 2'-aminoetilo (EA), 2'-O-metilo (2'-OMe), 2'-O-metoxietilo (2'-MOE), 2'-O-[2-(metilamino)-2-oxoetilo] (2'-O-NMA), y ácido 2'-desoxi-2'-fluoro-β-d-arabinonucleico (2'-FANA).

En algunas modalidades, un oligonucleótido que se proporciona en la presente descripción comprende una hebra antisentido que tiene el resto de azúcar de cada uno de los nucleótidos en las posiciones 2, 3, 4, 5, 7 y 14 de la hebra antisentido modificado con 2'-F y el resto de azúcar de cada uno de los nucleótidos restantes de la hebra antisentido modificado con una modificación seleccionada del grupo que consiste en 2'-O-propargilo, 2'-O-propilamina, 2'-amino, 2'-etilo, 2'-aminoetilo (EA), 2'-O-metilo (2'-OMe), 2'-O-metoxietilo (2'-MOE), 2'-O-

[2-(metilamino)-2-oxoetilo] (2'-O-NMA), y ácido 2'-desoxi-2'-fluoro-β-d-arabinonucleico (2'-FANA).

En algunas modalidades, un oligonucleótido que se proporciona en la presente descripción comprende una hebra antisentido que tiene el resto de azúcar de cada uno de los nucleótidos en las posiciones 1, 2, 3, 5, 10 y 14 de la hebra antisentido modificado con 2'-F y el resto de azúcar de cada uno de los nucleótidos restantes de la hebra antisentido modificado con una modificación seleccionada del grupo que consiste en 2'-O-propargilo, 2'-O-propilamina, 2'-amino, 2'-etilo, 2'-aminoetilo (EA), 2'-O-metilo (2'-OMe), 2'-O-metoxietilo (2'-MOE), 2'-O-[2-(metilamino)-2-oxoetilo] (2'-O-NMA), y ácido 2'-desoxi-2'-fluoro-β-d-arabinonucleico (2'-FANA).

En algunas modalidades, un oligonucleótido que se proporciona en la presente descripción comprende una hebra antisentido que tiene el resto de azúcar de cada uno de los nucleótidos en las posiciones 2, 3, 4, 5, 10 y 14 de la hebra antisentido modificado con 2'-F y el resto de azúcar de cada uno de los nucleótidos restantes de la hebra antisentido modificado con una modificación seleccionada del grupo que consiste en 2'-O-propargilo, 2'-O-propilamina, 2'-amino, 2'-etilo, 2'-aminoetilo (EA), 2'-O-metilo (2'-OMe), 2'-O-metoxietilo (2'-MOE), 2'-O-[2-(metilamino)-2-oxoetilo] (2'-O-NMA), y ácido 2'-desoxi-2'-fluoro-β-d-arabinonucleico (2'-FANA).

En algunas modalidades, un oligonucleótido que se proporciona en la presente descripción comprende una hebra antisentido que tiene el resto de azúcar de cada uno de los nucleótidos en las posiciones 2, 3, 5, 7, 10 y 14 de la hebra antisentido modificado con 2'-F y el resto de azúcar de cada uno de los nucleótidos restantes de la hebra antisentido modificado con una modificación seleccionada del grupo que consiste en 2'-O-propargilo, 2'-O-propilamina, 2'-amino, 2'-etilo, 2'-aminoetilo (EA), 2'-O-metilo (2'-OMe), 2'-O-metoxietilo (2'-MOE), 2'-O-[2-(metilamino)-2-oxoetilo] (2'-O-NMA), y ácido 2'-desoxi-2'-fluoro-β-d-arabinonucleico (2'-FANA).

En algunas modalidades, un oligonucleótido que se proporciona en la presente descripción comprende una hebra antisentido que tiene el resto de azúcar de cada uno de los nucleótidos en las posiciones 2, 3, 4, 5, 7, 10 y 14 de la hebra antisentido modificado con 2'-F y el resto de azúcar de cada uno de los nucleótidos restantes de la hebra antisentido modificado con una modificación que se selecciona del grupo que consiste en 2'-O-propargilo, 2'-O-propilamina, 2'-amino, 2'-etilo, 2'-aminoetilo (EA), 2'-O-metilo (2'-OMe), 2'-O-metoxietilo (2'-MOE), 2'-O-[2-(metilamino)-2-oxoetilo] (2'-O-NMA), y ácido 2'-desoxi-2'-fluoro-β-d-arabinonucleico (2'-FANA).

En algunas modalidades, un oligonucleótido que se proporciona en la presente descripción comprende una hebra antisentido que tiene el resto de azúcar de cada uno de los nucleótidos en las posiciones 2, 3, 4, 5, 7, 8, 10, 14, 16 y 19 de la hebra antisentido modificado con 2'-F y el resto de azúcar de cada uno de los nucleótidos restantes de la hebra antisentido modificado con una modificación que se selecciona del grupo que consiste en 2'-O-propargilo, 2'-O-propilamina, 2'-amino, 2'-etilo, 2'-aminoetilo (EA), 2'-O-metilo (2'-OMe),

2'-O-metoxietilo (2'-MOE), 2'-O-[2-(metilamino)-2-oxoetilo] (2'-O-NMA) y ácido 2'-desoxi-2'-fluoro-β-d-arabinonucleico (2'-FANA).

En algunas modalidades, un oligonucleótido que se proporciona en la presente descripción comprende una hebra antisentido que tiene el resto de azúcar en la posición 1, posición 2,
5 posición 3, posición 4, posición 5, posición 6, posición 7, posición 8, posición 9, posición 10, posición 11, posición 12, posición 13, posición 14, posición 15, posición 16, posición 17, posición 18, posición 19, posición 20, posición 21 o posición 22 modificado con 2'-F.

En algunas modalidades, un oligonucleótido que se proporciona en la presente descripción comprende una hebra antisentido que tiene el resto de azúcar en la posición 1, posición 2,
10 posición 3, posición 4, posición 5, posición 6, posición 7, posición 8, posición 9, posición 10, posición 11, posición 12, posición 13, posición 14, posición 15, posición 16, posición 17, posición 18, posición 19, posición 20, posición 21 o posición 22 modificado con 2'-OMe.

En algunas modalidades, un oligonucleótido que se proporciona en la presente descripción comprende una hebra antisentido que tiene el resto de azúcar en la posición 1, posición 2,
15 posición 3, posición 4, posición 5, posición 6, posición 7, posición 8, posición 9, posición 10, posición 11, posición 12, posición 13, posición 14, posición 15, posición 16, posición 17, posición 18, posición 19, posición 20, posición 21 o posición 22 modificado con una modificación que se selecciona del grupo que consiste en 2'-O-propargilo, 2'-O-propilamina, 2'-amino, 2'-etilo, 2'-aminoetilo (EA), 2'-O-metilo (2'-OMe), 2'-O-metoxietilo (2'-MOE), 2'-
20 O-[2-(metilamino)-2-oxoetilo] (2'-O-NMA) y ácido 2'-desoxi-2'-fluoro-β-d-arabinonucleico (2'-FANA).

En algunas modalidades, un oligonucleótido que se proporciona en la presente descripción comprende una hebra antisentido que tiene el resto de azúcar en la posición 1, posición 2,
posición 3, posición 4, posición 5, posición 6, posición 7, posición 8, posición 9, posición
25 posición 10, posición 11, posición 12, posición 13, posición 14, posición 15, posición 16, posición 17, posición 18, posición 19, posición 20, posición 21 o posición 22 modificado con una modificación que se selecciona del grupo que consiste en 2'-flúor (2'-F), 2'-O-propargilo, 2'-O-propilamina, 2'-amino, 2'-etilo, 2'-aminoetilo (EA), 2'-O-metilo (2'-OMe), 2'-O-metoxietilo (2'-MOE), 2'-O-[2-(metilamino)-2-oxoetilo] (2'-O-NMA) y ácido 2'-desoxi-2'-
30 fluoro-β-d-arabinonucleico (2'-FANA).

En algunas modalidades, un oligonucleótido que se proporciona en la presente descripción comprende una hebra sentido que tiene el resto de azúcar en las posiciones 8-11 modificado con 2'-F. En algunas modalidades, un oligonucleótido que se proporciona en la presente descripción comprende una hebra sentido que tiene el resto de azúcar en las posiciones 3, 8,
35 9, 10, 12, 13 y 17 modificado con 2'-F. En algunas modalidades, un oligonucleótido que se proporciona en la presente descripción comprende una hebra sentido que tiene el resto de azúcar en las posiciones 1-7 y 12-17 o 12-20 modificado con 2'OMe. En algunas modalidades, un oligonucleótido que se proporciona en la presente descripción comprende una hebra sentido que tiene el resto de azúcar en las posiciones 1-7, 12-27 y 31-36 modificado
40 con 2'OMe. En algunas modalidades, un oligonucleótido que se proporciona en la presente

descripción comprende una hebra sentido que tiene el resto de azúcar de cada uno de los nucleótidos en las posiciones 1-7 y 12-17 o 12-20 de la hebra sentido modificado con una modificación que se selecciona del grupo que consiste en 2'-O-propargilo, 2'-O-propilamina, 2'-amino, 2'-etilo, 2'-aminoetilo (EA), 2'-O-metilo (2'-OMe), 2'-O-metoxietilo (2'-MOE), 2'-O-[2-(metilamino)-2-oxoetilo] (2'-O-NMA) y ácido 2'-desoxi-2'-fluoro-β-d-arabinonucleico (2'-FANA). En algunas modalidades, un oligonucleótido que se proporciona en la presente descripción comprende una hebra sentido que tiene el resto de azúcar en las posiciones 1-2, 4-7, 11, 14-16 y 18-20 modificado con 2'OMe. En algunas modalidades, un oligonucleótido que se proporciona en la presente descripción comprende una hebra sentido que tiene el resto de azúcar de cada uno de los nucleótidos en las posiciones 1-2, 4-7, 11, 14-16 y 18-20 de la hebra sentido modificado con una modificación que se selecciona del grupo que consiste en 2'-O-propargilo, 2'-O-propilamina, 2'-amino, 2'-etilo, 2'-aminoetilo (EA), 2'-O-metilo (2'-OMe), 2'-O-metoxietilo (2'-MOE), 2'-O-[2-(metilamino)-2-oxoetilo] (2'-O-NMA) y ácido 2'-desoxi-2'-fluoro-β-d-arabinonucleico (2'-FANA).

En algunas modalidades, un oligonucleótido que se proporciona en la presente descripción comprende una hebra sentido que tiene el resto de azúcar en la posición 1, posición 2, posición 3, posición 4, posición 5, posición 6, posición 7, posición 8, posición 9, posición 10, posición 11, posición 12, posición 13, posición 14, posición 15, posición 16, posición 17, posición 18, posición 19, posición 20, posición 21, posición 22, posición 23, posición 24, posición 25, posición 26, posición 27, posición 28, posición 29, posición 30, posición 31, posición 32, posición 33, posición 34, posición 35, o posición 36 modificado con 2'-F. En algunas modalidades, un oligonucleótido que se proporciona en la presente descripción comprende una hebra sentido que tiene el resto de azúcar en la posición 1, posición 2, posición 3, posición 4, posición 5, posición 6, posición 7, posición 8, posición 9, posición 10, posición 11, posición 12, posición 13, posición 14, posición 15, posición 16, posición 17, posición 18, posición 19, posición 20, posición 21, posición 22, posición 23, posición 24, posición 25, posición 26, posición 27, posición 28, posición 29, posición 30, posición 31, posición 32, posición 33, posición 34, posición 35 o posición 36 modificado con 2'-OMe. En algunas modalidades, un oligonucleótido que se proporciona en la presente descripción comprende una hebra sentido que tiene el resto de azúcar en la posición 1, posición 2, posición 3, posición 4, posición 5, posición 6, posición 7, posición 8, posición 9, posición 10, posición 11, posición 12, posición 13, posición 14, posición 15, posición 16, posición 17, posición 18, posición 19, posición 20, posición 21, posición 22, posición 23, posición 24, posición 25, posición 26, posición 27, posición 28, posición 29, posición 30, posición 31, posición 32, posición 33, posición 34, posición 35 o posición 36 modificada con una modificación que se selecciona del grupo que consiste en 2'-O-propargilo, 2'-O-propilamina, 2'-amino, 2'-etilo, 2'-aminoetilo (EA), 2'-O-metilo (2'-OMe), 2'-O-metoxietilo (2'-MOE), 2'-O-[2-(metilamino)-2-oxoetilo] (2'-O-NMA) y ácido 2'-desoxi-2'-fluoro-β-d-arabinonucleico (2'-FANA).

En algunas modalidades, un oligonucleótido que se proporciona en la presente descripción comprende una hebra sentido que tiene el resto de azúcar en la posición 1, posición 2, posición 3, posición 4, posición 5, posición 6, posición 7, posición 8, posición 9, posición 10, posición 11, posición 12, posición 13, posición 14, posición 15, posición 16, posición 17, posición 18, posición 19, posición 20, posición 21, posición 22, posición 23, posición 24, posición 25, posición 26, posición 27, posición 28, posición 29, posición 30, posición 31, posición 32, posición 33, posición 34, posición 35 o posición 36 modificada con una modificación que se selecciona del grupo que consiste en 2'-flúor (2'-F), 2'-O-propargilo, 2'-O-propilamina, 2'-amino, 2'-etilo, 2'-aminoetilo (EA), 2'-O-metilo (2'-OMe), 2'-O-metoxietilo (2'-MOE), 2'-O-[2 -(metilamino)-2-oxoetilo] (2'-O-NMA) y ácido 2'-desoxi-2'-fluoro-β-d-arabinonucleico (2'-FANA).

Fosfato en el extremo terminal 5'

En algunas modalidades, un oligonucleótido descrito en la presente descripción (por ejemplo, un oligonucleótido de ARNi) comprende una hebra sentido y una hebra antisentido, en donde la hebra antisentido comprende un fosfato en el extremo 5' terminal. En algunas modalidades, los grupos fosfato del extremo terminal 5' de un oligonucleótido de ARNi mejoran la interacción con Ago2. Sin embargo, los oligonucleótidos que comprenden un grupo fosfato 5' pueden ser susceptibles a la degradación por fosfatasas u otras enzimas, que pueden limitar su rendimiento y/o biodisponibilidad *in vivo*. En algunas modalidades, un oligonucleótido en la presente descripción incluye análogos de fosfatos en 5' que son resistentes a dicha degradación. En algunas modalidades, el análogo de fosfato es oximetilfosfonato, vinilfosfonato o malonilfosfonato o una de sus combinaciones. En determinadas modalidades, el extremo terminal 5' de una hebra de oligonucleótido se une a un resto químico que imita las propiedades electrostáticas y estéricas de un grupo fosfato 5' natural ("imitador de fosfato"). En algunas modalidades, las hebras sentido y antisentido de un oligonucleótido comprenden secuencias de nucleótidos que se seleccionan del grupo que consiste en:

- a) SEQ ID NO: 579 y 600, respectivamente;
- b) SEQ ID NO: 580 y 601, respectivamente;
- c) SEQ ID NO: 595 y 616, respectivamente;
- d) SEQ ID NO: 590 y 611, respectivamente;
- e) SEQ ID NO: 596 y 617, respectivamente;
- f) SEQ ID NO: 597 y 618, respectivamente;
- g) SEQ ID NO: 585 y 606, respectivamente;
- h) SEQ ID NO: 586 y 607, respectivamente; y,
- i) SEQ ID NO: 587 y 608, respectivamente,

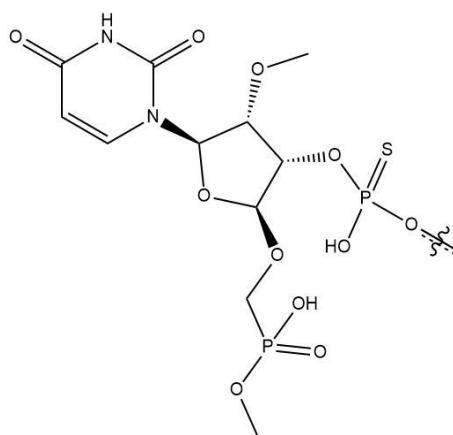
en donde el oligonucleótido comprende un fosfato terminal 5', opcionalmente un análogo de fosfato terminal 5'.

En algunas modalidades, las hebras sentido y antisentido de un oligonucleótido comprenden secuencias de nucleótidos que se seleccionan del grupo que consiste en:

- a) SEQ ID NO: 579 y 600, respectivamente;
b) SEQ ID NO: 580 y 601, respectivamente;
c) SEQ ID NO: 590 y 611, respectivamente;
d) SEQ ID NO: 597 y 618, respectivamente; y,
5 e) SEQ ID NO: 586 y 607, respectivamente,
en donde el oligonucleótido comprende un fosfato terminal 5', opcionalmente un análogo de fosfato terminal 5'.

En algunas modalidades, un oligonucleótido en la presente descripción (por ejemplo, un oligonucleótido de ARNi) tiene un análogo de fosfato en una posición de carbono 4' del
10 azúcar (denominado "análogo de fosfato 4"). Ver, por ejemplo, publicación de solicitud de patente internacional núm. WO 2018/045317. En algunas modalidades, un oligonucleótido en la presente descripción comprende un análogo de fosfato 4' en un nucleótido del extremo terminal nucleótido del extremo terminal 5'. En algunas modalidades, un análogo de fosfato es un oximetilfosfonato, en el que el átomo de oxígeno del grupo oximetilo se une al resto de
15 azúcar (por ejemplo, en su carbono 4') o análogo de este. En otras modalidades, un análogo de 4'-fosfato es un tiometilfosfonato o un aminometilfosfonato, en el que el átomo de azufre del grupo tiometilo o el átomo de nitrógeno del grupo aminometilo se une al carbono 4' del resto de azúcar o análogo de este. En determinadas modalidades, un análogo de fosfato 4' es un oximetilfosfonato. En algunas modalidades, un oximetilfosfonato se representa mediante
20 la fórmula $-O-CH_2-PO(OH)_2$, $-O-CH_2-PO(OR)_2$, o $-O-CH_2-PO(OH)(R)$, en el que R se selecciona independientemente de H, CH₃, un grupo alquilo, CH₂CH₂CN, CH₂OCOC(CH₃)₃, CH₂OCH₂CH₂Si(CH₃)₃ o un grupo protector. En determinadas modalidades, el grupo alquilo es CH₂CH₃. Más típicamente, R se selecciona independientemente de H, CH₃ o CH₂CH₃. En alguna modalidad, R es CH₃. En algunas modalidades, el análogo de fosfato 4' es 4'-oximetilfosfonato.
25 oximetilfosfonato.

En algunas modalidades, un oligonucleótido que se proporciona en la presente descripción comprende una hebra antisentido que comprende un análogo de fosfato 4' en el nucleótido del extremo terminal 5', en donde el nucleótido del extremo terminal 5' comprende la siguiente estructura:

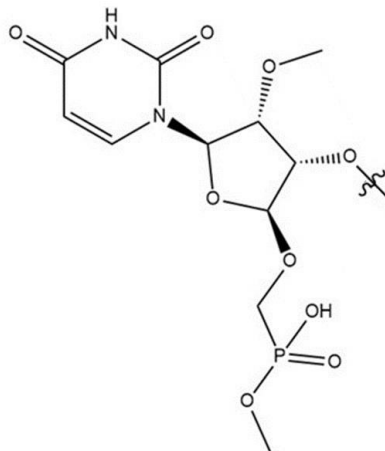


30

(Sustancia química 1)

Fosforotioato de 4'-O-monometilfosfonato-2'-O-metiluridina [MeFosfonato-4O-mUs].

En algunas modalidades, un oligonucleótido que se proporciona en la presente descripción comprende una hebra antisentido que comprende un análogo de fosfato 4' en el nucleótido del extremo terminal 5', en donde el nucleótido del extremo terminal 5' comprende la siguiente estructura:



5

(Sustancia química 1a)

4'-O-monometilfosfonato-2'-O-metiluridina [MeFosfonaoc-4O-mU].

La sustancia química 1a puede denominarse fosforotioato de 4'-O-monometilfosfonato-2'-O-metiluridina [MeFosfonato-4O-mUs] cuando se proporciona un enlace internucleotídico de fosforotioato.

10

Enlace internucleotídico modificado

En algunas modalidades, un oligonucleótido que se proporciona en la presente descripción (por ejemplo, un oligonucleótido de ARNi) comprende un enlace internucleotídico modificado. En algunas modalidades, las modificaciones o sustituciones de fosfato dan como resultado un oligonucleótido que comprende al menos aproximadamente 1 (por ejemplo, al menos 1, al menos 2, al menos 3 o al menos 5) enlace internucleotídico modificado. En algunas modalidades, cualquiera de los oligonucleótidos que se describen en la presente descripción comprende de aproximadamente 1 a aproximadamente 10 (por ejemplo, 1 a 10, 2 a 8, 4 a 6, 3 a 10, 5 a 10, 1 a 5, 1 a 3 o 1 a 2) enlaces internucleotídicos modificados. En algunas modalidades, cualquiera de los oligonucleótidos que se describen en la presente descripción comprende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 enlaces internucleotídicos modificados.

20

Un enlace internucleotídico modificado puede ser un enlace fosforoditioato, un enlace fosforotioato, un enlace fosfotriéster, un enlace tionoalquilfosfonato, un enlace tionalquilfosfotriéster, un enlace fosforamidito, un enlace fosfonato o un enlace boranofosfato. En algunas modalidades, al menos un enlace internucleotídico modificado de cualquiera de los oligonucleótidos como se describe en la presente descripción es un enlace fosforotioato.

25

En algunas modalidades, un oligonucleótido que se proporciona en la presente descripción (por ejemplo, un oligonucleótido de ARNi) tiene un enlace fosforotioato entre una o más de las posiciones 1 y 2 de la hebra sentido, posiciones 1 y 2 de la hebra antisentido, posiciones 2 y 3 de la hebra antisentido, posiciones 3 y 4 de la hebra antisentido, posiciones 20 y 21 de la hebra antisentido, y las posiciones 21 y 22 de la hebra antisentido. En algunas modalidades,

30

el oligonucleótido que se describe en la presente descripción tiene un enlace fosforotioato entre cada una de las posiciones 1 y 2 de la hebra sentido, posiciones 1 y 2 de la hebra antisentido, posiciones 2 y 3 de la hebra antisentido, posiciones 20 y 21 de la hebra antisentido, y las posiciones 21 y 22 de la hebra antisentido. En algunas modalidades, las

5 hebras sentido y antisentido de un oligonucleótido comprenden secuencias de nucleótidos que se seleccionan del grupo que consiste en:

- a) SEQ ID NO: 579 y 600, respectivamente;
- b) SEQ ID NO: 580 y 601, respectivamente;
- c) SEQ ID NO: 595 y 616, respectivamente;
- 10 d) SEQ ID NO: 590 y 611, respectivamente;
- e) SEQ ID NO: 596 y 617, respectivamente;
- f) SEQ ID NO: 597 y 618, respectivamente;
- g) SEQ ID NO: 585 y 606, respectivamente;
- h) SEQ ID NO: 586 y 607, respectivamente; y,
- 15 i) SEQ ID NO: 587 y 608, respectivamente,

en donde el oligonucleótido comprende un enlace internucleotídico modificado.

En algunas modalidades, las hebras sentido y antisentido de un oligonucleótido comprenden secuencias de nucleótidos que se seleccionan del grupo que consiste en:

- a) SEQ ID NO: 579 y 600, respectivamente;
- 20 b) SEQ ID NO: 580 y 601, respectivamente;
- c) SEQ ID NO: 590 y 611, respectivamente;
- d) SEQ ID NO: 597 y 618, respectivamente; y,
- e) SEQ ID NO: 586 y 607, respectivamente,

en donde el oligonucleótido comprende un enlace internucleotídico modificado.

25 Modificaciones de bases

En algunas modalidades, un oligonucleótido que se proporciona en la presente descripción (por ejemplo, un oligonucleótido de ARNi) comprende una o más nucleobases modificadas. En algunas modalidades, las nucleobases modificadas (también denominadas en la presente descripción como análogos de bases) se unen en la posición 1' de un resto de azúcar del

30 nucleótido. En determinadas modalidades, una nucleobase modificada es una base nitrogenada. En algunas modalidades, una nucleobase modificada no contiene un átomo de nitrógeno. Ver, por ejemplo, la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos núm. 2008/0274462. En algunas modalidades, un nucleótido modificado comprende una base universal. En algunas modalidades, un nucleótido modificado no contiene una nucleobase

35 (sin base). En algunas modalidades, las hebras sentido y antisentido de un oligonucleótido comprenden secuencias de nucleótidos que se seleccionan del grupo que consiste en:

- a) SEQ ID NO: 579 y 600, respectivamente;
- b) SEQ ID NO: 580 y 601, respectivamente;
- c) SEQ ID NO: 595 y 616, respectivamente;
- 40 d) SEQ ID NO: 590 y 611, respectivamente;

- e) SEQ ID NO: 596 y 617, respectivamente;
 f) SEQ ID NO: 597 y 618, respectivamente;
 g) SEQ ID NO: 585 y 606, respectivamente;
 h) SEQ ID NO: 586 y 607, respectivamente; y,
 5 i) SEQ ID NO: 587 y 608, respectivamente,
 en donde el oligonucleótido comprende una o más nucleobases modificadas.
 En algunas modalidades, las hebras sentido y antisentido de un oligonucleótido comprenden
 secuencias de nucleótidos que se seleccionan del grupo que consiste en:
 a) SEQ ID NO: 579 y 600, respectivamente;
 10 b) SEQ ID NO: 580 y 601, respectivamente;
 c) SEQ ID NO: 590 y 611, respectivamente;
 d) SEQ ID NO: 597 y 618, respectivamente; y,
 e) SEQ ID NO: 586 y 607, respectivamente,
 en donde el oligonucleótido comprende una o más nucleobases modificadas.
 15 En algunas modalidades, una base universal es un resto heterocíclico que se localiza en la
 posición 1' de un resto de azúcar del nucleótido en un nucleótido modificado, o la posición
 equivalente en una sustitución del resto de azúcar del nucleótido, que, cuando está presente
 en un híbrido, se puede ubicar opuesto a más de un tipo de base sin alterar sustancialmente
 la estructura del híbrido. En algunas modalidades, en comparación con un ácido nucleico
 20 monocatenario de referencia (por ejemplo, un oligonucleótido) que es totalmente
 complementario a un ácido nucleico diana (por ejemplo, un ARNm de *TMPRSS6*), un ácido
 nucleico monocatenario que contiene una base universal forma un híbrido con el ácido
 nucleico diana que tiene una T_m más baja que un híbrido formado con el ácido nucleico
 complementario. En algunas modalidades, cuando se compara con un ácido nucleico
 25 monocatenario de referencia en el que la base universal ha sido reemplazada por una base
 para generar un único error de apareamiento, el ácido nucleico monocatenario que contiene
 la base universal forma un híbrido con el ácido nucleico diana que tiene una T_m más alta que
 un híbrido formado con el ácido nucleico que comprende la base desapareada.
 Los ejemplos de nucleótidos de unión universal no limitantes incluyen, pero no se limitan a,
 30 inosina, 1- β -D-ribofuranosil-5-nitroindol y/o 1- β -D-ribofuranosil-3-nitropirrol (ver,
 publicación de solicitud de patente de Estados Unidos núm. 2007/0254362; Van Aerschot y
 otros (1995) *Nucleic Acids Res.* 23:4363-4370; Loakes y otros (1995) *Nucleic Acids Res.*
 23:2361-66; y Loakes y Brown (1994) *Nucleic Acids Res.* 22:4039-43).
 Ligandos de direccionamiento
 35 En algunas modalidades, es conveniente dirigir un oligonucleótido que se proporciona en la
 presente descripción (por ejemplo, un oligonucleótido de ARNi) a una o más células o tipo
 de células, tejidos, órganos o regiones o compartimentos anatómicos. Tal estrategia puede
 ayudar a evitar efectos indeseables al organismo tratado y/o evitar la pérdida indebida del
 oligonucleótido en células, tejidos, órganos o regiones o compartimentos anatómicos que no
 40 se beneficiarían del oligonucleótido o sus efectos (por ejemplo, inhibición o reducción de la

expresión de TMPRSS6). En consecuencia, en algunas modalidades, los oligonucleótidos que se describen en la presente descripción (por ejemplo, oligonucleótidos de ARNi) se modifican para facilitar el direccionamiento y/o el suministro a las células o tipos de células, tejidos, órganos o regiones o compartimentos anatómicos particulares (por ejemplo, para

5 facilitar el suministro del oligonucleótido al hígado). En algunas modalidades, un oligonucleótido comprende al menos un nucleótido (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más nucleótidos) conjugados con uno o más ligando(s) de direccionamiento. En algunas modalidades, las hebras sentido y antisentido de un oligonucleótido comprenden secuencias de nucleótidos que se seleccionan del grupo que consiste en:

10 a) SEQ ID NO: 579 y 600, respectivamente;
 b) SEQ ID NO: 580 y 601, respectivamente;
 c) SEQ ID NO: 595 y 616, respectivamente;
 d) SEQ ID NO: 590 y 611, respectivamente;
 e) SEQ ID NO: 596 y 617, respectivamente;
 15 f) SEQ ID NO: 597 y 618, respectivamente;
 g) SEQ ID NO: 585 y 606, respectivamente;
 h) SEQ ID NO: 586 y 607, respectivamente; y,
 i) SEQ ID NO: 587 y 608, respectivamente,

en donde el oligonucleótido comprende un ligando de direccionamiento conjugado con al

20 menos un nucleótido.

En algunas modalidades, las hebras sentido y antisentido de un oligonucleótido comprenden secuencias de nucleótidos que se seleccionan del grupo que consiste en:

a) SEQ ID NO: 579 y 600, respectivamente;
 b) SEQ ID NO: 580 y 601, respectivamente;
 25 c) SEQ ID NO: 590 y 611, respectivamente;
 d) SEQ ID NO: 597 y 618, respectivamente; y,
 e) SEQ ID NO: 586 y 607, respectivamente,

en donde el oligonucleótido comprende un ligando de direccionamiento conjugado con al menos un nucleótido.

30 En algunas modalidades, el ligando de direccionamiento comprende un carbohidrato, amino azúcar, colesterol, péptido, polipéptido, proteína o parte de una proteína (por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo), o lípido. En determinadas modalidades, el ligando de direccionamiento es un carbohidrato que comprende al menos un resto GalNAc.

En algunas modalidades, 1 o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5 o 6) nucleótidos de un

35 oligonucleótido que se proporcionan en la presente descripción (por ejemplo, un oligonucleótido de ARNi) se conjugan cada uno con un ligando de direccionamiento separado (por ejemplo, un resto GalNAc). En algunas modalidades, de 2 a 4 nucleótidos de un oligonucleótido se conjugan cada uno con un ligando de direccionamiento diferente. En algunas modalidades, los ligandos de direccionamiento se conjugan con 2 a 4 nucleótidos en

40 cualquiera de los extremos de la hebra sentido o antisentido (por ejemplo, los ligandos de

direccionamiento se conjugan con un saliente o extensión de 2 a 4 nucleótidos en el extremo terminal 5' o 3' de la hebra sentido o antisentido) de manera que los ligandos de direccionamiento se asemejan a las cerdas de un cepillo de dientes y el oligonucleótido se parece a un cepillo de dientes. Por ejemplo, un oligonucleótido puede comprender un tallo-lazo en el extremo terminal 5' o 3' de la hebra sentido y 1, 2, 3 o 4 nucleótidos del lazo del tallo pueden conjugarse individualmente con un ligando de direccionamiento. En algunas modalidades, un oligonucleótido que se proporciona por la descripción (por ejemplo, un oligonucleótido de ARNi) comprende un tallo-lazo en el extremo 3' terminal de la hebra sentido, en donde el lazo del tallo-lazo comprende un trilazo o un tetralazo, y en donde los 3 o 4 nucleótidos que comprenden el trilazo o tetralazo, respectivamente, se conjugan individualmente a un ligando de direccionamiento. En algunas modalidades, un oligonucleótido que se proporciona por la descripción (por ejemplo, un oligonucleótido de ARNi) comprende un tallo-lazo en el extremo terminal 3' de la hebra sentido, en donde el lazo del tallo-lazo comprende un tetralazo, y en donde 3 nucleótidos del tetralazo se conjugan individualmente con un ligando de direccionamiento.

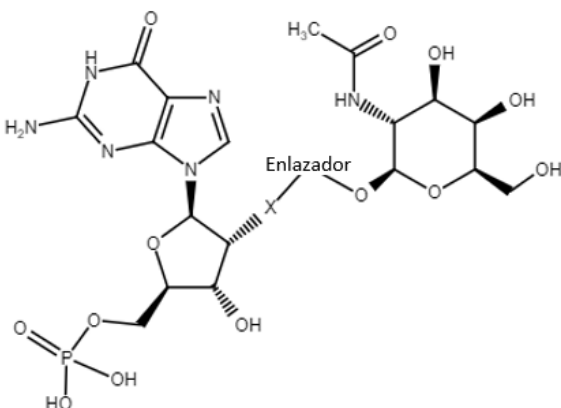
GalNAc es un ligando de carbohidrato de alta afinidad por el receptor de asialoglicoproteína (ASGPR), que se expresa principalmente en la superficie de los hepatocitos y tiene un papel importante en la unión, internalización y eliminación subsecuente de glicoproteínas circulantes que contienen residuos terminales de galactosa o GalNAc (asialoglicoproteínas). La conjugación (directa o indirecta) de restos GalNAc con los oligonucleótidos en la presente descripción puede usarse para dirigir estos oligonucleótidos al ASGPR expresado en las células. En algunas modalidades, un oligonucleótido en la presente descripción (por ejemplo, un oligonucleótido de ARNi) se conjuga con al menos uno o más restos GalNAc, en donde los restos GalNAc dirigen el oligonucleótido a un ASGPR expresado en células hepáticas humanas (por ejemplo, hepatocitos humanos). En algunas modalidades, el resto GalNAc dirige el oligonucleótido al hígado.

En algunas modalidades, un oligonucleótido en la presente descripción (por ejemplo, un oligonucleótido de ARNi) se conjuga directa o indirectamente con un resto de GalNAc monovalente. En algunas modalidades, el oligonucleótido se conjuga directa o indirectamente con más de un GalNAc monovalente (es decir, se conjuga con 2, 3 o 4 restos GalNAc monovalentes y típicamente se conjuga con 3 o 4 restos GalNAc monovalentes). En algunas modalidades, un oligonucleótido se conjuga con uno o más restos de GalNAc bivalentes, GalNAc trivalentes o GalNAc tetravalentes. En algunas modalidades, un resto de GalNAc bivalente, trivalente o tetravalente se conjuga a un oligonucleótido mediante un enlazador ramificado. En algunas modalidades, un resto de GalNAc monovalente se conjuga a un primer nucleótido y un resto de GalNAc bivalente, trivalente o tetravalente se conjuga a un segundo nucleótido mediante un enlazador ramificado.

En algunas modalidades, uno (1) o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5 o 6) nucleótidos de un oligonucleótido descrito en la presente descripción (por ejemplo, un oligonucleótido de ARNi) se conjugan cada uno con un resto de GalNAc. En algunas modalidades, cada uno de

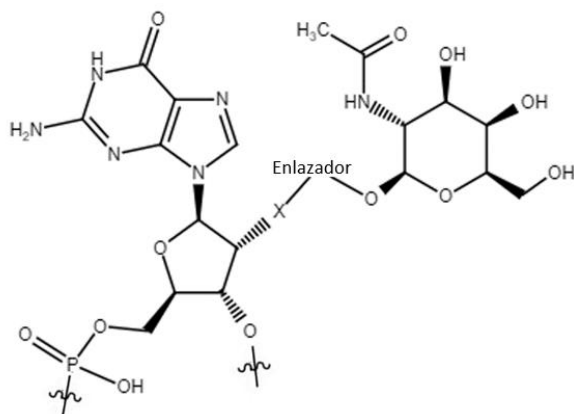
dos (2) a cuatro (4) nucleótidos de un tetralazo se conjuga con un resto de GalNAc separado. En algunas modalidades, cada uno de uno (1) a tres (3) nucleótidos de un trilazo se conjuga con un resto GalNAc separado. En algunas modalidades, los ligandos de direccionamiento se conjugan con dos (2) a cuatro (4) nucleótidos en cualquiera de los extremos de la hebra sentido o antisentido (por ejemplo, los ligandos se conjugan con un saliente o extensión de dos (2) a cuatro (4) nucleótidos en el extremo terminal 5' o 3' de la hebra sentido o antisentido) de manera que los restos GalNAc se asemejan a las cerdas de un cepillo de dientes y el oligonucleótido se asemeja a un cepillo de dientes. En algunas modalidades, los restos GalNAc se conjugan con un nucleótido de la hebra sentido. Por ejemplo, tres (3) o cuatro (4) restos de GalNAc se pueden conjugar con nucleótidos en el tetralazo de la hebra sentido donde cada resto de GalNAc se conjuga con un (1) nucleótido.

En algunas modalidades, un oligonucleótido que se describe en la presente descripción (por ejemplo, un oligonucleótido de ARNi) comprende un tetralazo, en donde el tetralazo (tetraLp) es cualquier combinación de nucleótidos de adenina (A) y guanina (G). En algunas modalidades, el tetralazo (tetraLp) comprende un resto de GalNAc monovalente unido a uno o más nucleótidos de guanina (G) del tetralazo mediante cualquier enlazador que se describe en la presente descripción, como se muestra más abajo en la sustancia química. 2 (X = heteroátomo):



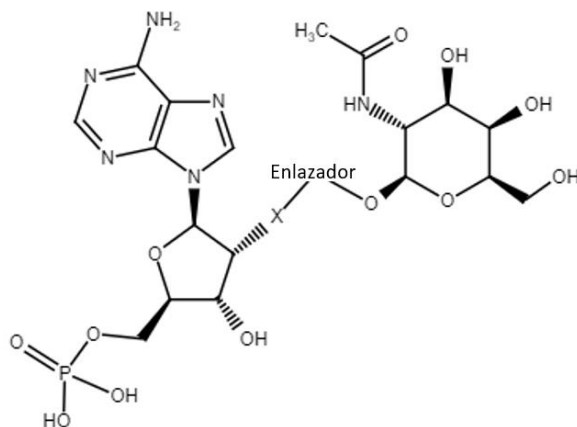
(Sustancia química 2)

Se entiende que cuando se comprende en un oligonucleótido, la sustancia química 2 puede unirse covalentemente a nucleótidos vecinos. En algunas modalidades, el tetralazo (tetraLp) comprende un resto de GalNAc monovalente unido a uno o más nucleótidos de guanina (G) del tetralazo *mediante* cualquier enlazador que se describe en la presente descripción, como se muestra más abajo en la sustancia química 2a (X=heteroátomo):



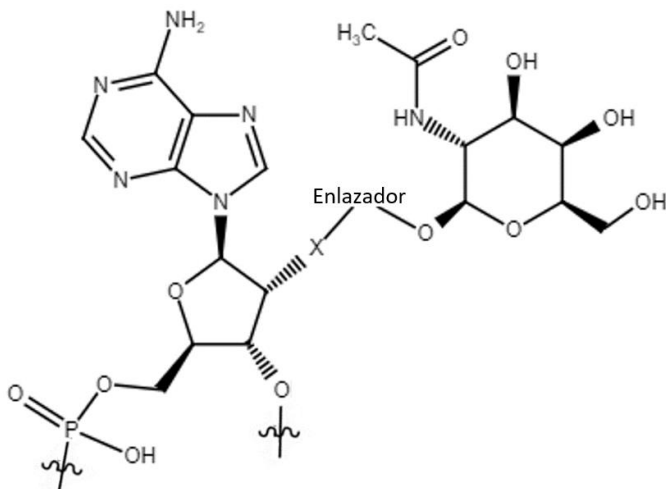
(Sustancia química 2a)

En algunas modalidades, el tetralazo (tetraLp) tiene un GalNAc monovalente unido a uno o más nucleótidos de adenina (A) del tetralazo mediante cualquier enlazador que se describe en la presente descripción, como se muestra más abajo en la sustancia química. 3 (X = heteroátomo):



(Sustancia química 3)

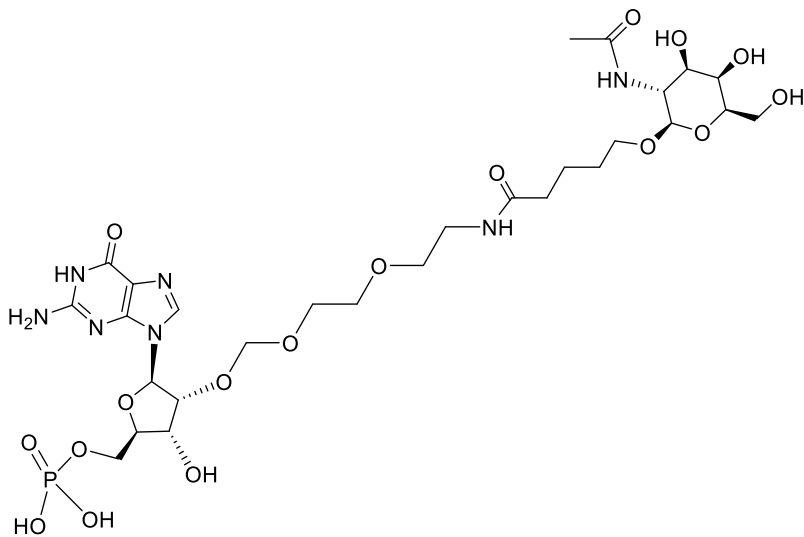
Se entiende que cuando se comprende en un oligonucleótido, la sustancia química 3 puede unirse covalentemente a nucleótidos vecinos. En algunas modalidades, el tetralazo (tetraLp) tiene un GalNAc monovalente unido a uno o más nucleótidos de adenina (A) del tetralazo mediante cualquier enlazador que se describe en la presente descripción, como se muestra más abajo en la sustancia química 3a (X=heteroátomo):



(Sustancia química 3a)

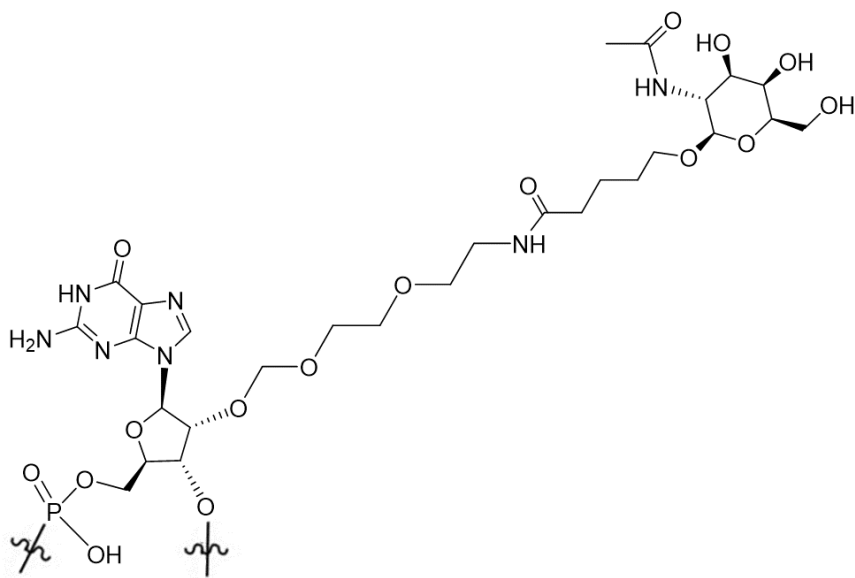
En algunas modalidades, un oligonucleótido en la presente descripción (por ejemplo, un oligonucleótido de ARNi) comprende un resto de GalNAc monovalente unido a un

nucleótido de guanina (G) denominado [ademG-GalNAc] o 2'-aminodietoximetanol-guanina-GalNAc, como se muestra más abajo (Sustancia química 4):



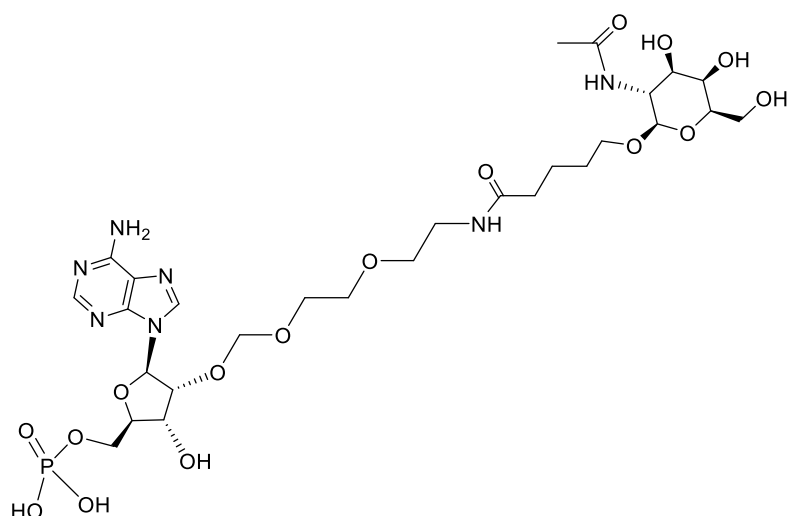
(Sustancia química 4)

- 5 Se entiende que cuando se comprende en un oligonucleótido, la sustancia química 4 puede unirse a nucleótidos vecinos tales como, por ejemplo, se muestra en la sustancia química 4a más abajo:



(Sustancia química 4a)

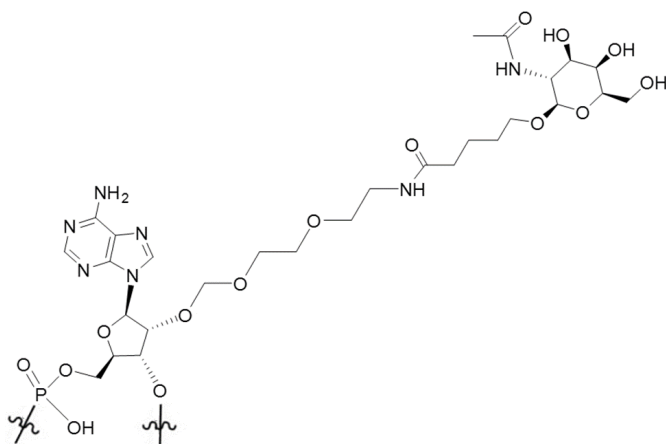
- 10 En algunas modalidades, un oligonucleótido en la presente descripción comprende un resto de GalNAc monovalente unido a un nucleótido de adenina, denominado [ademA-GalNAc] o 2'-aminodietoximetanol-adenina-GalNAc, como se muestra más abajo (Sustancia química 5):



(Sustancia química 5)

Se entiende que cuando se comprende en un oligonucleótido, la sustancia química 5 puede unirse a nucleótidos vecinos tales como, por ejemplo, se muestra en la sustancia química 5a

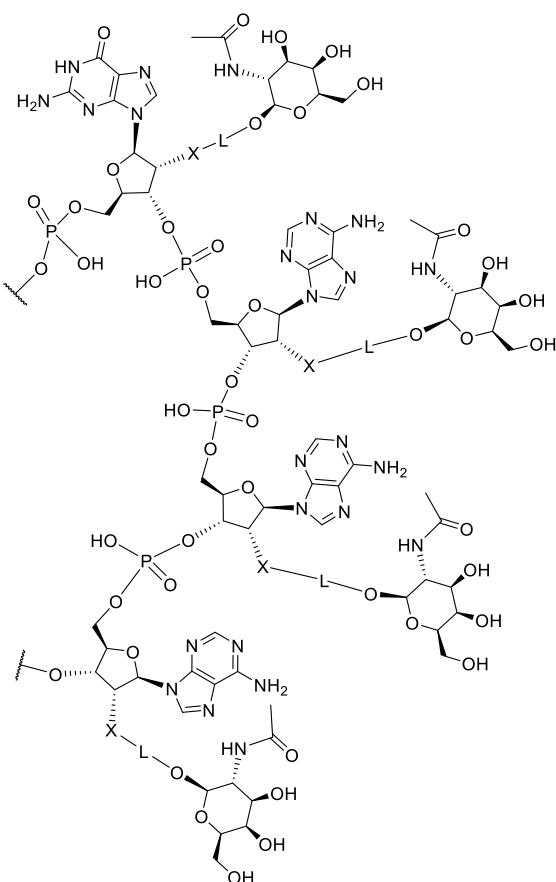
5 más abajo:



(Sustancia química 5a)

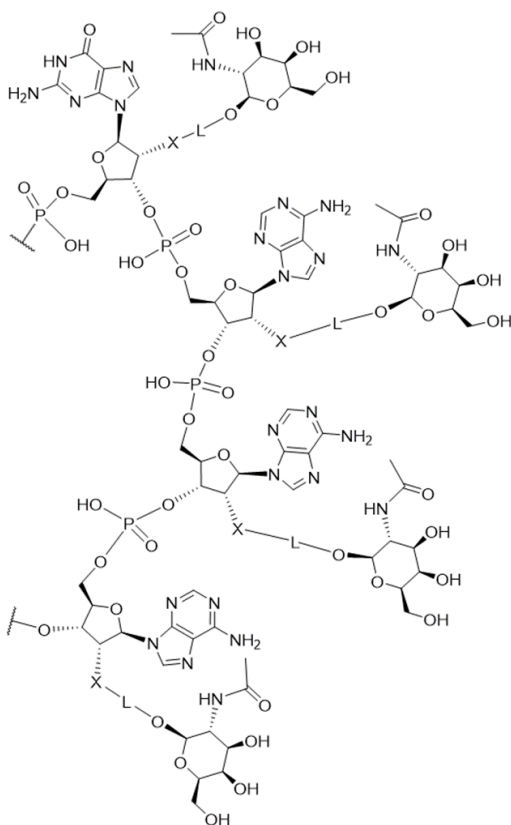
Más abajo se muestra un ejemplo de dicha conjugación (Sustancia química 6) para un lazo que comprende de 5' a 3' la secuencia de nucleótidos GAAA (L = enlazador, X = heteroátomo). Dicho lazo puede estar presente, por ejemplo, en las posiciones 27-30 de una hebra sentido que se proporciona en la presente descripción. En la fórmula química,  se usa para describir un punto de unión a la hebra de oligonucleótidos (Sustancia química 6).

10



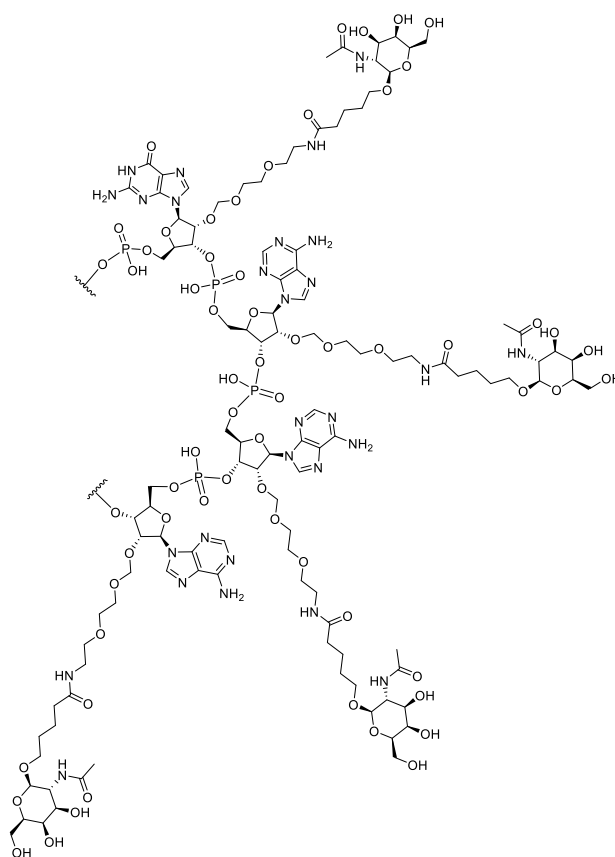
(Sustancia química 6)

Más abajo se muestra un ejemplo de dicha conjugación (Sustancia química 6a) para un lazo que comprende de 5' a 3' la secuencia de nucleótidos GAAA (L = enlazador, X =
 5 heteroátomo). Dicho lazo puede estar presente, por ejemplo, en las posiciones 27-30 de una hebra sentido que se proporciona en la presente descripción. En la fórmula química,  se usa para describir un punto de unión a la hebra de oligonucleótidos.

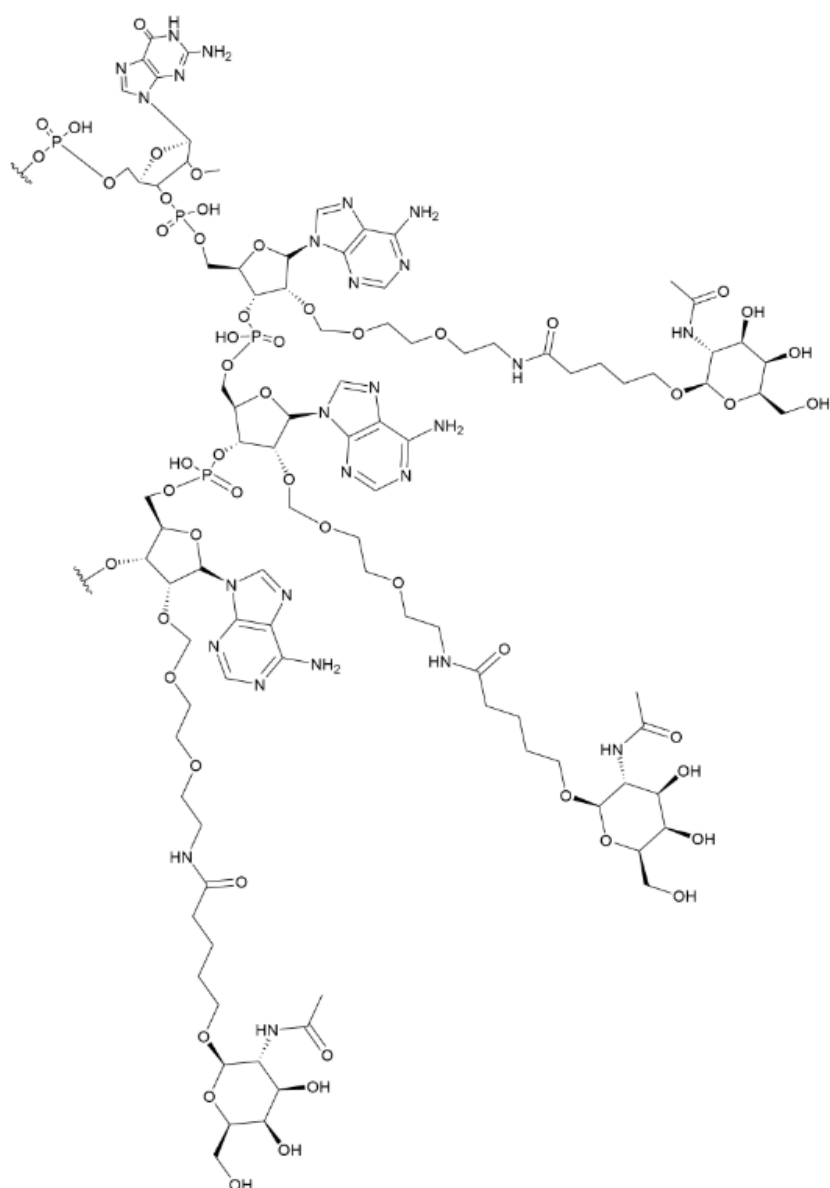


(Sustancia química 6a)

Se puede usar los métodos o la química apropiados (por ejemplo, química clic) para unir un ligando de direccionamiento a un nucleótido. En algunas modalidades, un ligando de direccionamiento se conjuga con un nucleótido que comprende un oligonucleótido en la presente descripción (por ejemplo, un oligonucleótido de ARNi) mediante el uso de un enlace clic. En algunas modalidades, se usa un enlazador basado en acetal para conjugar un ligando de direccionamiento a un nucleótido de cualquiera de los oligonucleótidos que se describen en la presente descripción. Los enlazadores basados en acetal se describen, por ejemplo, en la publicación de solicitud de patente internacional núm. WO2016/100401. En algunas modalidades, el enlazador es un enlazador lábil. Sin embargo, en otras modalidades, el enlazador es estable. Más abajo se muestra un ejemplo de un lazo que comprende de 5' a 3' los nucleótidos GAAA, en el que los restos de GalNAc se unen a los nucleótidos del lazo mediante el uso de un enlazador de acetal (Sustancia química 7 y 8). Dicho lazo puede estar presente, por ejemplo, en las posiciones 27-30 de cualquiera de las hebras sentido. En la fórmula química,  es un punto de unión a la hebra del oligonucleótido (Sustancia química 7 y 8).

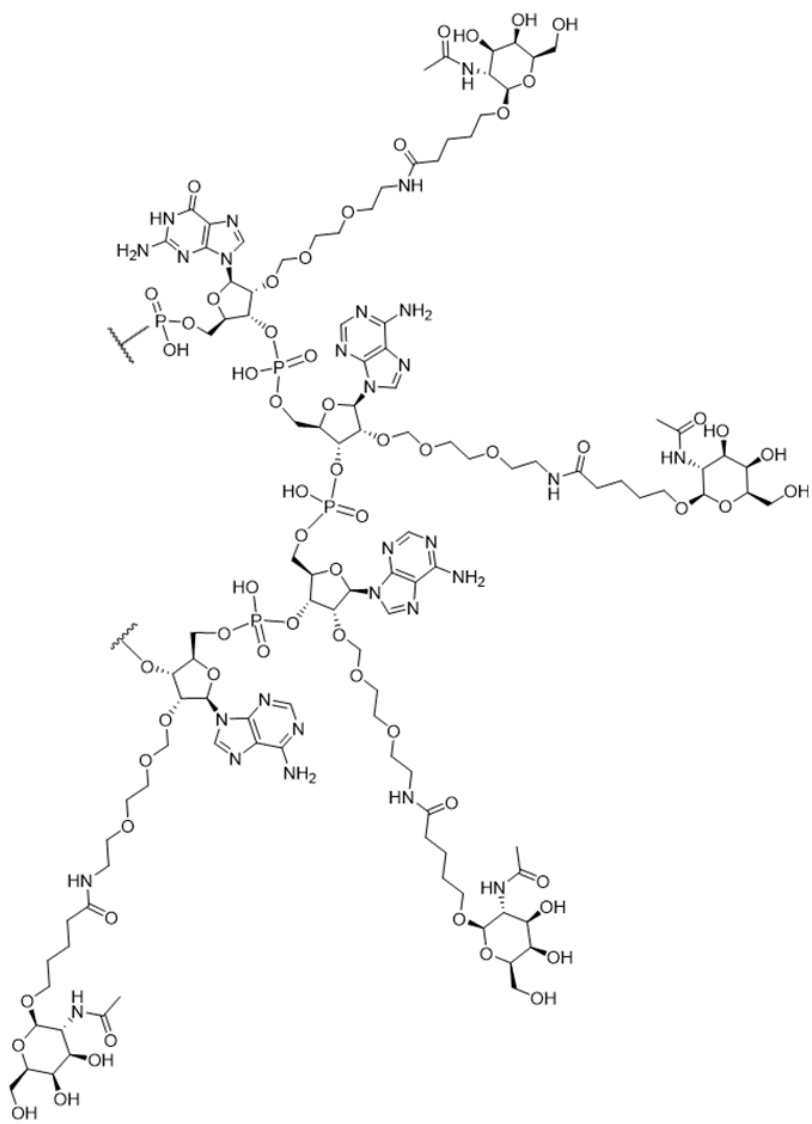


(Sustancia química 7), o

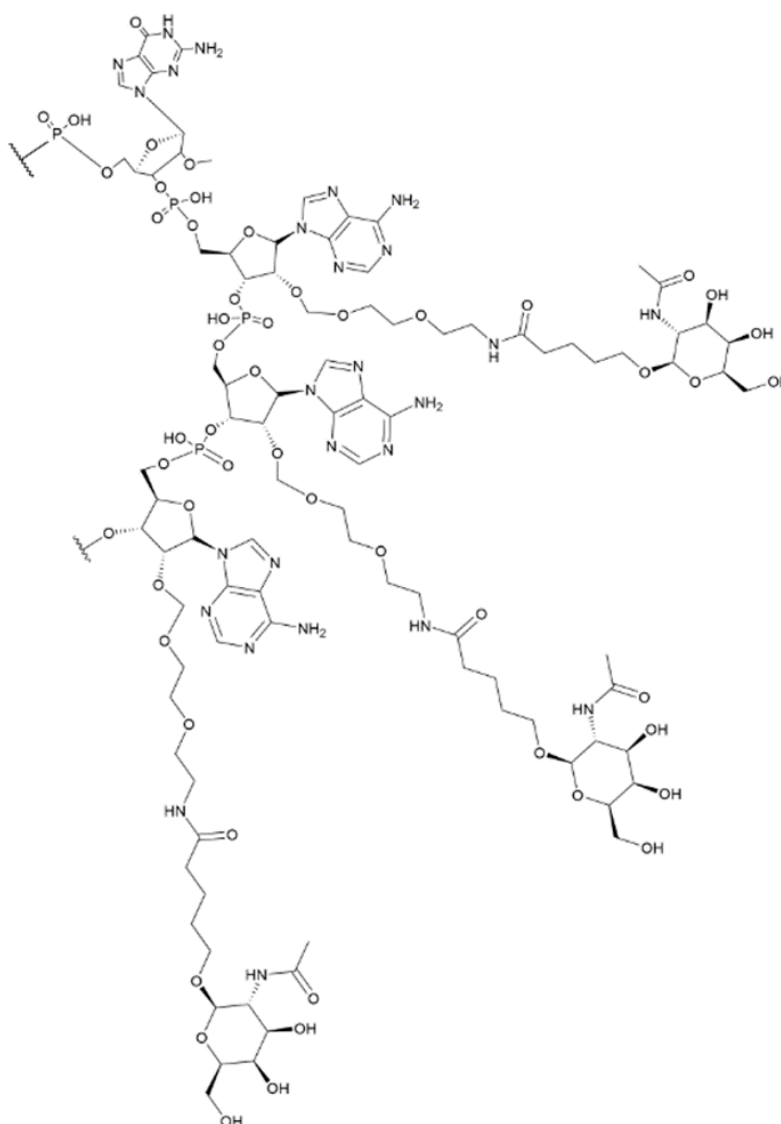


(Sustancia química 8)

Más abajo se muestra un ejemplo de un lazo que comprende de 5' a 3' los nucleótidos GAAA, en el que los restos de GalNAc se unen a los nucleótidos del lazo mediante el uso de un
 5 enzalador de acetal (Sustancia química 7a y 8a). Dicho lazo puede estar presente, por ejemplo, en las posiciones 27-30 de cualquiera de las hebras sentido. En la fórmula química,
 es un punto de unión a la hebra del oligonucleótido (Sustancia química 7a y 8a):



(Sustancia química 7a), o



(Sustancia química 8a)

Como se mencionó, se pueden usar varios métodos o técnicas de síntesis química apropiados (por ejemplo, química clic) para unir un ligando de direccionamiento a un nucleótido. En algunas modalidades, un ligando de direccionamiento se conjuga con un nucleótido mediante el uso de un enlace de clic. En algunas modalidades, se usa un enlazador basado en acetal para conjugar un ligando de direccionamiento a un nucleótido de cualquiera de los oligonucleótidos que se describen en la presente descripción. Los enlazadores basados en acetal se describen, por ejemplo, en publicación de solicitud de patente internacional núm. WO 2016/100401. En algunas modalidades, el enlazador es un enlazador lábil. Sin embargo, en otras modalidades, el enlazador es un enlazador estable.

En algunas modalidades, los oligonucleótidos en la presente descripción (por ejemplo, oligonucleótidos de ARNi) no tienen un GalNAc conjugado con ellos.

En algunas modalidades, las hebras sentido y antisentido de un oligonucleótido comprenden secuencias de nucleótidos que se seleccionan del grupo que consiste en:

- SEQ ID NO: 579 y 600, respectivamente;
- SEQ ID NO: 580 y 601, respectivamente;
- SEQ ID NO: 595 y 616, respectivamente;
- SEQ ID NO: 590 y 611, respectivamente;
- SEQ ID NO: 596 y 617, respectivamente;

- f) SEQ ID NO: 597 y 618, respectivamente;
g) SEQ ID NO: 585 y 606, respectivamente;
h) SEQ ID NO: 586 y 607, respectivamente; y,
i) SEQ ID NO: 587 y 608, respectivamente,
- 5 en donde el oligonucleótido comprende al menos un resto de GalNAc conjugado con un nucleótido.
- En algunas modalidades, las hebras sentido y antisentido de un oligonucleótido comprenden secuencias de nucleótidos que se seleccionan del grupo que consiste en:
- a) SEQ ID NO: 579 y 600, respectivamente;
10 b) SEQ ID NO: 580 y 601, respectivamente;
c) SEQ ID NO: 590 y 611, respectivamente;
d) SEQ ID NO: 597 y 618, respectivamente; y,
e) SEQ ID NO: 586 y 607, respectivamente,
- en donde el oligonucleótido comprende al menos un resto de GalNAc conjugado con un
15 nucleótido.
- Oligonucleótidos ilustrativos para reducir la expresión de *TMPRSS6*
- En algunas modalidades, el oligonucleótido dirigido a *TMPRSS6* (por ejemplo, un oligonucleótido de ARNi) para reducir la expresión de *TMPRSS6* que se proporciona por la descripción comprende una hebra sentido y una hebra antisentido, en donde todos los
20 nucleótidos que comprenden la hebra sentido y la hebra antisentido se modifican, en donde la hebra antisentido comprende una región de complementariedad con una secuencia diana de ARNm de *TMPRSS6* de cualquiera de las SEQ ID NO: 661-852 y en donde la región de complementariedad es de al menos 15 nucleótidos contiguos de longitud. En algunas modalidades, el nucleótido del extremo 5' terminal de la hebra antisentido comprende 4'-O-monometilfosfonatf-2'-O-metiluridina [MeFosfonato-4O-mU], como se describe en la
25 presente descripción. En algunas modalidades, el nucleótido del extremo 5' terminal de la hebra antisentido comprende un enlace fosforotioato. En algunas modalidades, la hebra antisentido y la hebra sentido comprenden uno o más nucleótidos modificados con 2'-flúor (2'-F) y 2'-O-metilo (2'-OMe) y al menos un enlace fosforotioato. En algunas modalidades,
30 la hebra antisentido comprende cuatro (4) enlaces fosforotioato y la hebra sentido comprende un (1) enlace fosforotioato. En algunas modalidades, la hebra antisentido comprende cinco (5) enlaces fosforotioato y la hebra sentido comprende un (1) enlace fosforotioato.
- En algunas modalidades, un oligonucleótido que se proporciona en la presente descripción (por ejemplo, un oligonucleótido de ARNi) comprende una hebra sentido que tiene una
35 secuencia de cualquiera de las SEQ ID NO: 193-384 y una hebra antisentido que comprende una secuencia complementaria que se selecciona de las SEQ ID NO: 385-576.
- En algunas modalidades, un oligonucleótido que se proporciona en la presente descripción (por ejemplo, un oligonucleótido de ARNi) comprende una hebra sentido que tiene una secuencia de cualquiera de las SEQ ID NO: 577-597 y una hebra antisentido que comprende
40 una secuencia complementaria que se selecciona de las SEQ ID NO: 598-618.

En algunas modalidades, un oligonucleótido que se proporciona en la presente descripción (por ejemplo, un oligonucleótido de ARNi) comprende una hebra sentido que tiene una secuencia de cualquiera de las SEQ ID NO: 619-639 y una hebra antisentido que comprende una secuencia complementaria que se selecciona de las SEQ ID NO: 640-660.

- 5 En algunas modalidades, un oligonucleótido que se proporciona en la presente descripción (por ejemplo, un oligonucleótido de ARNi) para reducir la expresión de *TMPRSS6* comprende:

una hebra sentido de 36 nucleótidos que comprende un nucleótido modificado con 2'-F en las posiciones 8-11, un nucleótido modificado con 2'-OMe en las posiciones 1-7, 12-27 y 31-36, un nucleótido conjugado con GalNAc en las posiciones 28, 29 y 30; y un enlace fosforotioato entre las posiciones 1 y 2;

- 10 una hebra antisentido de 22 nucleótidos que comprende un nucleótido modificado con 2'-F en las posiciones 2, 3, 4, 5, 7, 10 y 14, un 2'-OMe en las posiciones 1, 6, 8, 9, 11-13 y 15-22, un enlace fosforotioato entre las posiciones 1 y 2, las posiciones 2 y 3, las posiciones 3 y 4, las posiciones 20 y 21 y las posiciones 21 y 22, y un nucleótido del extremo 5' terminal en la posición 1 que comprende un análogo de fosfato 4', opcionalmente en donde el nucleótido del extremo 5' terminal comprende 4'-O-monometilfosfonato-2'-O-metiluridina [MeFosfonato-4O-mU]; en donde las posiciones 1-20 de la hebra antisentido forman una región híbrida con las posiciones 1-20 de la hebra sentido, en donde las posiciones 21-36 de la hebra sentido forman un tallo-lazo, en donde las posiciones 27-30 forman el lazo del tallo-lazo, opcionalmente en donde las posiciones 27-30 comprenden un tetralazo, en donde las posiciones 21 y 22 de la hebra antisentido comprenden un saliente, y en donde las hebras sentido y antisentido comprenden secuencias de nucleótidos seleccionadas del grupo que consiste en:

- 25 a) SEQ ID NO: 579 y 600, respectivamente;
b) SEQ ID NO: 580 y 601, respectivamente;
c) SEQ ID NO: 595 y 616, respectivamente;
d) SEQ ID NO: 590 y 611, respectivamente;
e) SEQ ID NO: 596 y 617, respectivamente;
30 f) SEQ ID NO: 597 y 618, respectivamente;
g) SEQ ID NO: 585 y 606, respectivamente;
h) SEQ ID NO: 586 y 607, respectivamente; y,
i) SEQ ID NO: 587 y 608, respectivamente.

- 35 En algunas modalidades, el oligonucleótido dirigido a *TMPRSS6* (por ejemplo, un oligonucleótido de ARNi) para reducir la expresión de *TMPRSS6* comprende:

una hebra sentido de 36 nucleótidos que comprende un nucleótido modificado con 2'-F en las posiciones 8-11, un nucleótido modificado con 2'-OMe en las posiciones 1-7, 12-27 y 31-36, un nucleótido conjugado con GalNAc en las posiciones 28, 29 y 30; y un enlace fosforotioato entre las posiciones 1 y 2;

una hebra antisentido de 22 nucleótidos que comprende un nucleótido modificado con 2'-F en las posiciones 2, 3, 4, 5, 7, 10 y 14, un 2'-OMe en las posiciones 1, 6, 8, 9, 11-13 y 15-22, un enlace fosforotioato entre las posiciones 1 y 2, las posiciones 2 y 3, las posiciones 3 y 4, las posiciones 20 y 21 y las posiciones 21 y 22, y un nucleótido del extremo 5' terminal en la posición 1 que comprende un análogo de fosfato 4', opcionalmente en donde el nucleótido del extremo 5' terminal comprende 4'-O-monometilfosfonato-2'-O-metiluridina [MeFosfonato-4O-mU]; en donde las posiciones 1-20 de la hebra antisentido forman una región híbrida con las posiciones 1-20 de la hebra sentido, en donde las posiciones 21-36 de la hebra sentido forman un tallo-lazo, en donde las posiciones 27-30 forman el lazo del tallo-lazo, opcionalmente en donde las posiciones 27-30 comprenden un tetralazo, en donde las posiciones 21 y 22 de la hebra antisentido comprenden un saliente, y en donde las hebras sentido y antisentido comprenden secuencias de nucleótidos seleccionadas del grupo que consiste en:

- a) SEQ ID NO: 579 y 600, respectivamente;
- b) SEQ ID NO: 580 y 601, respectivamente;
- c) SEQ ID NO: 590 y 611, respectivamente;
- d) SEQ ID NO: 597 y 618, respectivamente; y,
- e) SEQ ID NO: 586 y 607, respectivamente.

En algunas modalidades, un oligonucleótido dirigido a *TMPRSS6* para reducir la expresión de *TMPRSS6* que se proporciona por la descripción comprende una hebra sentido que comprende la secuencia de nucleótidos como se establece en la SEQ ID NO: 579 y una hebra antisentido que comprende la secuencia de nucleótidos como se establece en la SEQ ID NO: 600. En algunas modalidades, un oligonucleótido dirigido a *TMPRSS6* para reducir la expresión de *TMPRSS6* que se proporciona por la descripción comprende una hebra sentido que comprende la secuencia de nucleótidos como se establece en la SEQ ID NO: 580 y una hebra antisentido que comprende la secuencia de nucleótidos como se establece en la SEQ ID NO: 601. En algunas modalidades, un oligonucleótido dirigido a *TMPRSS6* para reducir la expresión de *TMPRSS6* que se proporciona por la descripción comprende una hebra sentido que comprende la secuencia de nucleótidos como se establece en la SEQ ID NO: 590 y una hebra antisentido que comprende la secuencia de nucleótidos como se establece en la SEQ ID NO: 611. En algunas modalidades, un oligonucleótido dirigido a *TMPRSS6* para reducir la expresión de *TMPRSS6* que se proporciona por la descripción comprende una hebra sentido que comprende la secuencia de nucleótidos como se establece en la SEQ ID NO: 597 y una hebra antisentido que comprende la secuencia de nucleótidos como se establece en la SEQ ID NO: 618. En algunas modalidades, un oligonucleótido dirigido a *TMPRSS6* para reducir la expresión de *TMPRSS6* que se proporciona por la descripción comprende una hebra sentido que comprende la secuencia de nucleótidos como se establece en la SEQ ID NO: 586 y una hebra antisentido que comprende la secuencia de nucleótidos como se establece en la SEQ ID NO: 607.

En algunas modalidades, un oligonucleótido dirigido a *TMPRSS6* (por ejemplo, un oligonucleótido de ARNi) para reducir la expresión de *TMPRSS6* comprende (i) una hebra antisentido de 19-30 nucleótidos de longitud, en donde la hebra antisentido comprende una secuencia de nucleótidos que comprende una región de complementariedad con una

5 secuencia diana de ARNm de *TMPRSS6*, en donde la región de complementariedad se establece en la SEQ ID NO: 184; y (ii) una hebra sentido de 19-50 nucleótidos de longitud que comprende una región de complementariedad con la hebra antisentido, en donde las hebras antisentido y sentido son hebras separadas que forman una región híbrida asimétrica que tiene un saliente de 1-4 nucleótidos en el extremo 3' terminal de la hebra antisentido.

10 En algunas modalidades, un oligonucleótido dirigido a *TMPRSS6* (por ejemplo, un oligonucleótido de ARNi) para reducir la expresión de *TMPRSS6* comprende (i) una hebra antisentido de 19-30 nucleótidos de longitud, en donde la hebra antisentido comprende una secuencia de nucleótidos que comprende una región de complementariedad con una

15 secuencia diana de ARNm de *TMPRSS6*, en donde la región de complementariedad se establece en la SEQ ID NO: 181; y (ii) una hebra sentido de 19-50 nucleótidos de longitud que comprende una región de complementariedad con la hebra antisentido, en donde las hebras antisentido y sentido son hebras separadas que forman una región híbrida asimétrica que tiene un saliente de 1-4 nucleótidos en el extremo 3' terminal de la hebra antisentido.

En algunas modalidades, un oligonucleótido dirigido a *TMPRSS6* (por ejemplo, un

20 oligonucleótido de ARNi) para reducir la expresión de *TMPRSS6* comprende (i) una hebra antisentido de 19-30 nucleótidos de longitud, en donde la hebra antisentido comprende una secuencia de nucleótidos que comprende una región de complementariedad con una secuencia diana de ARNm de *TMPRSS6*, en donde la región de complementariedad se establece en la SEQ ID NO: 158; y (ii) una hebra sentido de 19-50 nucleótidos de longitud

25 que comprende una región de complementariedad con la hebra antisentido, en donde las hebras antisentido y sentido son hebras separadas que forman una región híbrida asimétrica que tiene un saliente de 1-4 nucleótidos en el extremo 3' terminal de la hebra antisentido.

En algunas modalidades, un oligonucleótido dirigido a *TMPRSS6* (por ejemplo, un oligonucleótido de ARNi) para reducir la expresión de *TMPRSS6* comprende (i) una hebra

30 antisentido de 19-30 nucleótidos de longitud, en donde la hebra antisentido comprende una secuencia de nucleótidos que comprende una región de complementariedad con una secuencia diana de ARNm de *TMPRSS6*, en donde la región de complementariedad se establece en la SEQ ID NO: 134; y (ii) una hebra sentido de 19-50 nucleótidos de longitud que comprende una región de complementariedad con la hebra antisentido, en donde las

35 hebras antisentido y sentido son hebras separadas que forman una región híbrida asimétrica que tiene un saliente de 1-4 nucleótidos en el extremo 3' terminal de la hebra antisentido.

En algunas modalidades, un oligonucleótido dirigido a *TMPRSS6* (por ejemplo, un oligonucleótido de ARNi) para reducir la expresión de *TMPRSS6* comprende (i) una hebra antisentido de 19-30 nucleótidos de longitud, en donde la hebra antisentido comprende una

40 secuencia de nucleótidos que comprende una región de complementariedad con una

secuencia diana de ARNm de *TMPRSS6*, en donde la región de complementariedad se establece en la SEQ ID NO: 102; y (ii) una hebra sentido de 19-50 nucleótidos de longitud que comprende una región de complementariedad con la hebra antisentido, en donde las hebras antisentido y sentido son hebras separadas que forman una región híbrida asimétrica que tiene un saliente de 1-4 nucleótidos en el extremo terminal 3' de la hebra antisentido.

En algunas modalidades, un oligonucleótido dirigido a *TMPRSS6* (por ejemplo, un oligonucleótido de ARNi) para reducir la expresión de *TMPRSS6* comprende (i) una hebra antisentido de 19-30 nucleótidos de longitud, en donde la hebra antisentido comprende una secuencia de nucleótidos que comprende una región de complementariedad con una secuencia diana de ARNm de *TMPRSS6*, en donde la región de complementariedad se establece en la SEQ ID NO: 184; y (ii) una hebra sentido de 19-50 nucleótidos de longitud que comprende una región de complementariedad con la hebra antisentido y un tallo-lazo en el extremo terminal 3', en donde la región de complementariedad con la hebra antisentido se establece como S1-Lp-S2, en donde S1 es complementario a S2 y en donde Lp forma un lazo entre S1 y S2 de 3 a 5 nucleótidos de longitud, en donde las hebras antisentido y sentido son hebras separadas que forman una región híbrida asimétrica que tiene un saliente de 1-4 nucleótidos en el extremo terminal 3' de la hebra antisentido.

En algunas modalidades, un oligonucleótido dirigido a *TMPRSS6* (por ejemplo, un oligonucleótido de ARNi) para reducir la expresión de *TMPRSS6* comprende (i) una hebra antisentido de 19-30 nucleótidos de longitud, en donde la hebra antisentido comprende una secuencia de nucleótidos que comprende una región de complementariedad con una secuencia diana de ARNm de *TMPRSS6*, en donde la región de complementariedad se establece en la SEQ ID NO: 181; y (ii) una hebra sentido de 19-50 nucleótidos de longitud que comprende una región de complementariedad con la hebra antisentido y un tallo-lazo en el extremo terminal 3', en donde la región de complementariedad con la hebra antisentido se establece como S1-Lp-S2, en donde S1 es complementario a S2 y en donde Lp forma un lazo entre S1 y S2 de 3 a 5 nucleótidos de longitud, en donde las hebras antisentido y sentido son hebras separadas que forman una región híbrida asimétrica que tiene un saliente de 1-4 nucleótidos en el extremo terminal 3' de la hebra antisentido.

En algunas modalidades, un oligonucleótido dirigido a *TMPRSS6* (por ejemplo, un oligonucleótido de ARNi) para reducir la expresión de *TMPRSS6* comprende (i) una hebra antisentido de 19-30 nucleótidos de longitud, en donde la hebra antisentido comprende una secuencia de nucleótidos que comprende una región de complementariedad con una secuencia diana de ARNm de *TMPRSS6*, en donde la región de complementariedad se establece en la SEQ ID NO: 158; y (ii) una hebra sentido de 19-50 nucleótidos de longitud que comprende una región de complementariedad con la hebra antisentido y un tallo-lazo en el extremo terminal 3', en donde la región de complementariedad con la hebra antisentido se establece como S1-Lp-S2, en donde S1 es complementario a S2 y en donde Lp forma un lazo entre S1 y S2 de 3 a 5 nucleótidos de longitud, en donde las hebras antisentido y sentido son

hebras separadas que forman una región híbrida asimétrica que tiene un saliente de 1-4 nucleótidos en el extremo terminal 3' de la hebra antisentido.

En algunas modalidades, un oligonucleótido dirigido a TMPRSS6 (por ejemplo, un oligonucleótido de ARNi) para reducir la expresión de TMPRSS6 comprende (i) una hebra antisentido de 19-30 nucleótidos de longitud, en donde la hebra antisentido comprende una secuencia de nucleótidos que comprende una región de complementariedad con una secuencia diana de ARNm de TMPRSS6, en donde la región de complementariedad se establece en la SEQ ID NO: 134; y (ii) una hebra sentido de 19-50 nucleótidos de longitud que comprende una región de complementariedad con la hebra antisentido y un tallo-lazo en el extremo terminal 3', en donde la región de complementariedad con la hebra antisentido se establece como S1-Lp-S2, en donde S1 es complementario a S2 y en donde Lp forma un lazo entre S1 y S2 de 3 a 5 nucleótidos de longitud, en donde las hebras antisentido y sentido son hebras separadas que forman una región híbrida asimétrica que tiene un saliente de 1-4 nucleótidos en el extremo terminal 3' de la hebra antisentido.

En algunas modalidades, un oligonucleótido dirigido a TMPRSS6 (por ejemplo, un oligonucleótido de ARNi) para reducir la expresión de TMPRSS6 comprende (i) una hebra antisentido de 19-30 nucleótidos de longitud, en donde la hebra antisentido comprende una secuencia de nucleótidos que comprende una región de complementariedad con una secuencia diana de ARNm de TMPRSS6, en donde la región de complementariedad se establece en la SEQ ID NO: 102; y (ii) una hebra sentido de 19-50 nucleótidos de longitud que comprende una región de complementariedad con la hebra antisentido y un tallo-lazo en el extremo terminal 3', en donde la región de complementariedad con la hebra antisentido se establece como S1-Lp-S2, en donde S1 es complementario a S2 y en donde Lp forma un lazo entre S1 y S2 de 3 a 5 nucleótidos de longitud, en donde las hebras antisentido y sentido son hebras separadas que forman una región híbrida asimétrica que tiene un saliente de 1-4 nucleótidos en el extremo terminal 3' de la hebra antisentido.

En algunas modalidades, un oligonucleótido dirigido a TMPRSS6 (por ejemplo, un oligonucleótido de ARNi) para reducir la expresión de TMPRSS6 comprende (i) una hebra antisentido de 19-30 nucleótidos de longitud, en donde la hebra antisentido comprende una secuencia de nucleótidos que comprende una región de complementariedad con una secuencia diana de ARNm de TMPRSS6, en donde la región de complementariedad se establece en la SEQ ID NO: 184; y (ii) una hebra sentido de 19-50 nucleótidos de longitud que comprende una región de complementariedad con la hebra antisentido, en donde la región de complementariedad con la hebra antisentido se establece en SEQ ID NO: 844, en donde las hebras antisentido y sentido son hebras separadas que forman una región híbrida asimétrica que tiene un saliente de 1-4 nucleótidos en el extremo terminal 3' de la hebra antisentido.

En algunas modalidades, un oligonucleótido dirigido a TMPRSS6 (por ejemplo, un oligonucleótido de ARNi) para reducir la expresión de TMPRSS6 comprende (i) una hebra antisentido de 19-30 nucleótidos de longitud, en donde la hebra antisentido comprende una

secuencia de nucleótidos que comprende una región de complementariedad con una secuencia diana de ARNm de TMPRSS6, en donde la región de complementariedad se establece en la SEQ ID NO: 181; y (ii) una hebra sentido de 19-50 nucleótidos de longitud que comprende una región de complementariedad con la hebra antisentido, en donde la

5 región de complementariedad con la hebra antisentido se establece en la SEQ ID NO: 841, en donde las hebras antisentido y sentido son hebras separadas que forman una región híbrida asimétrica que tiene un saliente de 1-4 nucleótidos en el extremo 3' terminal de la hebra antisentido.

En algunas modalidades, un oligonucleótido dirigido a TMPRSS6 (por ejemplo, un

10 oligonucleótido de ARNi) para reducir la expresión de TMPRSS6 comprende (i) una hebra antisentido de 19-30 nucleótidos de longitud, en donde la hebra antisentido comprende una secuencia de nucleótidos que comprende una región de complementariedad con una secuencia diana de ARNm de TMPRSS6, en donde la región de complementariedad se establece en la SEQ ID NO: 158; y (ii) una hebra sentido de 19-50 nucleótidos de longitud

15 que comprende una región de complementariedad con la hebra antisentido, en donde la región de complementariedad con la hebra antisentido se establece en la SEQ ID NO: 818, en donde las hebras antisentido y sentido son hebras separadas que forman una región híbrida asimétrica que tiene un saliente de 1-4 nucleótidos en el extremo 3' terminal de la hebra antisentido.

En algunas modalidades, un oligonucleótido dirigido a TMPRSS6 (por ejemplo, un

20 oligonucleótido de ARNi) para reducir la expresión de TMPRSS6 comprende (i) una hebra antisentido de 19-30 nucleótidos de longitud, en donde la hebra antisentido comprende una secuencia de nucleótidos que comprende una región de complementariedad con una secuencia diana de ARNm de TMPRSS6, en donde la región de complementariedad se establece en la SEQ ID NO: 134; y (ii) una hebra sentido de 19-50 nucleótidos de longitud

25 que comprende una región de complementariedad con la hebra antisentido, en donde la región de complementariedad con la hebra antisentido se establece en la SEQ ID NO: 794, en donde las hebras antisentido y sentido son hebras separadas que forman una región híbrida asimétrica que tiene un saliente de 1-4 nucleótidos en el extremo 3' terminal de la hebra antisentido.

30 En algunas modalidades, un oligonucleótido dirigido a TMPRSS6 (por ejemplo, un oligonucleótido de ARNi) para reducir la expresión de TMPRSS6 comprende (i) una hebra antisentido de 19-30 nucleótidos de longitud, en donde la hebra antisentido comprende una secuencia de nucleótidos que comprende una región de complementariedad con una

35 secuencia diana de ARNm de TMPRSS6, en donde la región de complementariedad se establece en la SEQ ID NO: 102; y (ii) una hebra sentido de 19-50 nucleótidos de longitud que comprende una región de complementariedad con la hebra antisentido, en donde la región de complementariedad con la hebra antisentido se establece en SEQ ID NO: 762, en donde las hebras antisentido y sentido son hebras separadas que forman una región híbrida

asimétrica que tiene un saliente de 1-4 nucleótidos en el extremo terminal 3' de la hebra antisentido.

En algunas modalidades, un oligonucleótido dirigido a TMPRSS6 (por ejemplo, un oligonucleótido de ARNi) para reducir la expresión de TMPRSS6 comprende (i) una hebra antisentido de 19-30 nucleótidos de longitud, en donde la hebra antisentido comprende una secuencia de nucleótidos que comprende una región de complementariedad con una secuencia diana de ARNm de TMPRSS6, en donde la región de complementariedad se establece en la SEQ ID NO: 184; y (ii) una hebra sentido de 19-50 nucleótidos de longitud que comprende una región de complementariedad con la hebra antisentido y un tallo-lazo en el extremo terminal 3', en donde la región de complementariedad con la hebra antisentido se establece en la SEQ ID NO: 844, en donde el tallo-lazo se establece como S1-Lp-S2, en donde S1 es complementario a S2 y en donde Lp forma un lazo entre S1 y S2 de 3 a 5 nucleótidos de longitud, en donde las hebras antisentido y sentido son hebras separadas que forman una región híbrida asimétrica que tiene un saliente de 1-4 nucleótidos en el extremo terminal 3' de la hebra antisentido.

En algunas modalidades, un oligonucleótido dirigido a TMPRSS6 (por ejemplo, un oligonucleótido de ARNi) para reducir la expresión de TMPRSS6 comprende (i) una hebra antisentido de 19-30 nucleótidos de longitud, en donde la hebra antisentido comprende una secuencia de nucleótidos que comprende una región de complementariedad con una secuencia diana de ARNm de TMPRSS6, en donde la región de complementariedad se establece en la SEQ ID NO: 181; y (ii) una hebra sentido de 19-50 nucleótidos de longitud que comprende una región de complementariedad con la hebra antisentido y un tallo-lazo en el extremo terminal 3', en donde la región de complementariedad con la hebra antisentido se establece en la SEQ ID NO: 841, en donde el tallo-lazo se establece como S1-Lp-S2, en donde S1 es complementario a S2 y en donde Lp forma un lazo entre S1 y S2 de 3 a 5 nucleótidos de longitud, en donde las hebras antisentido y sentido son hebras separadas que forman una región híbrida asimétrica que tiene un saliente de 1-4 nucleótidos en el extremo terminal 3' de la hebra antisentido.

En algunas modalidades, un oligonucleótido dirigido a TMPRSS6 (por ejemplo, un oligonucleótido de ARNi) para reducir la expresión de TMPRSS6 comprende (i) una hebra antisentido de 19-30 nucleótidos de longitud, en donde la hebra antisentido comprende una secuencia de nucleótidos que comprende una región de complementariedad con una secuencia diana de ARNm de TMPRSS6, en donde la región de complementariedad se establece en la SEQ ID NO: 158; y (ii) una hebra sentido de 19-50 nucleótidos de longitud que comprende una región de complementariedad con la hebra antisentido y un tallo-lazo en el extremo terminal 3', en donde la región de complementariedad con la hebra antisentido se establece en la SEQ ID NO: 818, en donde el tallo-lazo se establece como S1-Lp-S2, en donde S1 es complementario a S2 y en donde Lp forma un lazo entre S1 y S2 de 3 a 5 nucleótidos de longitud, en donde las hebras antisentido y sentido son hebras separadas que

forman una región híbrida asimétrica que tiene un saliente de 1-4 nucleótidos en el extremo terminal 3' de la hebra antisentido.

En algunas modalidades, un oligonucleótido dirigido a TMPRSS6 (por ejemplo, un oligonucleótido de ARNi) para reducir la expresión de TMPRSS6 comprende (i) una hebra antisentido de 19-30 nucleótidos de longitud, en donde la hebra antisentido comprende una secuencia de nucleótidos que comprende una región de complementariedad con una secuencia diana de ARNm de TMPRSS6, en donde la región de complementariedad se establece en la SEQ ID NO: 134; y (ii) una hebra sentido de 19-50 nucleótidos de longitud que comprende una región de complementariedad con la hebra antisentido y un tallo-lazo en el extremo terminal 3', en donde la región de complementariedad con la hebra antisentido se establece en la SEQ ID NO: 794, en donde el tallo-lazo se establece como S1-Lp-S2, en donde S1 es complementario a S2 y en donde Lp forma un lazo entre S1 y S2 de 3 a 5 nucleótidos de longitud, en donde las hebras antisentido y sentido son hebras separadas que forman una región híbrida asimétrica que tiene un saliente de 1-4 nucleótidos en el extremo terminal 3' de la hebra antisentido.

En algunas modalidades, un oligonucleótido dirigido a TMPRSS6 (por ejemplo, un oligonucleótido de ARNi) para reducir la expresión de TMPRSS6 comprende (i) una hebra antisentido de 19-30 nucleótidos de longitud, en donde la hebra antisentido comprende una secuencia de nucleótidos que comprende una región de complementariedad con una secuencia diana de ARNm de TMPRSS6, en donde la región de complementariedad se establece en la SEQ ID NO: 102; y (ii) una hebra sentido de 19-50 nucleótidos de longitud que comprende una región de complementariedad con la hebra antisentido y un tallo-lazo en el extremo terminal 3', en donde la región de complementariedad con la hebra antisentido se establece en la SEQ ID NO: 762, en donde el tallo-lazo se establece como S1-Lp-S2, en donde S1 es complementario a S2 y en donde Lp forma un lazo entre S1 y S2 de 3 a 5 nucleótidos de longitud, en donde las hebras antisentido y sentido son hebras separadas que forman una región híbrida asimétrica que tiene un saliente de 1-4 nucleótidos en el extremo terminal 3' de la hebra antisentido.

En algunas modalidades, la descripción proporciona un oligonucleótido (por ejemplo, un oligonucleótido de ARNi) para reducir la expresión de *TMPRSS6*, en donde el oligonucleótido comprende una hebra sentido y una hebra antisentido de acuerdo con:

Hebra sentido: 5'-mX-S-mX-mX-mX-mX-mX-mX-fX-fX-fX-fX-mX-mX-mX-mX-mX-mX-mX-mX-mX-mX-mX-mX-mX-mX-mX-mX-mX-mX-[ademX-GalNAc]-[ademX-GalNAc]-[ademX-GalNAc]-mX-mX-mX-mX-mX-mX-3';

35 hibridada a:

Hebra antisentido: 5'-[MeFosfonato-4O-mX]-S-fX-S-fX-S-fX-fX-mX-fX-mX-mX-fX-mX-mX-mX-fX-mX-mX-mX-mX-mX-S-mX-S-mX-3';

en donde mX= nucleótido modificado con 2'-O-metilo,

fX= nucleótido modificado con 2'-flúor,

40 -S- = enlace fosforotioato,

- = enlace fosfodiéster,

[MeFosfonato-4O-mX] = nucleótido modificado 4'-O-monometilfosfonato-2'-O-metilo, y ademX-GalNAc = GalNAc unido a un nucleótido.

En algunas modalidades, la descripción proporciona un oligonucleótido de ARNi para
5 reducir la expresión de *TMPRSS6*, el oligonucleótido comprende una hebra sentido y una
hebra antisentido, en donde la hebra sentido comprende la secuencia y todas las
modificaciones de 5' -
[mGs][mG][mU][mG][mC][mU][mA][fC][fU][fC][fU][mG][mG][mU][mA][mU][mU][m
U][mC][mA][mG][mC][mA][mG][mC][mC][mG][ademA-GalNAc][ademA-
10 GalNAc][ademA-GalNAc][mG][mG][mC][mU][mG][mC]-3' (SEQ ID NO: 621), y en
donde la hebra antisentido comprende la secuencia y todas las modificaciones de 5'
[MeFosfonato-4O-
mUs][fGs][fAs][fA][fA][mU][fA][mC][mC][fA][mG][mA][mG][fU][mA][mG][mC][mA]
[mC][mCs][mGs][mG]-3' (SEQ ID NO: 642), en donde mC, mA, mG, mU = ribonucleósidos
15 2'-OMe; fA, fC, fG, fU = ribonucleósidos 2'-F; s=fosforotioato, y en donde ademA-GalNAc
= nucleótido de adenina modificado con GalNAc.

En algunas modalidades, la descripción proporciona un oligonucleótido de ARNi para
reducir la expresión de *TMPRSS6*, el oligonucleótido comprende una hebra sentido y una
hebra antisentido, en donde la hebra sentido comprende la secuencia y todas las
20 modificaciones de 5'
[mGs][mC][mU][mA][mC][mU][mC][fU][fG][fG][fU][mA][mU][mU][mU][mC][mC][m
U][mA][mA][mG][mC][mA][mG][mC][mC][mG][ademA-GalNAc][ademA-
GalNAc][ademA-GalNAc][mG][mG][mC][mU][mG][mC]-3' (SEQ ID NO: 622), y en
donde la hebra antisentido comprende la secuencia y todas las modificaciones de 5'
25 [MePhosphonate-4O-
mUs][fUs][fAs][fG][fG][mA][fA][mA][mU][fA][mC][mC][mA][fG][mA][mG][mU][mA]
[mG][mCs][mGs][mG]- 3' (SEQ ID NO: 643), en donde mC, mA, mG, mU =
ribonucleósidos 2'-OMe; fA, fC, fG, fU = ribonucleósidos 2'-F; s=fosforotioato, y en donde
ademA-GalNAc = nucleótido de adenina modificado con GalNAc.

En algunas modalidades, la descripción proporciona un oligonucleótido de ARNi para
30 reducir la expresión de *TMPRSS6*, el oligonucleótido comprende una hebra sentido y una
hebra antisentido, en donde la hebra sentido comprende la secuencia y todas las
modificaciones de 5' -
[mCs][mU][mC][mA][mC][mC][mU][fG][fC][fU][fU][mC][mU][mU][mC][mU][mG][m
35 G][mU][mA][mG][mC][mA][mG][mC][mC][mG][ademA-GalNAc][ademA-
GalNAc][ademA-GalNAc][mG][mG][mC][mU][mG][mC]-3' (SEQ ID NO: 632), y en
donde la hebra antisentido comprende la secuencia y todas las modificaciones de 5' -
[MeFosfonato-4O-
mUs][fAs][fCs][fC][fA][mG][fA][mA][mG][fA][mA][mG][mC][fA][mG][mG][mU][mG]
40 [mA][mGs][mGs][mG] -3' (SEQ ID NO: 653), en donde mC, mA, mG, mU =

ribonucleósidos 2'-OMe; fA, fC, fG, fU = ribonucleósidos 2'-F; s=fosforotioato, y en donde ademA-GalNAc = nucleótido de adenina modificado con GalNAc.

En algunas modalidades, la descripción proporciona, un oligonucleótido de ARNi para reducir la expresión de *TMPRSS6*, el oligonucleótido comprende una hebra sentido y una

5 hebra antisentido, en donde la hebra sentido comprende la secuencia y todas las modificaciones de 5' -

[mAs][mG][mU][mG][mU][mG][mA][fA][fA][fG][fA][mC][mA][mU][mA][mG][mC][mU][mG][mA][mG][mC][mA][mG][mC][mC][mG][ademA-GalNAc][ademA-GalNAc][ademA-GalNAc][mG][mG][mC][mU][mG][mC]3' (SEQ ID NO: 639), y en

10 donde la hebra antisentido comprende la secuencia y todas las modificaciones de 5'-[MeFosfonato-4O-

mUs][fCs][fAs][fG][fC][mU][fA][mU][mG][fU][mC][mU][mU][fU][mC][mA][mC][mA][mC][mUs][mGs][mG] -3' (SEQ ID NO: 660), en donde mC, mA, mG, mU = ribonucleósidos 2'-OMe; fA, fC, fG, fU = ribonucleósidos 2'-F; s=fosforotioato, y en donde ademA-GalNAc=

15 GalNAc nucleótido de adenina modificado.

En algunas modalidades, la descripción proporciona, un oligonucleótido de ARNi para reducir la expresión de *TMPRSS6*, el oligonucleótido comprende una hebra sentido y una hebra antisentido, en donde la hebra sentido comprende la secuencia y todas las modificaciones de 5' -

20 [mGs][mG][mG][mU][mG][mC][mA][fC][fU][fA][fU][mG][mG][mC][mU][mU][mG][mU][mA][mA][mG][mC][mA][mG][mC][mC][mG][ademA-GalNAc][ademA-GalNAc][ademA-GalNAc][mG][mG][mC][mU][mG][mC]3' (SEQ ID NO: 628), y en

donde la hebra antisentido comprende la secuencia y todas las modificaciones de 5'-[MeFosfonato-4O-

25 mUs][fUs][fAs][fC][fA][mA][fG][mC][mC][fA][mU][mA][mG][fU][mG][mC][mA][mC][mC][mCs][mGs][mG] -3' (SEQ ID NO: 649), en donde mC, mA, mG, mU = ribonucleósidos 2'-OMe; fA, fC, fG, fU = ribonucleósidos 2'-F; s=fosforotioato, y en donde ademA-GalNAc = nucleótido de adenina modificado con GalNAc.

En algunas modalidades, la descripción proporciona un oligonucleótido (por ejemplo, un oligonucleótido de ARNi) para reducir la expresión de *TMPRSS6*, en donde el oligonucleótido comprende una hebra sentido y una hebra antisentido que comprende secuencias de nucleótidos que se seleccionan del grupo que consiste en:

a) SEQ ID NO: 621 y 642, respectivamente;

b) SEQ ID NO: 622 y 643, respectivamente;

35 c) SEQ ID NO: 637 y 658, respectivamente;

d) SEQ ID NO: 632 y 653, respectivamente;

e) SEQ ID NO: 638 y 659, respectivamente;

f) SEQ ID NO: 639 y 660, respectivamente;

g) SEQ ID NO: 627 y 648, respectivamente;

40 h) SEQ ID NO: 628 y 649, respectivamente; y,

i) SEQ ID NO: 629 y 650, respectivamente.

En algunas modalidades, un oligonucleótido dirigido a *TMPRSS6* para reducir la expresión de *TMPRSS6* que se proporciona por la descripción comprende una hebra sentido que comprende la secuencia de nucleótidos como se establece en la SEQ ID NO: 621 y una hebra antisentido que comprende la secuencia de nucleótidos como se establece en la SEQ ID NO: 642. En algunas modalidades, un oligonucleótido dirigido a *TMPRSS6* para reducir la expresión de *TMPRSS6* que se proporciona por la descripción comprende una hebra sentido que comprende la secuencia de nucleótidos como se establece en la SEQ ID NO: 622 y una hebra antisentido que comprende la secuencia de nucleótidos como se establece en la SEQ ID NO: 643. En algunas modalidades, un oligonucleótido dirigido a *TMPRSS6* para reducir la expresión de *TMPRSS6* que se proporciona por la descripción comprende una hebra sentido que comprende la secuencia de nucleótidos como se establece en la SEQ ID NO: 632 y una hebra antisentido que comprende la secuencia de nucleótidos como se establece en la SEQ ID NO: 653. En algunas modalidades, un oligonucleótido dirigido a *TMPRSS6* para reducir la expresión de *TMPRSS6* que se proporciona por la descripción comprende una hebra sentido que comprende la secuencia de nucleótidos como se establece en la SEQ ID NO: 639 y una hebra antisentido que comprende la secuencia de nucleótidos como se establece en la SEQ ID NO: 660. En algunas modalidades, un oligonucleótido dirigido a *TMPRSS6* para reducir la expresión de *TMPRSS6* que se proporciona por la descripción comprende una hebra sentido que comprende la secuencia de nucleótidos como se establece en la SEQ ID NO: 628 y una hebra antisentido que comprende la secuencia de nucleótidos como se establece en la SEQ ID NO: 649.

En algunas modalidades, un oligonucleótido dirigido a *TMPRSS6* para reducir la expresión de *TMPRSS6* que se proporciona por la descripción comprende una hebra sentido que comprende la secuencia de nucleótidos como se establece en la SEQ ID NO: 621 y una hebra antisentido que comprende la secuencia de nucleótidos como se establece en la SEQ ID NO: 642, la hebra antisentido que comprende una región de complementariedad a un transcripto de ARN de *TMPRSS6*, en donde dicho ARNi tiene forma de un conjugado que tiene la estructura como se muestra en Figura 14A.

En algunas modalidades, un oligonucleótido dirigido a *TMPRSS6* para reducir la expresión de *TMPRSS6* que se proporciona por la descripción comprende una hebra sentido que comprende la secuencia de nucleótidos como se establece en la SEQ ID NO: 621 y una hebra antisentido que comprende la secuencia de nucleótidos como se establece en la SEQ ID NO: 642, la hebra antisentido que comprende una región de complementariedad a un transcripto de ARN de *TMPRSS6*, en donde dicho ARNi tiene forma de un conjugado que tiene la estructura como se muestra en las Figuras 10A-B.

En algunas modalidades, un oligonucleótido dirigido a *TMPRSS6* para reducir la expresión de *TMPRSS6* que se proporciona por la descripción comprende una hebra sentido que comprende la secuencia de nucleótidos como se establece en la SEQ ID NO: 632 y una hebra antisentido que comprende la secuencia de nucleótidos como se establece en la SEQ ID NO:

653, la hebra antisentido que comprende una región de complementariedad a un transcripto de ARN de TMPRSS6, en donde dicho ARNi tiene forma de un conjugado que tiene la estructura como se muestra en la Figura 14B.

En algunas modalidades, un oligonucleótido dirigido a TMPRSS6 para reducir la expresión de *TMPRSS6* que se proporciona por la descripción comprende una hebra sentido que comprende la secuencia de nucleótidos como se establece en la SEQ ID NO: 632 y una hebra antisentido que comprende la secuencia de nucleótidos como se establece en la SEQ ID NO: 653, la hebra antisentido que comprende una región de complementariedad a un transcripto de ARN de TMPRSS6, en donde dicho ARNi tiene forma de un conjugado que tiene la estructura como se muestra en las Figuras 11A-B.

En algunas modalidades, un oligonucleótido dirigido a TMPRSS6 para reducir la expresión de *TMPRSS6* que se proporciona por la descripción comprende una hebra sentido que comprende la secuencia de nucleótidos como se establece en la SEQ ID NO: 639 y una hebra antisentido que comprende la secuencia de nucleótidos como se establece en la SEQ ID NO: 660, la hebra antisentido que comprende una región de complementariedad a un transcripto de ARN de TMPRSS6, en donde dicho ARNi tiene forma de un conjugado que tiene la estructura como se muestra en la Figura 14C.

En algunas modalidades, un oligonucleótido dirigido a TMPRSS6 para reducir la expresión de *TMPRSS6* que se proporciona por la descripción comprende una hebra sentido que comprende la secuencia de nucleótidos como se establece en la SEQ ID NO: 639 y una hebra antisentido que comprende la secuencia de nucleótidos como se establece en la SEQ ID NO: 660, la hebra antisentido que comprende una región de complementariedad a un transcripto de ARN de TMPRSS6, en donde dicho ARNi tiene forma de un conjugado que tiene la estructura como se muestra en las Figuras 12A-B.

En algunas modalidades, un oligonucleótido dirigido a TMPRSS6 para reducir la expresión de *TMPRSS6* que se proporciona por la descripción comprende una hebra sentido que comprende la secuencia de nucleótidos como se establece en la SEQ ID NO: 628 y una hebra antisentido que comprende la secuencia de nucleótidos como se establece en la SEQ ID NO: 649, la hebra antisentido que comprende una región de complementariedad a un transcripto de ARN de TMPRSS6, en donde dicho ARNi tiene forma de un conjugado que tiene la estructura como se muestra en la Figura 14D.

En algunas modalidades, un oligonucleótido dirigido a TMPRSS6 para reducir la expresión de *TMPRSS6* que se proporciona por la descripción comprende una hebra sentido que comprende la secuencia de nucleótidos como se establece en la SEQ ID NO: 628 y una hebra antisentido que comprende la secuencia de nucleótidos como se establece en la SEQ ID NO: 649, la hebra antisentido que comprende una región de complementariedad a un transcripto de ARN de TMPRSS6, en donde dicho ARNi tiene forma de un conjugado que tiene la estructura como se muestra en las Figuras 13A-B.

Formulaciones

Varias formulaciones (por ejemplo, formulaciones farmacéuticas) se han desarrollado para usar los oligonucleótidos. Por ejemplo, los oligonucleótidos (por ejemplo, oligonucleótidos de ARNi) se pueden suministrar a un sujeto o a un entorno celular mediante el uso de una formulación que minimice la degradación, facilite el suministro y/o la captación, o proporcione otra propiedad beneficiosa a los oligonucleótidos en la formulación. En algunas modalidades, en la presente descripción se proporcionan composiciones que comprenden oligonucleótidos (por ejemplo, oligonucleótidos de ARNi) para reducir la expresión de *TMPRSS6*. Dichas composiciones se pueden formular adecuadamente de manera que cuando se administran a un sujeto, ya sea en el entorno inmediato de una célula diana o sistémicamente, una porción suficiente de los oligonucleótidos ingresa a la célula para reducir la expresión de *TMPRSS6*. Puede usarse cualquier variedad de formulaciones de oligonucleótidos adecuadas para suministrar oligonucleótidos para la reducción de *TMPRSS6* como se describe en la presente descripción. En algunas modalidades, se formula un oligonucleótido en soluciones tampón tales como soluciones salinas tamponadas con fosfato, liposomas, estructuras micelares y cápsidas. Cualquiera de los oligonucleótidos que se describen en la presente descripción puede proporcionarse no solo como ácidos nucleicos, sino también en forma de una sal farmacéuticamente aceptable.

Pueden usarse formulaciones de oligonucleótidos con lípidos catiónicos para facilitar la transfección de los oligonucleótidos en células. Por ejemplo, pueden usarse lípidos catiónicos, como la lipofectina, derivados catiónicos del glicerol y moléculas policationicas (por ejemplo, polilisina). Los lípidos adecuados incluyen oligofectamina, lipofectamina (Life Technologies), NC388 (Ribozyme Pharmaceuticals, Inc., Boulder, Colo.) o FuGene 6 (Roche), todos los cuales pueden usarse de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

En consecuencia, en algunas modalidades, una formulación comprende una nanopartícula lipídica. En algunas modalidades, un excipiente comprende un liposoma, un lípido, un complejo lipídico, una microesfera, una micropartícula, una nanoesfera o una nanopartícula, o puede formularse de cualquier otra manera para su administración a las células, tejidos, órganos o el cuerpo de un sujeto que lo necesite (ver, por ejemplo, Remington: THE SCIENCE y PRACTICE OF PHARMACY, 22da edición, Pharmaceutical Press, 2013).

En algunas modalidades, las formulaciones en la presente descripción comprenden un excipiente. En algunas modalidades, un excipiente confiere a una composición estabilidad mejorada, absorción mejorada, solubilidad mejorada y/o mejora terapéutica del ingrediente activo. En algunas modalidades, un excipiente es un agente amortiguador (por ejemplo, citrato de sodio, fosfato de sodio, una base tris o hidróxido de sodio) o un vehículo (por ejemplo, una solución amortiguada, vaselina, sulfóxido de dimetilo o aceite mineral). En algunas modalidades, un oligonucleótido se liofiliza para prolongar su vida útil y después se convierte en una solución antes de usar (por ejemplo, administración a un sujeto). En consecuencia, un excipiente en una composición que comprende cualquiera de los oligonucleótidos descritos en la presente descripción puede ser un lioprotector (por ejemplo,

manitol, lactosa, polietilen glicol o polivinilpirrolidona) o un modificador de temperatura de colapso (por ejemplo, dextrano, Ficoll™ o gelatina).

En algunas modalidades, una composición farmacéutica se formula para que sea compatible con su vía de administración prevista. Ejemplos de vías de administración incluyen administración parenteral (por ejemplo, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, intradérmica, subcutánea), oral (por ejemplo, inhalación), transdérmica (por ejemplo, tópica), transmucosal y rectal.

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen soluciones acuosas estériles (cuando son solubles en agua) o dispersiones y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. Para la administración intravenosa, los portadores adecuados incluyen solución salina fisiológica, agua bacteriostática, Cremophor EL™ (BASF, Parsippany, NJ) o solución salina tamponada con fosfato (PBS). El portador puede ser un solvente o un medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido y similares), y mezclas adecuadas de estos. En muchos casos, será preferente incluir agentes isotónicos en la composición, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol, cloruro de sodio. Las soluciones inyectables estériles se pueden preparar mediante la incorporación de los oligonucleótidos en una cantidad requerida en un solvente seleccionado con uno o una combinación de los ingredientes mencionados anteriormente, según se requiera, seguido de esterilización por filtración.

En algunas modalidades, una composición puede contener al menos aproximadamente un 0,1 % del agente terapéutico (por ejemplo, un oligonucleótido de ARNi para reducir la expresión de *TMPRSS6*) o más, aunque el porcentaje del (de los) ingrediente(s) activo(s) puede(n) estar entre aproximadamente el 1 % a aproximadamente el 80 % o más del peso o volumen de la composición total. Factores tales como la solubilidad, la biodisponibilidad, la semivida biológica, la vía de administración, la vida útil del producto, así como también otras consideraciones farmacológicas serán contempladas por un experto en la técnica de preparar tales formulaciones farmacéuticas y, como tal, puede ser conveniente una variedad de dosis y regímenes de tratamiento.

30 Métodos de uso

Reducción de la expresión de *TMPRSS6*

En algunas modalidades, la descripción proporciona métodos para poner en contacto o suministrar a una célula o población de células una cantidad efectiva de oligonucleótidos que se proporcionan en la presente descripción (por ejemplo, oligonucleótidos de ARNi) para reducir la expresión de *TMPRSS6*. En algunas modalidades, una reducción de la expresión de *TMPRSS6* se determina mediante la medición de una reducción en la cantidad o el nivel de ARNm de *TMPRSS6*, proteína matriptasa-2, o la actividad de matriptasa-2 en una célula. Los métodos incluyen los que se describen en la presente descripción y conocidos por los expertos en la técnica.

Los métodos que se proporcionan en la presente descripción son útiles en cualquier tipo de célula adecuada. En algunas modalidades, una célula es cualquier célula que expresa el ARNm de *TMPRSS6* (por ejemplo, hepatocitos). En algunas modalidades, la célula es una célula primaria obtenida de un sujeto. En algunas modalidades, la célula primaria ha experimentado un número limitado de pases de manera que la célula mantiene sustancialmente sus propiedades fenotípicas naturales. En algunas modalidades, una célula a la que se suministra el oligonucleótido es *ex vivo* o *in vitro* (es decir, puede suministrarse a una célula en cultivo o a un organismo en el que reside la célula).

En algunas modalidades, los oligonucleótidos en la presente descripción (por ejemplo, oligonucleótidos de ARNi) se suministran a una célula o población de células mediante el uso de un método de suministro de ácido nucleico conocido en la técnica que incluye, pero no se limita a, inyección de una solución que contiene los oligonucleótidos, bombardeo con partículas cubiertas por los oligonucleótidos, exposición de la célula o población de células a una solución que contiene los oligonucleótidos, o electroporación de membranas celulares en presencia de los oligonucleótidos. Pueden usarse otros métodos conocidos en la técnica para suministrar oligonucleótidos a las células, tal como el transporte de portadores mediado por lípidos, el transporte mediado por productos químicos y la transfección de liposomas catiónicos tal como el fosfato de calcio y otros.

En algunas modalidades, la reducción de la expresión de *TMPRSS6* se determina mediante un ensayo o técnica que evalúa una o más moléculas, propiedades o características de una célula o población de células asociadas con la expresión de *TMPRSS6*, o por un ensayo o técnica que evalúa moléculas que son directamente indicativas de la expresión de *TMPRSS6* en una célula o población de células (por ejemplo, ARNm de *TMPRSS6* o proteína matriptasa-2). En algunas modalidades, la medida en que un oligonucleótido que se proporciona en la presente descripción reduce la expresión de *TMPRSS6* se evalúa mediante la comparación de la expresión de *TMPRSS6* en una célula o población de células en contacto con el oligonucleótido con un control apropiado (por ejemplo, una célula o población de células apropiadas que no se pusieron en contacto con el oligonucleótido o que se pusieron en contacto con un oligonucleótido de control). En algunas modalidades, una cantidad o nivel de control de la expresión de *TMPRSS6* en una célula o población de células de control está predeterminada, de manera que no es necesario medir la cantidad o el nivel de control en todos los casos en que se realiza el ensayo o la técnica. El nivel o valor predeterminado puede tomar una variedad de formas. En algunas modalidades, un nivel o valor predeterminado puede ser un valor de corte único, tal como una mediana o una media.

En algunas modalidades, poner en contacto o suministrar un oligonucleótido que se describe en la presente descripción (por ejemplo, un oligonucleótido de ARNi) a una célula o una población de células da como resultado una reducción en la expresión de *TMPRSS6* en una célula o población de células que no se pusieron en contacto con el oligonucleótido o que se pusieron en contacto con un oligonucleótido de control. En algunas modalidades, la reducción de la expresión de *TMPRSS6* es aproximadamente 1 % o menor, aproximadamente

5 % o menor, aproximadamente 10 % o menor, aproximadamente 15 % o menor, aproximadamente 20 % o menor, aproximadamente 25 % o menor, aproximadamente 30 % o menor, aproximadamente 35 % o menor, aproximadamente 40 % o menor, aproximadamente 45 % o menor, aproximadamente 50 % o menor, aproximadamente 55 % o menor, aproximadamente 60 % o menor, aproximadamente 70 % o menor, aproximadamente 80 % o menor, o aproximadamente 90 % o menor con relación a una cantidad o nivel de control de la expresión de *TMPRSS6*. En algunas modalidades, la cantidad o nivel de control de expresión de *TMPRSS6* es una cantidad o nivel de ARNm de *TMPRSS6* y/o proteína matriptasa-2 en una célula o población de células que no se ha puesto en contacto con un oligonucleótido en la presente descripción. En algunas modalidades, la expresión de ARNm de *TMPRSS6* se mide mediante el uso de métodos conocidos en la técnica. En algunas modalidades, la expresión de ARNm de *TMPRSS6* se mide mediante qPCR. En algunas modalidades, la expresión de la proteína *TMPRSS6* se mide mediante el uso de métodos conocidos en la técnica. En algunas modalidades, la expresión de la proteína *TMPRSS6* se mide mediante ELISA. En algunas modalidades, la expresión de la proteína *TMPRSS6* se mide mediante inmunoelectrotransferencia. En algunas modalidades, el efecto del suministro de un oligonucleótido en la presente descripción a una célula o población de células de acuerdo con un método de la presente descripción se evalúa después de un período o cantidad de tiempo finitos (por ejemplo, minutos, horas, días, semanas, meses). Por ejemplo, en algunas modalidades, la expresión de *TMPRSS6* se determina en una célula o población de células al menos aproximadamente 4 horas, aproximadamente 8 horas, aproximadamente 12 horas, aproximadamente 18 horas, aproximadamente 24 horas; o al menos aproximadamente 1 día, aproximadamente 2 días, aproximadamente 3 días, aproximadamente 4 días, aproximadamente 5 días, aproximadamente 6 días, aproximadamente 7 días, aproximadamente 8 días, aproximadamente 9 días, aproximadamente 10 días, aproximadamente 11 días, aproximadamente 12 días, aproximadamente 13 días, aproximadamente 14 días, aproximadamente 21 días, aproximadamente 28 días, aproximadamente 35 días, aproximadamente 42 días, aproximadamente 49 días, aproximadamente 56 días, aproximadamente 63 días, aproximadamente 70 días, aproximadamente 77 días, o aproximadamente 84 días o más después de poner en contacto o suministrar el oligonucleótido a la célula o población de células. En algunas modalidades, la expresión de *TMPRSS6* se determina en una célula o población de células al menos aproximadamente 1 mes, aproximadamente 2 meses, aproximadamente 3 meses, aproximadamente 4 meses, aproximadamente 5 meses o aproximadamente 6 meses o más después de poner en contacto o suministrar el oligonucleótido a la célula o población de células.

En algunas modalidades, un oligonucleótido que se proporciona en la presente descripción (por ejemplo, un oligonucleótido de ARNi) se suministra en forma de un transgén diseñado para expresar en una célula el oligonucleótido o las hebras que comprenden el oligonucleótido (por ejemplo, sus hebras sentido y antisentido). En algunas modalidades, un

oligonucleótido en la presente descripción se suministra mediante el uso de un transgén diseñado para expresar cualquier oligonucleótido que se describe en la presente descripción. Los transgenes pueden suministrarse mediante el uso de vectores virales (por ejemplo, adenovirus, retrovirus, virus vaccinia, poxvirus, virus adenoasociados o virus del herpes simple) o vectores no virales (por ejemplo, plásmidos o ARNm sintéticos). En algunas modalidades, los transgenes se pueden inyectar directamente a un sujeto.

Métodos de tratamiento

La descripción proporciona oligonucleótidos (por ejemplo, oligonucleótidos de ARNi) para usar como medicamento, en particular para usar en un método para el tratamiento de enfermedades, trastornos y afecciones asociadas con la deficiencia o supresión de hepcidina. La descripción también proporciona oligonucleótidos para usar, o adaptables para usar, para tratar un sujeto (por ejemplo, un ser humano que tiene una enfermedad, trastorno o afección asociados con la deficiencia o supresión de hepcidina) que se beneficiaría de la reducción de la expresión de *TMPRSS6*. En algunos aspectos, la descripción proporciona oligonucleótidos para usar, o adaptados para usar, para tratar a un sujeto que tiene una enfermedad, trastorno o afección asociados con la deficiencia o supresión de hepcidina. En algunas modalidades, el sujeto que necesita reducción de *TMPRSS6* tiene, o está riesgo de, una enfermedad, trastorno o afección de acumulación de hierro. En algunas modalidades, las composiciones, compuestos y métodos que se describen en la presente descripción se proporcionan para su uso en la reducción de los niveles de hierro en un individuo. En algunas modalidades, la acumulación de hierro se debe a una enfermedad, trastorno o afección en el sujeto. En algunas modalidades, la enfermedad, trastorno y/o afección es hemocromatosis tal como la hemocromatosis hereditaria. En algunas modalidades, la enfermedad, trastorno y/o afección es β -talasemia. En algunas modalidades, la enfermedad, trastorno y/o afección es policitemia vera. La descripción también proporciona oligonucleótidos para usar, o adaptables para usar, en la fabricación de un medicamento o composición farmacéutica para tratar una enfermedad, trastorno o afección asociados con la deficiencia o supresión de hepcidina. En algunas modalidades, los oligonucleótidos para usar, o adaptables para usar, se dirigen al ARNm de *TMPRSS6* y reducen la expresión de *TMPRSS6* (por ejemplo, mediante la vía de ARNi). En algunas modalidades, los oligonucleótidos para usar, o adaptables para usar, se dirigen al ARNm de *TMPRSS6* y reducen la cantidad o el nivel de ARNm de *TMPRSS6*, proteína matriptasa-2 y/o actividad de *TMPRSS6*.

La descripción también proporciona métodos para tratar a un sujeto que tiene, se sospecha que tiene o está en riesgo de desarrollar una enfermedad, trastorno o afección asociados con la deficiencia o supresión de hepcidina con un oligonucleótido que se proporciona en la presente descripción. En algunos aspectos, la descripción proporciona métodos para tratar o atenuar el inicio o la progresión de una enfermedad, trastorno o afección asociados con la deficiencia o supresión de hepcidina mediante el uso de los oligonucleótidos en la presente descripción. En otros aspectos, la descripción proporciona métodos para lograr uno o más beneficios terapéuticos en un sujeto que tiene una enfermedad, trastorno o afección asociados

con la deficiencia o supresión de hepcidina mediante el uso de los oligonucleótidos que se proporcionan en la presente descripción. En algunas modalidades de los métodos en la presente descripción, el sujeto se trata mediante la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de cualquiera o más de los oligonucleótidos que se proporcionan en la presente descripción. En algunas modalidades, el tratamiento comprende reducir la expresión de *TMPRSS6*. En algunas modalidades, el sujeto se trata terapéuticamente. En algunas modalidades, el sujeto se trata profilácticamente.

En algunas modalidades de los métodos en la presente descripción, uno o más oligonucleótidos en la presente descripción (por ejemplo, oligonucleótidos de ARNi), o una composición farmacéutica que comprende uno o más oligonucleótidos, se administra a un sujeto que tiene una enfermedad, trastorno o afección asociados con la deficiencia o supresión de hepcidina de manera que la expresión de *TMPRSS6* se reduce en el sujeto, para tratar de esta manera al sujeto. En algunas modalidades, una cantidad o nivel de ARNm de *TMPRSS6* se reduce en el sujeto. En algunas modalidades, una cantidad o nivel de la proteína matriptasa-2 se reduce en el sujeto. En algunas modalidades, una cantidad o nivel de actividad de matriptasa-2 se reduce en el sujeto.

En algunas modalidades de los métodos en la presente descripción, un oligonucleótido que se proporciona en la presente descripción (por ejemplo, un oligonucleótido de ARNi), o una composición farmacéutica que comprende el oligonucleótido, se administra a un sujeto que tiene una enfermedad, trastorno o afección asociados con la deficiencia o supresión de hepcidina de manera que la expresión de *TMPRSS6* se reduce en el sujeto en al menos aproximadamente 30 %, aproximadamente 35 %, aproximadamente 40 %, aproximadamente 45 %, aproximadamente 50 %, aproximadamente 55 %, aproximadamente 60 %, aproximadamente 65 %, aproximadamente 70 %, aproximadamente 75 %, aproximadamente 80 %, aproximadamente 85 %, aproximadamente 90 %, aproximadamente 95 %, aproximadamente 99 % o más del 99 % cuando se compara con la expresión de *TMPRSS6* antes de la administración de uno o más oligonucleótidos o composición farmacéutica. En algunas modalidades, la expresión de *TMPRSS6* se reduce en el sujeto en al menos aproximadamente 30 %, aproximadamente 35 %, aproximadamente 40 %, aproximadamente 45 %, aproximadamente 50 %, aproximadamente 55 %, aproximadamente 60 %, aproximadamente 65 %, aproximadamente 70 %, aproximadamente 75 %, aproximadamente 80 %, aproximadamente 85 %, aproximadamente 90 %, aproximadamente 95 %, aproximadamente 99 % o más del 99 % cuando se compara con la expresión de *TMPRSS6* en un sujeto (por ejemplo, un sujeto de referencia o de control) que no recibe el oligonucleótido u oligonucleótidos o la composición farmacéutica o que recibe un oligonucleótido u oligonucleótidos, composición farmacéutica o tratamiento de control.

En algunas modalidades de los métodos en la presente descripción, un oligonucleótido o los oligonucleótidos en la presente descripción (por ejemplo, oligonucleótidos de ARNi), o una composición farmacéutica que comprende el oligonucleótido o los oligonucleótidos, se administra a un sujeto que tiene una enfermedad, trastorno o afección asociados con la

deficiencia o supresión de hepcidina de manera que una cantidad o nivel de ARNm de *TMPRSS6* se reduce en el sujeto en al menos aproximadamente 30 %, aproximadamente 35 %, aproximadamente 40 %, aproximadamente 45 %, aproximadamente 50 %, aproximadamente 55 %, aproximadamente 60 %, aproximadamente 65 %, aproximadamente 70 %, aproximadamente 75 %, aproximadamente 80 %, aproximadamente 85 %, aproximadamente 90 %, aproximadamente 95 %, aproximadamente 99 % o más del 99 % cuando se compara con la cantidad o el nivel de ARNm de *TMPRSS6* antes de la administración del oligonucleótido o la composición farmacéutica. En algunas modalidades, una cantidad o nivel de ARNm de *TMPRSS6* se reduce en el sujeto en al menos aproximadamente 30 %, aproximadamente 35 %, aproximadamente 40 %, aproximadamente 45 %, aproximadamente 50 %, aproximadamente 55 %, aproximadamente 60 %, aproximadamente 65 %, aproximadamente 70 %, aproximadamente 75 %, aproximadamente 80 %, aproximadamente 85 %, aproximadamente 90 %, aproximadamente 95 %, aproximadamente 99 % o más del 99 % cuando se compara con una cantidad o nivel de ARNm de *TMPRSS6* en un sujeto (por ejemplo, un sujeto de referencia o de control) que no recibe el oligonucleótido u oligonucleótidos o la composición farmacéutica o que recibe un oligonucleótido u oligonucleótidos, composición farmacéutica o tratamiento de control.

En algunas modalidades de los métodos en la presente descripción, un oligonucleótido o los oligonucleótidos en la presente descripción, o una composición farmacéutica que comprende el oligonucleótido o los oligonucleótidos, se administra a un sujeto que tiene una enfermedad, trastorno o afección asociados con la deficiencia o supresión de hepcidina de manera que una cantidad o nivel de la proteína matriptasa-2 se reduce en el sujeto en al menos aproximadamente 30 %, aproximadamente 35 %, aproximadamente 40 %, aproximadamente 45 %, aproximadamente 50 %, aproximadamente 55 %, aproximadamente 60 %, aproximadamente 65 %, aproximadamente 70 %, aproximadamente 75 %, aproximadamente 80 %, aproximadamente 85 %, aproximadamente 90 %, aproximadamente 95 %, aproximadamente 99 % o más del 99 % cuando se compara con la cantidad o el nivel de proteína matriptasa-2 antes de la administración del oligonucleótido o la composición farmacéutica. En algunas modalidades, una cantidad o nivel de proteína matriptasa-2 se reduce en el sujeto en al menos aproximadamente 30 %, aproximadamente 35 %, aproximadamente 40 %, aproximadamente 45 %, aproximadamente 50 %, aproximadamente 55 %, aproximadamente 60 %, aproximadamente 65 %, aproximadamente 70 %, aproximadamente 75 %, aproximadamente 80 %, aproximadamente 85 %, aproximadamente 90 %, aproximadamente 95 %, aproximadamente 99 % o más del 99 % cuando se compara con una cantidad o nivel de proteína matriptasa-2 en un sujeto (por ejemplo, un sujeto de referencia o de control) que no recibe el oligonucleótido u oligonucleótidos o la composición farmacéutica o que recibe un oligonucleótido, oligonucleótidos o composición farmacéutica o el tratamiento de control.

En algunas modalidades de los métodos en la presente descripción, un oligonucleótido u oligonucleótidos (por ejemplo, oligonucleótidos de ARNi) en la presente descripción, o una

composición farmacéutica que comprende el oligonucleótido u oligonucleótidos, se administra a un sujeto que tiene una enfermedad, trastorno o afección que se asocian con la deficiencia o supresión de hepcidina de manera que una cantidad o nivel de la actividad/expresión del gen *TMPRSS6* se reduce en el sujeto en al menos aproximadamente

5 30 %, aproximadamente 35 %, aproximadamente 40 %, aproximadamente 45 %, aproximadamente 50 %, aproximadamente 55 %, aproximadamente 60 %, aproximadamente 65 %, aproximadamente 70 %, aproximadamente 75 %, aproximadamente 80 %, aproximadamente 85 %, aproximadamente 90 %, aproximadamente 95 %, aproximadamente 99 % o más del 99 % cuando se compara con la cantidad o el nivel de la actividad de

10 *TMPRSS6* antes de la administración del oligonucleótido o la composición farmacéutica. En algunas modalidades, una cantidad o nivel de la actividad de *TMPRSS6* se reduce en el sujeto en al menos aproximadamente 30 %, aproximadamente 35 %, aproximadamente 40 %, aproximadamente 45 %, aproximadamente 50 %, aproximadamente 55 %, aproximadamente 60 %, aproximadamente 65 %, aproximadamente 70 %, aproximadamente 75 %,

15 aproximadamente 80 %, aproximadamente 85 %, aproximadamente 90 %, aproximadamente 95 %, aproximadamente 99 % o más del 99 % cuando se compara con una cantidad o nivel de actividad de *TMPRSS6* en un sujeto (por ejemplo, un sujeto de referencia o de control) que no recibe el oligonucleótido o la composición farmacéutica o que recibe un oligonucleótido, composición farmacéutica o tratamiento de control.

20 En algunas modalidades de los métodos en la presente descripción, un oligonucleótido que se proporciona en la presente descripción (por ejemplo, un oligonucleótido de ARNi), o una composición farmacéutica que comprende el oligonucleótido, se administra a un sujeto que tiene una enfermedad, trastorno o afección asociados con la deficiencia o supresión de hepcidina de manera que la producción de hepcidina aumenta en el sujeto en al menos

25 aproximadamente 30 %, aproximadamente 35 %, aproximadamente 40 %, aproximadamente 45 %, aproximadamente 50 %, aproximadamente 55 %, aproximadamente 60 %, aproximadamente 65 %, aproximadamente 70 %, aproximadamente 75 %, aproximadamente 80 %, aproximadamente 85 %, aproximadamente 90 %, aproximadamente 95 %, aproximadamente 99 % o más del 99 % cuando se compara con la producción de hepcidina

30 antes de la administración de uno o más oligonucleótidos o composición farmacéutica. En algunas modalidades, la producción de hepcidina aumenta en el sujeto en al menos aproximadamente 30 %, aproximadamente 35 %, aproximadamente 40 %, aproximadamente 45 %, aproximadamente 50 %, aproximadamente 55 %, aproximadamente 60 %, aproximadamente 65 %, aproximadamente 70 %, aproximadamente 75 %, aproximadamente

35 80 %, aproximadamente 85 %, aproximadamente 90 %, aproximadamente 95 %, aproximadamente 99 % o más del 99 % cuando se compara con la producción de hepcidina en un sujeto (por ejemplo, un sujeto de referencia o de control) que no recibe el oligonucleótido u oligonucleótidos o la composición farmacéutica o que recibe un oligonucleótido u oligonucleótidos, la composición farmacéutica o el tratamiento de control.

En algunas modalidades de los métodos en la presente descripción, un oligonucleótido que se proporciona en la presente descripción (por ejemplo, un oligonucleótido de ARNi), o una composición farmacéutica que comprende el oligonucleótido, se administra a un sujeto que tiene una enfermedad, trastorno o afección asociados con la deficiencia o supresión de hepcidina de manera que el hierro sérico se reduce en el sujeto en al menos aproximadamente 30 %, aproximadamente 35 %, aproximadamente 40 %, aproximadamente 45 %, aproximadamente 50 %, aproximadamente 55 %, aproximadamente 60 %, aproximadamente 65 %, aproximadamente 70 %, aproximadamente 75 %, aproximadamente 80 %, aproximadamente 85 %, aproximadamente 90 %, aproximadamente 95 %, aproximadamente 99 % o más del 99 % cuando se compara con el hierro sérico antes de la administración de uno o más oligonucleótidos o composición farmacéutica. En algunas modalidades, el hierro sérico se reduce en el sujeto en al menos aproximadamente 30 %, aproximadamente 35 %, aproximadamente 40 %, aproximadamente 45 %, aproximadamente 50 %, aproximadamente 55 %, aproximadamente 60 %, aproximadamente 65 %, aproximadamente 70 %, aproximadamente 75 %, aproximadamente 80 %, aproximadamente 85 %, aproximadamente 90 %, aproximadamente 95 %, aproximadamente 99 % o más del 99 % cuando se compara con el hierro sérico en un sujeto (por ejemplo, un sujeto de referencia o de control) que no recibe el oligonucleótido u oligonucleótidos o la composición farmacéutica o que recibe un oligonucleótido u oligonucleótidos, la composición farmacéutica o el tratamiento de control.

En algunas modalidades de los métodos en la presente descripción, un oligonucleótido que se proporciona en la presente descripción (por ejemplo, un oligonucleótido de ARNi), o una composición farmacéutica que comprende el oligonucleótido, se administra a un sujeto que tiene una enfermedad, trastorno o afección asociados con la deficiencia o supresión de hepcidina de manera que la saturación de hierro sérico se reduce en el sujeto en al menos aproximadamente 30 %, aproximadamente 35 %, aproximadamente 40 %, aproximadamente 45 %, aproximadamente 50 %, aproximadamente 55 %, aproximadamente 60 %, aproximadamente 65 %, aproximadamente 70 %, aproximadamente 75 %, aproximadamente 80 %, aproximadamente 85 %, aproximadamente 90 %, aproximadamente 95 %, aproximadamente 99 % o más del 99 % cuando se compara con la saturación de hierro sérico antes de la administración de uno o más oligonucleótidos o composición farmacéutica. En algunas modalidades, la saturación de hierro sérico se reduce en el sujeto en al menos aproximadamente 30 %, aproximadamente 35 %, aproximadamente 40 %, aproximadamente 45 %, aproximadamente 50 %, aproximadamente 55 %, aproximadamente 60 %, aproximadamente 65 %, aproximadamente 70 %, aproximadamente 75 %, aproximadamente 80 %, aproximadamente 85 %, aproximadamente 90 %, aproximadamente 95 %, aproximadamente 99 % o más del 99 % cuando se compara con la saturación de hierro sérico en un sujeto (por ejemplo, un sujeto de referencia o de control) que no recibe el oligonucleótido u oligonucleótidos o la composición farmacéutica o que recibe un oligonucleótido u oligonucleótidos, la composición farmacéutica o el tratamiento de control.

Los métodos adecuados para determinar la expresión de *TMPRSS6*, la cantidad o el nivel de ARNm de *TMPRSS6*, proteína matriptasa-2, actividad de matriptasa-2, o un biomarcador relacionado o afectado por la modulación de la expresión de *TMPRSS6* (por ejemplo, un biomarcador de plasma), en el sujeto, o en una muestra del sujeto, se conocen en la técnica.

5 Además, los ejemplos que se establecen en la presente descripción ilustran los métodos para determinar la expresión de *TMPRSS6*.

En algunas modalidades, la expresión de *TMPRSS6*, la cantidad o el nivel de ARNm de *TMPRSS6*, proteína matriptasa-2, actividad de matriptasa-2, o un biomarcador relacionado o afectado por la modulación de la expresión de *TMPRSS6*, o cualquiera de sus combinaciones,

10 se reduce en una célula (por ejemplo, un hepatocito), una población o un grupo de células (por ejemplo, un organoide), un órgano (por ejemplo, hígado), sangre o una fracción de esta (por ejemplo, plasma), un tejido (por ejemplo, tejido hepático), una muestra (por ejemplo, una muestra de biopsia de hígado), o cualquier otro material biológico apropiado obtenido o aislado del sujeto. En algunas modalidades, la expresión de *TMPRSS6*, la cantidad o el nivel

15 de ARNm de *TMPRSS6*, proteína matriptasa-2, actividad de matriptasa-2, o de un biomarcador relacionado o afectado por la modulación de la expresión de *TMPRSS6*, o cualquiera de sus combinaciones, se reduce en más de un tipo de célula (por ejemplo, un hepatocito y uno o más tipos de células), más de un grupo de células, más de un órgano (por ejemplo, hígado y uno o más órganos adicionales), más de una fracción de sangre (por

20 ejemplo, plasma y una o más fracciones de sangre adicionales), más de un tipo de tejido (por ejemplo, tejido hepático y uno o más tipos de tejido adicionales), o más de un tipo de muestra (por ejemplo, una muestra de biopsia de hígado y uno o más tipos de muestra de biopsia adicionales).

Debido a su alta especificidad, los oligonucleótidos que se proporcionan en la presente

25 descripción (por ejemplo, oligonucleótidos de ARNi) se dirigen específicamente al ARNm de los genes diana (por ejemplo, ARNm de *TMPRSS6*) de células y tejido(s) u órgano(s) (por ejemplo, hígado). En la prevención de la enfermedad, el gen diana puede ser uno que se requiera para la iniciación o el mantenimiento de la enfermedad o que se haya identificado como asociado con un mayor riesgo de contraer la enfermedad. En el tratamiento de la

30 enfermedad, el oligonucleótido puede ponerse en contacto con las células, tejido(s) u órgano(s) (por ejemplo, hígado) que exhibe o es responsable de mediar la enfermedad. Por ejemplo, un oligonucleótido (por ejemplo, un oligonucleótido de ARNi) sustancialmente idéntico a la totalidad o parte de un gen de tipo salvaje (es decir, nativo) o mutado que se asocia con un trastorno o afección asociados con la deficiencia o supresión de hepcidina

35 puede ponerse en contacto o introducirse en un tipo de célula o tejido de interés tal como un hepatocito u otra célula hepática.

Ejemplos de una enfermedad, trastorno o afección que se asocia con la deficiencia o supresión de hepcidina incluyen, pero no se limitan a, hemocromatosis (por ejemplo, hemocromatosis hereditaria), betatalasemia, policitemia vera, anemia ferropénica resistente

40 al hierro.

En algunas modalidades, el gen diana puede ser un gen diana de cualquier mamífero, tal como una diana humana. Cualquier gen diana puede silenciarse de acuerdo con el método que se describe en la presente descripción.

Los métodos que se describen en la presente descripción típicamente implican administrar a un sujeto una cantidad efectiva de un oligonucleótido en la presente descripción (por ejemplo, un oligonucleótido de ARNi), es decir, una cantidad que produce o genera un resultado terapéutico conveniente. Una cantidad terapéuticamente aceptable puede ser una cantidad que trata terapéuticamente una enfermedad o trastorno. La dosis adecuada para cualquier sujeto dependerá de ciertos factores, que incluyen el tamaño del sujeto, el área superficial corporal, la edad, la composición que se va a administrar, el (los) ingrediente(s) activo(s) en la composición, el tiempo y la vía de administración, el estado general de salud, y otros medicamentos que se administran simultáneamente.

En algunas modalidades, a un sujeto se le administra cualquiera de las composiciones en la presente descripción (por ejemplo, una composición que comprende un oligonucleótido de ARNi que se describe en la presente descripción) ya sea por vía enteral (por ejemplo, por vía oral, por sonda de alimentación gástrica, por sonda de alimentación duodenal, mediante gastrostomía o por vía rectal), por vía parenteral (por ejemplo, inyección subcutánea, inyección o infusión intravenosa, inyección o infusión intraarterial, infusión intraósea, inyección intramuscular, inyección intracerebral, inyección intracerebroventricular, intratecal), por vía tópica (por ejemplo, epicutánea, inhalatoria, mediante gotas para los ojos, o a través de una membrana mucosa), o por inyección directa en un órgano diana (por ejemplo, el hígado de un sujeto). Típicamente, los oligonucleótidos en la presente descripción se administran por vía intravenosa o subcutánea.

En algunas modalidades, un oligonucleótido en la presente descripción (por ejemplo, un oligonucleótido de ARNi), o una composición farmacéutica que comprende el oligonucleótido, se administra solo o en combinación. En algunas modalidades, los oligonucleótidos en la presente descripción se administran en combinación simultáneamente, secuencialmente (en cualquier orden) o intermitentemente. Por ejemplo, se pueden coadministrar simultáneamente dos oligonucleótidos. Alternativamente, se puede administrar un oligonucleótido seguido de la administración de un segundo oligonucleótido cualquier periodo de tiempo después (por ejemplo, una hora, un día, una semana o un mes).

En algunas modalidades, el sujeto a tratar es un sujeto humano o primate no humano u otro sujeto mamífero. Otros sujetos ilustrativos incluyen animales domesticados tales como perros y gatos; ganado tal como caballos, vacas, cerdos, ovejas, cabras y pollos; y animales tales como ratones, ratas, cobayos y hámsteres.

Kits

En algunas modalidades, la descripción proporciona un kit que comprende un oligonucleótido en la presente descripción (por ejemplo, un oligonucleótido de ARNi) e instrucciones de uso. En algunas modalidades, el kit comprende un oligonucleótido en la presente descripción y un prospecto que contiene instrucciones para el uso del kit y/o

cualquier componente de este. En algunas modalidades, el kit comprende, en un contenedor adecuado, un oligonucleótido en la presente descripción, uno o más controles y varios tampones, reactivos, enzimas y otros ingredientes estándar bien conocidos en la técnica. En algunas modalidades, el recipiente comprende al menos un frasco, pocillo, tubo de ensayo, 5 matraz, botella, jeringa u otro medio recipiente, en el que se coloca el oligonucleótido y, en algunos casos, se divide adecuadamente en alícuotas. En algunas modalidades en las que se proporciona un componente adicional, el kit contiene recipientes adicionales en los que se coloca este componente. Los kits también pueden incluir un medio que contiene el oligonucleótido y cualquier otro reactivo en confinamiento cerrado para la venta comercial. 10 Dichos recipientes pueden incluir recipientes de plástico moldeados por inyección o soplado en los que se retienen los frascos deseados. Los recipientes y/o kits pueden incluir un etiquetado con instrucciones de uso y/o advertencias.

En algunas modalidades, un kit comprende un oligonucleótido en la presente descripción (por ejemplo, un oligonucleótido de ARNi) y un portador farmacéuticamente aceptable, o 15 una composición farmacéutica que comprende el oligonucleótido e instrucciones para tratar o retrasar la progresión de una enfermedad, trastorno o afección asociados con la deficiencia o supresión de hepcidina en un sujeto que lo necesita.

Definiciones

Como se usa en la presente descripción, el término "oligonucleótido antisentido" abarca una 20 molécula basada en ácido nucleico que tiene una secuencia complementaria a la totalidad o parte del ARNm diana, en particular una secuencia semilla que de esta manera puede formar un híbrido con un ARNm. Por lo tanto, el término "oligonucleótido antisentido", como se usa en la presente descripción, puede denominarse como un "inhibidor basado en ácido nucleico complementario" o "hebra guía".

25 Como se usa en la presente descripción, "aproximadamente" o "aproximadamente", cuando se aplica a uno o más valores de interés, se refiere a un valor que es similar a un valor de referencia establecido. En determinadas modalidades, "aproximadamente" se refiere a un intervalo de valores que se encuentran dentro de 25 %, 20 %, 19 %, 18 %, 17 %, 16 %, 15 %, 14 %, 13 %, 12 %, 11 %, 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 % o menos 30 en cualquier dirección (mayor o menor que) el valor de referencia establecido a menos que se indique de cualquier otra manera o sea evidente de cualquier otra manera a partir del contexto (excepto cuando tal número exceda el 100 % de un valor posible).

Como se usa en la presente descripción, "administrar", "administra", "administración" y similares se refiere a proporcionar una sustancia (por ejemplo, un oligonucleótido) a un sujeto 35 de una manera que sea farmacológicamente útil (por ejemplo, para tratar una enfermedad, trastorno o afección en el sujeto).

Como se usa en la presente descripción, "atenuar", "atenúa", "atenuación" y similares se refiere a reducir o detener efectivamente. Como un ejemplo no limitante, uno o más de los 40 tratamientos en la presente descripción pueden reducir o detener efectivamente el inicio o la progresión de la anemia ferropénica resistente al hierro, hemocromatosis o betatalasemia en

un sujeto. Esta atenuación se puede ejemplificar mediante, por ejemplo, una disminución en uno o más aspectos (por ejemplo, síntomas, características tisulares, y celular, inflamatorio, o la actividad inmunológica, etc.) de la anemia ferropénica resistente al hierro, hemocromatosis, o betatalasemia, sin progresión detectable (empeoramiento) de uno o más aspectos de la hemocromatosis o betatalasemia, o ningún aspecto detectable de la anemia ferropénica resistente al hierro, hemocromatosis, o betatalasemia en un sujeto cuando podría esperarse de cualquier otra manera.

Como se usa en la presente descripción, “complementario” se refiere a una relación estructural entre dos nucleótidos (por ejemplo, en dos ácidos nucleicos opuestos o en regiones opuestas de una sola hebra de ácido nucleico) que permite que los dos nucleótidos formen pares de bases entre sí. Por ejemplo, un nucleótido de purina de un ácido nucleico que es complementario a un nucleótido de pirimidina de un ácido nucleico opuesto puede aparearse formando enlaces de hidrógeno entre sí. En algunas modalidades, los nucleótidos complementarios pueden aparearse a la manera de Watson-Crick o de cualquier otra manera que permita la formación de híbridos estables. En algunas modalidades, dos ácidos nucleicos pueden tener regiones de múltiples nucleótidos que son complementarios entre sí para formar regiones de complementariedad, como se describió en la presente descripción.

Como se usa en la presente descripción, “desoxirribonucleótido” se refiere a un nucleótido que tiene un hidrógeno en lugar de un hidroxilo en la posición 2' de su azúcar pentosa cuando se compara con un ribonucleótido. Un desoxirribonucleótido modificado es un desoxirribonucleótido que tiene una o más modificaciones o sustituciones de átomos distintos de los de la posición 2', que incluyen modificaciones o sustituciones en o del azúcar, el grupo fosfato o la base.

Como se usa en la presente descripción, “oligonucleótido bicatenario” u “oligonucleótido bc” se refiere a un oligonucleótido que está sustancialmente en una forma híbrida. En algunas modalidades, el apareamiento de bases complementarias de la(s) región(es) híbrido de un oligonucleótido bicatenario se forma entre secuencias antiparalelas de nucleótidos de hebras de ácido nucleico separadas covalentemente. En algunas modalidades, el apareamiento de bases complementarias de la(s) región(es) híbrida(s) de un oligonucleótido bicatenario se forma entre secuencias antiparalelas de nucleótidos de hebras de ácido nucleico que están unidas covalentemente. En algunas modalidades, el apareamiento de bases complementarias de la(s) región(es) híbrida(s) de un oligonucleótido bicatenario se forma a partir de una sola hebra de ácido nucleico que se pliega (por ejemplo, mediante una horquilla) para proporcionar secuencias antiparalelas complementarias de nucleótidos que forman pares de bases. En algunas modalidades, un oligonucleótido bicatenario comprende dos hebras de ácido nucleico separadas covalentemente que forman un híbrido totalmente entre sí. Sin embargo, en algunas modalidades, un oligonucleótido bicatenario comprende dos hebras de ácido nucleico separadas covalentemente que forman un híbrido parcialmente (por ejemplo, con salientes en uno o ambos extremos). En algunas modalidades, un oligonucleótido bicatenario comprende una secuencia antiparalela de nucleótidos que son parcialmente

complementarios y, por lo tanto, pueden tener uno o más errores de apareamiento, que pueden incluir errores de apareamiento internos o errores de apareamiento en los extremos.

Como se usa en la presente descripción, “híbrido”, en referencia a los ácidos nucleicos (por ejemplo, oligonucleótidos), se refiere a una estructura formada a través del apareamiento de bases complementarias de dos secuencias antiparalelas de nucleótidos.

Como se usa en la presente descripción, “excipiente” se refiere a un agente no terapéutico que se puede incluir en una composición, por ejemplo, para proporcionar o contribuir a una consistencia deseada o un efecto estabilizador.

Como se usa en la presente descripción, “hepatocito” o “hepatocitos” se refiere a células de los tejidos parenquimatosos del hígado. Estas células constituyen aproximadamente 70%-85% de la masa del hígado y producen albúmina sérica, FBN y el grupo de protrombina de los factores de coagulación (excepto los factores 3 y 4). Los marcadores para las células del linaje de hepatocitos incluyen, pero no se limitan a, transtiretina (Ttr), glutamina sintetasa (Glul), factor nuclear de hepatocitos 1a (Hnf1a) y factor nuclear de hepatocitos 4a (Hnf4a).

Los marcadores para hepatocitos maduros pueden incluir, pero no se limitan a, citocromo P450 (Cyp3a11), citocromo P450 3A4 (CYP3A4), fumarilacetoacetato hidrolasa (Fah), glucosa 6-fosfato (G6p), albúmina (Alb) y OC2-2F8. Ver, por ejemplo, Huch y otros (2013) Nature 494:247-50.

Como se usa en la presente descripción, un “agente hepatotóxico” se refiere a un compuesto químico, virus u otra sustancia que es en sí misma tóxica para el hígado o que puede procesarse para formar un metabolito que es tóxico para el hígado. Los agentes hepatotóxicos pueden incluir, pero no se limitan a, tetracloruro de carbono (CCl₄), acetaminofén (paracetamol), cloruro de vinilo, arsénico, cloroformo, medicamentos antiinflamatorios no esteroideos (como aspirina y fenilbutazona).

Como se usa en la presente descripción, el término “*TMPRSS6*” se refiere a la serina proteasa transmembrana 6. El gen *TMPRSS6* codifica la proteína matriptasa-2 que funciona en una vía de señalización con hepcidina para regular el equilibrio de hierro en el cuerpo. matriptasa-2

Como se usa en la presente descripción, “enlazador lábil” se refiere a un enlazador que se puede escindir (por ejemplo, mediante pH ácido). Un “enlazador bastante estable” se refiere a un enlazador que no se puede escindir.

Como se usa en la presente descripción, “enlace internucleotídico modificado” se refiere a un enlace internucleotídico que tiene una o más modificaciones químicas cuando se compara con un enlace internucleotídico de referencia que comprende un enlace fosfodiéster. En algunas modalidades, un nucleótido modificado es un enlace que no se produce de forma natural. Típicamente, un enlace internucleotídico modificado confiere una o más propiedades convenientes a un ácido nucleico en el que está presente el enlace internucleotídico modificado. Por ejemplo, un enlace internucleotídico modificado puede mejorar la estabilidad térmica, la resistencia a la degradación, la resistencia a las nucleasas, la solubilidad, la biodisponibilidad, la bioactividad, la inmunogenicidad reducida, etc.

Como se usa en la presente descripción, “nucleótido modificado” se refiere a un nucleótido que tiene una o más modificaciones químicas cuando se compara con un nucleótido de referencia correspondiente que se selecciona de: ribonucleótido de adenina, ribonucleótido de guanina, ribonucleótido de citosina, ribonucleótido de uracilo, desoxirribonucleótido de adenina, desoxirribonucleótido de guanina, desoxirribonucleótido de citosina y desoxirribonucleótido de timidina. En algunas modalidades, un nucleótido modificado es un nucleótido de origen no natural. En algunas modalidades, un nucleótido modificado tiene una o más modificaciones químicas en su azúcar, nucleobase y/o grupo fosfato. En algunas modalidades, un nucleótido modificado tiene uno o más restos químicos conjugados con un nucleótido de referencia correspondiente. Típicamente, un nucleótido modificado confiere una o más propiedades convenientes a un ácido nucleico en el que está presente el nucleótido modificado. Por ejemplo, un nucleótido modificado puede mejorar la estabilidad térmica, la resistencia a la degradación, la resistencia a las nucleasas, la solubilidad, la biodisponibilidad, la bioactividad, la inmunogenicidad reducida, etc. Cuando se refiere a un oligonucleótido que se modifica, puede entenderse que se refiere a un oligonucleótido que comprende al menos un nucleótido modificado en el mismo. Cuando se refiere a un oligonucleótido que se modifica completamente, puede entenderse que se refiere a un oligonucleótido en donde todos los nucleótidos en el mismo son nucleótidos modificados. Dichos nucleótidos modificados no necesitan comprender las mismas modificaciones.

Como se usa en la presente descripción, "estructura de tetralazo con mella" se refiere a una estructura de un oligonucleótido de ARNi que se caracteriza por hebras sentido (pasajera) y antisentido (guía) separadas, en las que la hebra sentido tiene una región de complementariedad con la hebra antisentido, y en donde al menos una de las hebras, generalmente la hebra sentido, tiene un tetralazo configurado para estabilizar una región de tallo adyacente formada dentro de al menos una hebra. Se dice que la estructura tiene una mella por una discontinuidad entre la hebra principal de la hebra sentido y antisentido, típicamente por una discontinuidad entre los azúcares de pentosa de los nucleótidos adyacentes de las hebras sentido y antisentido. Una “estructura con mella” puede referirse generalmente con esta misma definición cuando el lazo puede ser o no un tetralazo (por ejemplo, uno puede referirse a una estructura con mella cuando la hebra sentido forma un trilazo, tetralazo u otro tipo de lazo como se describe en la presente descripción).

Como se usa en la presente descripción, "oligonucleótido" se refiere a un ácido nucleico corto (por ejemplo, menos de aproximadamente 100 nucleótidos de longitud). Un oligonucleótido puede ser monocatenario (mc) o bicatenario (bc). Un oligonucleótido puede comprender desoxirribonucleósidos, ribonucleósidos, o una combinación de ambos. En algunas modalidades, un oligonucleótido bicatenario que comprende ribonucleósidos se denomina “ARNbc”. Un oligonucleótido puede tener o no regiones híbridas. Como un conjunto de ejemplos no limitantes, un oligonucleótido puede ser, pero no se limita a, un ARN de interferencia pequeño (ARNip), microARN (miARN), ARN de horquilla corto (ARNhc),

ARN de interferencia de sustrato de dicer (DsiARN), oligonucleótido antisentido, ARNip corto o ARNip mc.

Como se usa en la presente descripción, "saliente" se refiere a nucleótido(s) terminal(es) sin apareamiento de bases que resulta de una hebra o región que se extiende más allá del extremo terminal de una hebra complementaria con la que la hebra o región forma un híbrido. En algunas modalidades, un saliente comprende uno o más nucleótidos desapareados que se extienden desde una región híbrida en (o cerca de) el extremo terminal 5' o el extremo terminal 3' de un oligonucleótido. En determinadas modalidades, el saliente es un saliente 3' o 5' en la hebra antisentido o hebra sentido de un oligonucleótido.

Como se usa en la presente descripción, las características pueden describirse como proporcionadas "en", "sobre" o "en" el extremo 3' o extremo 5' de una hebra. Se entiende que las características que se describen de los nucleótidos en un extremo de la hebra dada, tales como modificaciones de azúcar, modificaciones internucleótidos, errores de apareamiento de nucleótidos y salientes, por ejemplo, se refieren al/a los nucleótido(s) de esa hebra cerca del extremo de la hebra definido (por ejemplo, en el extremo 3' de la hebra sentido).

Como se usa en la presente descripción, "análogo de fosfato" se refiere a un resto químico que imita las propiedades electrostáticas y/o estéricas de un grupo fosfato. En algunas modalidades, el análogo de fosfato imita las propiedades electrostáticas y/o estéricas de un grupo fosfato en sistemas biológicos. En algunas modalidades, un análogo de fosfato se ubica en el nucleótido del extremo 5' terminal de un oligonucleótido en lugar de un fosfato 5', que a menudo es susceptible de eliminación enzimática. En algunas modalidades, un análogo de fosfato 5' contiene un enlace resistente a la fosfatasa. Los ejemplos de análogos de fosfato incluyen, pero no se limitan a, 5' fosfonatos, tal como 5' metileno fosfonato (5'-MP) y 5'-(E)-vinilfosfonato (5'-VP). En algunas modalidades, un oligonucleótido tiene un análogo de fosfato en una posición de carbono 4' del azúcar (denominado "análogo de 4'-fosfato") en un nucleótido del extremo 5' terminal. Un ejemplo de un análogo de 4'-fosfato es el oximetilfosfonato, en el que el átomo de oxígeno del grupo oximetilo se une al resto de azúcar (por ejemplo, en su carbono 4') o análogo de este. Ver, por ejemplo, la publicación de patente de Estados Unidos núm. 2019-0177729. Se han desarrollado otras modificaciones para el extremo terminal 5' de los oligonucleótidos (ver, por ejemplo, la solicitud de patente internacional núm. WO 2011/133871; patente de Estados Unidos núm. 8,927,513; y Prakash y otros (2015) NUCLEIC ACIDS RES. 43:2993-3011).

Como se usa en la presente descripción, "expresión reducida" de un gen (por ejemplo, *TMPRSS6*) se refiere a una disminución en la cantidad o nivel del transcritto de ARN (por ejemplo, ARNm de *TMPRSS6*) o la proteína codificada por el gen y/o una disminución en la cantidad o nivel de actividad del gen en una célula, una población de células, una muestra o un sujeto, cuando se compara con una referencia apropiada (por ejemplo, una célula, población de células, muestra o sujeto de referencia). Por ejemplo, el acto de poner en contacto una célula con un oligonucleótido en la presente descripción (por ejemplo, un

oligonucleótido que comprende una hebra antisentido que tiene una secuencia de nucleótidos que es complementaria a una secuencia de nucleótidos que comprende el ARNm de *TMPRSS6*) puede resultar en una disminución en la cantidad o nivel de ARNm de *TMPRSS6*, proteína y/o actividad de matriptasa-2 (por ejemplo, mediante degradación del ARNm de *TMPRSS6* por la vía de ARNi) cuando se compara con una célula que no se trata con el oligonucleótido. De manera similar, y como se usa en la presente descripción, “reducir la expresión” se refiere a un acto que da como resultado una expresión reducida de un gen (por ejemplo, *TMPRSS6*).

Como se usa en la presente descripción, “reducción de la expresión de *TMPRSS6*” se refiere a una disminución en la cantidad o nivel de ARNm de *TMPRSS6*, proteína matriptasa-2 y/o actividad de matriptasa-2 en una célula, una población de células, una muestra o un sujeto cuando se compara con una referencia apropiada (por ejemplo, una célula de referencia, una población de células, una muestra o un sujeto).

Como se usa en la presente descripción, “región de complementariedad” se refiere a una secuencia de nucleótidos de un ácido nucleico (por ejemplo, un oligonucleótido) que es suficientemente complementaria a una secuencia antiparalela de nucleótidos para permitir la hibridación entre las dos secuencias de nucleótidos bajo condiciones de hibridación apropiadas (por ejemplo, en un tampón de fosfato, en una célula, etc.). En algunas modalidades, un oligonucleótido en la presente descripción comprende una secuencia de direccionamiento que tiene una región de complementariedad a una secuencia diana de ARNm. Una región de complementariedad puede ser de una longitud dada e identificarse por un número de nucleótidos contiguos (por ejemplo, al menos 15 nucleótidos contiguos de longitud), con referencia a un número de nucleótidos unidos de manera contigua entre sí a través de enlaces internucleótidos.

Como se usa en la presente descripción, “ribonucleótido” se refiere a un nucleótido que tiene una ribosa como su azúcar pentosa, que contiene un grupo hidroxilo en su posición 2'. Un ribonucleótido modificado es un ribonucleótido que tiene una o más modificaciones o sustituciones de átomos distintos de los de la posición 2', que incluyen modificaciones o sustituciones en o de la ribosa, el grupo fosfato o la base.

Como se usa en la presente descripción, “oligonucleótido de ARNi” se refiere a (a) un oligonucleótido bicatenario que tiene una hebra sentido (pasajera) y una hebra antisentido (guía), en donde la hebra antisentido o parte de la hebra antisentido se usa por la endonucleasa *Argonaute 2* (Ago2) en la escisión de un ARNm diana (por ejemplo, ARNm de *TMPRSS6*) o (b) un oligonucleótido monocatenario que tiene una sola hebra antisentido, donde esa hebra antisentido (o parte de esa hebra antisentido) se usa por la endonucleasa Ago2 en la escisión de un ARNm diana (por ejemplo, ARNm de *TMPRSS6*).

Como se usa en la presente descripción, “hebra” se refiere a una única secuencia contigua de nucleótidos unidos entre sí a través de enlaces internucleotídicos (por ejemplo, enlaces fosfodiéster o enlaces fosforotioato). En algunas modalidades, una hebra tiene dos extremos libres (por ejemplo, un extremo 5' y un extremo 3').

Como se usa en la presente descripción, “sujeto” significa cualquier mamífero, que incluye ratones, conejos, primates no humanos (NHP) y seres humanos. En una modalidad, el sujeto es un ser humano o NHP. Además, “individuo” o “paciente” pueden usarse indistintamente con “sujeto.”

5 Como se usa en la presente descripción, "sintético" se refiere a un ácido nucleico u otra molécula que se sintetiza artificialmente (por ejemplo, mediante el uso de una máquina (por ejemplo, un sintetizador de ácido nucleico de estado sólido)) o que de cualquier otra manera no derive de una fuente natural (por ejemplo, una célula u organismo) que normalmente produce la molécula.

10 Como se usa en la presente descripción, "ligando de direccionamiento" se refiere a una molécula (por ejemplo, un carbohidrato, aminoazúcar, colesterol, polipéptido o lípido tal como por ejemplo un resto de GalNAc) que se une selectivamente a una molécula similar (por ejemplo, un receptor) de un tejido o célula de interés y que puede conjugarse con otra sustancia con el propósito de dirigir la otra sustancia al tejido o célula de interés. Por ejemplo,
15 en algunas modalidades, un ligando de direccionamiento puede conjugarse con un oligonucleótido con el propósito de dirigir el oligonucleótido a un tejido o célula específicos de interés. En algunas modalidades, un ligando de direccionamiento se une selectivamente a un receptor de la superficie celular. En consecuencia, en algunas modalidades, un ligando de direccionamiento cuando se conjuga con un oligonucleótido facilita el suministro del
20 oligonucleótido en una célula particular a través de la unión selectiva a un receptor que se expresa en la superficie de la célula y la internalización endosómica del complejo que comprende el oligonucleótido, el ligando de direccionamiento y el receptor en la célula. En algunas modalidades, un ligando de direccionamiento se conjuga con un oligonucleótido mediante un enlazador que se escinde después o durante la internalización celular de manera
25 que el oligonucleótido se libera del ligando de direccionamiento en la célula.

Como se usa en la presente descripción, “secuencia diana” se refiere a una porción contigua de la secuencia de nucleótidos de una molécula de ARNm formada durante la transcripción de un gen *TMPRSS6* (por ejemplo, las SEQ ID NO: 853, 854 y 855) que incluye ARNm que es un producto del procesamiento del ARN de un producto de transcripción primario. En
30 algunas modalidades, la porción diana de la secuencia será al menos lo suficientemente larga como para servir como sustrato para la escisión dirigida por ARNi en o cerca de esa porción de la secuencia de nucleótidos de una molécula de ARNm formada durante la transcripción de un gen *TMPRSS6*. En algunas modalidades, la secuencia diana está dentro de la región codificante de proteínas del gen *TMPRSS6*. En algunas modalidades, la secuencia diana está
35 dentro de la UTR 3’ del gen *TMPRSS6*.

Como se usa en la presente descripción, “secuencia de direccionamiento” se refiere a una secuencia de nucleótidos que es total o parcialmente complementaria a una secuencia diana. Como se usa en la presente descripción, “lazo”, “trilazo”, o “tetralazo” se refiere a una región desapareada de un ácido nucleico (por ejemplo, oligonucleótido) que está flanqueada por dos
40 regiones antiparalelas del ácido nucleico que son suficientemente complementarias entre sí,

de manera que bajo condiciones de hibridación adecuadas (por ejemplo, en un tampón de fosfato, en una célula), las dos regiones antiparalelas, que flanquean la región desapareada, hibridan para formar un híbrido (que se denomina “tallo”). Un lazo aumenta la estabilidad de un híbrido adyacente formado por hibridación de secuencias flanqueantes de nucleótidos. El

5 aumento de la estabilidad es detectable como un aumento de la temperatura de fusión (T_m) de un híbrido con tallo adyacente que es más alta que la T_m del híbrido con tallo adyacente que se espera, en promedio, de un conjunto de lazos de longitud comparable que consiste en secuencias de nucleótidos seleccionadas al azar. Por ejemplo, un lazo (por ejemplo, tetralazo o trilazo) puede conferir una T_m de al menos aproximadamente 50 °C, al menos

10 aproximadamente 55 °C, al menos aproximadamente 56 °C, al menos aproximadamente 58 °C, al menos aproximadamente 60 °C, al menos aproximadamente 65 °C o al menos aproximadamente 75 °C en Na_2HPO_4 10 mM a una horquilla que comprende un híbrido de al menos 2 pares de bases (pb) de longitud. En algunas modalidades, un tetralazo puede conferir una T_m de al menos aproximadamente 50 °C, al menos aproximadamente 55 °C, al

15 menos aproximadamente 56 °C, al menos aproximadamente 58 °C, al menos aproximadamente 60 °C, al menos aproximadamente 65 °C o al menos aproximadamente 75 °C en NaH_2PO_4 10 mM a una horquilla que comprende un híbrido de al menos 2 pares de bases (pb) de longitud. En algunas modalidades, un lazo puede estabilizar un pb en un híbrido con tallo adyacente mediante interacciones de apilamiento. Además, las interacciones entre

20 los nucleótidos en un lazo incluyen, pero no se limitan a, apareamiento de bases no Watson-Crick, interacciones de apilamiento, enlaces de hidrógeno e interacciones de contacto (Cheong y otros. (1990) *Nature* 346:680-82; Heus y Pardi (1991) *Science* 253:191-94). En algunas modalidades, un lazo comprende o consiste de 3 a 6 nucleótidos y típicamente tiene de 4 a 5 nucleótidos. En determinadas modalidades, un lazo comprende o consiste de 3, 4, 5

25 o 6 nucleótidos, que pueden o no estar modificados (por ejemplo, que pueden o no estar conjugados con un resto de direccionamiento/ligando de direccionamiento). En una modalidad, un lazo que consiste de 3 nucleótidos es un trilazo. En una modalidad, un lazo que consiste de 4 nucleótidos es un tetralazo. Puede usarse cualquier nucleótido en el tetralazo y los símbolos IUPAC-IUB estándar para tales nucleótidos pueden usarse como se

30 describió en Cornish-Bowden (1985) *Nucleic Acids Res.* 13:3021-30. Por ejemplo, la letra “N” puede usarse para indicar que cualquier base puede estar en esa posición, la letra “R” puede usarse para mostrar que A (adenina) o G (guanina) pueden estar en esa posición, y “B” puede usarse para mostrar que C (citocina), G (guanina) o T (timina) pueden estar en esa posición. Los ejemplos de tetralazos incluyen la familia de tetralazos UNCG (por ejemplo,

35 UUCG), la familia GNRA de tetralazos (por ejemplo, GAAA) y el tetralazo CUUG (Woese y otros (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:8467-71; Antao y otros (1991) *Nucleic Acids Res.* 19:5901-05). Ejemplos de tetralazos de ADN incluyen la familia de tetralazos d(GNNA) (por ejemplo, d(GTTA), la familia de tetralazos d(GNRA)), la familia de tetralazos d(GNAB), la familia de tetralazos d(CNNG) y la familia de tetralazos d(TNCG) (por

40 ejemplo, d(TTCG)). Ver, por ejemplo, Nakano y otros. (2002) *Biochem.* 41:14281-92; Shinji

- y otros (2000) Nippon Kagakkai Koen Yokoshu 78:731. En algunas modalidades, el tetralazo está contenido dentro de una estructura de tetralazo con muesca.
- Como se usa en la presente descripción, “tratar” o “tratamiento” se refiere al acto de proporcionar atención a un sujeto que lo necesita, por ejemplo, mediante la administración de un agente terapéutico (por ejemplo, un oligonucleótido en la presente descripción) al sujeto, con el propósito de mejorar la salud y/o el bienestar del sujeto con respecto a una afección existente (por ejemplo, una enfermedad, trastorno) o para prevenir o disminuir la posibilidad de que ocurra una afección. En algunas modalidades, el tratamiento implica reducir la frecuencia o la gravedad de al menos un signo, síntoma o factor contribuyente de una afección (por ejemplo, enfermedad, trastorno) que experimenta un sujeto.
- “Farmacéuticamente aceptable” indica que la sustancia o composición debe ser química y/o toxicológicamente adecuada para el tratamiento de mamíferos.
- Como se usa en la presente descripción, el símbolo $\bowtie$ se usa para describir un punto de acoplamiento.
- 15 Lista de modalidades adicionales de la invención
1. Un oligonucleótido de ARNi para reducir la expresión de serina proteasa transmembrana 6 (*TMPRSS6*), el oligonucleótido comprende una hebra sentido y una hebra antisentido, en donde la hebra sentido y la hebra antisentido forman una región híbrida, en donde la hebra antisentido comprende una región de complementariedad con una secuencia diana de ARNm de *TMPRSS6* de cualquiera de las SEQ ID NO: 661-852, y en donde la región de complementariedad es de al menos 15 nucleótidos contiguos de longitud.
 2. Un oligonucleótido de ARNi para reducir la expresión de serina proteasa transmembrana 6 (*TMPRSS6*), el oligonucleótido comprende una hebra sentido y una hebra antisentido que forman una región híbrida, en donde la hebra antisentido comprende una región de complementariedad con una secuencia diana de ARNm de *TMPRSS6* como se establece en cualquiera de las SEQ ID NO: 661-852, y en donde la región de complementariedad es de al menos 15 nucleótidos contiguos de longitud.
 3. El oligonucleótido de ARNi de acuerdo con la modalidad 1 o 2, en donde la hebra sentido es de 15 a 50 nucleótidos de longitud.
 - 30 4. El oligonucleótido de ARNi de acuerdo con una cualquiera de las modalidades precedentes, en donde la hebra sentido es de 18 a 36 nucleótidos de longitud.
 5. El oligonucleótido de ARNi de acuerdo con una cualquiera de las modalidades precedentes, en donde la hebra antisentido es de 15 a 30 nucleótidos de longitud.
 6. El oligonucleótido de ARNi de acuerdo con una cualquiera de las modalidades precedentes, en donde la hebra antisentido es de 22 nucleótidos de longitud y en donde la hebra antisentido y la hebra sentido forman una región híbrida de al menos 19 nucleótidos de longitud, opcionalmente de al menos 20 nucleótidos de longitud.
 - 35 7. El oligonucleótido de ARNi de acuerdo con una cualquiera de las modalidades precedentes, en donde la hebra antisentido es de 22 nucleótidos de longitud y en donde la

- hebra antisentido y la hebra sentido forman una región híbrida de al menos 20 nucleótidos de longitud.
8. El oligonucleótido de ARNi de acuerdo con una cualquiera de las modalidades precedentes, en donde la región de complementariedad es de al menos 18 nucleótidos contiguos de longitud, opcionalmente la región de complementariedad es de al menos 19 nucleótidos contiguos de longitud.
9. El oligonucleótido de ARNi de acuerdo con una cualquiera de las modalidades precedentes, en donde la región de complementariedad es de al menos 19 nucleótidos contiguos de longitud.
10. El oligonucleótido de ARNi de acuerdo con una cualquiera de las modalidades precedentes, en donde la región de complementariedad es de al menos 19 nucleótidos contiguos de longitud.
11. El oligonucleótido de ARNi de acuerdo con una cualquiera de las modalidades precedentes, en donde la región de complementariedad es de al menos 20 nucleótidos contiguos de longitud.
12. Un oligonucleótido de ARNi bicatenario para reducir la expresión de *TMPRSS6*, el oligonucleótido comprende:
- (i) una hebra antisentido de 19-30 nucleótidos de longitud, en donde la hebra antisentido comprende una secuencia de nucleótidos que comprende una región de complementariedad con una secuencia diana de ARNm de *TMPRSS6*, en donde la región de complementariedad se selecciona de SEQ ID NO: 1-192, y
- (ii) una hebra sentido de 19-50 nucleótidos de longitud que comprende una región de complementariedad con la hebra antisentido, en donde las hebras antisentido y sentido son hebras separadas que forman una región híbrida asimétrica que tiene un saliente de 1-4 nucleótidos en el extremo terminal 3' de la hebra antisentido.
13. El oligonucleótido de ARNi de acuerdo con una cualquiera de las modalidades precedentes, en donde el extremo 3' de la hebra sentido comprende un tallo-lazo establecido como S1-Lp-S2, en donde S1 es complementario con S2 y en donde Lp forma un lazo entre S1 y S2 de 3-5 nucleótidos de longitud.
14. El oligonucleótido de ARNi de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-12, en donde la hebra sentido comprende un tallo-lazo establecido como S1-Lp-S2 cerca del extremo 3', en donde S1 es complementario con S2 y en donde Lp forma un lazo de 3-5 nucleótidos de longitud entre S1 y S2.
15. El oligonucleótido de ARNi de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-12, en donde la hebra sentido cerca del extremo 3' comprende un tallo-lazo establecido como S1-Lp-S2, en donde S1 es complementario con S2 y en donde Lp forma un lazo de 3-5 nucleótidos de longitud entre S1 y S2.
16. El oligonucleótido de ARNi de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 13-15, en donde Lp es un trilazo o un tetralazo.

17. El oligonucleótido de ARNi de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 13-16, en donde Lp es un tetralazo.
18. El oligonucleótido de ARNi de acuerdo con la modalidad 17, en donde el tetralazo comprende la secuencia 5'-GAAA-3'.
- 5 19. El oligonucleótido de ARNi de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 13-18, en donde el lazo es un tetralazo que comprende la secuencia 5'-GAAA-3'.
20. El oligonucleótido de ARNi de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 13-19, en donde S1 y S2 tienen 1 nucleótido, 2 nucleótidos, 3 nucleótidos, 4 nucleótidos, 5 nucleótidos, 6 nucleótidos, 7 nucleótidos, 8 nucleótidos, 9 nucleótidos o 10 nucleótidos de longitud.
- 10 21. El oligonucleótido de ARNi de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 13-19, en donde S1 y S2 tienen 1 nucleótido, 2 nucleótidos, 3 nucleótidos, 4 nucleótidos, 5 nucleótidos, 6 nucleótidos, 7 nucleótidos, 8 nucleótidos, 9 nucleótidos o 10 nucleótidos de longitud.
- 15 22. El oligonucleótido de ARNi de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 13-21, en donde S1 y S2 tienen de 1-10 nucleótidos de longitud.
23. El oligonucleótido de ARNi de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 13-22, en donde S1 y S2 tiene 6 nucleótidos de longitud.
24. El oligonucleótido de ARNi de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 13-23, en donde el tallo-lazo comprende la secuencia 5'-GCAGCCGAAAGGCUGC-3' (SEQ ID NO: 856).
- 20 25. El oligonucleótido de ARNi de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 13-24, en donde se forma una discontinuidad entre la hebra sentido y la hebra antisentido, formando una estructura con mella.
- 25 26. El oligonucleótido de ARNi de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 13-25, en donde se forma una discontinuidad entre la hebra sentido y la hebra antisentido, formando una estructura de tetralazo con mella.
27. El oligonucleótido de ARNi de acuerdo con una cualquiera de las modalidades precedentes, en donde la hebra antisentido comprende una secuencia saliente en 3' de uno o más nucleótidos de longitud.
- 30 28. El oligonucleótido de ARNi de acuerdo con la modalidad 27, en donde el saliente comprende nucleótidos de purina.
29. El oligonucleótido de ARNi de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 27-28, en donde la secuencia saliente en 3' es de 2 nucleótidos de longitud.
- 35 30. El oligonucleótido de ARNi de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 27-29, en donde el saliente 3' se selecciona de AA, GG, AG y GA.
31. El oligonucleótido de ARNi de acuerdo con la modalidad 30, en donde el saliente es GG o AA.
32. El oligonucleótido de ARNi de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 30-31, en donde el saliente es GG.
- 40

33. El oligonucleótido de ARNi de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 27-29, en donde el saliente 3' se selecciona de 5'-AA-3', 5'-GG-3', 5'-AG-3' y 5'-GA-3'.
34. El oligonucleótido de ARNi de acuerdo con la modalidad 33, en donde el saliente es 5'-GG-3' o 5'-AA-3'.
- 5 35. El oligonucleótido de ARNi de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 33-34, en donde el saliente es 5'-GG-3'.
36. El oligonucleótido de ARNi de acuerdo con una cualquiera de las modalidades precedentes, en donde el oligonucleótido comprende al menos un nucleótido modificado.
37. El oligonucleótido de ARNi de acuerdo con una cualquiera de las modalidades
10 precedentes, en donde el oligonucleótido está totalmente modificado.
38. El oligonucleótido de ARNi de acuerdo con una cualquiera de las modalidades precedentes, en donde todos los nucleótidos del oligonucleótido son nucleótidos modificados.
39. El oligonucleótido de ARNi de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-36, en
15 donde el oligonucleótido está parcialmente modificado.
40. El oligonucleótido de ARNi de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 36-39, en donde el oligonucleótido modificado comprende un nucleótido conjugado con ligando de direccionamiento.
41. El oligonucleótido de ARNi de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 36-40,
20 en donde el nucleótido modificado comprende un nucleótido conjugado con ligando de direccionamiento.
42. El oligonucleótido de ARNi de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 36-41, en donde el oligonucleótido comprende una modificación 2'.
43. El oligonucleótido de ARNi de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 36-42,
25 en donde el nucleótido modificado comprende una modificación 2'.
44. El oligonucleótido de ARNi de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 42-43, en donde la modificación 2' es una modificación que se selecciona de 2'-aminoetilo, 2'-flúor, 2'-O-metilo, 2'-O-metoxietilo y ácido 2'-desoxi-2'-fluoro-β-d-arabinonucleico.
45. El oligonucleótido de ARNi de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 42-44,
30 en donde la modificación 2' se selecciona de 2'-flúor (2'-F) y 2'-O-metilo (2'-OMe).
46. El oligonucleótido de ARNi de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 36-45, en donde la modificación es una modificación 2' que se selecciona de 2'-flúor (2'-F) y 2'-O-metilo (2'-OMe).
47. El oligonucleótido de ARNi de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 36-46,
35 en donde aproximadamente 10-15 %, 10 %, 11 %, 12 %, 13 %, 14 % o 15 % de los nucleótidos de la hebra sentido comprenden una modificación 2'-flúor (2'-F).
48. El oligonucleótido de ARNi de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 36-47, en donde aproximadamente 25-35 %, 25 %, 26 %, 27 %, 28 %, 29 %, 30 %, 31 %, 32 %, 33 %, 34 % o 35 % de los nucleótidos de la hebra antisentido comprenden una modificación 2'-
40 flúor (2'-F).

49. El oligonucleótido de ARNi de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 36-48, en donde aproximadamente 25-35 %, 25 %, 26 %, 27 %, 28 %, 29 %, 30 %, 31 %, 32 %, 33 %, 34 % o 35 % de los nucleótidos del oligonucleótido comprenden una modificación 2'-flúor (2'-F).
- 5 50. El oligonucleótido de ARNi de acuerdo con una cualquiera de las modalidades precedentes, en donde la hebra sentido comprende 36 nucleótidos con las posiciones 1-36 de 5' a 3', en donde las posiciones 8-11 comprenden una modificación 2'-flúor (2'-F).
51. El oligonucleótido de ARNi de acuerdo con una cualquiera de las modalidades precedentes, en donde
- 10 la hebra sentido comprende 36 nucleótidos, numerados de 5' a 3'; y
todas las posiciones 8-11 de la hebra sentido comprenden una modificación 2'-flúor (2'-F).
52. El oligonucleótido de ARNi de acuerdo con una cualquiera de las modalidades precedentes, en donde
la hebra sentido tiene 36 nucleótidos de longitud, numerados de 5' a 3'; y
- 15 todas las posiciones 8-11 de la hebra sentido comprenden una modificación 2'-flúor (2'-F).
53. El oligonucleótido de ARNi de acuerdo con una cualquiera de las modalidades precedentes, en donde la hebra antisentido comprende 22 nucleótidos con las posiciones 1-22 de 5' a 3', y en donde las posiciones 2, 3, 4, 5, 7, 10 y 14 comprenden una modificación 2'-flúor (2'-F).
- 20 54. El oligonucleótido de ARNi de acuerdo con una cualquiera de las modalidades precedentes, en donde
la hebra antisentido comprende 22 nucleótidos, numerados de 5' a 3'; y
todas las posiciones 2, 3, 4, 5, 7, 10 y 14 de la hebra antisentido comprenden una modificación 2'-flúor (2'-F).
- 25 55. El oligonucleótido de ARNi de acuerdo con una cualquiera de las modalidades precedentes, en donde
la hebra antisentido tiene 22 nucleótidos de longitud, numerados de 5' a 3'; y
todas las posiciones 2, 3, 4, 5, 7, 10 y 14 de la hebra antisentido comprenden una modificación 2'-flúor (2'-F).
- 30 56. El oligonucleótido de ARNi de acuerdo con una cualquiera de las modalidades precedentes, en donde la hebra sentido comprende 36 nucleótidos con las posiciones 1-36 de 5' a 3', y en donde las posiciones 1-7, 12-27, y 31-36 comprenden una modificación 2'-O-metilo.
57. El oligonucleótido de ARNi de acuerdo con una cualquiera de las modalidades
- 35 precedentes, en donde
la hebra sentido comprende 36 nucleótidos, numerados de 5' a 3'; y
todas las posiciones 1-7, 12-27 y 31-36 de la hebra sentido comprenden una modificación 2'-O-metilo.
58. El oligonucleótido de ARNi de acuerdo con una cualquiera de las modalidades
- 40 precedentes, en donde

- la hebra sentido tiene 36 nucleótidos de longitud, numerados de 5' a 3'; y todas las posiciones 1-7, 12-27 y 31-36 de la hebra sentido comprenden una modificación 2'-O-metilo.
59. El oligonucleótido de ARNi de acuerdo con una cualquiera de las modalidades precedentes, en donde la hebra antisentido comprende 22 nucleótidos con las posiciones 1-22 de 5' a 3', y en donde las posiciones 1, 6, 8, 9, 11-13, y 15-22 comprenden una modificación 2'-O-metilo.
60. El oligonucleótido de ARNi de acuerdo con una cualquiera de las modalidades precedentes, en donde
- 10 la hebra antisentido comprende 22 nucleótidos, numerados de 5' a 3'; y todas las posiciones 1, 6, 8, 9, 11-13 y 15-22 de la hebra antisentido comprenden una modificación 2'-O-metilo.
61. El oligonucleótido de ARNi de acuerdo con una cualquiera de las modalidades precedentes, en donde
- 15 la hebra antisentido tiene 22 nucleótidos de longitud, numerados de 5' a 3'; y todas las posiciones 1, 6, 8, 9, 11-13 y 15-22 de la hebra antisentido comprenden una modificación 2'-O-metilo.
62. El oligonucleótido de ARNi de acuerdo con una cualquiera de las modalidades precedentes, en donde
- 20 la hebra sentido comprende 36 nucleótidos y la hebra antisentido comprende 22 nucleótidos, los nucleótidos de cada una de las hebras se numeran de 5' a 3'; todas las posiciones 1-7, 12-27 y 31-36 de la hebra sentido y las posiciones 1, 6, 8, 9, 11-13 y 15-22 de la hebra antisentido comprenden una modificación 2'-O-metilo; y todas las posiciones 8-11 de la hebra sentido y 2, 3, 4, 5, 7, 10 y 14 de la hebra antisentido
- 25 comprenden una modificación 2'-flúor.
63. El oligonucleótido de ARNi de acuerdo con una cualquiera de las modalidades precedentes, en donde el oligonucleótido comprende al menos un enlace internucleotídico modificado.
64. El oligonucleótido de ARNi de acuerdo con la modalidad 63, en donde al menos un
- 30 enlace internucleotídico modificado es un enlace fosforotioato.
65. El oligonucleótido de ARNi de acuerdo con una cualquiera de las modalidades precedentes, el oligonucleótido comprende al menos un enlace fosforotioato.
66. El oligonucleótido de ARNi de acuerdo con una cualquiera de las modalidades precedentes, en donde la hebra antisentido comprende un enlace fosforotioato (i) entre las
- 35 posiciones 1 y 2, y entre las posiciones 2 y 3; o (ii) entre las posiciones 1 y 2, entre las posiciones 2 y 3, y entre las posiciones 3 y 4, en donde las posiciones están numeradas 1-4 de 5' a 3'.
67. El oligonucleótido de ARNi de acuerdo con una cualquiera de las modalidades precedentes, en donde la hebra antisentido es de 22 nucleótidos de longitud, y en donde la

- hebra antisentido comprende un enlace fosforotioato entre las posiciones 20 y 21 y entre las posiciones 21 y 22, en donde las posiciones están numeradas 1-22 de 5' a 3'.
68. El oligonucleótido de ARNi de acuerdo con una cualquiera de las modalidades precedentes, en donde
- 5 la hebra antisentido comprende 22 nucleótidos, numerados de 5' a 3'; y se proporciona un enlace fosforotioato entre las posiciones 1 y 2, entre las posiciones 2 y 3; y entre las posiciones 3 y 4, entre las posiciones 20 y 21 y entre las posiciones 21 y 22 de la hebra antisentido.
69. El oligonucleótido de ARNi de acuerdo con una cualquiera de las modalidades precedentes, en donde la hebra sentido comprende un enlace fosforotioato entre las
- 10 posiciones 1 y 2, en donde las posiciones se numeran de 5' a 3'.
70. El oligonucleótido de ARNi de acuerdo con una cualquiera de las modalidades precedentes, en donde
- la hebra antisentido comprende 22 nucleótidos;
- 15 los nucleótidos de cada una de las hebras se numeran de 5' a 3'; se proporciona un enlace fosforotioato entre las posiciones 1 y 2 de la hebra sentido, y entre las posiciones 1 y 2, entre las posiciones 2 y 3; y entre las posiciones 3 y 4, entre las posiciones 20 y 21 y entre las posiciones 21 y 22 de la hebra antisentido.
71. El oligonucleótido de ARNi de acuerdo con una cualquiera de las modalidades precedentes, en donde el carbono 4' del azúcar del nucleótido 5' de la hebra antisentido
- 20 comprende un análogo de fosfato.
72. El oligonucleótido de ARNi de acuerdo con la modalidad 71, en donde el análogo de fosfato es oximetilfosfonato, vinilfosfonato o malonilfosfonato, opcionalmente en donde el análogo de fosfato es un análogo de 4'-fosfato que comprende 4'-oximetilfosfonato.
- 25 73. El oligonucleótido de ARNi de acuerdo con una cualquiera de las modalidades precedentes, en donde el nucleótido 5'-terminal de la hebra antisentido comprende una estructura de acuerdo con la sustancia química 1a (MeFosfonato-4O-mU).
74. El oligonucleótido de ARNi de acuerdo con una cualquiera de las modalidades precedentes, en donde al menos un nucleótido del oligonucleótido se conjuga con uno o más
- 30 ligandos de direccionamiento.
75. El oligonucleótido de ARNi de acuerdo con la modalidad 74, en donde cada ligando de direccionamiento comprende un carbohidrato, aminoazúcar, colesterol, o polipéptido.
76. El oligonucleótido de ARNi de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 13-75, en donde el tallo-lazo comprende uno o más ligandos de direccionamiento conjugados con
- 35 uno o más nucleótidos del tallo-lazo.
77. El oligonucleótido de ARNi de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 74-76, en donde el uno o más ligandos de direccionamiento se conjugan con uno o más nucleótidos del lazo.
78. El oligonucleótido de ARNi de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 13-77,
- 40 en donde el lazo (Lp) comprende 4 nucleótidos numerados 1-4 de 5' a 3', en donde cada uno

- de los nucleótidos en las posiciones 2, 3 y 4 comprende uno o más ligandos de direccionamiento, en donde los ligandos de direccionamiento son iguales o diferentes.
79. El oligonucleótido de ARNi de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 74-78, en donde cada ligando de direccionamiento comprende un resto de N-acetilgalactosamina (GalNAc).
80. El oligonucleótido de ARNi de acuerdo con la modalidad 79, en donde el resto GalNAc es un resto GalNAc monovalente, un resto GalNAc bivalente, un resto GalNAc trivalente o un resto GalNAc tetravalente.
81. El oligonucleótido de ARNi de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 79-80, en donde el resto GalNAc es un resto GalNAc monovalente.
82. El oligonucleótido de ARNi de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 13-81, en donde hasta 4 nucleótidos de Lp del tallo-lazo se conjugan cada uno con un resto GalNAc monovalente.
83. El oligonucleótido de ARNi de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 13-82, en donde el lazo Lp es de 4 nucleótidos de longitud numerados 1-4 de 5' a 3', en donde los nucleótidos del lazo Lp en las posiciones 2, 3 y 4 se conjugan cada uno con un resto de N-acetilgalactosamina (GalNAc) monovalente.
84. El oligonucleótido de ARNi de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 13-82, en donde el lazo Lp es de 4 nucleótidos de longitud, y en donde el segundo, tercer y cuarto nucleótidos del lazo Lp de 5' a 3' se conjugan cada uno a un resto de N-acetilgalactosamina (GalNAc) monovalente.
85. El oligonucleótido de ARNi de acuerdo con una cualquiera de las modalidades precedentes, en donde la región de complementariedad es totalmente complementaria a la secuencia diana del ARNm.
86. El oligonucleótido de ARNi de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-84, en donde la región de complementariedad es parcialmente complementaria a la secuencia diana del ARNm.
87. El oligonucleótido de ARNi de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-84 y 86, en donde la región de complementariedad comprende no más de cuatro errores de apareamiento con la secuencia diana del ARNm.
88. El oligonucleótido de ARNi de acuerdo con una cualquiera de las modalidades precedentes, en donde la región de complementariedad es totalmente complementaria a la secuencia diana del ARNm de *TMPRSS6* en las posiciones de nucleótidos 2-8 de la hebra antisentido, en donde las posiciones de nucleótidos se numeran de 5' a 3'.
89. El oligonucleótido de ARNi de acuerdo con una cualquiera de las modalidades precedentes, en donde la región de complementariedad es totalmente complementaria a la secuencia diana del ARNm de *TMPRSS6* en las posiciones de nucleótidos 2-11 de la hebra antisentido, en donde las posiciones de nucleótidos se numeran de 5' a 3'.

90. El oligonucleótido de ARNi de acuerdo con una cualquiera de las modalidades precedentes, en donde la secuencia diana de ARNm de *TMPRSS6* es como se establece en la SEQ ID NO: 844.
- 5 91. El oligonucleótido de ARNi de acuerdo con una cualquiera de las modalidades precedentes, en donde la hebra sentido comprende una secuencia de nucleótidos como se establece en la SEQ ID NO: 184, y opcionalmente en donde la hebra antisentido comprende una secuencia de nucleótidos como se establece en la SEQ ID NO: 844.
- 10 92. El oligonucleótido de ARNi de acuerdo con una cualquiera de las modalidades precedentes, en donde la hebra sentido comprende una secuencia de nucleótidos de una cualquiera de las SEQ ID NO: 579-580, 585-587, 590 y 595-597.
93. El oligonucleótido de ARNi de acuerdo con una cualquiera de las modalidades precedentes, en donde la hebra sentido comprende una secuencia de nucleótidos que se selecciona de las SEQ ID NO: 579-580, 585-587, 590 y 595-597.
- 15 94. El oligonucleótido de ARNi de acuerdo con una cualquiera de las modalidades precedentes, en donde la hebra antisentido comprende una secuencia de nucleótidos de una cualquiera de las SEQ ID NO: 600-601, 606-608, 611 y 616-618.
95. El oligonucleótido de ARNi de acuerdo con una cualquiera de las modalidades precedentes, en donde la hebra antisentido comprende una secuencia de nucleótidos que se selecciona de las SEQ ID NO: 600-601, 606-608, 611 y 616-618.
- 20 96. El oligonucleótido de ARNi de acuerdo con una cualquiera de las modalidades precedentes, en donde la hebra sentido y las hebras antisentido comprenden secuencias de nucleótidos que se seleccionan del grupo que consiste en:
- a) SEQ ID NO: 579 y 600, respectivamente;
 - b) SEQ ID NO: 580 y 601, respectivamente;
 - 25 c) SEQ ID NO: 595 y 616, respectivamente;
 - d) SEQ ID NO: 590 y 611, respectivamente;
 - e) SEQ ID NO: 596 y 617, respectivamente;
 - f) SEQ ID NO: 597 y 618, respectivamente;
 - g) SEQ ID NO: 585 y 606, respectivamente;
 - 30 h) SEQ ID NO: 586 y 607, respectivamente; y,
 - i) SEQ ID NO: 587 y 608, respectivamente.
97. El oligonucleótido de ARNi de acuerdo con una cualquiera de las modalidades precedentes, en donde la hebra sentido y las hebras antisentido comprenden secuencias de nucleótidos que se seleccionan del grupo que consiste en:
- 35 a) SEQ ID NO: 579 y 600, respectivamente;
- b) SEQ ID NO: 580 y 601, respectivamente;
 - c) SEQ ID NO: 590 y 611, respectivamente;
 - d) SEQ ID NO: 597 y 618, respectivamente; y,
 - e) SEQ ID NO: 586 y 607, respectivamente.

98. El oligonucleótido de ARNi de acuerdo con una cualquiera de las modalidades precedentes, en donde la hebra sentido comprende una secuencia de nucleótidos como se establece en la SEQ ID NO: 600, y opcionalmente en donde la hebra antisentido comprende una secuencia de nucleótidos como se establece en la SEQ ID NO: 579.
- 5 99. El oligonucleótido de ARNi de acuerdo con una cualquiera de las modalidades precedentes, en donde la hebra sentido comprende una secuencia de nucleótidos como se establece en la SEQ ID NO: 579, en donde la hebra antisentido comprende una secuencia de nucleótidos como se establece en la SEQ ID NO: 600.
- 10 100. El oligonucleótido de ARNi de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-97, en donde la hebra sentido comprende una secuencia de nucleótidos como se establece en la SEQ ID NO: 580, en donde la hebra antisentido comprende una secuencia de nucleótidos como se establece en la SEQ ID NO: 601.
- 15 101. El oligonucleótido de ARNi de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-97, en donde la hebra sentido comprende una secuencia de nucleótidos como se establece en la SEQ ID NO: 590, en donde la hebra antisentido comprende una secuencia de nucleótidos como se establece en la SEQ ID NO: 611.
- 20 102. El oligonucleótido de ARNi de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-97, en donde la hebra sentido comprende una secuencia de nucleótidos como se establece en la SEQ ID NO: 597, en donde la hebra antisentido comprende una secuencia de nucleótidos como se establece en la SEQ ID NO: 618.
- 25 103. El oligonucleótido de ARNi de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-97, en donde la hebra sentido comprende una secuencia de nucleótidos como se establece en la SEQ ID NO: 586, en donde la hebra antisentido comprende una secuencia de nucleótidos como se establece en la SEQ ID NO: 607.
- 30 104. El oligonucleótido de ARNi de acuerdo con una cualquiera de las modalidades precedentes, en donde la hebra antisentido es de 22 nucleótidos de longitud.
105. El oligonucleótido de ARNi de acuerdo con una cualquiera de las modalidades precedentes, en donde la hebra sentido es de 36 nucleótidos de longitud.
106. El oligonucleótido de ARNi de acuerdo con una cualquiera de las modalidades precedentes, en donde la hebra sentido y las hebras antisentido comprenden secuencias de nucleótidos que se seleccionan del grupo que consiste en:
- a) SEQ ID NO: 621 y 642, respectivamente;
 - b) SEQ ID NO: 622 y 643, respectivamente;
 - c) SEQ ID NO: 637 y 658, respectivamente;
 - 35 d) SEQ ID NO: 632 y 653, respectivamente;
 - e) SEQ ID NO: 638 y 659, respectivamente;
 - f) SEQ ID NO: 639 y 660, respectivamente;
 - g) SEQ ID NO: 627 y 648, respectivamente;
 - h) SEQ ID NO: 628 y 649, respectivamente; y,
 - 40 i) SEQ ID NO: 629 y 650, respectivamente.

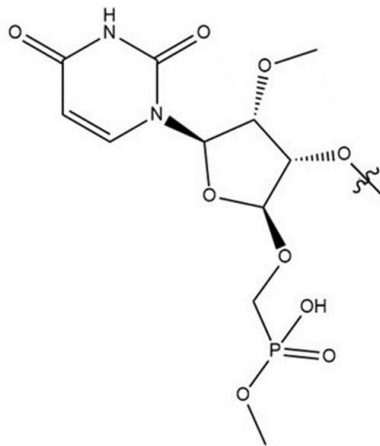
107. El oligonucleótido de ARNi de acuerdo con una cualquiera de las modalidades precedentes, en donde la hebra sentido y las hebras antisentido comprenden secuencias de nucleótidos que se seleccionan del grupo que consiste en:
- SEQ ID NO: 621 y 642, respectivamente;
 - 5 b) SEQ ID NO: 622 y 643, respectivamente;
 - c) SEQ ID NO: 632 y 653, respectivamente;
 - d) SEQ ID NO: 639 y 660, respectivamente; y,
 - e) SEQ ID NO: 628 y 649, respectivamente.
108. El oligonucleótido de ARNi de acuerdo con una cualquiera de las modalidades precedentes, en donde la hebra sentido comprende una secuencia de nucleótidos como se establece en la SEQ ID NO: 621, en donde la hebra antisentido comprende una secuencia de nucleótidos como se establece en la SEQ ID NO: 642.
109. El oligonucleótido de ARNi de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-107, en donde la hebra sentido comprende una secuencia de nucleótidos como se establece en la SEQ ID NO: 642, y opcionalmente en donde la hebra antisentido comprende una secuencia de nucleótidos como se establece en la SEQ ID NO: 621.
110. El oligonucleótido de ARNi de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-107, en donde la hebra sentido comprende una secuencia de nucleótidos como se establece en la SEQ ID NO: 622, en donde la hebra antisentido comprende una secuencia de nucleótidos como se establece en la SEQ ID NO: 643.
111. El oligonucleótido de ARNi de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-107, en donde la hebra sentido comprende una secuencia de nucleótidos como se establece en la SEQ ID NO: 632, en donde la hebra antisentido comprende una secuencia de nucleótidos como se establece en la SEQ ID NO: 653.
112. El oligonucleótido de ARNi de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-107, en donde la hebra sentido comprende una secuencia de nucleótidos como se establece en la SEQ ID NO: 639, en donde la hebra antisentido comprende una secuencia de nucleótidos como se establece en la SEQ ID NO: 660.
113. El oligonucleótido de ARNi de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-107, en donde la hebra sentido comprende una secuencia de nucleótidos como se establece en la SEQ ID NO: 628, en donde la hebra antisentido comprende una secuencia de nucleótidos como se establece en la SEQ ID NO: 649.
114. Un oligonucleótido de ARNi para reducir la expresión de serina proteasa transmembrana 6 (*TMPRSS6*), el oligonucleótido comprende una hebra sentido y una hebra antisentido que forma una región híbrida, en donde
- la hebra antisentido comprende 22 nucleótidos y comprende una secuencia de nucleótidos como se establece en la SEQ ID NO: 600, y la hebra sentido comprende 36 nucleótidos y comprende una secuencia de nucleótidos como se establece en la SEQ ID NO: 579, los nucleótidos de cada una de las hebras se numeran de 5' a 3';

todas las posiciones 1-7, 12-27 y 31-36 de la hebra sentido y las posiciones 1, 6, 8, 9, 11-13 y 15-22 de la hebra antisentido comprenden una modificación 2'-O-metilo (2'-OMe), y todas las posiciones 8-11 de la hebra sentido y 2, 3, 4, 5, 7, 10 y 14 de la hebra antisentido comprenden una modificación 2'-flúor (2'-F);

- 5 se proporciona un enlace fosforotioato entre las posiciones 1 y 2 de la hebra sentido, y entre las posiciones 1 y 2, entre las posiciones 2 y 3, entre las posiciones 3 y 4, entre las posiciones 20 y 21 y entre las posiciones 21 y 22 de la hebra antisentido;

la hebra sentido cerca del extremo 3' comprende un tallo-lazo que se establece como S1-Lp-S2, S1 es complementario a S2, la Lp forma un lazo de 4 nucleótidos de longitud, y en donde el segundo, tercer y cuarto nucleótidos del lazo Lp de 5' a 3' se conjugan cada uno con un

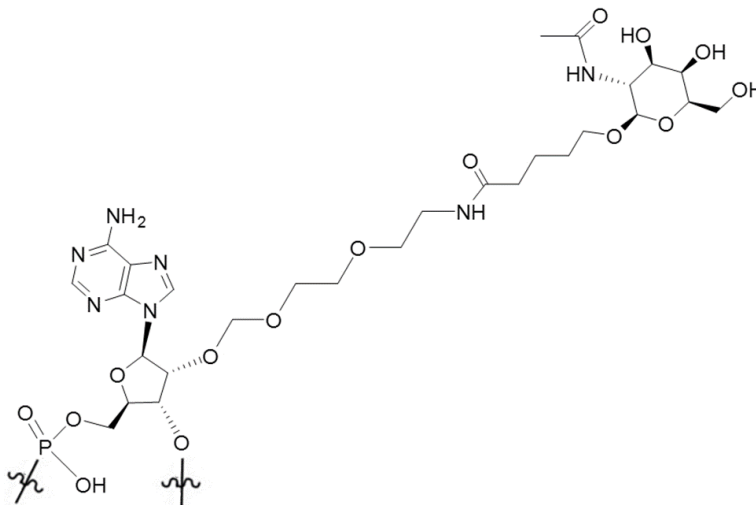
- 10 resto de N-acetilgalactosamina (GalNAc) monovalente; y el nucleótido 5'-terminal de la hebra antisentido comprende una estructura de acuerdo con la sustancia química 1a (MeFosfonato-4O-mU):



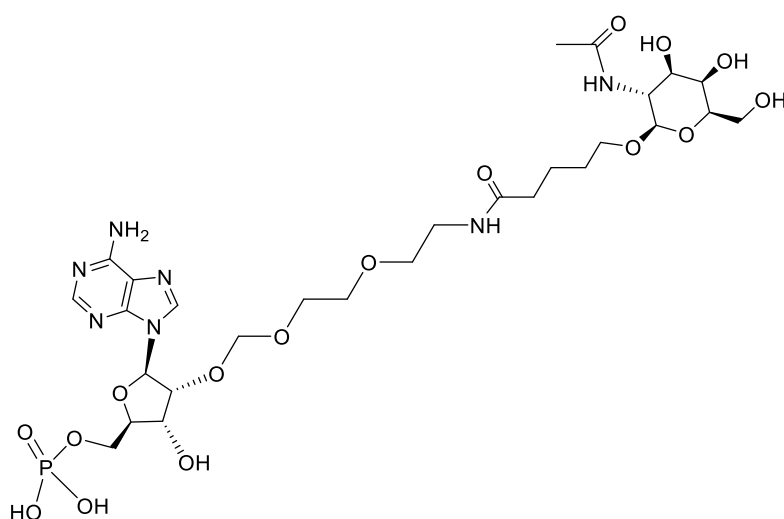
- 15 115. El oligonucleótido de ARNi de acuerdo con la modalidad 114, en donde la hebra antisentido comprende un saliente 3' de uno o más nucleótidos de purina de longitud, y opcionalmente en donde el saliente 3' es 5'-GG-3'.

116. El oligonucleótido de ARNi de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 114-115, en donde los nucleótidos del lazo Lp conjugado con el resto de N-acetilgalactosamina (GalNAc) monovalente comprenden cada uno una estructura de acuerdo con la sustancia

- 20 química 5a:

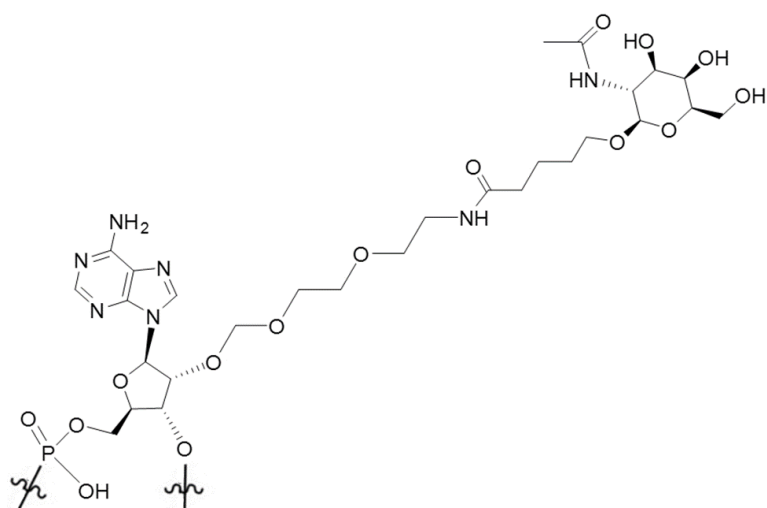


117. Un oligonucleótido de ARNi para reducir la expresión de *TMPRSS6*, el oligonucleótido comprende una hebra sentido y una hebra antisentido, en donde la hebra sentido comprende la secuencia y todas las modificaciones de 5'-[mGs][mG][mU][mG][mC][mU][mA][fC][fU][fC][fU][mG][mG][mU][mA][mU][mU][mU][mC][mA][mG][mC][mA][mG][mC][mC][mG][ademA-GalNAc][ademA-GalNAc][ademA-GalNAc][mG][mG][mC][mU][mG][mC]-3' (SEQ ID NO: 621), y en donde la hebra antisentido comprende la secuencia y todas las modificaciones de 5'-[MeFosfonato-4O-mUs][fGs][fAs][fA][fA][mU][fA][mC][mC][fA][mG][mA][mG][fU][mA][mG][mC][mA][mC][mCs][mGs][mG]-3' (SEQ ID NO: 642), en donde mC, mA, mG, mU=ribonucleósidos 2'-OMe; fA, fC, fG, fU=ribonucleósidos 2'-F; s=fosforotioato, y en donde ademA-GalNAc =



(Sustancia química 5)

118. Un oligonucleótido de ARNi para reducir la expresión de *TMPRSS6*, el oligonucleótido comprende una hebra sentido y una hebra antisentido, en donde la hebra sentido comprende la secuencia y todas las modificaciones de 5'-[mGs][mG][mU][mG][mC][mU][mA][fC][fU][fC][fU][mG][mG][mU][mA][mU][mU][mU][mC][mA][mG][mC][mA][mG][mC][mC][mG][ademA-GalNAc][ademA-GalNAc][ademA-GalNAc][mG][mG][mC][mU][mG][mC]-3' (SEQ ID NO: 621); la hebra antisentido comprende la secuencia y todas las modificaciones de 5'-[MeFosfonato-4O-mUs][fGs][fAs][fA][fA][mU][fA][mC][mC][fA][mG][mA][mG][fU][mA][mG][mC][mA][mC][mCs][mGs][mG]-3' (SEQ ID NO: 642); mC, mA, mG, mU indican nucleótidos modificados 2'-O-metilo (2'-OMe); fA, fC, fG, fU indican nucleótidos modificados con 2'-flúor (2'-F); s indica un enlace internucleotídico de fosforotioato; y ademA-GalNAc comprende una estructura de acuerdo con la sustancia química 5a:



119. Un oligonucleótido de ARNi para reducir la expresión de *TMPRSS6*, el oligonucleótido comprende una hebra sentido y una hebra antisentido, en donde

la hebra sentido comprende la secuencia y todas las modificaciones de 5'-

5 [mGs][mG][mU][mG][mC][mU][mA][fC][fU][fC][fU][mG][mG][mU][mA][mU][mU][mU][mC][mA][mG][mC][mA][mG][mC][mC][mG][ademA-GalNAc][ademA-GalNAc][ademA-GalNAc][mG][mG][mC][mU][mG][mC]-3' (SEQ ID NO: 621);

la hebra antisentido comprende la secuencia y todas las modificaciones de 5'-[MeFosfonato-4O-

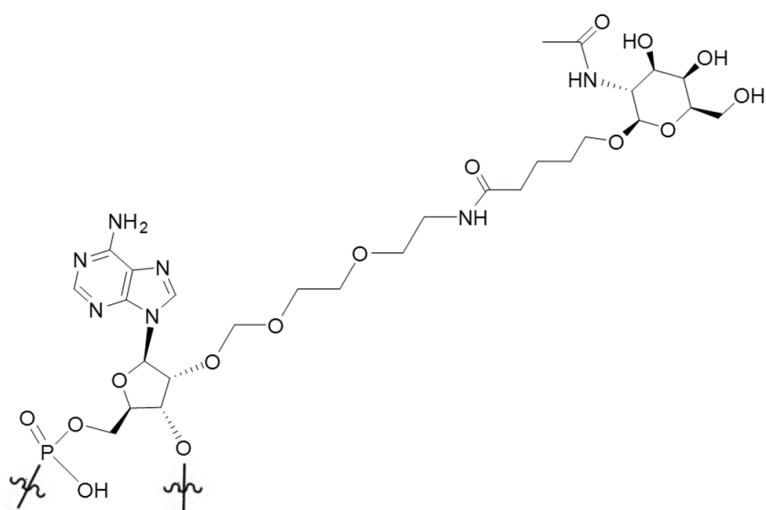
10 mUs][fGs][fAs][fA][fA][mU][fA][mC][mC][fA][mG][mA][mG][fU][mA][mG][mC][mA][mC][mCs][mGs][mG]-3' (SEQ ID NO: 642);

mC, mA, mG, mU indican nucleótidos modificados 2'-O-metilo (2'-OMe);

fA, fC, fG, fU indican nucleótidos modificados con 2'-flúor (2'-F);

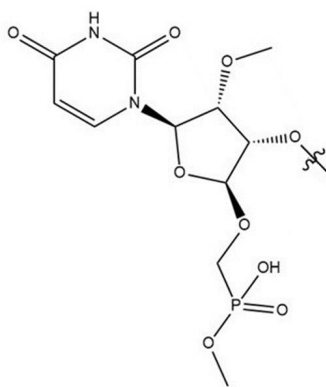
s indica un enlace internucleotídico de fosforotioato;

15 ademA-GalNAc comprende una estructura de acuerdo con la sustancia química 5a:



; y

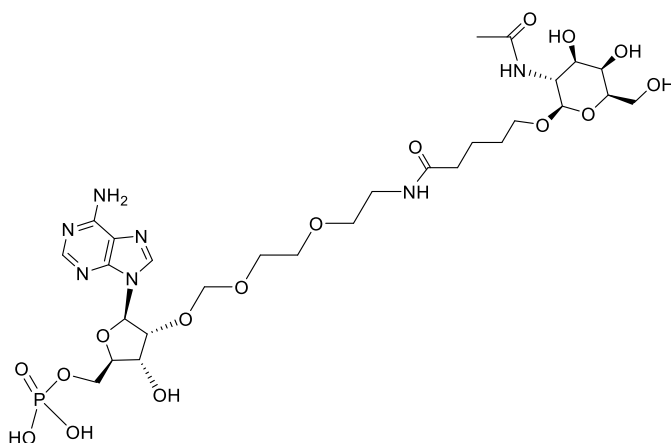
MeFosfonato-4O-mU comprende una estructura de acuerdo con la sustancia química 1a:



120. Un oligonucleótido de ARNi para reducir la expresión de *TMPRSS6*, el oligonucleótido comprende una hebra sentido y una hebra antisentido, en donde la hebra sentido comprende la secuencia y todas las modificaciones de 5'-

5 [mGs][mC][mU][mA][mC][mU][mC][fU][fG][fG][fU][mA][mU][mU][mU][mC][mC][mU][mA][mA][mG][mC][mA][mG][mC][mC][mG][ademA-GalNAc][ademA-GalNAc][ademA-GalNAc][mG][mG][mC][mU][mG][mC]-3' (SEQ ID NO: 622), y en donde la hebra antisentido comprende la secuencia y todas las modificaciones de 5'-

10 [MeFosfonato-4O-mUs][fUs][fAs][fG][fG][mA][fA][mA][mU][fA][mC][mC][mA][fG][mA][mG][mU][mA][mG][mCs][mGs][mG]-3' (SEQ ID NO: 643), en donde mC, mA, mG, mU=ribonucleósidos 2'-OMe; fA, fC, fG, fU=ribonucleósidos 2'-F; s=fosforotioato, y en donde ademA-GalNAc =



15 (Sustancia química 5)

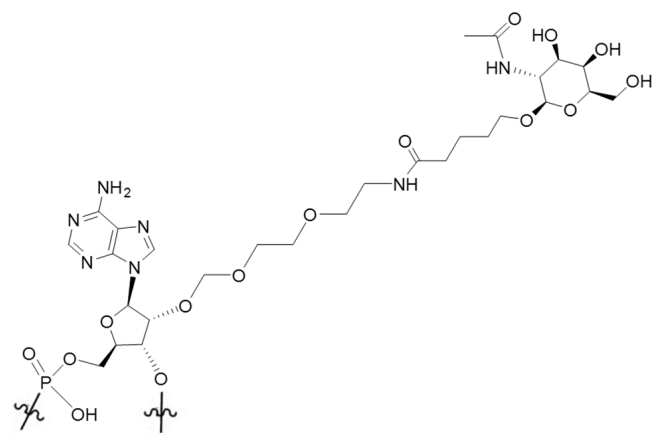
121. Un oligonucleótido de ARNi para reducir la expresión de *TMPRSS6*, el oligonucleótido comprende una hebra sentido y una hebra antisentido, en donde la hebra sentido comprende la secuencia y todas las modificaciones de 5'-

20 [mGs][mC][mU][mA][mC][mU][mC][fU][fG][fG][fU][mA][mU][mU][mU][mC][mC][mU][mA][mA][mG][mC][mA][mG][mC][mC][mG][ademA-GalNAc][ademA-GalNAc][ademA-GalNAc][mG][mG][mC][mU][mG][mC]-3' (SEQ ID NO: 622); la hebra antisentido comprende la secuencia y todas las modificaciones de 5'-[MeFosfonato-4O-

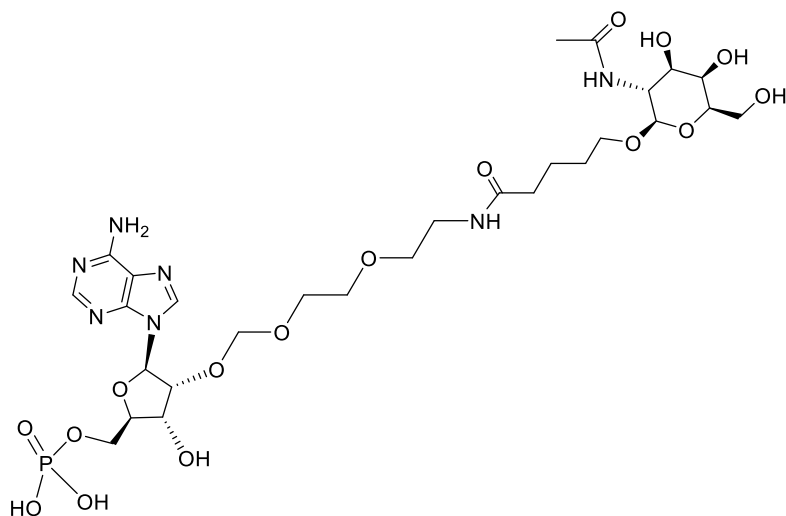
25 mUs][fUs][fAs][fG][fG][mA][fA][mA][mU][fA][mC][mC][mA][fG][mA][mG][mU][mA][mG][mCs][mGs][mG]-3' (SEQ ID NO: 643)

mC, mA, mG, mU indican nucleótidos modificados 2'-O-metilo (2'-OMe);

fA, fC, fG, fU indican nucleótidos modificados con 2'-flúor (2'-F);
s indica un enlace internucleotídico de fosforotioato; y
ademA-GalNAc comprende una estructura de acuerdo con la sustancia química 5a:



- 5
122. Un oligonucleótido de ARNi para reducir la expresión de *TMPRSS6*, el oligonucleótido comprende una hebra sentido y una hebra antisentido, en donde la hebra sentido comprende la secuencia y todas las modificaciones de 5'-[mCs][mU][mC][mA][mC][mC][mU][fG][fC][fU][fU][mC][mU][mU][mC][mU][mG][mG][mU][mA][mG][mC][mA][mG][mC][mC][mG][ademA-GalNAc][ademA-GalNAc][ademA-GalNAc][mG][mG][mC][mU][mG][mC]-3' (SEQ ID NO: 632), y en donde la hebra antisentido comprende la secuencia y todas las modificaciones de 5'-[MeFosfonato-4O-mUs][fAs][fCs][fC][fA][mG][fA][mA][mG][fA][mA][mG][mC][fA][mG][mG][mU][mG][mA][mGs][mGs][mG]-3' (SEQ ID NO: 653), en donde mC, mA, mG, mU=ribonucleósidos 2'-OMe; fA, fC, fG, fU=ribonucleósidos 2'-F; s=fosforotioato, y en donde ademA-GalNAc =
- 10
- 15
- =



(Sustancia química 5)

123. Un oligonucleótido de ARNi para reducir la expresión de *TMPRSS6*, el oligonucleótido comprende una hebra sentido y una hebra antisentido, en donde la hebra sentido de detección comprende la secuencia y todas las modificaciones de 5'-[mCs][mU][mC][mA][mC][mC][mU][fG][fC][fU][fU][mC][mU][mU][mC][mU][mG][mG][mU][mA][mG][mC][mA][mG][mC][mC][mG][ademA-GalNAc][ademA-GalNAc][ademA-GalNAc][mG][mG][mC][mU][mG][mC]-3' (SEQ ID NO: 632);
- 20

la hebra antisentido comprende la secuencia y todas las modificaciones de 5'-[MeFosfonato-4O-

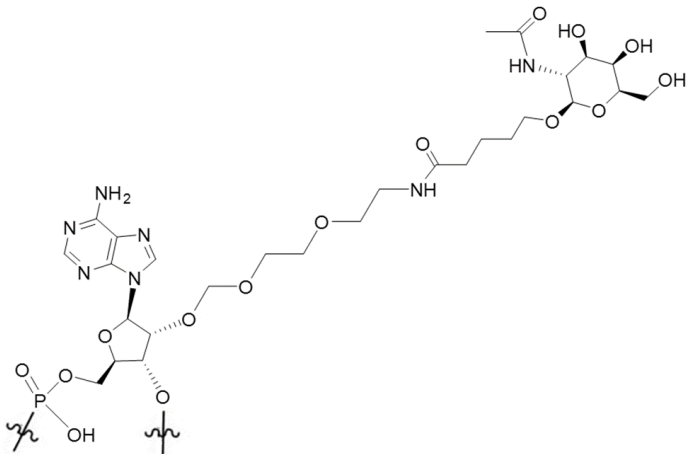
mUs][fAs][fCs][fC][fA][mG][fA][mA][mG][fA][mA][mG][mC][fA][mG][mG][mU][mG][mA][mGs][mGs][mG]-3' (SEQ ID NO: 653);

5 mC, mA, mG, mU indican nucleótidos modificados 2'-O-metilo (2'-OMe);

fA, fC, fG, fU indican nucleótidos modificados con 2'-flúor (2'-F);

s indica un enlace internucleotídico de fosforotioato; y

ademA-GalNAc comprende una estructura de acuerdo con la sustancia química 5a:

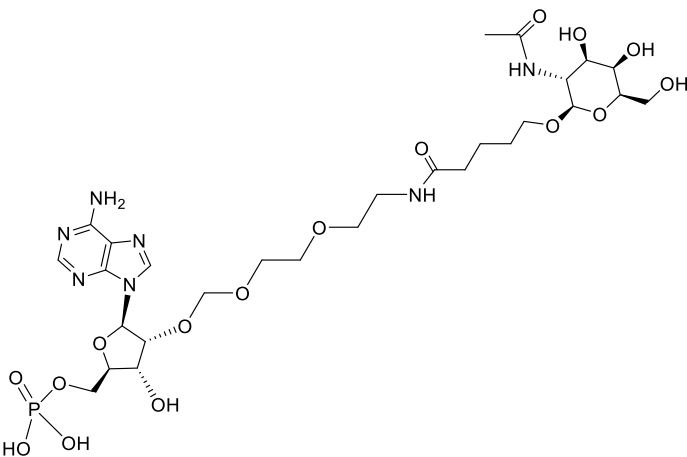


10 124. Un oligonucleótido de ARNi para reducir la expresión de TMPRSS6, el oligonucleótido comprende una hebra sentido y una hebra antisentido, en donde la hebra sentido comprende la secuencia y todas las modificaciones de 5'-[mAs][mG][mU][mG][mU][mG][mA][fA][fA][fG][fA][mC][mA][mU][mA][mG][mC][mU][mG][mA][mG][mC][mA][mG][mC][mC][mG][ademA-GalNAc][ademA-

15 GalNAc][ademA-GalNAc][mG][mG][mC][mU][mG][mC]-3' (SEQ ID NO: 639), y en donde la hebra antisentido comprende la secuencia y todas las modificaciones de 5'-[MeFosfonato-4O-

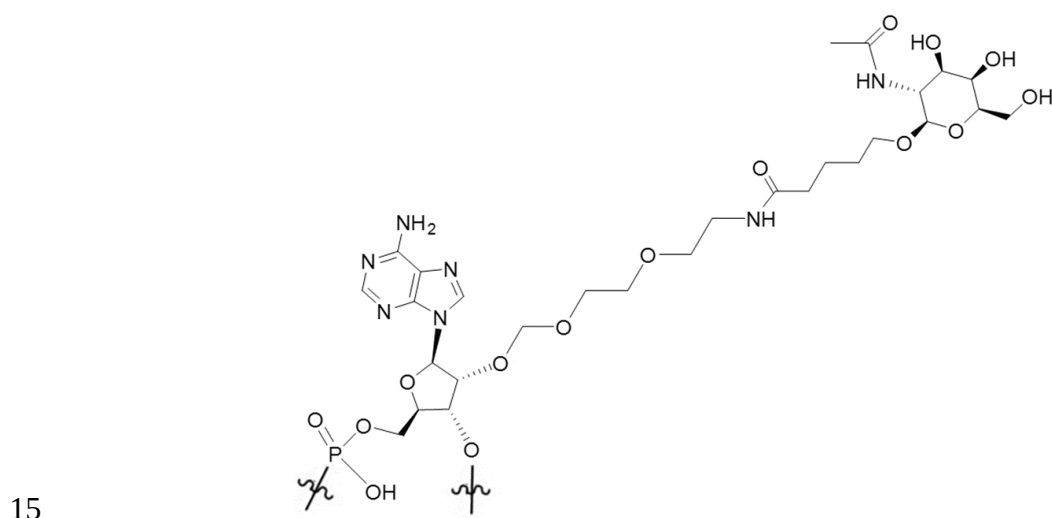
mUs][fCs][fAs][fG][fC][mU][fA][mU][mG][fU][mC][mU][mU][fU][mC][mA][mC][mA][mC][mUs][mGs][mG]-3' (SEQ ID NO: 660), en donde mC, mA, mG, mU=ribonucleósidos

20 2'-Ome; fA, fC, fG, fU=ribonucleósidos 2'-F; s=fosforotioato, y en donde ademA-GalNAc =



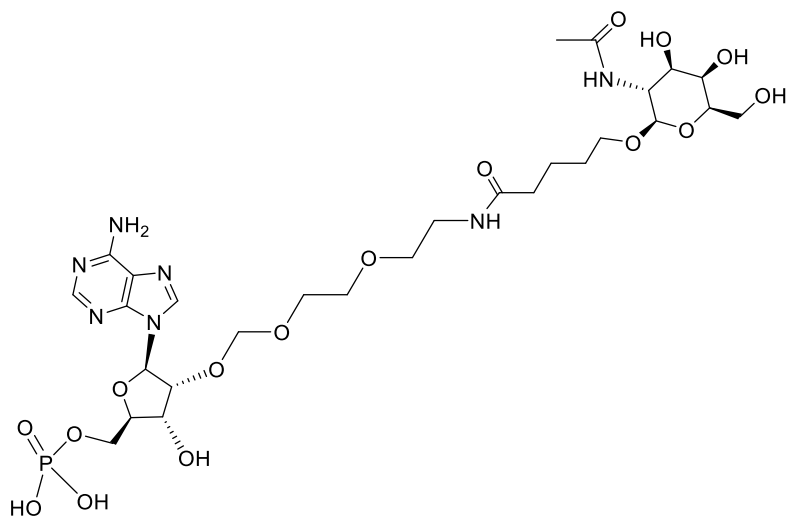
(Sustancia química 5)

125. Un oligonucleótido de ARNi para reducir la expresión de *TMPRSS6*, el oligonucleótido comprende una hebra sentido y una hebra antisentido, en donde la hebra sentido comprende la secuencia y todas las modificaciones de 5'-[mAs][mG][mU][mG][mU][mG][mA][fA][fA][fG][fA][mC][mA][mU][mA][mG][mC][mU][mG][mA][mG][mC][mA][mG][mC][mC][mG][ademA-GalNAc][ademA-GalNAc][ademA-GalNAc][mG][mG][mC][mU][mG][mC]-3' (SEQ ID NO: 639); la hebra antisentido comprende la secuencia y todas las modificaciones de 5'-[MeFosfonato-4O-mUs][fCs][fAs][fG][fC][mU][fA][mU][mG][fU][mC][mU][mU][fU][mC][mA][mC][mA][mC][mUs][mGs][mG]-3' (SEQ ID NO: 660); mC, mA, mG, mU indican nucleótidos modificados 2'-O-metilo (2'-OMe); fA, fC, fG, fU indican nucleótidos modificados con 2'-flúor (2'-F); s indica un enlace internucleotídico de fosforotioato; y ademA-GalNAc comprende una estructura de acuerdo con la sustancia química 5a:



126. Un oligonucleótido de ARNi para reducir la expresión de *TMPRSS6*, el oligonucleótido comprende una hebra sentido y una hebra antisentido, en donde la hebra sentido comprende la secuencia y todas las modificaciones de 5'-[mGs][mG][mG][mU][mG][mC][mA][fC][fU][fA][fU][mG][mG][mC][mU][mU][mG][mU][mA][mA][mG][mC][mA][mG][mC][mC][mG][ademA-GalNAc][ademA-GalNAc][ademA-GalNAc][mG][mG][mC][mU][mG][mC]-3' (SEQ ID NO: 628), y en donde la hebra antisentido comprende la secuencia y todas las modificaciones de 5'-[MePhosphonate-4O-mUs][fUs][fAs][fC][fA][mA][fG][mC][mC][fA][mU][mA][mG][fU][mG][mC][mA][mC][mC][mCs][mGs][mG]-3' (SEQ ID NO: 649), en donde mC, mA, mG, mU=ribonucleósidos 2'-OMe; fA, fC, fG, fU=ribonucleósidos 2'-F; s=fosforotioato, y en donde ademA-GalNAc =

25



(Sustancia química 5)

127. Un oligonucleótido de ARNi para reducir la expresión de *TMPRSS6*, el oligonucleótido comprende una hebra sentido y una hebra antisentido, en donde

5 la hebra de detección comprende la secuencia y todas las modificaciones de 5'-[mGs][mG][mG][mU][mG][mC][mA][fC][fU][fA][fU][mG][mG][mC][mU][mU][mG][mU][mA][mA][mG][mC][mA][mG][mC][mC][mG][ademA-GalNAc][ademA-GalNAc][ademA-GalNAc][mG][mG][mC][mU][mG][mC]-3' (SEQ ID NO: 628);

la hebra antisentido comprende la secuencia y todas las modificaciones de 5'- [MeFosfonato-4O-

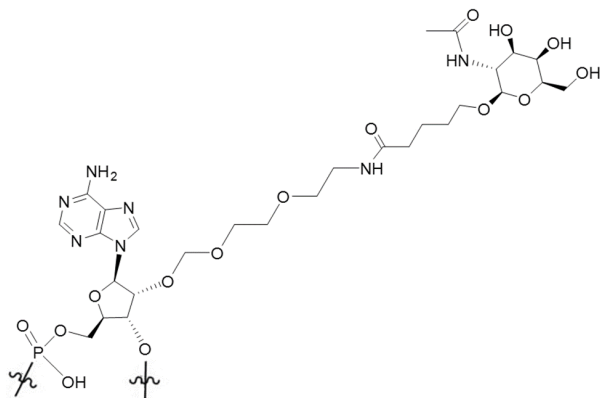
10 mUs][fUs][fAs][fC][fA][mA][fG][mC][mC][fA][mU][mA][mG][fU][mG][mC][mA][mC][mC][mCs][mGs][mG]-3' (SEQ ID NO: 649);

mC, mA, mG, mU indican nucleótidos modificados 2'-O-metilo (2'-OMe);

fA, fC, fG, fU indican nucleótidos modificados con 2'-flúor (2'-F);

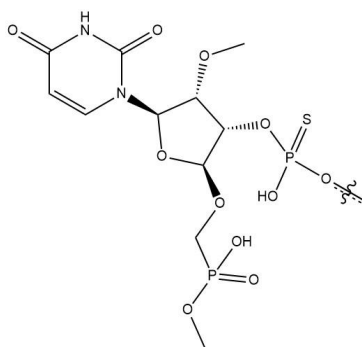
15 s indica un enlace internucleotídico de fosforotioato; y

ademA-GalNAc comprende una estructura de acuerdo con la sustancia química 5a:

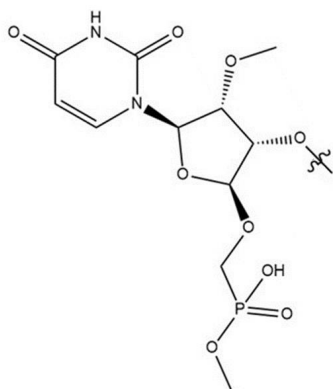


128. El oligonucleótido de ARNi de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 116-127, en donde MeFosfonato-4O-mUs comprende una estructura de acuerdo con la sustancia

20 química. 1:



129. El oligonucleótido de ARNi de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 116-127, en donde MeFosfonato-4O-mU comprende una estructura de acuerdo con la sustancia química 1a:



5

130. Un oligonucleótido de ARNi para reducir la expresión de *TMPRSS6* que comprende una hebra sentido y una hebra antisentido, en donde la hebra sentido comprende la SEQ ID NO: 621 y la hebra antisentido comprende la SEQ ID NO: 642, en donde la hebra antisentido comprende una región de complementariedad con un transcripto de ARN de *TMPRSS6*, y en donde el oligonucleótido tiene forma de un conjugado que tiene la estructura como se muestra en las Figuras 10A-B.

131. Un oligonucleótido de ARNi para reducir la expresión de *TMPRSS6* que comprende una hebra sentido y una hebra antisentido, en donde la hebra sentido comprende la SEQ ID NO: 621 y la hebra antisentido comprende la SEQ ID NO: 642, en donde la hebra antisentido comprende una región de complementariedad con un transcripto de ARN de *TMPRSS6*, y en donde el oligonucleótido tiene forma de un conjugado que tiene la estructura como se muestra en la Figura 14A.

132. Un oligonucleótido de ARNi para reducir la expresión de *TMPRSS6* que comprende una hebra sentido y una hebra antisentido, en donde la hebra sentido comprende la SEQ ID NO: 632 y la hebra antisentido comprende la SEQ ID NO: 653, en donde la hebra antisentido comprende una región de complementariedad con un transcripto de ARN de *TMPRSS6*, y en donde el oligonucleótido tiene forma de un conjugado que tiene la estructura como se muestra en las Figuras 11A-B.

133. Un oligonucleótido de ARNi para reducir la expresión de *TMPRSS6* que comprende una hebra sentido y una hebra antisentido, en donde la hebra sentido comprende la SEQ ID NO: 632 y la hebra antisentido comprende la SEQ ID NO: 653, en donde la hebra antisentido comprende una región de complementariedad con un transcripto de ARN de *TMPRSS6*, y

en donde el oligonucleótido tiene forma de un conjugado que tiene la estructura como se muestra en la Figura 14B.

134. Un oligonucleótido de ARNi para reducir la expresión de *TMPRSS6* que comprende una hebra sentido y una hebra antisentido, en donde la hebra sentido comprende la SEQ ID NO: 639 y la hebra antisentido comprende la SEQ ID NO: 660, en donde la hebra antisentido comprende una región de complementariedad con un transcripto de ARN de *TMPRSS6*, y en donde el oligonucleótido tiene forma de un conjugado que tiene la estructura como se muestra en las Figuras 12A-B.

135. Un oligonucleótido de ARNi para reducir la expresión de *TMPRSS6* que comprende una hebra sentido y una hebra antisentido, en donde la hebra sentido comprende la SEQ ID NO: 639 y la hebra antisentido comprende la SEQ ID NO: 660, en donde la hebra antisentido comprende una región de complementariedad con un transcripto de ARN de *TMPRSS6*, y en donde el oligonucleótido tiene forma de un conjugado que tiene la estructura como se muestra en la Figura 14C.

136. Un oligonucleótido de ARNi para reducir la expresión de *TMPRSS6* que comprende una hebra sentido y una hebra antisentido, en donde la hebra sentido comprende la SEQ ID NO: 628 y la hebra antisentido comprende la SEQ ID NO: 649, en donde la hebra antisentido comprende una región de complementariedad con un transcripto de ARN de *TMPRSS6*, y en donde el oligonucleótido tiene forma de un conjugado que tiene la estructura como se muestra en la Figura 13A-B.

137. Un oligonucleótido de ARNi para reducir la expresión de *TMPRSS6* que comprende una hebra sentido y una hebra antisentido, en donde la hebra sentido comprende la SEQ ID NO: 628 y la hebra antisentido comprende la SEQ ID NO: 649, en donde la hebra antisentido comprende una región de complementariedad con un transcripto de ARN de *TMPRSS6*, y en donde el oligonucleótido tiene forma de un conjugado que tiene la estructura como se muestra en la Figura 14D.

138. Una composición farmacéutica que comprende el oligonucleótido de ARNi de acuerdo con una cualquiera de las modalidades precedentes, y un portador, agente de suministro o excipiente farmacéuticamente aceptables.

139. Un método para tratar a un sujeto que tiene una enfermedad, trastorno o afección asociados con la deficiencia o supresión de hepcidina, el método comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva del oligonucleótido de ARNi de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-137, o una composición farmacéutica de acuerdo con la modalidad 138, para tratar de esta manera al sujeto.

140. El método de acuerdo con la modalidad 139, en donde (i) aumenta la expresión de hepcidina; (ii) disminuyen los niveles de hierro sérico; (iii) disminuye la saturación de hierro sérico; o (iv) cualquier combinación de (i)-(iii), después de administrar el oligonucleótido de ARNi.

141. Un método para suministrar un oligonucleótido a un sujeto, el método comprende administrar la composición farmacéutica de la modalidad 138 al sujeto.

142. Un método para reducir la expresión de *TMPRSS6* en una célula, una población de células o un sujeto, el método comprende la etapa de:
- i) poner en contacto la célula o la población de células con el oligonucleótido de ARNi de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-137, o la composición farmacéutica de la modalidad 138; o
 - ii) administrar al sujeto el oligonucleótido de ARNi de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-137, o la composición farmacéutica de la modalidad 138.
143. El método de acuerdo con la modalidad 142, en donde reducir la expresión de *TMPRSS6* comprende reducir una cantidad o nivel de ARNm de *TMPRSS6*, una cantidad o nivel de proteína matriptasa-2, o ambos.
144. El método de acuerdo con la modalidad 142 o 143, en donde reducir la expresión de *TMPRSS6* da como resultado (i) un aumento en la producción de hepcidina; (ii) una disminución en la saturación de hierro sérico; (iii) una disminución en el hierro sérico; o (iv) cualquier combinación de (i)-(iii).
145. El método de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 142-144, en donde el sujeto tiene una enfermedad, trastorno o afección asociada con la deficiencia o supresión de hepcidina.
146. El método de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 139-140 y 145, en donde la enfermedad, trastorno o afección asociada con la deficiencia de hepcidina es hemocromatosis tal como la hemocromatosis hereditaria.
147. El método de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 139-140 y 145, en donde la enfermedad, trastorno o afección asociada con la deficiencia de hepcidina es betatalasemia.
148. El método de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 139-140 y 145, en donde la enfermedad, trastorno o afección asociada con la supresión de hepcidina es policitemia vera.
149. El método de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 139-148, en donde el oligonucleótido de ARNi, o la composición farmacéutica, se administra en combinación con una segunda composición o agente terapéutico.
150. El uso del oligonucleótido de ARNi de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-137, o la composición farmacéutica de acuerdo con la modalidad 138, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad, trastorno o afección asociada con la deficiencia o supresión de hepcidina, opcionalmente para el tratamiento de la hemocromatosis tal como la hemocromatosis hereditaria, policitemia vera o betatalasemia.
151. El oligonucleótido de ARNi de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-137, o la composición farmacéutica de acuerdo con la modalidad 138, para su uso como un medicamento.
152. El oligonucleótido de ARNi de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-137, o la composición farmacéutica de acuerdo con la modalidad 138, para su uso como un medicamento.

153. El oligonucleótido de ARNi de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-137, o la composición farmacéutica de la modalidad 138, para su uso, o adaptable para su uso en el tratamiento de una enfermedad, trastorno o afección asociada con la deficiencia o supresión de hepcidina, opcionalmente para el tratamiento de la hemocromatosis tal como hemocromatosis hereditaria, policitemia vera, o betatalasemia.
154. El oligonucleótido de ARNi de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-137, o la composición farmacéutica de acuerdo con 138, para su uso en el tratamiento de la hemocromatosis tal como hemocromatosis hereditaria.
155. El oligonucleótido de ARNi de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-137, o la composición farmacéutica de acuerdo con 138, para su uso en el tratamiento de policitemia vera.
156. El oligonucleótido de ARNi de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-137, o la composición farmacéutica de acuerdo con 138, para su uso en el tratamiento de betatalasemia.
157. El oligonucleótido de ARNi de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-137, o la composición farmacéutica de acuerdo con 138, para su uso en el tratamiento de la hemocromatosis tal como la hemocromatosis hereditaria o betatalasemia.
158. Un kit que comprende el oligonucleótido de ARNi de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-137, un portador farmacéuticamente aceptable opcional y un prospecto que comprende instrucciones para la administración a un sujeto que tiene una enfermedad, trastorno o afección asociados con la deficiencia o supresión de hepcidina.
159. Un kit que comprende el oligonucleótido de ARNi de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1-137, o la composición farmacéutica de la modalidad 138, y un prospecto que comprende instrucciones para la administración a un sujeto que tiene una enfermedad, trastorno o afección asociados con la deficiencia o supresión de hepcidina.
160. El uso de la modalidad 150, el oligonucleótido de ARNi o la composición farmacéutica para su uso, o adaptable para su uso, de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 151-157, o el kit de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 158-159, en donde la enfermedad, trastorno o afección asociada con la deficiencia o supresión de hepcidina es hemocromatosis tal como hemocromatosis hereditaria, policitemia vera o betatalasemia.

Ejemplos

Ejemplo 1: Preparación de oligonucleótidos de ARNi

Síntesis y purificación de oligonucleótidos

Los oligonucleótidos (oligonucleótidos de ARNi) que se describen en los Ejemplos anteriores se sintetizaron químicamente mediante el uso de métodos que se describen en la presente descripción. Generalmente, los oligonucleótidos de ARN_{bci} se sintetizaron mediante el uso de métodos de síntesis de oligonucleótidos en fase sólida como se describe para los ARN_{ip} de 19-23 mer (ver, por ejemplo, Scaringe y otros (1990) Nucleic Acids Res. 18:5433-5441 y Usman y otros (1987) J. Am. Chem. Soc. 109:7845-45; ver además, patentes de Estados Unidos núm. 5,804,683; 5,831,071; 5,998,203; 6,008,400; 6,111,086; 6,117,657;

6,353,098; 6,362,323; 6,437,117 y 6,469,158) además de usar la síntesis de fosforamidita conocida (ver, por ejemplo Hughes y Ellington (2017) Cold Spring Harb Perspect Biol. 9(1):a023812; Beaucage S.L., Caruthers M.H. *Studies on Nucleotide Chemistry V: Deoxynucleoside Phosphoramidites — A New Class of Key Intermediates for*

5 *Deoxypolynucleotide Synthesis*, Tetrahedron Lett. 1981;22:1859–62. Doi: 10.1016/S0040-4039(01)90461-7). Los oligonucleótidos de ARN_{bci} que tienen una secuencia central de 19 mer se formatearon en construcciones que tienen una hebra sentido de 25 mer y una hebra antisentido de 27 mer para permitir el procesamiento por la maquinaria de ARN_i. La secuencia central de 19 mer es complementaria a una región en el ARN_m de *TMPRSS6*.

10 Se sintetizaron hebras de ARN individuales y se purificaron por HPLC de acuerdo con métodos estándar (Integrated DNA Technologies; Coralville, IA). Por ejemplo, los oligonucleótidos de ARN se sintetizaron mediante el uso de química de fosforamidita en fase sólida, se desprotegieron y desalinizaron en columnas NAP-5 (Amersham Pharmacia Biotech; Piscataway, NJ) mediante el uso de técnicas estándar (Damha y Olgivie (1993)

15 *Methods Mol. Biol.* 20:81-114; Wincott y otros (1995) *Nucleic Acids Res.* 23:2677-84). Los oligómeros se purificaron mediante el uso de cromatografía líquida de alto rendimiento de intercambio iónico (IE-HPLC) en una columna Amersham Source 15Q (1,0 cm x 25 cm; Amersham Pharmacia Biotech) mediante el uso de un gradiente lineal por etapas de 15 minutos. El gradiente varió de 90:10 de los tampones A:B a 52:48 de los tampones A:B,

20 donde el tampón A es Tris 100 mM pH 8,5 y el tampón B es Tris 100 mM pH 8,5, NaCl 1 M. Las muestras se monitorearon a 260 nm y los picos correspondientes a las especies de oligonucleótidos de longitud completa se recolectaron, agruparon, desalinizaron en columnas NAP-5 y liofilizaron.

La pureza de cada oligómero se determina mediante electroforesis capilar (CE) en un

25 Beckman PACE 5000 (Beckman Coulter, Inc.; Fullerton, CA). Los capilares CE tienen un diámetro interior de 100 µm y contienen gel 100R para ADN_{mc} (Beckman-Coulter). Típicamente, se inyectó aproximadamente 0,6 nmol de oligonucleótido en un capilar, se corrió en un campo eléctrico de 444 V/cm y se detectó mediante absorbancia UV a 260 nm. El tampón de corrida de Tris-Borato-7 M-urea desnaturalizante se adquirió de Beckman-

30 Coulter. Se obtuvieron oligorribonucleótidos que tenían una pureza de al menos el 90 % según lo evaluado por CE para usar en los experimentos que se describen más abajo. La identidad del compuesto se verificó mediante espectroscopía de masas de tiempo de vuelo de ionización desorción láser asistida por matriz (MALDI-TOF) en una estación de trabajo de bioespectrometría Voyager DE™ (Applied Biosystems; Foster City, CA) siguiendo el

35 protocolo recomendado por el fabricante. Se obtuvieron masas moleculares relativas de todos los oligómeros, a menudo dentro del 0,2 % de la masa molecular esperada.

Preparación de híbridos

Los oligómeros de ARN monocatenario se resuspendieron (por ejemplo, a una concentración de 100 µM) en tampón híbrido que consiste de acetato de potasio 100 mM, HEPES 30 mM,

40 pH 7,5. Se mezclaron hebras sentido y antisentido complementarias en cantidades molares

iguales para producir una solución final de, por ejemplo, híbrido 50 μM. Las muestras se calentaron a 100 °C durante 5 minutos en tampón de ARN (IDT) y se dejaron enfriar a temperatura ambiente antes de su uso. Los oligonucleótidos de ARNi se almacenaron a –20 °C. Los oligómeros de ARN monocatenario se almacenaron liofilizados o en agua libre de nucleasas a –80 °C.

Ejemplo 2: Generación de oligonucleótidos de ARNi conjugados con GalNAc dirigidos a TMPRSS6

La serina proteasa transmembrana 6 (TMPRSS6) es una serina proteasa transmembrana de tipo II que se encuentra en la superficie celular. La proteína funciona en una vía de señalización con hepcidina para regular el equilibrio de hierro en el cuerpo.

Identificación de secuencias diana del ARNm de TMPRSS6

Para generar oligonucleótidos de ARNi de *TMPRSS6*, se usó un algoritmo basado en computadora para identificar computacionalmente las secuencias diana de ARNm de *TMPRSS6* adecuadas para ensayar la inhibición de la expresión de *TMPRSS6* por la vía del ARNi. El algoritmo proporcionó secuencias de hebras guía (antisentido) de oligonucleótidos de ARNi, cada una de las cuales tenía una región de complementariedad con una secuencia diana de ARNm de *TMPRSS6* adecuada del ARNm humano (Hs) o murino (Mm) (por ejemplo, SEQ ID NO: 853 y 854, respectivamente; Tabla 1). Debido a la conservación de la secuencia a través de las especies, algunas de las secuencias diana de ARNm de *TMPRSS6* identificadas para el ARNm de *TMPRSS6* humano son homólogas a la secuencia diana de ARNm de *TMPRSS6* correspondiente del ARNm de *TMPRSS6* murino (Mm) (SEQ ID NO: 854; Tabla 1) y/o ARNm de *TMPRSS6* de mono cynomolgus (Mf) (SEQ ID NO: 855; Tabla 1). Se prevé que los oligonucleótidos de ARNi de *TMPRSS6* que comprenden una región de complementariedad con secuencias diana del ARNm de *TMPRSS6* homólogas con similitud de secuencia de nucleótidos tengan la capacidad de dirigirse a los ARNm de *TMPRSS6* homólogos. (por ejemplo, ARNm de *TMPRSS6* humano y de *TMPRSS6* de mono).

Tabla 1. Secuencias ilustrativas de ARNm de *TMPRSS6* humano, *TMPRSS6* de mono y *TMPRSS6* murino

Especies	Núm de secuencia de referencia de GenBank	SEQ ID NO
Humano (Hs)	NM_001289000,2	853
Murino (Mm)	NM_001355601,1	854
Mono cynomolgus (Mf)	XM_005567384,2	855

Específicamente, los oligonucleótidos que se sintetizaron como se describió en el Ejemplo 1 se usan para generar los oligonucleótidos de ARNi bicatenarios que comprenden una estructura de tetralazo con mella conjugada con GalNAc (denominada en la presente descripción “oligonucleótidos de *TMPRSS6* conjugados con GalNAc” u “oligonucleótidos GalNAc- *TMPRSS6*”) que tienen una hebra pasajera de 36 mer y una hebra guía de 22 mer. Además, las secuencias de nucleótidos que comprenden la hebra pasajera y la hebra guía tienen un patrón distinto de nucleótidos modificados y enlaces fosforotioato. Tres de los

nucleótidos que comprenden el tetralazo se conjugaron cada uno con un resto GalNAc (CAS#14131-60-3). El patrón de modificación de cada hebra se ilustra más abajo:

Hebra sentido: 5'-

[mXs][mX][mX][mX][mX][mX][mX][fX][fX][fX][fX][mX][mX][mX][mX]

5 [mX][mX][mX][mX][mX][mX][mX][mX][mX][mX][mX][mX][ademX-GalNAc][ademX-
GalNAc][ademX-GalNAc][mX][mX][mX][mX][mX][mX]- 3'

Hibridada a:

Hebra antisentido: 5'-[MeFosfonato-4O-mXs][fXs][fXs][fX][fX][mX][fX][mX][mX][fX][mX][mX][mX][fX][mX][mX][mX][mX][mX][mX][mXs][mXs][mX]- 3'

10 Tabla 2.Clave de modificación

Símbolo	Modificación/enlace
[MeFosfonato-4O-mXs]	Nucleótido modificado con 4'-O-monometilfosfonato-2'-O-metilo con un enlace fosforotioato al nucleótido vecino
[ademX-GalNAc]	GalNAc unido a un nucleótido
[mXs]	Nucleótido modificado con 2'-O-metilo con un enlace fosforotioato al nucleótido vecino
[fXs]	Nucleótido modificado con 2'-flúor con un enlace fosforotioato al nucleótido vecino
[mX]	Nucleótido modificado con 2'-O-metilo con enlaces fosfodiéster con nucleótidos vecinos
[fX]	Nucleótido modificado con 2'-flúor con enlaces fosfodiéster con nucleótidos vecinos

Se entiende que “X” en los patrones de modificación y clave de modificación anteriores se refiere a nucleobases.

Ensayos basados en células in vitro

La capacidad de oligonucleótidos de TMPRSS6 conjugados con GalNAc para reducir el ARNm de *TMPRSS6* se midió mediante el uso de ensayos celulares *in vitro*. Brevemente, las células Hep3B humanas que expresan el gen *TMPRSS6* humano endógeno se transfectaron con oligonucleótidos de TMPRSS6 conjugados con GalNAc a 1 nM en pocillos separados de una placa de cultivo celular de múltiples pocillos. Las células se mantuvieron durante 24 horas después de la transfección con los oligonucleótidos de TMPRSS6 conjugados con GalNAc modificados, y después la cantidad restante de ARNm de *TMPRSS6* de las células transfectadas se determinó mediante el uso de un ensayo de qPCR basado en TAQMAN®. Se usaron dos ensayos de qPCR, un ensayo 3' y un ensayo 5', para determinar los niveles de ARNm de *TMPRSS6* medido mediante el uso de sondas de PCR conjugadas con 6-carboxi-fluoresceína (FAM). Estos ensayos se identifican en la Tabla 3 más abajo. Los pares de cebadores se analizaron para el por ciento (%) de ARNm restante.

Tabla 3. Ensayos de qPCR

Ensayo 3'	Hacia adelante-1652 (F1652)	AGCCTGATTGTCTCAACGG	SEQ ID NO: 857
	Inverso-1725	CTGGAAGGTGAATGTCCAC	SEQ ID NO: 858
	Sonda-1676	ACGAAGAGCAGTGCCAGGAAGG	SEQ ID NO: 859
Ensayo 5'	Hacia adelante-394 (F394)	GTACTCAATCGCCACTTCTCC	SEQ ID NO: 860
	Inverso-539	GAATAGACGGAGCTGGAGTTG	SEQ ID NO: 861
	Sonda-450	CAGTGAAACCGCCAAAGCCCAG	SEQ ID NO: 862

Los resultados indicaron que los oligonucleótidos de *TMPRSS6* conjugados con GalNAc diseñados para dirigirse al ARNm de *TMPRSS6* inhibieron la expresión de *TMPRSS6* en células, como se determinó por una cantidad reducida de ARNm de *TMPRSS6* en células transfectadas con oligonucleótidos de *TMPRSS6* conjugados con GalNAc con relación a las

5 células de control, e indicaron que las secuencias de nucleótidos que comprenden los oligonucleótidos conjugados con GalXC son útiles para generar oligonucleótidos de ARNi para inhibir la expresión de *TMPRSS6*.

Ejemplo 3: Los oligonucleótidos de ARNi *TMPRSS6* conjugados con GalNAc inhiben la expresión de *TMPRSS6* humano y murino *in vivo*

10 Para evaluar la capacidad de los oligonucleótidos de ARNi para reducir la expresión de *TMPRSS6 in vivo*, se usó un modelo de ratón HDI.

Se evaluaron nueve oligonucleótidos de *TMPRSS6* conjugados con GalNAc que se muestran en la Tabla 4. Los oligonucleótidos que se seleccionaron se basaron en las secuencias de nucleótidos que se usaron para generar oligonucleótidos de ARNi para inhibir la expresión

15 de *TMPRSS6* en el cribado del Ejemplo 2.

Los oligonucleótidos se evaluaron en ratones modificados genéticamente para expresar transitoriamente el ARNm de *TMPRSS6* humano en hepatocitos de hígado de ratón. Brevemente, los ratones CD-1 hembras de 6-8 semanas de edad (n = 5) recibieron la administración por vía subcutánea de los oligonucleótidos de *TMPRSS6* conjugados con

20 GalNAc indicados a una concentración de 1 mg/kg o 2 mg/kg formulados en PBS. A un grupo de ratones controles (n = 5) se les administró solo PBS. Tres días después (72 horas), los ratones se inyectaron hidrodinámicamente (HDI) con 25 µg de un plásmido de ADN que codifica el marco abierto de lectura (ORF) del gen *TMPRSS6* humano (pCMV6_*TMPRSS6* que contiene NM_153609 (Cat #: SC306623, Origene)) bajo el control de una secuencia

25 promotora ubicua de citomegalovirus (CMV). Un día después de la introducción del plásmido de ADN, se recogieron muestras de hígado de los ratones HDI. El ARN total derivado de estos ratones HDI se sometió a análisis qRT-PCR para determinar los niveles de ARNm de *TMPRSS6*. Específicamente, el ARN se extrajo del tejido hepático para determinar los niveles de ARNm de *TMPRSS6* humano y endógeno murino mediante qPCR

30 (normalizado al gen neoR). Los niveles de ARNm de *TMPRSS6* humano se determinaron mediante el uso de ensayos de sonda de qPCR (IDT) PrimeTime™ 5' y 3', las cuales consisten de un par de cebadores y una sonda marcada con fluorescencia específica para ARNm de *TMPRSS6* humano. Los niveles de *TMPRSS6* murino se midieron de manera similar. El porcentaje de ARNm de *TMPRSS6* humano y endógeno murino restante en las

35 muestras de ratones tratados se determinó mediante el uso del método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ("Ct delta-delta") (Livak y Schmittgen (2001) *Methods* 25:402–408). Los valores se normalizaron para la eficiencia de la transfección mediante el uso del gen NeoR incluido en el plásmido de ADN.

Tabla 4. Oligonucleótidos de ARNi de *TMPRSS6* humano conjugados con GalNAc para el cribado de HDI

	Dianas de especies	Hebra sentido no modificada (SEQ ID NO)	Hebra antisentido no modificada (SEQ ID NO)	Hebra sentido modificada (SEQ ID NO)	Hebra antisentido modificada (SEQ ID NO)
TMPRSS6-416	Hs/Mf	579	600	621	642
TMPRSS6-0419	Hs/Mf	580	601	622	643
TMPRSS6-0615	Hs/Mf	595	616	637	658
TMPRSS6-0651	Hs/Mf/Mm	590	611	632	653
TMPRSS6-0654	Hs/Mf	596	617	638	659
TMPRSS6-0831	Hs/Mf	597	618	639	660
TMPRSS6-1375	Hs/Mf	585	606	627	648
TMPRSS6-1546	Hs/Mf	586	607	628	649
TMPRSS6-1550	Hs/Mf	587	608	629	650

Como se muestra en los ensayos de qPCR 5’ y 3’ en las Figuras 1A y 1B, y la Tabla 5, cada oligonucleótido redujo la expresión de TMPRSS6 en al menos 50 % a 2 mg/kg. TMPRSS6-0416, -0831 y -1546 fueron los oligonucleótidos más potentes y redujeron la expresión de TMPRSS6 en más del 50 % a la concentración inferior de 1 mg/kg. Estos datos demostraron que los oligonucleótidos modificados con GalNAc redujeron exitosamente la expresión de *TMPRSS6* humano *in vivo*.

Tabla 5. Resumen de ensayos 5’ y 3’ de las Figuras 1A y 1B

Construceto	Hs <i>TMPRSS6</i> -5'/F394				Hs <i>TMPRSS6</i> -3'/F1652			
	1 mg/kg		2 mg/kg		1 mg/kg		2 mg/kg	
	% restantes	SEM	% restantes	SEM	% restantes	SEM	% restantes	SEM
TMPRSS6-416	36,1	5,7	19,7	3,6	34,9	5,0	18,9	3,6
TMPRSS6-0419	44,0	5,5	19,0	3,0	46,6	7,2	22,0	2,5
TMPRSS6-0615	51,7	3,5	20,5	3,4	53,4	3,8	23,0	4,1
TMPRSS6-0651	46,0	4,0	31,7	3,5	53,9	5,3	31,5	3,7
TMPRSS6-0654	53,1	8,5	32,0	4,7	59,4	8,7	31,2	8,2
TMPRSS6-0831	33,8	2,7	29,1	4,5	33,4	1,8	34,5	5,0
TMPRSS6-1375	61,9	4,2	46,0	6,1	61,2	3,3	46,8	3,2
TMPRSS6-1546	26,4	1,5	26,1	3,9	30,6	1,7	23,5	4,1
TMPRSS6-1550	35,0	10,7	40,8	5,7	34,2	9,2	39,0	4,9

Como se muestra en la Figura 2, el oligonucleótido de ARNi de *TMPRSS6* conjugado con GalNAc *TMPRSS6*-0651, que tiene especificidad para *TMPRSS6* murino además de *TMPRSS6* humano, redujo la expresión de *TMPRSS6* murino endógena en al menos 50 % a 2 mg/kg. Estos datos demostraron que los oligonucleótidos modificados con GalNAc redujeron exitosamente la expresión de *TMPRSS6* murino endógena *in vivo*.

Ejemplo 4: Los oligonucleótidos de ARNi *TMPRSS6* conjugados con GalNAc inhiben la expresión *in vivo* de *TMPRSS6* de mono

Para evaluar la capacidad de los oligonucleótidos de ARNi para reducir la expresión de *TMPRSS6 in vivo*, se usó un modelo de mono (mono cynomolgus).

Se evaluaron cuatro oligonucleótidos de *TMPRSS6* conjugados con GalNAc modificados que se muestran en la Tabla 6 y se representan en las Figuras 3A-3D. Los oligonucleótidos que se seleccionaron se basaron en el cribado en el Ejemplo 2 y los resultados del Ejemplo 3. Brevemente, los monos cynomolgus, generalmente denominados en la presente descripción monos, se les administraron por vía subcutánea los oligonucleótidos de *TMPRSS6* conjugados con GalNAc indicados a una concentración de 1 mg/kg o 4 mg/kg formulados en

PBS el día 0, 28, 56, 84 y 112. A un grupo de monos controles (n = 5) se les administró solo PBS. El ARN total derivado de estos monos se sometió a análisis qRT-PCR para determinar los niveles de ARNm de *TMPRSS6*. Específicamente, el ARN se extrajo del tejido hepático para determinar los niveles de ARNm de *TMPRSS6* de mono mediante qPCR (normalizado al gen B2M) el día -7, 28, 56, 84, 112 y 168. Los niveles de ARNm de *TMPRSS6* de mono se determinaron mediante el uso de un ensayo de sonda de qPCR (IDT) PrimeTime™, las cuales consisten de un par de cebadores y una sonda marcada con fluorescencia específica para ARNm de *TMPRSS6* de mono. El porcentaje de ARNm de *TMPRSS6* de mono restante en las muestras de monos tratados se determinó mediante el uso del método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (“Ct delta-delta”) (Livak y Schmittgen (2001) Methods 25:402–408).

Tabla 6. Oligonucleótidos de ARNi de *TMPRSS6* de mono conjugados con GalNAc para el cribado NHP

	Dianas de especies	Hebra sentido no modificada (SEQ ID NO)	Hebra antisentido no modificada (SEQ ID NO)	Hebra sentido modificada (SEQ ID NO)	Hebra antisentido modificada (SEQ ID NO)
TMPRSS6-416	Hs/Mf	579	600	621	642
TMPRSS6-0651	Hs/Mf/Mm	590	611	632	653
TMPRSS6-0831	Hs/Mf	597	618	639	660
TMPRSS6-1546	Hs/Mf	586	607	628	649

Como se muestra en las Figuras 4A-4F, correspondientes a cada una de las muestras en los días -7, 28, 56, 84, 112 y 168 respectivamente, cada oligonucleótido redujo la expresión de *TMPRSS6* en al menos un 50 % tanto a 1 mg/kg como a 4 mg/kg a lo largo del estudio (es decir, durante 168 días). Estos datos demostraron que los oligonucleótidos modificados con GalNAc redujeron exitosamente la expresión de *TMPRSS6* de mono *in vivo*.

Ejemplo 5: Los oligonucleótidos de ARNi *TMPRSS6* conjugados con GalNAc modulan la homeostasis del hierro *in vivo*

Las mutaciones de pérdida de función en *TMPRSS6* dan lugar a niveles plasmáticos elevados de hepcidina y conducen a trastornos graves, que incluye la anemia ferropénica resistente al hierro. La proteína hepcidina es un regulador de la homeostasis del hierro y dirige la entrada del hierro a la circulación. Cuando los niveles de *hepcidina* son altos, los niveles de hierro sérico disminuyen, lo que puede provocar anemia. Cuando los niveles de hepcidina son bajos, en estados de enfermedad tales como la hemocromatosis, se pueden producir aumentos y sobrecargas de los niveles de hierro. Se sabe que *TMPRSS6* suprime la expresión de la *hepcidina* y, por lo tanto, la inhibición de *TMPRSS6* puede modular la expresión de la *hepcidina* y alterar los niveles de hierro sérico y la saturación.

Para evaluar los cambios en la homeostasis del hierro, se midieron los niveles de *hepcidina*, hierro sérico y saturación de hierro sérico después de la inhibición de *TMPRSS6*. Se administraron los cuatro oligonucleótidos de *TMPRSS6* conjugados con GalNAc modificados que se muestran en la Tabla 6 y se representan en las Figuras 3A-3D a monos cynomolgus como se describió en el Ejemplo 4. El ARN total derivado de estos monos se sometió a análisis qRT-PCR para determinar los niveles de ARNm de *hepcidina*.

Específicamente, el ARN se extrajo del tejido hepático para determinar los niveles de ARNm de *hepcidina* de mono mediante qPCR (normalizado al gen B2M) el día -7, 28, 56, 84, 112 y 168. Los niveles de ARNm de *hepcidina* de mono se determinaron mediante el uso de un ensayo de sonda de qPCR (IDT) PrimeTime™, las cuales consisten de un par de cebadores y una sonda marcada con fluorescencia específica para ARNm de *TMPRSS6* de mono. El porcentaje de ARNm de *hepcidina* de mono restante en las muestras de monos tratados se determinó mediante el uso del método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (“Ct delta-delta”) (Livak y Schmittgen (2001) Methods 25:402–408).

Como se muestra en las Figuras 5A-5F, correspondientes a cada una de las muestras en los días -7, 28, 56, 84, 112 y 168 respectivamente, en el día 56 (Figura 5C) se observó una regulación al alza significativa en la *hepcidina* para todos los oligonucleótidos. Se observó una regulación al alza de la *hepcidina* durante el resto del estudio hasta el día 168. Estos datos demuestran que los oligonucleótidos modificados con GalNAc para inhibir *TMPRSS6* reducen exitosamente el aumento de la expresión de *hepcidina in vivo*.

Para medir el hierro sérico y la saturación de hierro sérico, se colectó suero de los animales el día -7, 28, 56, 84, 112 y 168. Los niveles de hierro se miden mediante el uso de un análisis del panel de hierro realizado en el laboratorio de diagnóstico veterinario Cornell.

Como se muestra en las Figuras 6A-6F y Figuras 7A-7B, se observó una reducción dependiente de la dosis de hierro sérico después del día 28 y generalmente durante todo el estudio de 168 días para cada oligonucleótido. De manera similar, se observó una reducción dependiente de la dosis de la saturación de hierro sérico después del día 28 y generalmente durante todo el estudio de 168 días para cada oligonucleótido, como se muestra en las Figuras 8A-8F y Figuras 9A-9B. Juntos, estos datos demostraron que los oligonucleótidos modificados con GalNAc para inhibir *TMPRSS6* redujeron exitosamente el hierro sérico y la saturación de hierro sérico *in vivo*. Subsecuentemente, la reducción del hierro libre puede beneficiar a los pacientes con enfermedades de sobrecarga de hierro, como la hemocromatosis hereditaria (sobrecarga primaria de hierro) y la betatalasemia (sobrecarga secundaria de hierro), y podría limitar la eritropoyesis elevada y regulada erróneamente como se observa en la policitemia vera.

Aunque ciertas características de la invención se ilustraron y describieron en la presente descripción, ahora se les ocurrirán muchas modificaciones, sustituciones, cambios, y equivalentes a los expertos en la técnica. Por lo tanto, debe entenderse que las reivindicaciones anexas pretenden cubrir todas esas modificaciones y cambios siempre que caigan dentro del verdadero espíritu de la invención.