

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 543 004**

51 Int. Cl.:

C12N 15/113 (2010.01)

A61K 31/713 (2006.01)

C12N 15/11 (2006.01)

C07H 21/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.10.2009 E 09810834 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.04.2015 EP 2344639**

54 Título: **Composiciones y métodos para inhibir la expresión de transtiretina**

30 Prioridad:

15.09.2009 US 242783 P

02.03.2009 US 156670 P

09.06.2009 US 185545 P

18.11.2008 US 115738 P

20.10.2008 US 106956 P

22.09.2009 US 244794 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
13.08.2015

73 Titular/es:

**ALNYLAM PHARMACEUTICALS, INC. (100.0%)
300 Third Street, 3rd Floor
Cambridge, MA 02142, US**

72 Inventor/es:

**SAH, DINAH WEN-YEE;
HINKLE, GREGORY;
ALVAREZ, RENE;
MILSTEIN, STUART y
CHEN, QINGMIN**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 543 004 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Composiciones y métodos para inhibir la expresión de transtiretina.

La invención se refiere a un ácido ribonucleico bicatenario (ARNds) que fija como objetivo un gen de la transtiretina (TTR) y métodos para usar el ARNds para inhibir la expresión de TTR.

5 La transtiretina (TTR) es una proteína de unión a hormonas tiroideas, segregada. La TTR se une y transporta proteína de unión a retinol (PUR)/ Vitamina A y tirosina en suero (T4) en plasma y líquido cefalorraquídeo.

10 Tanto la TTR de secuencia normal como la TTR de secuencia variable producen amiloidosis. La TTR de secuencia normal produce amiloidosis cardíaca en personas que son mayores y se denomina amiloidosis sistémica senil (SSA, por sus siglas en inglés) (también denominada amiloidosis cardíaca senil (SCA, por sus siglas en inglés)). La SSA con frecuencia va acompañada de depósitos microscópicos en otros muchos órganos. Las mutaciones de la TTR aceleran el proceso de formación amiloide de TTR y son el factor de riesgo más importante para el desarrollo de amiloidosis de TTR clínicamente significativa (también denominada ATTR (por sus siglas en inglés) (tipo amiloidosis - transtiretina)). Se sabe que más de 85 variantes de TTR amiloidogénicas producen amiloidosis familiar sistémica. El hígado es el principal sitio de expresión de TTR. Otros sitios de expresión significativos incluyen el plexo colóide, la retina y el páncreas.

15 La amiloidosis por TTR se manifiesta de diversas formas. Cuando se ve afectado el sistema nervioso periférico más destacadamente, la enfermedad se denomina polineuropatía amiloidótica familiar (FAP, por sus siglas en inglés). Cuando está implicado principalmente el corazón pero no el sistema nervioso, la enfermedad se denomina cardiomiopatía amiloidótica familiar (FAC, por sus siglas en inglés). Un tercer tipo principal de amiloidosis por TTR se denomina amiloidosis leptomeníngea/del SNC (Sistema Nervioso Central).

20 Se ha demostrado que las moléculas de ARN bicatenarias (ARNds) bloquean la expresión génica en un mecanismo regulador altamente conservado conocido como interferencia por ARN (ARNi). La patente internacional WO 99/32619 Fire *et al.*) describe el uso de un ARNds de al menos 25 nucleótidos de longitud para inhibir la expresión de genes en *C. elegans*. Se ha demostrado también que el ARNds degrada el ARN objetivo en otros organismos, incluyendo las plantas (véase, por ejemplo, la patente internacional WO 99/53050, Waterhouse *et al.* y la patente internacional WO 99/61631, Heifetz *et al.*), *Drosophila* (véase, por ej. yang, D., *et al*, *Curr. Biol.* (2.000) 10: 1.191-1.200) y mamíferos (véase la patente internacional WO 00/44895, Limmer y la patente alemana DE 101 00 586.5, Kreuzer *et al.*).

25 La patente de EE.UU. 20070207974 describe los ARNsi funcionales e hiperfuncionales. La patente de EE.UU. 20090082300 describe moléculas antisentido dirigidas contra TTR. La Patente de EE.UU. N° 7.250.496 describe microARNs dirigidos contra TTR.

30 Stein *et al.* (The Journal of Neuroscience 24, 7.707-7.717 (2.004)) describen que la neutralización de la transtiretina invierte los efectos neuroprotectores de la proteína precursora amiloide secretada en ratones. Kurosawa *et al.* (Biochemical and Biophysical Research Communications 337, 1.012-1.018 (2.005)) describen la eliminación selectiva de un alelo de transtiretina mutante por los ARN de interferencia pequeños.

35 La invención se define por las reivindicaciones.

40 En un aspecto, la invención proporciona un ácido ribonucleico bicatenario (ARNds) para inhibir la expresión de la transtiretina (TTR), en la que dicho ARNds comprende una hebra transcrita y una hebra complementaria, comprendiendo la hebra complementaria una región complementaria a una parte de un ARNm que codifique transtiretina (TTR), en la que dicha región de complementariedad tiene 19 nucleótidos de longitud, la hebra complementaria comprende la SEC ID N° 170 y cada hebra del ARNds tiene 19, 20, 21, 22, 23 ó 24 nucleótidos de longitud.

45 También se describe un ácido ribonucleico bicatenario (ARNds) para inhibir la expresión de la transtiretina (TTR), en la que dicho ARNds comprende una hebra transcrita y una hebra complementaria, comprendiendo la hebra complementaria una región complementaria a una parte de un ARNm que codifica la transtiretina (TTR), en la que dicha región de complementariedad tiene menos de 30 nucleótidos de longitud y la hebra complementaria comprende 15 o más nucleótidos contiguos de la SEC ID N° 170, SEC ID N° 450, SEC ID N° 730 o SEC ID N° 1.010. La hebra transcrita también puede comprender 15 o más nucleótidos contiguos de la SEC ID N° 169, SEC ID N° 449, SEC ID N° 729 o SEC ID N° 1.009.

50 En otra realización, la hebra transcrita consta de la SEC ID N° 449 y la hebra complementaria consta de la SEC ID N° 450. En otra realización relacionada más, la hebra transcrita consta de la SEC ID N° 729 y la hebra complementaria consta de la SEC ID N° 730. En otra realización relacionada más, la hebra transcrita consta de la SEC ID N° 1.009 y la hebra complementaria consta de la SEC ID N° 1.010. El ARNds también puede comprender una hebra transcrita seleccionada de las Tablas 3A, 3B, 4, 6A, 6B, 7 y 16 y una hebra complementaria seleccionada de las Tablas 3A, 3B, 4, 6A, 6B, 7 y 16.

Según la invención, la región de complementariedad entre la hebra complementaria del ARNs y el ARNm que codifica la transtiretina tiene 19 nucleótidos de longitud. También se describe una región de complementariedad que consta de la SEC ID N° 169. Según la invención, cada hebra del ARNs tiene 19, 20, 21, 22, 23 ó 24 nucleótidos de longitud. En otra realización, cada hebra tiene 21 nucleótidos de longitud.

5 También se describe un ARNs para inhibir la expresión de la transtiretina que no escinde un ARNm de la TTR entre el nucleótido adenina en la posición 637 de la SEC ID N° 1.331 y el nucleótido guanina en la posición 638 de la SEC ID N° 1.331. El ARNs descrito puede escindir un ARNm de la TTR entre el nucleótido guanina en la posición 636 de la SEC ID N° 1.331 y el nucleótido adenina en la posición 637 de la SEC ID N° 1.331. El ARNs descrito puede hibridar a un ARNm de la TTR entre el nucleótido guanina en la posición 628 de la SEC ID N° 1.331 y el nucleótido uracilo en la posición 646 de la SEC ID N° 1.331.

10 En otras realizaciones relacionadas, la invención proporciona ARNs de la invención para inhibir la expresión de la transtiretina en la que el ARNs comprende uno o más nucleótidos modificados. En realizaciones relacionadas, se elige al menos un nucleótido modificado (o nucleótidos) del grupo que consiste en: un nucleótido 2'-O-metilo-modificado, un nucleótido que comprende un grupo 5'-fosforotioato y un nucleótido terminal ligado a un derivado de colesterilo o grupo bisdecilamida del ácido dodecanoico. En otra realización relacionada, el nucleótido modificado se elige del grupo de: un nucleótido 2'-desoxi-2'-fluoro-modificado, un nucleótido 2'-desoxi-modificado, un nucleótido bloqueado, un nucleótido abásico, un nucleótido 2'-amino-modificado, un nucleótido 2'-alquil-modificado, nucleótido de morfolino, un fosforamidato y un nucleótido que comprende base no natural. En ciertas realizaciones, el ARNs comprende al menos un nucleótido 2'-O-metilo-modificado.

20 En otras realizaciones, se conjuga un ARNs como se describió anteriormente para inhibir la expresión de la transtiretina a un ligando o se formula en una formulación de lípidos. La formulación de lípidos puede ser una formulación de LNP, una formulación de LNP01, una formulación de XTC-SNALP a una formulación de SNALP. La formulación de XTC-SNALP puede ser como sigue: usando 2,2-Dilinoil-4-dimetilaminoetil-[1,3]-dioxolano (XTC) con XTC/DPPC/Colesterol/PEG-cDMA en una proporción de 57,1/7,1/34,4/1,4 y una proporción de lípido:ARNsi de aproximadamente 7. En otras realizaciones relacionadas más, la hebra transcrita del ARNs consta de la SEC ID N° 1.009 y la hebra complementaria consta de la SEC ID N° 1.010 y el ARNs se formula en una formulación de XTC-SNALP como sigue: usando 2,2-Dilinoil-4-dimetilaminoetil-[1,3]-dioxolano (XTC) con un XTC/DPPC/Colesterol/PEG-cDMA en una proporción de 57,1/7,1/34,4/1,4 y una relación de lípido:ARNsi de aproximadamente 7. Alternativamente, un ARNs tal como los descritos anteriormente se puede formular en una formulación de LNP09 como sigue: usando XTC/DSPC/Col/PEG₂₀₀₀-C14 en una proporción de 50/10/38,5/1,5 % en moles y una relación de lípido:ARNsi de aproximadamente 11:1. En otra variación, el ARNs se formula en una formulación de LNP11 como sigue: usando MC3/DSPC/Col/PEG₂₀₀₀-C14 en una proporción de 50/10/38,5/1,5 % en moles y una relación de lípido:ARNsi de aproximadamente 11:1. El ARNs también se puede formular en una formulación de LNP09 o una formulación de LNP11 y reduce los niveles de ARNm de la TTR por aproximadamente 85 a 90% a una dosis de 0,3 mg/kg, en relación con un grupo de control de PBS. También, el ARNs se puede formular en una formulación de LNP09 o una formulación de LNP11 y reduce los niveles de ARNm de la TTR por aproximadamente 50% a una dosis de 0,1 mg/kg, en relación con un grupo de control de PBS. El ARNs se puede formular en una formulación de LNP09 o una formulación de LNP11 y reduce los niveles de proteína TTR de una manera dependiente de la dosis en relación con un grupo de control de PBS cuando se mide mediante un método western. El ARNs se puede formular en una formulación de SNALP como sigue: usando DiinDMA con un DLinDMA/DPPC/Colesterol/PEG2000-cDMA en una proporción de 57,1/7,1/34,4/1,4 y una proporción de lípido:ARNsi de aproximadamente 7.

45 La administración de un ARNs tal como los descritos anteriormente para inhibir la expresión de transtiretina, puede dar como resultado inhibición de aproximadamente 95% de expresión de ARNm de la TTR cuando se mide por un ensayo PCR en tiempo real, en el que la célula es una célula HepG2 o una célula Hep3B y en la que la concentración del ARNs es 10 nM. La administración del ARNs a una célula puede dar como resultado inhibición de aproximadamente 74% de expresión de ARNm de la TTR cuando se mide mediante un ensayo de ADN ramificado, en el que la célula es una célula HepG2 o una célula Hep3B y en la que la concentración del ARNs es 10 nM. El ARNs puede tener un IC50 menor que 10 pM en una célula HepG2, en el que la concentración del ARNs es 10 nM. El ARNs puede tener un ED50 de aproximadamente 1 mg/kg. La administración del ARNs puede reducir ARNm de la TTR por aproximadamente 80% en hígado de mono cynomolgus, en el que la concentración del ARNs es 3 mg/kg. La administración del ARNs puede no dar como resultado actividad inmunoestimuladora en células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC, por sus siglas en inglés) cuando se mide por ensayos ELISA IFN-alfa y TNF-alfa. La administración del ARNs puede reducir los niveles de ARNm de la TTR en el hígado por aproximadamente 97% o los niveles de proteína TTR en suero por aproximadamente 90%, en la que la concentración del ARNs es 6 mg/kg. La administración del ARNs puede reducir los niveles de ARNm de la TTR en el hígado y/o los niveles de proteína TTR en suero hasta 22 días, en la que la concentración del ARNs es 6 mg/kg o 3 mg/kg. El ARNs puede suprimir los niveles de proteína TTR en suero hasta el día 14 post-tratamiento cuando se administra a un individuo con necesidad del mismo a 1 mg/kg o 3 mg/kg. El ARNs puede reducir la expresión de TTR por 98,9% en una célula Hep3B a una concentración de 0,1 nM cuando se mide por PCR en tiempo real. El ARNs puede reducir la expresión de TTR por 99,4% en una célula Hep3B a una concentración de 10 nM cuando se mide por PCR en tiempo real.

Además se describe un ácido ribonucleico bicatenario (ARNds) para inhibir la expresión de la transtiretina (TTR), en la que dicho ARNds comprende una hebra transcrita y una hebra complementaria, comprendiendo la hebra complementaria una región complementaria a una parte de una transtiretina (TTR) que codifica ARNm, en la que dicha región de complementariedad tiene menos de 30 nucleótidos de longitud y en la que el ARNds comprende una hebra transcrita seleccionada de las Tablas 3A, 3B, 4, 6A, 6B, 7 y 16 y una hebra complementaria seleccionada de las Tablas 3A, 3B, 4, 6A, 6B, 7 y 16.

En otra realización, la invención proporciona un ácido ribonucleico bicatenario (ARNds) para inhibir la expresión de la transtiretina (TTR), en la que dicho ARNds comprende una hebra complementaria que comprende una región complementaria a 19 nucleótidos de los nucleótidos 618-648 de la SEC ID N° 1.331 y en la que dicha base de la hebra complementaria se empareja con la guanina en la posición 628 de la SEC ID N° 1.331.

En algunas realizaciones, la invención proporciona una célula que contiene cualquiera de los ARNds de la invención. En algunas otras realizaciones, la invención proporciona un vector que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica al menos una hebra de cualquiera de los ARNds de la invención. En algunas realizaciones, el vector está en una célula.

En otras realizaciones, la invención proporciona una composición farmacéutica para inhibir la expresión de un gen de TTR que comprende cualquiera de los ARNds de la invención y un portador farmacéuticamente aceptable. Se describe también una composición farmacéutica para inhibir la expresión de un gen de TTR que comprende un ARNds y una formulación de SNALP, en la que el ARNds comprende una hebra complementaria que tiene menos de 30 nucleótidos de longitud y comprende 15 o más contiguos nucleótidos de la SEC ID N° 170, SEC ID N° 450, SEC ID N° 730 o SEC ID N° 1.010 y en la que la formulación de SNALP comprende DlinDMA, DPPC, Colesterol y PEG2000-cDMA en una proporción de 57,1/7,1/34,4/1,4 respectivamente.

En otra realización más, la invención proporciona un método para inhibir la expresión de TTR en una célula, comprendiendo el método: (a) poner en contacto la célula con cualquiera de ARNds de la invención y (b) mantener la célula producida en la etapa (a) durante un tiempo suficiente para obtener la degradación de la transcripción del ARNm de un gen de TTR, inhibiendo de ese modo la expresión del gen de TTR en la célula, siempre que se excluya cualquier método de tratamiento del cuerpo del ser humano o del animal por terapia.

En otra realización más, la invención proporciona un ARNds de la invención para uso en un método para tratar un trastorno mediado por expresión de TTR, en el que el ser humano presenta amiloidosis por transtiretina y/o trastorno hepático. En realizaciones relacionadas, el ARNds se tiene que administrar al ser humano a aproximadamente 0,01; 0,1; 0,5; 1,0; 2,5 ó 5,0 mg/kg. En otra realización relacionada más, el ARNds se tiene que administrar al ser humano a aproximadamente 1,0 mg/kg. Se puede proporcionar además al ser humano un trasplante de hígado. La administración del ARNds puede reducir el ARNm de la TTR por aproximadamente 80% en el hígado humano, en el que la concentración del ARNds es 3 mg/kg. La administración del ARNds puede no dar como resultado actividad inmunoestimuladora en el ser humano cuando se mide por ensayos ELISA de IFN-alfa y TNF-alfa. La administración del ARNds puede reducir los niveles de ARNm de la TTR hepáticos por aproximadamente 97% o los niveles de proteína TTR en suero por aproximadamente 90%, en la que la concentración del ARNds es 6 mg/kg. La administración del ARNds puede reducir los niveles de ARNm de la TTR hepáticos y/o los niveles de proteína TTR en suero hasta 22 días, en la que la concentración del ARNds es 6 mg/kg o 3 mg/kg. El ARNds se puede formular en una formulación de LNP09 como sigue: usando XTC/DSPC/Col/PEG₂₀₀₀-C14 en una proporción de 50/10/38,5/1,5 % en moles y una relación de lípido:ARNsi de aproximadamente 11:1. El ARNds se puede formular en una formulación de LNP11 como sigue: usando MC3/DSPC/Col/PEG₂₀₀₀-C14 en una proporción de 50/10/38,5/1,5 % en moles y una proporción de lípido:ARNsi de aproximadamente 11:1. El ARNds se puede formular en una formulación de LNP09 o una formulación de LNP11 y reduce los niveles de ARNm de la TTR por aproximadamente 85 a 90% a una dosis de 0,3 mg/kg, en relación con un grupo de control de PBC. El ARNds se puede formular en una formulación de LNP09 o una formulación de LNP11 y reduce los niveles de ARNm de la TTR por aproximadamente 50% a una dosis de 0,1 mg/kg, en relación con un grupo de control de PBC. El ARNds se puede formular en una formulación de LNP09 o una formulación de LNP11 y reduce los niveles de proteína TTR de una manera dependiente de la dosis en relación a un grupo de control de PBC cuando se mide por un método western. La administración del ARNds puede suprimir los niveles de proteína TTR en suero hasta el día 14 post-tratamiento cuando se administra a un ser humano a 1 mg/kg o 3 mg/kg. El ARNds se puede formular en una formulación de SNALP como sigue: usando DlinDMA con un DlinDMA/DPPC/Colesterol/PEG2000-cDMA en una proporción de 57,1/7,1/34,4/1,4 y una proporción de lípido:ARNsi de aproximadamente 7.

Se describe el uso de un ARNds para tratar un trastorno mediado por expresión de TTR que comprende administrar a un ser humano con necesidad de dicho tratamiento una cantidad terapéuticamente eficaz de cualquiera de los ARNds descritos en el Sumario, anteriormente.

El uso de un ARNds en un método para inhibir la expresión de TTR en una célula, en la que el método comprende (a) poner en contacto la célula con un ARNds descrito en el Sumario, anteriormente y (b) mantener la célula producida en la etapa (a) durante un tiempo suficiente para obtener la degradación de la transcripción de ARNm de un gen de TTR, inhibiendo de ese modo la expresión del gen de TTR en la célula.

La FIG. 1 es una gráfica de niveles de TNFalfa e IFNalfa en los PBMC humanos cultivados después de transfección con ARNsi de TTR.

La FIG. 2A y 2B son curvas de respuesta a la dosis para AD-18324 y AD-18328, respectivamente, en células HepG2.

5 La FIG. 3 es una curva de respuesta a la dosis para AD-18246 en células HepG2.

La FIG. 4A y la FIG. 4B muestran la inhibición de los niveles de ARNm hepático y de proteínas en plasma, respectivamente, en ratones H129-mTTR-KO/iNOS-KO/hTTR transgénicos por una administración de inyección intravenosa rápida de TTR-ARNds (AD-18324, AD-18328 y AD-18246) formulada en LNP01.

10 La FIG. 5 es una gráfica que resume las mediciones de los niveles de ARNm de la TTR en los hígados de primates no humanos después de infusión intravenosa de 15 minutos de TTR-ARNds (AD-18324 y AD-18328) formulada en SNALP.

15 La FIG. 6A y la FIG. 6B muestran la inhibición de los niveles de ARNm hepático humano de la TTR V30M y de proteínas en suero, respectivamente, en ratones transgénicos por una administración intravenosa rápida de SNALP-18328. Se determinaron las medias del grupo, se normalizó al grupo de control de PBS y después se representó gráficamente. Las barras de error representan desviaciones estándar. El porcentaje de reducción de la media del grupo, relativa a PBS, se indica para los grupos de SNALP-1955 y SNALP-18328. (***) $p < 0,001$, ANOVA de un factor, con ensayo retrospectivo de Dunn).

20 La FIG. 7A y la FIG. 7B muestran la durabilidad de la reducción de los niveles de ARNm hepático de TTR V30M humano y de proteínas en suero, respectivamente, en ratones transgénicos durante 22 días después de una administración intravenosa rápida única de SNALP-18328. Se determinaron las medias del grupo. Se normalizaron los niveles de ARNm de TTR/GAPDH a los niveles del día 0 y se representaron gráficamente. El porcentaje de reducción de los niveles de ARNm de la TTR normalizados en relación con SNALP-1955 para cada instante de tiempo se calculó y se indicó para los grupos de SNALP-18328. (***) $p < 0,001$ ANOVA de un factor, con ensayo retrospectivo de Dunn).

25 La FIG. 8 muestra el transcurso del tiempo de los niveles de proteína en suero de la TTR en primates no humanos durante 14 días después de una infusión intravenosa de 15 minutos, única, de SNALP-18328.

La FIG. 9 muestra la reducción de inmunoreactividad de la TTR en diversos tejidos de ratones en los que se ha invalidado TTR/HSF-1 V30M humano después de administración intravenosa rápida de SNALP-18328. E, esófago; S, estómago; II, intestino/duodeno; 14, intestino/colon; N, nervio; D, ganglios de la raíz dorsal.

30 La FIG. 10 muestra las mediciones de los niveles de ARNm de la TTR en los hígados de primates no humanos después de infusión intravenosa de 15 minutos de XTC-SNALP-18328.

35 Las FIGs. 11A y 11B muestran las mediciones de ARNm de la TTR y los niveles de proteína en suero, respectivamente, en hígados de primates no humanos después de infusión intravenosa de 15 minutos de LNP09-18328 o LNP11-18328. La FIG 11C muestra el transcurso del tiempo de los niveles de proteína en suero de la TTR después de 28 días después de infusión intravenosa de 15 minutos de 0,3 mg/kg de LNP09-18328, cuando se compara con el grupo de control de PBS.

La FIG. 12 muestra la secuencia de ARNm de la TTR humano (Ref. Sec. NM_000371.3, SEC ID N° 1.331).

40 Las FIGs. 13A y 13B son las secuencias de ARNm de la TTR humano y de rata, respectivamente. La FIG. 13A es la secuencia de ARNm de la TTR humano (Ref. Sec. NM_000371.2, SEC ID N° 1.329). La FIG. 13B es la secuencia de ARNm de la TTR de rata (Ref. Sec. NM_012681.1, SEC ID N° 1.330).

La FIG. 14 muestra la alineación de nucleótidos de NM_000371.3, NM_000371.2 y AD-18328.

La FIG. 15 ilustra los síntomas y las mutaciones en TTR asociadas a neuropatía amiloidótica familiar, cardiomiopatía amiloidótica familiar y amiloidosis del SNC.

45 La FIG. 16 muestra la reducción de los niveles de ARNm de la TTR en el hígado con SNALP-18534 con diferentes duraciones de la infusión intravenosa. A los grupos de animales ($n=4$ /grupo) se administró 1 mg/kg de SNALP-18534 por una infusión intravenosa de 15 minutos o 1, 2 ó 3 horas. Cuarenta y ocho horas más tarde, se practicó la eutanasia a las ratas y se recogieron los hígados. Se midieron los niveles de TTR y GAPDH de lisados de hígado usando el ensayo de ADNb Quantigene. Se calculó la relación de los niveles de ARNm de TTR a GAPDH para cada animal. Se determinaron las medias del grupo y se normalizó a un grupo de control de PBS y después se representó gráficamente. Las barras de error representan desviaciones estándar. (***) $p < 0,001$, ANOVA de un factor con ensayo retrospectivo de Bonferroni, en relación con PBS).

50 La FIG 17 muestra las mediciones de los niveles de ARNm de la TTR en hígados de ratas después de infusión intravenosa de 15 minutos de LNP07-18534 o LNP08-18534.

La FIG. 18 muestra inhibición *in vivo* de niveles de ARNm de la TTR endógenos en hígados de ratas Sprague-Dawley después de una infusión IV de 15 minutos de LNP09-18534 o LNP11-18534. Se administró de manera intravenosa a grupos de animales (n=4/grupo) 0,01; 0,03; 0,1 ó 0,3 mg/kg de LNP09-18534, LNP-11-18534 o PBS por una infusión intravenosa de 15 minutos. Cuarenta y ocho horas más tarde, se practicó la eutanasia a los animales y se recogieron los hígados. Se midieron los niveles de ARNm de TTR y GAPDH de lisados de biopsia de hígado usando el ensayo de ADNb Quantigene. Se calculó la relación de los niveles de ARNm de TTR a GAPDH para cada animal. Se determinaron las medias del grupo, se normalizó al grupo de control de PBS y después se representó gráficamente. Las barras de error representan desviaciones estándar.

Se describen ARNs y métodos para usar los ARNs para inhibir la expresión de un gen de TTR en una célula o un mamífero donde el ARNs fija como objetivo un gen de TTR. También se describen composiciones y métodos para tratar afecciones y enfermedades patológicas, tales como una amiloidosis por TTR, en un mamífero producida por la expresión de un gen de TTR. El ARNs dirige la degradación específica de la secuencia de ARNm por un procedimiento conocido como interferencia de ARN (ARNi).

Los ARNs de las composiciones caracterizadas en la presente memoria incluyen una hebra de ARN (la hebra complementaria) con una región que tiene menos de 30 nucleótidos de longitud, en general 19-24 nucleótidos de longitud y es sustancialmente complementaria a al menos parte de una transcripción de ARNm de un gen de TTR. El uso de estos ARNs permite la degradación fijada como objetivo de los ARNm de los genes que están implicados en patologías asociadas a la expresión de la TTR en mamíferos. Dosis muy bajas de los ARNs de la TTR pueden mediar de manera específica y de manera eficaz en particular ARNi, dando como resultado una inhibición significativa de la expresión de un gen de la TTR. Usando ensayos a base de células, los presentes autores han demostrado que la TTR que fija como objetivo los ARNs puede mediar de manera específica y de manera eficaz ARNi, dando como resultado una inhibición significativa de la expresión de un gen de la TTR. Así, los métodos y las composiciones que incluyen estos ARNs son útiles para tratar procesos patológicos que pueden estar mediados por TTR de regulación hacia abajo, tal como en el tratamiento de un trastorno hepático o una amiloidosis de la TTR, por ejemplo FAP.

Los métodos y las composiciones que contienen un ARNs de la TTR son útiles para tratar procesos patológicos mediados por expresión de TTR, tal como una amiloidosis por TTR. Un método para tratar un trastorno mediado por expresión de TTR puede incluir administrar a un ser humano con necesidad de dicho tratamiento una cantidad terapéuticamente eficaz de un ARNs fijado como objetivo a TTR. Se puede administrar un ARNs al ser humano a aproximadamente 0,01; 0,1; 0,5; 1,0; 2; 2,5; 3; 4; 5; 6; 7; 8; 9; 10; 11; 12; 13; 14; 15; 16; 17; 18; 19; 20; 21; 22; 23; 24 ó 25 mg/kg.

La siguiente descripción detallada describe cómo preparar y usar las composiciones que contienen los ARNs para inhibir la expresión de un gen de TTR, así como composiciones y métodos para tratar enfermedades y trastornos producidos por la expresión de este gen. Las composiciones farmacéuticas descritas incluyen un ARNs con una hebra complementaria que comprende una región de complementariedad que tiene menos de 30 nucleótidos de longitud, en general 19-24 nucleótidos de longitud y es sustancialmente complementaria a al menos parte de una transcripción de ARN de un gen de TTR, junto con un portador farmacéuticamente aceptable. Las composiciones también incluyen un ARNs con una hebra complementaria con una región de complementariedad que tiene menos de 30 nucleótidos de longitud, en general 19-24 nucleótidos de longitud y es sustancialmente complementaria a al menos parte de una transcripción de ARN de un gen de TTR.

La hebra transcrita de un ARNs puede incluir 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 o más nucleótidos contiguos de la SEC ID N° 169, SEC ID N° 449, SEC ID N° 729 o SEC ID N° 1.009. La hebra complementaria de un ARNs puede incluir 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 o más nucleótidos contiguos de la SEC ID N° 170, SEC ID N° 450, SEC ID N° 730 o SEC ID N° 1.010. En una realización, la hebra transcrita de un ARNs consta de la SEC ID N° 449 y la hebra complementaria consta de la SEC ID N° 450. En una realización, la hebra transcrita de un ARNs consta de SEC ID N° 729 y la hebra complementaria consta de la SEC ID N° 730. En una realización, la hebra transcrita de un ARNs consta de la SEC ID N° 1.009 del mismo y la hebra complementaria consta de la SEC ID N° 1.010.

Un ARNs puede incluir al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más nucleótidos modificados. Un nucleótido modificado puede incluir un nucleótido 2'-O-metil-modificado, un nucleótido que comprende un grupo 5'-fosforotioato y/o un nucleótido terminal ligado a un derivado de colesterilo o grupo bisdecilamida de ácido dodecanoico. En una realización, un nucleótido modificado puede incluir un nucleótido 2'-desoxi-2'-fluoro-modificado, un nucleótido 2'-desoxi-modificado, un nucleótido bloqueado, un nucleótido abásico, un nucleótido 2'-amino-modificado, un nucleótido 2'-alquil-modificado, nucleótido de morfolino, un fosforamidato y/o un nucleótido que comprende base no natural.

La región de complementariedad de un ARNs puede tener al menos 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 ó más nucleótidos de longitud. La región de complementariedad puede incluir 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 o más nucleótidos contiguos de la SEC ID N° 169.

Cada hebra de un ARNs puede tener 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 o más nucleótidos de longitud. El ARNs puede incluir una hebra transcrita o fragmento de 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 ó

21 nucleótidos de la misma, seleccionados de las Tablas 3A, 3B, 4, 6A, 6B, 7 y 16 y una hebra complementaria o fragmento de 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 ó 21 nucleótidos de la misma, seleccionados de las Tablas 3A, 3B, 4, 6A, 6B, 7 y 16.

- 5 La administración de un ARNds a una célula puede dar como resultado aproximadamente 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 90%, 95% o más de inhibición de expresión de ARNm de la TTR cuando se mide por un ensayo de PCR en tiempo real. La administración de un ARNds a una célula puede dar como resultado aproximadamente 40% a 45%, 45% a 50%, 50% a 55%, 55% a 60%, 60% a 65%, 65% a 70%, 70% a 75%, 75% a 80%, 80% a 85%, 85% a 90%, 90% a 95% o más de inhibición de la expresión de ARNm de la TTR cuando se mide por un ensayo de PCR en tiempo real. La administración de un ARNds a una célula puede dar como resultado aproximadamente 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 90%, 95% o más de inhibición de la expresión de ARNm de la TTR cuando se mide por un ensayo de ADN ramificado. La administración de un ARNds a una célula puede dar como resultado aproximadamente 40% a 45%, 45% a 50%, 50% a 55%, 55% a 60%, 60% a 65%, 65% a 70%, 70% a 75%, 75% a 80%, 80% a 85%, 85% a 90%, 90% a 95% o más de inhibición de la expresión de ARNm de la TTR cuando se mide por un ensayo de ADN ramificado.
- 10
- 15 Un ARNds puede tener un IC50 menor que 0,01 pM, 0,1 pM, 1 pM, 5 pM, 10 pM, 100pM o 1.000 pM. Un ARNds puede tener un ED50 de aproximadamente 0,01; 0,1; 1; 5 ó 10 mg/kg.

- La administración de un ARNds puede reducir ARNm de la TTR por aproximadamente 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 90%, 95% o más en monos cynomolgus. La administración de un ARNds puede reducir los niveles de ARNm de la TTR hepáticos por aproximadamente 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 90%, 95% o más o los niveles de proteína TTR en suero por aproximadamente 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 90%, 95% o más. La administración de un ARNds puede reducir los niveles de ARNm de la TTR hepáticos y/o los niveles de proteína TTR en suero hasta 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 o más días.
- 20

- Un ARNds se puede formular en una formulación de LNP y reduce los niveles de ARNm de la TTR por aproximadamente 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 90%, 95% o más a una dosis de 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7; 0,8; 0,9 ó 1 mg/kg, en relación con un grupo de control de PBC. Un ARNds se puede formular en una formulación de LNP y reduce los niveles de proteína TTR aproximadamente 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 90%, 95% o más en relación con un grupo de control de PBC cuando se mide por un método western. Un ARNds puede suprimir los niveles de proteína TTR en suero hasta del día 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 ó 25 post-tratamiento cuando se administra a un individuo con necesidad del mismo a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 ó 25 mg/kg.
- 25
- 30

- De acuerdo con esto, se describen composiciones farmacéuticas que contienen un ARNds de la TTR y un portador farmacéuticamente aceptable, métodos para usar las composiciones para inhibir la expresión de un gen de TTR y métodos para usar las composiciones farmacéuticas para tratar enfermedades producidas por expresión de un gen de TTR.
- 35

I. Definiciones

- Por conveniencia, el significado de ciertos términos y expresiones usados en la memoria descriptiva, ejemplos y reivindicaciones adjuntas, se proporciona a continuación. Si existe una aparente discrepancia entre el uso de un término en otras partes de esta memoria descriptiva y su definición proporcionada en esta sección, prevalecerá la definición en esta sección.
- 40

- "G," "C," "A" y "U" representan en general cada uno un nucleótido que contiene guanina, citosina, adenina y uracilo como una base, respectivamente. "T" y "dT" se usan de forma intercambiable en la presente memoria y se refieren a un desoxirribonucleótido en el que la nucleobase es timina, por ej., desoxirribotimina. Sin embargo, se puede entender que el término "ribonucleótido" o "nucleótido" o "desoxirribonucleótido" también se puede referir a un nucleótido modificado, como se detalla además a continuación, o un resto de reemplazo de sustitución. El experto sabe que se pueden reemplazar guanina, citosina, adenina y uracilo por otros restos sin modificar sustancialmente las propiedades de apareamiento de bases de un oligonucleótido que comprende un nucleótido que soporta dicho resto de sustitución. Por ejemplo, sin limitación, un nucleótido que comprende inosina como su base puede emparejar base con nucleótidos que contienen adenina, citosina o uracilo. Por lo tanto, los nucleótidos que contienen uracilo, guanina o adenina se pueden reemplazar en las secuencias de nucleótidos de la invención por un nucleótido que contenga, por ejemplo, inosina. Las secuencias que comprenden tales restos de sustitución son realizaciones de la invención.
- 45
- 50

- Como se usa en la presente memoria, "transtiretina" ("TTR") se refiere a un gen en una célula. TTR es también conocido como ATTR, HsT2651, PALB, prealbúmina, TBPA y la transtiretina (prealbúmina, amiloidosis tipo I). La secuencia de una transcripción de ARNm de la TTR humano se puede encontrar en NM_000371. La secuencia de ARNm de la TTR de ratón se puede encontrar en NM_013697.2 y la secuencia de ARNm de la TTR de rata se puede encontrar en NM_012681.1.
- 55

Como se usa en la presente memoria, "secuencia objetivo" se refiere a una porción contigua de la secuencia de nucleótidos de una molécula de ARNm formada durante la transcripción de un gen de TTR, incluyendo ARNm que es un producto de tratamiento de ARN de un producto de transcripción primario.

5 Como se usa en la presente memoria, el término "hebra que comprende una secuencia" se refiere a un oligonucleótido que comprende una cadena de nucleótidos que se describe por la secuencia referida usando la nomenclatura de nucleótidos clásica.

10 Como se usa en la presente memoria y a menos que se indique de otro modo, el término "complementario," cuando se usa para describir una primera secuencia de nucleótidos en relación a una segunda secuencia de nucleótidos, se refiere a la capacidad de un oligonucleótido o polinucleótido que comprende la primera secuencia de nucleótidos para hibridar y formar una estructura dúplex en ciertas condiciones con un oligonucleótido o polinucleótido que comprende la segunda secuencia de nucleótidos, como entenderá el experto. Tales condiciones, por ejemplo, pueden ser condiciones rigurosas, donde las condiciones rigurosas pueden incluir: NaCl 400 mM, PIPES 40 mM pH 6,4, AEDT 1 mM, 50°C o 70°C durante 12-16 horas seguido por lavado. Se pueden aplicar otras condiciones, tales como condiciones fisiológicamente relevantes como se pueden encontrar en el interior de un organismo. El experto podrá determinar la serie de condiciones más apropiadas para un ensayo de complementariedad de dos secuencias de acuerdo con la aplicación última de los nucleótidos hibridados.

15 Esto incluye apareamiento de bases del oligonucleótido o polinucleótido que comprende la primera secuencia de nucleótidos al oligonucleótido o polinucleótido que comprende la segunda secuencia de nucleótidos por la longitud completa de la primera y segunda secuencia de nucleótidos. Dichas secuencias se pueden referir como "completamente complementarias" con respecto una a la otra en la presente memoria. Sin embargo, en el caso de que una primera secuencia se refiera como "sustancialmente complementaria" con respecto a una segunda secuencia en la presente memoria, las dos secuencias pueden ser completamente complementarias o pueden formar una o más, pero generalmente no más de 4, 3 ó 2 pares de bases erróneamente emparejadas en la hibridación, al tiempo que se retiene la capacidad para hibridar en las condiciones más relevantes a su aplicación última. Sin embargo, en el caso de que se designen dos oligonucleótidos para formar, en la hibridación, uno o más salientes monocatenarios, dicho salientes no se considerarán como errores de emparejamiento con respecto a la determinación de complementariedad. Por ejemplo, un ARNs que comprende un oligonucleótido de 21 nucleótidos de longitud y otro oligonucleótido de 23 nucleótidos de longitud, en el que el oligonucleótido más largo comprende una secuencia de 21 nucleótidos que es completamente complementario al oligonucleótido más corto, se puede referir como "completamente complementario" para los fines descritos en la presente memoria.

20 Secuencias "complementarias", como se usa en la presente memoria, también pueden incluir, o se forman completamente de, pares de bases no de Watson-Crick y/o pares de bases formadas de nucleótidos no naturales y modificados, en la medida en que se satisfagan los requerimientos anteriores con respecto a su capacidad para hibridar. Dichas pares de bases no de Watson-Crick incluyen, pero no se limitan a, apareamiento de bases G:U Wobble o Hogstein.

25 Los términos "complementario," "completamente complementario" y "sustancialmente complementario" en la presente memoria se pueden usar con respecto al emparejamiento de bases entre la hebra transcrita y la hebra complementaria de un ARNs o entre la hebra complementaria de un ARNs y una secuencia objetivo, como se entenderá a partir del contexto de su uso.

30 Como se usa en la presente memoria, un polinucleótido que es "sustancialmente complementario a al menos parte de" un ARN mensajero (ARNm) se refiere a un polinucleótido que es sustancialmente complementario a una porción contigua del ARNm de interés (*por ej.*, un ARNm que codifica TTR) incluyendo un 5' UTR, un marco de lectura abierto (ORF, por sus siglas en inglés) o un 3' UTR. Por ejemplo, un polinucleótido es complementario a al menos una parte de un ARNm de la TTR si la secuencia es sustancialmente complementaria a una porción no interrumpida de un ARNm que codifica TTR.

35 El término "ARN bicatenario" o "ARNs," como se usa en la presente memoria, se refiere a un complejo de moléculas de ácido ribonucleico, que tienen una doble estructura que comprende dos cadenas de ácidos nucleicos antiparalelas y sustancialmente complementarias, como se definió anteriormente. En general, la mayoría de los nucleótidos de cada cadena son ribonucleótidos, pero como se describe con detalle en la presente memoria, cada una o las dos cadenas también pueden incluir al menos un no ribonucleótido, por ejemplo, desoxirribonucleótido y/o un nucleótido modificado. Además, como se usa en esta memoria descriptiva, "ARNs" puede incluir modificaciones químicas a los ribonucleótidos, incluyendo modificaciones sustanciales en múltiples nucleótidos e incluyendo todos los tipos de modificaciones descritos en la presente memoria o conocidos en la técnica. Cualquiera de tales modificaciones, como se usa en una molécula de tipo ARNs, están incluidas por "ARNs" para los fines de esta memoria descriptiva y las reivindicaciones.

40 Las dos hebras que forman la estructura doble pueden ser diferentes porciones de una molécula de ARN más grande o pueden ser moléculas de ARN separadas. En el caso de que las dos hebras sean parte de una molécula más grande, y por lo tanto estén conectadas por una cadena ininterrumpida de nucleótidos entre el extremo 3' de una hebra y el extremo 5' de la otra hebra respectiva formando la doble estructura, la cadena de ARN que conecta

se refiere como un "bucle horquilla". En el caso de que las dos hebras estén conectadas mediante enlaces covalentes por medios distintos de una cadena ininterrumpida de nucleótidos entre el extremo 3' de una hebra y el extremo 5' de la otra hebra respectiva formando la doble estructura, la estructura de conexión se refiere como un "ligador". Las hebras de ARN pueden tener el mismo número de nucleótidos o uno diferente. El número máximo de pares de bases es el número de nucleótidos en la hebra más corta del ARNs menos cualquier saliente que esté presente en el dúplex. Además de la doble estructura, un ARNs puede comprender uno o más salientes de nucleótidos. El término "ARNsi" se usa también en la presente memoria para referirse a un ARNs como se describió anteriormente.

Como se usa en la presente memoria, un "saliente de nucleótido" se refiere a un nucleótido o nucleótidos no emparejados que sobresalen de la doble cadena de un ARNs cuando un extremo 3' de una hebra del ARNs se extiende más allá del extremo 5' de la otra hebra, o viceversa. "Romo" o "extremo romo" significa que no hay nucleótidos no emparejados en ese extremo del ARNs, es decir, no saliente de nucleótido. Un ARNs "de extremo romo" es un ARNs que tiene doble cadena por toda su longitud, es decir, no tiene saliente de nucleótidos en ningún extremo de la molécula.

El término "hebra complementaria" se refiere a la hebra de un ARNs que incluye una región que es sustancialmente complementaria a una secuencia objetivo. Como se usa en la presente memoria, el término "región de complementariedad" se refiere a la región en la hebra complementaria que es sustancialmente complementaria a una secuencia, por ejemplo una secuencia objetivo, como se define en la presente memoria. En el caso de que la región de complementariedad no sea completamente complementaria a la secuencia objetivo, los errores de emparejamiento son mejor tolerados en las regiones terminales y, si hay, están en general en una región o regiones terminales, por ejemplo, en 6, 5, 4, 3 ó 2 nucleótidos del extremo 5' y/o 3'.

El término "hebra transcrita," como se usa en la presente memoria, se refiere a la hebra de un ARNs que incluye una región que es sustancialmente complementaria a una región de la hebra complementaria.

Como se usa en la presente memoria, el término "SNALP" se refiere a una partícula de ácido nucleico-lípido estable. Una SNALP representa una vesícula de lípidos que recubre un interior acuoso reducido que comprende un ácido nucleico tal como un ARNs o un plásmido a partir del cual se transcribe un ARNs. Se describe SNALP, por ej., en las Publicaciones de Solicitud de Patente de EE.UU. Nos. 20060240093, 20070135372 y la Patente de EE.UU. n° de Serie 61/045.228 presentada el 15 de abril de 2.008.

"Introducir en una célula", cuando se refiere a un ARNs, significa facilitar la captación o absorción en la célula, como entienden los expertos en la materia. La absorción o captación de ARNs puede tener lugar a través de procesos de difusión no auxiliados o procesos celulares activos o mediante agentes o dispositivos auxiliares. El significado de este término no se limita a células in vitro; un ARNs también se puede "introducir en una célula", en el que la célula es parte de un organismo viviente. En tal caso, la introducción en la célula incluirá el suministro al organismo. Por ejemplo, para suministro in vivo, se puede inyectar ARNs en un sitio del tejido o administrar por vía sistémica. La introducción in vitro en una célula incluye métodos conocidos en la técnica tales como electroporación y lipofección. Otras propuestas se describen en la presente memoria o son conocidas en la técnica.

Los términos "silenciar," "inhibir la expresión de," "regular hacia abajo la expresión de," "suprimir la expresión de" y similares en la medida en que se refieren a un gen de TTR, se refieren en la presente memoria a la eliminación al menos parcial de la expresión de un gen de TTR, como se manifiesta por una reducción de la cantidad de ARNm que se puede aislar de una primera célula o grupo de células en que se transcribe un gen de TTR y que ha sido o han sido tratadas de manera que se inhibe la expresión de un gen de TTR, cuando se compara con una segunda célula o grupo de células sustancialmente idénticas a la primera célula o grupo de células pero que no ha sido o no han sido tratadas así (células de control). El grado de inhibición se expresa normalmente en términos de:

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

Alternativamente, el grado de inhibición se puede proporcionar en términos de una reducción de un parámetro que esté funcionalmente ligado a la expresión de un gen de TTR, por ej., la cantidad de proteína codificada por un gen de TTR que es segregada por una célula o el número de células que muestra un cierto fenotipo, por ejemplo, muerte celular programada. En principio, se puede determinar el silenciamiento de un gen de TTR en cualquier célula que exprese el objetivo, de manera constitutiva o por ingeniería genómica y por cualquier ensayo apropiado. Sin embargo, cuando se requiere una referencia para determinar si un ARNs determinado inhibe la expresión de un gen de TTR en un cierto grado y, por lo tanto, se incluye por la invención inmediata, los ensayos proporcionados en los Ejemplos a continuación servirán como tal referencia.

Por ejemplo, en algunos casos, la expresión de un gen de TTR se suprime por al menos aproximadamente 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45% o 50% por administración del oligonucleótido bicatenario caracterizado en la invención. En algunas realizaciones, se suprime un gen de TTR por al menos aproximadamente 60%, 70% u 80% por administración del oligonucleótido bicatenario caracterizado en la invención. En algunas realizaciones, se

suprimen un gen de TTR por al menos aproximadamente 85%, 90% o 95% por administración del oligonucleótido bicatenario caracterizado en la invención.

5 Como se usa en la presente memoria en el contexto de la expresión de TTR, los términos "tratar", "tratamiento" y similares, se refieren a alivio de o mitigación de procesos patológicos mediados por expresión de TTR. En el contexto de la presente invención en la medida en que se refiere a cualquiera de las otras afecciones citadas en la presente memoria a continuación (distintas de procesos patológicos mediados por expresión de TTR), los términos "tratar", "tratamiento" y similares significan alivio o mitigación de al menos un síntoma asociado a dicha afección o a retardar o invertir el progreso de dicha afección, tal como el retardamiento de la progresión de una amiloidosis por TTR, tal como FAP. Los síntomas de amiloidosis por TTR incluyen neuropatía sensorial (por ejemplo, parestesia, hipoestesia en miembros distales), neuropatía autonómica (por ejemplo, disfunción gastrointestinal, tal como úlcera gástrica o hipotensión ortostática), neuropatía motora, convulsiones, demencia, mielopatía, polineuropatía, síndrome del túnel carpiano, insuficiencia autonómica, cardiomiopatía, opacidades vítreas, insuficiencia renal, nefropatía, sustancialmente mBMI reducido (Índice de Masa Corporal modificado, por sus siglas en inglés), disfunción de los nervios craneales y distrofia del entramado de la córnea.

15 Como se usa en la presente memoria, las expresiones "cantidad terapéuticamente eficaz" y "cantidad profilácticamente eficaz" se refieren a una cantidad que proporciona un beneficio terapéutico en el tratamiento, prevención o gestión de procesos patológicos mediados por expresión de TTR o un síntoma sintomático de procesos patológicos mediados por expresión de TTR. La cantidad específica que es terapéuticamente eficaz se puede determinar fácilmente por un profesional habilitado médico ordinario y puede variar dependiendo de factores conocidos en la técnica, tales como, por ejemplo, el tipo de procesos patológicos mediados por expresión de TTR, la historia y la edad del paciente, la fase de los procesos patológicos mediados por expresión de TTR y la administración de otros procesos antipatológicos mediados por agentes de expresión de TTR.

20 Como se usa en la presente memoria, una "composición farmacéutica" comprende una cantidad farmacológicamente eficaz de un ARNs y un portador farmacéuticamente aceptable. Como se usa en la presente memoria, "cantidad farmacológicamente eficaz," "cantidad terapéuticamente eficaz" o simplemente "cantidad eficaz" se refiere a esa cantidad de un ARN eficaz para producir el resultado farmacológico, terapéutico o preventivo, deseado. Por ejemplo, si se considera eficaz un tratamiento clínico determinado cuando hay al menos 25% de reducción en un parámetro medible asociado a una enfermedad o trastorno, una cantidad terapéuticamente eficaz de un fármaco para el tratamiento de esa enfermedad o trastorno es la cantidad necesaria para efectuar al menos una reducción del 25% en ese parámetro. Por ejemplo, una cantidad terapéuticamente eficaz de un ARNs que fija como objetivo TTR puede reducir los niveles en suero de TTR por al menos 25%. En otro ejemplo, una cantidad terapéuticamente eficaz de un ARNs que fija como objetivo TTR puede mejorar la función hepática o la función renal por al menos 25%.

25 El término "portador farmacéuticamente aceptable" se refiere a un portador para administración de un agente terapéutico. Tales portadores incluyen, pero no se limitan a, disolución salina, disolución salina tamponada, dextrosa, agua, glicerol, etanol y combinaciones de los mismos. El término excluye específicamente medio de cultivo celular. Para fármacos administrados por vía oral, los portadores farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, excipientes farmacéuticamente aceptables tales como diluyentes inertes, agentes disgregantes, agentes de unión, agentes lubricantes, agentes edulcorantes, agentes saborizantes, agentes colorantes y conservantes. Diluyentes inertes adecuados incluyen carbonato de sodio y de calcio, fosfato de sodio y de calcio y lactosa, mientras almidón de maíz y ácido alginico son agentes disgregantes adecuados. Los agentes aglutinantes pueden incluir almidón y gelatina, mientras que el agente lubricante, si hay, será generalmente estearato de magnesio, ácido esteárico o talco. Si se desea, los comprimidos pueden estar recubiertos con un material tal como monoestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo, para retardar la absorción en el tubo digestivo.

30 Como se usa en la presente memoria, una "célula transformada" es una célula en que se ha introducido un vector a partir del cual se puede expresar una molécula de ARNs.

II. Ácido ribonucleico bicatenario (ARNds)

35 Se describen en la presente memoria moléculas de ácido ribonucleico bicatenario (ARNds) para inhibir la expresión de un gen de TTR en una célula o mamífero, por ejemplo, en un ser humano que tiene una amiloidosis por TTR, donde el ARNs incluye una hebra complementaria con una región de complementariedad que es complementaria a al menos una parte de un ARNm formado en la expresión de un gen de TTR y donde la región de complementariedad tiene menos de 30 nucleótidos de longitud, en general 19-24 nucleótidos de longitud y donde dicho ARNs, en el contacto con una célula que expresa dicho gen de TTR, inhibe la expresión de dicho gen de TTR por al menos 30% cuando se ensaya por, por ejemplo, un método basado en PCR o ADN ramificado (ADNb) o por un método basado en proteínas, tal como por método western. La expresión de un gen de TTR se puede reducir por al menos 30% cuando se mide mediante un ensayo como se describe en los Ejemplos a continuación. Por ejemplo, la expresión de un gen de TTR en cultivo celular, tal como en células Hep3B, se puede ensayar midiendo los niveles de ARNm de la TTR, tales como por ensayo de ADNb o TaqMan o midiendo los niveles de proteína, tal como por el método ELISA. El ARNs de la invención puede incluir además uno o más salientes de nucleótidos monocatenarios.

El ARNs se puede sintetizar por métodos clásicos conocidos en la técnica como se discute además a continuación, por ejemplo, por uso de un sintetizador de ADN automatizado, tal como están comercialmente disponibles en, por ejemplo, Biosearch, Applied Biosystems, Inc. El ARNs incluye dos hebras de ARN que son suficientemente complementarias para hibridación para formar una doble estructura. Una hebra del ARNs (la hebra complementaria) incluye una región de complementariedad que es sustancialmente complementaria y en general completamente complementaria, a una secuencia objetivo, derivada de la secuencia de un ARNm formada durante la expresión de un gen de TTR, la otra hebra (la hebra transcrita) incluye una región que es complementaria a la hebra complementaria, de manera que las dos hebras se hibridan y forman una doble estructura cuando se combinan en condiciones adecuadas. En general, la doble estructura tiene entre 15 y 30 o entre 25 y 30 o entre 18 y 25 o entre 19 y 24 o entre 19 y 21 ó 19, 20 ó 21 pares de bases de longitud. En una realización, el dúplex tiene 19 pares de bases de longitud. En otra realización, el dúplex tiene 21 pares de bases de longitud. Cuando se usan dos ARNs diferentes en asociación, las longitudes del dúplex pueden ser idénticas o pueden diferir.

Cada hebra del ARNs tiene en general entre 15 y 30 o entre 18 y 25 ó 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 ó 25 nucleótidos de longitud. En otras realizaciones, cada hebra tiene 25-30 nucleótidos de longitud. Cada hebra del dúplex puede tener la misma longitud o ser de longitudes diferentes. Cuando se usan dos ARNs en asociación, las longitudes de cada hebra de cada ARNs pueden ser idénticas o pueden diferir.

El ARNs puede incluir uno o más salientes monocatenarios de uno o más nucleótidos. Al menos un extremo del ARNs puede tener un saliente de nucleótidos monocatenario de 1 a 4, en general 1 ó 2 nucleótidos. La hebra complementaria del ARNs puede tener salientes de 1-10 nucleótidos cada uno en el extremo 3' y el extremo 5' por la hebra transcrita. La hebra transcrita del ARNs puede tener salientes de 1-10 nucleótidos cada uno en el extremo 3' y el extremo 5' por la hebra complementaria.

Un ARNs que tiene al menos un saliente de nucleótidos puede presentar propiedades inhibitoras inesperadamente superiores que la contrapartida de extremo romo. La presencia de saliente de sólo un nucleótido puede reforzar la actividad interferente del ARNs, sin afectar a su estabilidad total. Un ARNs que tiene sólo un saliente se ha demostrado particularmente estable y eficaz in vivo, así como en una variedad de células, medios de cultivo celular, sangre y suero. En general el saliente monocatenario se sitúa en el extremo terminal 3' de la hebra complementaria o, alternativamente, en el extremo terminal 3' de la hebra transcrita. El ARNs también puede tener un extremo romo, en general situado en el extremo 5' de la hebra complementaria. Dichos ARNs pueden presentar estabilidad y actividad inhibitora mejoradas, permitiendo así la administración a dosis bajas, es decir, menores que 5 mg/kg de peso corporal del receptor al día. En general, la hebra complementaria del ARNs presenta un saliente de nucleótidos en el extremo 3' y el extremo 5' es romo. Uno o más de los nucleótidos en el saliente se puede reemplazar con un tiofosfato del nucleósido.

Un gen de TTR puede ser un gen de TTR humano. La hebra transcrita del ARNs puede ser una de las secuencias transcritas de las Tablas 3A, 3B, 4, 6A, 6B o 7 y la hebra complementaria puede ser una de las secuencias complementarias de las Tablas 3A, 3B, 4, 6A, 6B o 7. Los agentes complementarios alternativos que fijan como objetivo en otra parte en la secuencia objetivo proporcionada en las Tablas 3A, 3B, 4, 6A, 6B o 7 se pueden determinar fácilmente usando la secuencia objetivo y la secuencia de TTR blanqueadora.

El experto sabe que el ARNs que tiene una doble estructura de entre 20 y 23, pero específicamente 21, pares de bases se ha estimado como particularmente eficaz en la inducción de interferencia por ARN (Elbashir *et al.*, EMBO 2.001, 20: 6.877-6.888). Sin embargo, otros han encontrado que los ARNs más cortos o más largos también pueden ser eficaces. En las realizaciones descritas anteriormente, debido a la naturaleza de las secuencias de oligonucleótidos proporcionadas en las Tablas 3A, 3B, 4, 6A, 6B y 7, los ARNs caracterizados en la invención pueden incluir al menos una hebra de una longitud descrita en la presente memoria. Se puede esperar razonablemente que los ARNs más cortos que tengan una de las secuencias de las Tablas 3A, 3B, 4, 6A, 6B o 7 menos sólo unos nucleótidos en uno o en ambos extremos pueden ser similarmente eficaces cuando se compara con el ARNs descrito anteriormente. Por lo tanto, se considera por la invención el ARNs con una secuencia parcial de al menos 15,16, 17,18, 19, 20 o más nucleótidos contiguos de una de las secuencias de las Tablas 3, 4, 6 ó 7 y que difieren en su capacidad para inhibir la expresión de un gen de TTR en un ensayo como se describe en la presente memoria a continuación por no más de 5,10,15, 20, 25 ó 30% de inhibición de un ARNs que comprenda la secuencia completa. Además, el ARNs que se escinde dentro de una secuencia objetivo de TTR deseada se puede preparar fácilmente usando la correspondiente secuencia complementaria de TTR y una secuencia transcrita complementaria.

Además, los ARNs proporcionados en las Tablas 3A, 3B, 4, 6A, 6B o 7 identifican un sitio en un TTR que es susceptible a escisión a base de ARNi. Como tal, se describen los ARNs que fijan como objetivo dentro de la secuencia fijada como objetivo por uno de los agentes de la presente invención. Como se usa en la presente memoria, se dice que un segundo ARNs fija como objetivo dentro de la secuencia de un primer ARNs si el segundo ARNs escinde el mensaje en cualquier parte dentro del ARNm que es complementario a la hebra complementaria del primer ARNs. Dicho segundo ARNs constará en general de al menos 15 nucleótidos contiguos a partir de una de las secuencias proporcionadas en las Tablas 3A, 3B, 4, 6A, 6B o 7 acoplados a secuencias de nucleótidos adicionales tomadas de la región contigua a la secuencia seleccionada en un gen de TTR.

El ARNds descrito puede contener uno o más errores de emparejamiento a la secuencia fijada como objetivo. El ARNds descrito puede contener no más de 3 errores de emparejamiento. Si la hebra complementaria del ARNds contiene errores de emparejamiento a una secuencia fijada como objetivo, es preferible que el área de desajuste no esté situada en el centro de la región de complementariedad. Si la hebra complementaria del ARNds contiene errores de emparejamiento a la secuencia fijada como objetivo, es preferible que el desajuste esté restringido a 5 nucleótidos de cualquier extremo, por ejemplo 5, 4, 3, 2 ó 1 nucleótido de cualquiera de los extremos 5' o 3' de la región de complementariedad. Por ejemplo, para una hebra de ARNds de 23 nucleótidos que sea complementaria una región de un gen de TTR, el ARNds no contiene en general ningún error de emparejamiento dentro de los 13 nucleótidos centrales. Los métodos descritos se pueden usar para determinar si un ARNds que contiene un error de emparejamiento a una secuencia fijada como objetivo es eficaz en la inhibición de la expresión de un gen de TTR. La consideración de la eficacia de los ARNds con errores de emparejamiento en la inhibición de la expresión de un gen de TTR es importante, especialmente si se sabe que la región particular de complementariedad en un gen de TTR presenta variación de secuencia polimórfica en la población.

Modificaciones

El ARNds se puede modificar de manera química para mejorar la estabilidad. Los ácidos nucleicos caracterizados en la invención se pueden sintetizar y/o modificar por métodos establecidos en la técnica, tales como los descritos en "Current protocols in nucleic acid chemistry," Beaucage, S. L. *et al.* (Eds.), John Wiley & Sons, Inc., Nueva York, NY, USA, que se incorpora por este medio en la presente memoria por referencia. Ejemplos específicos de compuestos de ARNds útiles en esta invención incluyen los ARNds que contienen cadenas carbonadas modificadas o uniones internucleósido no naturales. Como se define en esta memoria descriptiva, los ARNds con cadenas carbonadas modificadas incluyen aquéllos que retienen un átomo de fósforo en la cadena carbonada y aquéllos que no tienen un átomo de fósforo en la cadena carbonada. Para los fines de esta memoria descriptiva y como a veces se refiere en la técnica, el ARNds modificado que no presenta un átomo de fósforo en su cadena carbonada internucleósido también se puede considerar que son oligonucleósidos.

Las cadenas carbonadas de ARNds modificado incluyen, por ejemplo, fosforotioatos, fosforotioatos quirales, fosforditioatos, fosfotriésteres, aminoalquilfosfotriésteres, metil y otros alquil-fosfonatos incluyendo 3'-alquilenofosfonatos y fosfonatos quirales, fosfinatos, fosforamidatos incluyendo 3'-aminofosforamidato y aminoalquilfosforamidatos, tionofosforamidatos, tionoalquilfosfonatos, tionoalquilfosfotriésteres y boranofosfonatos con uniones 3'-5' normales, análogos de éstos 2'-5' ligados y aquéllos) con polaridad invertida en los que los pares adyacentes de unidades de nucleósido están ligados 3'-5' a 5'-3' o 2'-5' a 5-2'. También se incluyen diversas sales, sales mixtas y formas de ácido libre.

Las Patentes de EE.UU. representativas que explican la preparación de las uniones que contienen fósforo anteriores incluyen, pero no se limitan a, las Patentes de EE.UU. N° 3.687.808; 4.469.863; 4.476.301; 5.023.243; 5.177.195; 5.188.897; 5.264.423; 5.276.019; 5.278.302; 5.286.717; 5.321.131; 5.399.676; 5.405.939; 5.453.496; 5.455.233; 5.466.677; 5.476.925; 5.519.126; 5.536.821; 5.541.316; 5.550.111; 5.563.253; 5.571.799; 5.587.361 y 5.625.050.

Las cadenas principales de ARNds modificado que no incluyen un átomo de fósforo en las mismas presentan cadenas principales que están formadas por uniones alquil o cicloalquil internucleósido de cadena corta, heteroátomos mixtos y uniones alquil o cicloalquil internucleósido o una o más uniones internucleósido heteroatómicas o heterocíclicas. Estas incluyen aquéllas que tienen uniones morfolino (formadas en parte a partir de la porción de azúcar de un nucleósido); cadenas principales de siloxano; cadenas principales de sulfuro, sulfóxido y sulfona; cadenas principales de formacetilo y tioformacetilo; cadenas principales de metilenoformacetilo y tioformacetilo; cadenas principales que contienen alqueno; cadenas principales de sulfamato; cadenas principales de metilenoimino y metilenoimidazino; cadenas principales de sulfonato y sulfonamida; cadenas principales de amida y otros que tienen partes de componentes de N, O, S y CH₂ mixtas.

Las Patentes de EE.UU. representativas que explican la preparación de los oligonucleósidos anteriores incluyen, pero no se limitan a, las Patentes de EE.UU. N° 5.034.506; 5.166.315; 5.185.444; 5.214.134; 5.216.141; 5.235.033; 5.64.562; 5.264.564; 5.405.938; 5.434.257; 5.466.677; 5.470.967; 5.489.677; 5.541.307; 5.561.225; 5.596.086; 5.602.240; 5.608.046; 5.610.289; 5.618.704; 5.623.070; 5.663.312; 5.633.360; 5.677.437 y 5.677.439.

En otros miméticos de ARNds adecuados, tanto el azúcar como la unión internucleósido, es decir, la cadena principal, de las unidades de nucleótidos se reemplazan con nuevos grupos. Las unidades de base se mantienen para hibridación con un compuesto fijado como objetivo de ácido nucleico apropiado. Uno de tales compuestos oligoméricos, un mimético de ARNds que ha demostrado presentar excelentes propiedades de hibridación, se refiere como un ácido nucleico peptídico (PNA, por sus siglas en inglés). En compuestos de PNA, la cadena principal de azúcar de un ARNds es reemplazada con una cadena principal que contiene amida, en particular una cadena principal de aminoetilglicina. Las nucleobases son retenidas y se ligan directamente o indirectamente a átomos de nitrógeno aza de la porción amida de la cadena principal. Las Patentes de EE.UU. representativas que explican la preparación de compuestos PNA incluyen, pero no se limitan a, las Patentes de EE.UU. N° 5.539.082; 5.714.331 y 5.719.262. Se puede encontrar explicación adicional de compuestos PNA en Nielsen *et al.*, Science, 1.991, 254, 1.497-1.500.

Se describen los ARNds con cadenas principales de fosforotioato y oligonucleósidos con cadenas principales heteroatómicas y en particular --CH₂--NH--CH₂--, --CH₂--N(CH₃)--O--CH₂-- [conocido como un metileno (metilimino) o cadena principal de MMI], --CH₂--O--N(CH₃)--CH₂--, --CH₂--N(CH₃)--N(CH₃)--CH₂-- y -N(CH₃)--CH₂--CH₂-- [en las que la cadena principal de fosfodiéster natural se representa como --O--P--O--CH₂--] de la Patente de EE.UU. N° 5.489.677 referida anteriormente y las cadenas principales de amida de la Patente de EE.UU. N° 5.602.240 referida anteriormente. También se prefieren los ARNds con estructuras de la cadena principal de morfolino de la Patente de EE.UU. N° 5.034.506 referida anteriormente.

Los ARNds modificados también pueden contener uno o más restos azúcar sustituidos. Los ARNds pueden comprender uno de lo siguiente en la posición 2': OH; F; O-, S- o N-alquilo; O-, S- o N-alqueno; O-, S- o N-alquino u O-alquil-O-alquilo, en los que el alquilo, alqueno y alquino puede ser al que alquilo C₁ a C₁₀ o alqueno y alquino C₂ a C₁₀ sustituido o no sustituido. Se prefieren en particular O[(CH₂)_nO]_mCH₃, O(CH₂)_nOCH₃, O(CH₂)_nNH₂, O(CH₂)_nCH₃, O(CH₂)_nONH₂ y O(CH₂)_nON[(CH₂)_nCH₃]₂, donde n y m son desde 1 a aproximadamente 10. Otros ARNds preferidos comprenden uno de lo siguiente en la posición 2': alquilo inferior C₁ a C₁₀, alquilo inferior sustituido, alcarilo, aralquilo, O-alcarilo u O-aralquilo, SH, SCH₃, OCN, Cl, Br, CN, CF₃, OCF₃, SOCH₃, SO₂CH₃, ONO₂, NO₂, N₃, NH₂, heterocicloalquilo, heterocicloalcarilo, aminoalquilamino, polialquilamino, sililo sustituido, un grupo de escisión de ARN, un grupo informador, un intercalador, un grupo para mejorar las propiedades farmacocinéticas de un ARNds o un grupo para mejorar las propiedades farmacodinámicas de un ARNds y otros sustituyentes con propiedades similares. Una modificación preferida incluye 2'-metoxietoxi (2'-O--CH₂CH₂OCH₃, también conocido como 2'-O-(2-metoxietilo) o 2'-MOE) (Martin et al., Helv. Chim. Acta, 1.995, 78, 486-504) es decir, un grupo alcoxi-alcoxi. Una modificación preferida más incluye 2'-dimetilaminoxietoxi, es decir, un grupo O(CH₂)₂ON(CH₃)₂, también conocido como 2'-DMAOE, como se describe en los ejemplos en la presente memoria a continuación y 2'-dimetilaminoetoxietoxi (también conocido en la técnica como 2'-O-dimetilaminoetoxietilo o 2'-DMAEOE), es decir, 2'-O--CH₂--O--CH₂--N(CH₂)₂, también descrito en los ejemplos en la presente memoria a continuación.

Otras modificaciones incluyen 2'-metoxi (2'-OCH₃), 2'-aminopropoxi (2'-OCH₂CH₂CH₂NH₂) y 2'-fluoro (2'-F). También se pueden hacer modificaciones similares en otras posiciones en el ARNds, en particular la posición 3' del azúcar en el nucleótido 3' terminal o en los ARNds 2'-5' ligados y la posición 5' del nucleótido 5' terminal. Los ARNds también pueden presentar miméticos de azúcar tales como restos ciclobutilo en vez del azúcar pentofuranosilo. Las Patentes de EE.UU. representativas que explican la preparación de dichas estructuras de azúcar modificado incluyen, pero no se limitan a, las Patentes de EE.UU. N° 4.981.957; 5.118.800; 5.319.080; 5.359.044; 5.393.878; 5.446.137; 5.466.786; 5.514.785; 5.519.134; 5.567.811; 5.576.427; 5.591.722; 5.597.909; 5.610.300; 5.627.053; 5.639.873; 5.646.265; 5.658.873; 5.670.633 y 5.700.920, algunos de los cuales son de propiedad comúnmente con la solicitud of inmediata.

Los ARNds también pueden incluir modificaciones o sustituciones de nucleobase (también referido en la técnica simplemente como "base"). Como se usa en la presente memoria, nucleobases "no modificadas" o "naturales" incluyen las bases de purina adenina (A) y guanina (G) y las bases de pirimidina timina (T), citosina (C) y uracilo (U). Las nucleobases modificadas incluyen otras nucleobases sintéticas y naturales tales como: 5-metilcitosina (5-me-C), 5-hidroximetilcitosina, xantina, hipoxantina, 2-aminoadenina, 6-metil y otros alquil-derivados de adenina y guanina, 2-propil y otros alquil-derivados de adenina y guanina, 2-tiouracilo, 2-tiotimina y 2-tiocitosina, 5-halouracilo y citosina, 5-propinil-uracilo y citosina, 6-azouracilo, citosina y timina, 5-uracilo (pseudouracilo), 4-tiouracilo, 8-halo, 8-amino, 8-tiol, 8-tioalquilo, 8-hidroxilanal otras adeninas y guaninas 8-sustituidas, 5-halo, en particular 5-bromo, 5-trifluorometil y otros uracilos y citosinas 5-sustituidos, 7-metilguanina y 7-metiladenina, 8-azaguanina y 8-azaadenina, 7-deazaguanina y 7-daazaadenina y 3-deazaguanina y 3-deazaadenina. Más nucleobases incluyen las descritas en la Patente de EE.UU. N° 3.687.808, las descritas en The Concise Encyclopedia of Polymer Science and Engineering, páginas 858-859, Kroschwitz, J. L., ed. John Wiley & Sons, 1.990, estas descritas por Englisch *et al.*, *Angewandte Chemie*, Edición Internacional, 1.991, 30, 613 y las descritas por Sanghvi Y S., Capítulo 15, *DsRNA Research and Applications*, páginas 289-302, Crooke, S. T. y Lebleu, B., Ed., CRC Press, 1.993. Algunas de estas nucleobases son útiles en particular para aumentar la afinidad de unión de los compuestos oligómeros caracterizados en la invención. Estas incluyen pirimidinas 5-sustituidas, 6-azapirimidinas y purinas N-2, N-6 y O-6 sustituidas, incluyendo 2-aminopropiladenina, 5-propiniluracilo y 5-propinilcitosina. Se ha demostrado que las sustituciones de 5-metilcitosina aumentan la estabilidad del dúplex de los ácidos nucleicos por 0,6-1,2°C. (Sanghvi, Y. S., Crooke, S. T. y Lebleu, B., Eds., *DsRNA Research and Applications*, CRC Press, Boca Raton, 1.993, págs. 276-278) y son sustituciones de bases ejemplares, incluso más en particular cuando se combinan con modificaciones de 2'-O-metoxietil-azúcar.

Las Patentes de EE.UU. representativas que explican la preparación de algunas de las nucleobases modificadas indicadas anteriormente así como otras nucleobases modificadas incluyen, pero no se limitan a, la Patente de EE.UU. N° 3.687.808 indicada anteriormente, así como las Patentes de EE.UU. N° 4.845.205; 5.130.30; 5.134.066; 5.175.273; 5.367.066; 5.432.272; 5.457.187; 5.459.255; 5.484.908; 5.502.177; 5.525.711; 5.552.540; 5.587.469; 5.594.121; 5.596.091; 5.614.617 y 5.681.941 y la Patente de EE.UU. N° 5.750.692.

Conjugados

Otra modificación de los ARNds de la invención implica ligar mediante enlaces covalentes al ARNds uno o más

restos o conjugados que mejoran la actividad, distribución celular o absorción celular del ARNs. Dichos restos incluyen pero no están limitados a restos de lípidos tales como un resto de colesterol (Letsinger *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1.989, 86: 6.553-6.556), ácido cólico (Manoharan *et al.*, Biorg. Med. Chem. Lett., 1.994, 4: 1.053-1.060), un tioéter, por ej., beril-S-tritilol (Manoharan *et al.*, Ann. N. Y. Acad. Sci., 1.992, 660: 306-309; Manoharan *et al.*, Biorg. Med. Chem. Lett., 1.993, 3: 2.765-2.770), un tiocolesterol (Oberhauser *et al.*, Nucl. Acid Res., 1.992, 20: 533-538), una cadena alifática, por ej., dodecandiol o restos undecilo (Saison-Behmoaras *et al.*, EMBO J, 1.991, 10: 1.111-1.118; Kabanov *et al.*, FEBS Lett., 1.990, 259: 327-330; Svinarchuk *et al.*, Biochimie, 1.993, 75: 49-54), un fosfolípido, por ej., di-hexadecil-rac-glicerol o trietilamonio 1,2-di-O-hexadecil-rac-glicerol-3-Hfosfonato (Manoharan *et al.*, Tetrahedron Lett., 1.995, 36: 3.651-3.654; Shea *et al.*, Nucl. Acid Res., 1.990, 18: 3.777-3.783), una poliamina o una cadena de polietilenglicol (Manoharan *et al.*, Nucleosides & Nucleótido, 1.995, 14: 969-973) o ácido adamantanoacético (Manoharan *et al.*, Tetrahedron Lett., 1.995, 36: 3.651-3.654), un resto palmitilo (Mishra *et al.*, Biochim. Biophys. Acta, 1.995, 1.264: 229-237) o un resto octadecilamina o hexiloamino-carboniloxicolesterol (Crooke *et al.*, J. Pharmacol. Exp. Ther., 1.996, 277: 923-937).

Las Patentes de EE.UU. representativas que explican la preparación de dichos conjugados de ARNs incluyen, pero no se limitan a, las Patentes de EE.UU. N° 4.828.979; 4.948.882; 5.218.105; 5.525.465; 5.541.313; 5.545.730; 5.552.538; 5.578.717; 5.580.731; 5.591.584; 5.109.124; 5.118.802; 5.138.045; 5.414.077; 5.486.603; 5.512.439; 5.578.718; 5.608.046; 4.587.044; 4.605.735; 4.667.025; 4.762.779; 4.789.737; 4.824.941; 4.835.263; 4.876.335; 4.904.582; 4.958.013; 5.082.830; 5.112.963; 5.214.136; 5.082.830; 5.112.963; 5.214.136; 5.245.022; 5.254.469; 5.258.506; 5.262.536; 5.272.250; 5.292.873; 5.317.098; 5.371.241; 5.391.723; 5.416.203; 5.451.463; 5.510.475; 5.512.667; 5.514.785; 5.565.552; 5.567.810; 5.574.142; 5.585.481; 5.587.371; 5.595.726; 5.597.696; 5.599.923; 5.599.928 y 5.688.941.

No es necesario que todas las posiciones en un compuesto determinado se modifiquen de manera uniforme y de hecho más de una de las modificaciones mencionadas se puede incorporar en un único compuesto o incluso en un único nucleósido en un ARNs. La presente invención también incluye compuestos de ARNs que son compuestos quiméricos. Compuestos de ARNs "quiméricos" o "quimeras" en el contexto de esta invención, son compuestos de ARNs, en particular los ARNs, que contienen dos o más regiones distintas químicamente, constituyendo cada una al menos una unidad monomérica, es decir, un nucleótido en el caso de un compuesto de ARNs. Estos ARNs contienen típicamente al menos una región en la que se modifica el ARNs de manera que se confiere en el ARNs resistencia aumentada a la degradación de la nucleasa, absorción celular aumentada y/o afinidad de unión aumentada para el ácido nucleico fijado como objetivo. Una región adicional del ARNs puede servir como sustrato para enzimas capaces de escindir ARN: ADN o híbridos de ARN:ARN. Como ejemplo, la RNasa H es una endonucleasa celular que escinde la hebra de ARN de un dúplex ARN:ADN. La activación de la RNasa H, por lo tanto, da como resultado escisión del objetivo de ARN, aumentando normalmente de ese modo la eficacia de la inhibición de ARNs de expresión del gen. Por consiguiente, con frecuencia se pueden obtener resultados comparables con ARNs más cortos cuando se usan los ARNs quiméricos, comparado con los fosforotioato desoxiARNs que hibridan la misma región fijada como objetivo.

La escisión del objetivo de ARN se puede detectar de manera rutinaria mediante electroforesis de gel y, si es necesario, técnicas de hibridación de ácidos nucleicos asociados conocidas en la técnica. El sitio de escisión en el ARNm fijado como objetivo de un ARNs puede ser determinado usando métodos conocidos en general para un experto en la materia, por ejemplo, el método 5'-RACE descrito en Soutschek *et al.*, *Nature*; 2.004, Vol. 432, págs. 173-178. En una realización, usando el método 5'-RACE descrito por Soutschek *et al.*, se determinó ALN-18328 para escindir un ARNm de la TTR entre el nucleótido guanina en la posición 636 de la SEC ID N° 1.331 (NM_000371.3) y el nucleótido adenina en la posición 637 de la SEC ID N° 1.331. En una realización, se determinó que ALN-18328 no escinde un ARNm de la TTR entre el nucleótido adenina en la posición 637 de la SEC ID N° 1.331 y el nucleótido guanina en la posición 638 de la SEC ID N° 1.331.

En algunos casos, el ARNs se puede modificar mediante un grupo no ligando. Se han conjugado una serie de moléculas no ligando a los ARNs para aumentar la actividad, la distribución celular o la absorción celular del ARNs y están disponibles procedimientos para realizar dichas conjugaciones en la bibliografía científica. Dichos restos no ligandos tienen restos lipídicos incluidos, tales como colesterol (Letsinger *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1.989, 86: 6.553), ácido cólico (Manoharan *et al.*, Bioorg. Med. Chem. Lett., 1.994, 4: 1.053), un tioéter, por ej., hexil-S-tritilol (Manoharan *et al.*, Ann. N. Y. Acad. Sci., 1.992, 660: 306; Manoharan *et al.*, Bioorg. Med. Chem. Lett., 1.993, 3: 2.765), un tiocolesterol (Oberhauser *et al.*, Nucl. Acids Res., 1.992, 20: 533), una cadena alifática, por ej., dodecandiol o restos undecilo (Saison-Behmoaras *et al.*, EMBO J, 1.991, 10: 111; Kabanov *et al.*, FEBS Lett., 1.990, 259: 327; Svinarchuk *et al.*, Biochimie, 1.993, 75: 49), un fosfolípido, por ej., di-hexadecil-rac-glicerol o 1,2-di-O-hexadecil-rac-glicerol-3-H-fosfonato de trietilamonio (Manoharan *et al.*, Tetrahedron Lett., 1.995, 36: 3.651; Shea *et al.*, Nucl. Acids Res., 1.990, 18: 3.777), una poliamina o una cadena de polietilenglicol (Manoharan *et al.*, Nucleosides & Nucleótido, 1.995, 14: 969) o ácido adamantanoacético (Manoharan *et al.*, Tetrahedron Lett., 1.995, 36: 3.651), un resto palmitilo (Mishra *et al.*, Biochim. Biophys. Acta, 1.995, 1.264: 229) o un resto octadecilamina o hexilamino-carbonil-oxicolesterol (Crooke *et al.*, J. Pharmacol. Exp. Ther., 1.996, 277: 923). Las patentes de Estados Unidos representativas que explican la preparación de dichos conjugados de ARNs se enumeraron anteriormente. Los protocolos de conjugación típicos implican la síntesis de los ARNs que soportan un aminoligador en una o más posiciones de la secuencia. El grupo amino se hace reaccionar después con la molécula que se conjuga usando

reactivos de acoplamiento o activantes apropiados. La reacción de conjugación se puede realizar con el ARNs aún ligado al soporte sólido o después de escisión del ARNs en fase disolución. La purificación del conjugado de ARNs por HPLC proporciona típicamente el conjugado puro.

ARNs codificados de vector.

- 5 En otro aspecto, se expresa moléculas de ARNs de la TTR a partir de unidades de transcripción insertadas en vectores de ADN o ARN (véase, por ejemplo, Couture, A, *et al.*, *TIG*. (1.996), 12: 5-10; Skillern, A., *et al.*, Publicación de Patente Internacional PCT N° WO 00/22113, Conrad, Publicación de Patente Internacional PCT N° WO 00/22114 y Conrad, Patente de EE.UU. N° 6.054.299). Estos transgenes se pueden introducir, una construcción lineal, un plásmido circular o un vector vírico, que se puede incorporar y heredar como un transgen integrado en el genoma huésped. También se puede construir el transgen para permitir que se herede como un plásmido extracromosómico (Gassmann, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1.995) 92: 1.292).

- 10 Se pueden transcribir las hebras individuales de un ARNs mediante activadores en dos vectores de expresión separados y transfectar conjuntamente en una célula fijada como objetivo. Alternativamente, cada hebra individual del ARNs se puede transcribir mediante activadores ambos de los cuales se sitúan en el mismo plásmido de expresión. En una realización, un ARNs se expresa como una repetición invertida unida mediante una secuencia de polinucleótidos ligadora de manera que el ARNs presente una estructura de horquilla.

- 15 Los vectores de expresión de ARNs recombinante son en general plásmidos de ADN o vectores víricos. Se pueden construir vectores víricos de expresión de ARNs basándose en, pero no limitándose a, virus adenoasociados (para una revisión, véase Muzyczka, *et al.*, *Curr. Topics Micro. Immunol.* (1.992) 158: 97-129)); adenovirus (véase, por ejemplo, Berkner, *et al.*, *BioTechniques* (1.998) 6: 616), Rosenfeld *et al.* (1.991, *Science* 252: 431-434) y Rosenfeld *et al.* (1.992), *Cell* 68:143-155) o alfavirus así como otros conocidos en la técnica. Se han usado retrovirus para introducir una variedad de genes en muchos diferentes tipos de células, incluyendo células epiteliales, in vitro y/o in vivo (véase, por ejemplo, Eglitis, *et al.*, *Science* (1.985) 230: 1.395-1.398; Danos y Mulligan, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1.998) 85: 6.460-6.464; Wilson *et al.*, 1.988, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 3.014-3.018; Armentano *et al.*, 1.990, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 61416145; Huber *et al.*, 1.991, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 8.039-8.043; Ferry *et al.*, 1.991, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 8.377-8.381; Chowdhury *et al.*, 1.991, *Science* 254: 1.802-1.805; van Beusechem, *et al.*, 1.992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 7.640-19; Kay *et al.*, 1.992, *Human Gene Therapy* 3: 641-647; Dai *et al.*, 1.992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 10.892-10.895; Hwu *et al.*, 1.993, *J. Immunol.* 150: 4.104-4.115; Patente de EE.UU. N° 4.868.116; Patente de EE.UU. N° 4.980.286; Solicitud de Patente Internacional PCT WO 89/07136; Solicitud de Patente Internacional PCT WO 89/02468; Solicitud de Patente Internacional PCT WO 89/05345 y Solicitud de Patente Internacional PCT WO 92/07573). Los vectores retrovirales recombinantes capaces de transducir y expresar genes insertados en el genoma de una célula pueden ser producidos por transfección del genoma retroviral recombinante en estirpes celulares empaquetadas adecuadas tales como PA317 y Psi-CRIP (Comette *et al.*, 1.991, *Human Gene Therapy* 2: 5-10; Cone *et al.*, 1.984, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 6.349). Se pueden usar vectores adenovíricos recombinantes para infectar una amplia variedad de células y tejidos en huéspedes susceptibles (por ejemplo, rata, hámster, perro y chimpancé) (Hsu *et al.*, 1.992, *J. Infectious Disease*, 166: 769) y también presentan la ventaja de no requerir células mitóticamente activas para infección.

- 20 Se puede usar cualquier vector vírico capaz de aceptar las secuencias codificadoras para la molécula o las moléculas de ARNs que se tienen que expresar, por ejemplo vectores procedentes de adenovirus (AV); virus adenoasociados (AAV); retrovirus (por ejemplo, lentivirus (LV), Rabdovirus, virus de la leucemia murina); herpesvirus y similares. El tropismo de vectores víricos se puede modificar mediante pseudotipificación de los vectores con proteínas de envoltura u otros antígenos de superficie de otros virus o por sustitución de diferentes proteínas de cápside vírica, como sea apropiado.

- 25 Por ejemplo, los vectores lentivíricos caracterizados en la invención se pueden pseudotipificar con proteínas de superficie a partir de virus de la estomatitis vesicular (VSV, por sus siglas en inglés), rabia, Ebola, Mokola y similares. Los vectores AAV caracterizados en la invención se pueden hacer para fijar como objetivo diferentes células por diseño de los vectores para expresar diferentes serotipos de proteínas de cápside. Por ejemplo, un vector AAV que expresa una cápside de serotipo 2 en un genoma de serotipo 2 se denomina AAV 2/2. Este gen de cápside de serotipo 2 en el vector AAV 2/5 puede ser reemplazado por un gen de cápside de serotipo 5 para producir un vector AAV 2/2. Las técnicas para construir vectores AAV que expresen diferentes serotipos de proteínas de cápside están dentro de la destreza de la técnica; véase, por ejemplo, Rabinowitz *J E et al.*, (2.002), *J Virol* 76: 791-801.

- 30 La selección de vectores víricos recombinantes adecuados para uso en la invención, los métodos para insertar secuencias de ácidos nucleicos para expresar el ARNs en el vector y los métodos para suministrar el vector vírico a las células de interés están dentro de la destreza de la técnica. Véase, por ejemplo, Domburg R (1.995), *Gene Therap.* 2: 301-310; Eglitis M A (1.988), *Biotechniques* 6: 608-614; Miller A D (1.990), *Hum Gene Therap.* 1: 5-14; Anderson W F (1.998), *Nature* 392: 25-30 y Rubinson D A *et al.*, *Nat. Genet.* 33: 401-406.

Los vectores víricos pueden proceder de AV y AAV. En una realización, el ARNs caracterizado en la invención se expresa como dos moléculas de ARN monocatenarias complementarias, separadas, a partir de un vector AAV

recombinante que tiene, por ejemplo, los activadores de ARN U6 o H1 o el activador de citomegalovirus (CMV).

Un vector AV adecuado para expresar el ARNds caracterizado en la invención, un método para construir el vector AV recombinante y un método para suministrar el vector a células fijadas como objetivo, se describen en Xia H *et al.* (2.002), *Nat. Biotech.* 20: 1.006-1.010.

- 5 Los vectores AAV adecuados para expresar el ARNds caracterizado en la invención, los métodos para construir el vector AV recombinante y los métodos para suministrar los vectores a las células fijadas como objetivo, se describen en Samulski R *et al.* (1.987), *J. Virol.* 61: 3.096-3.101; Fisher K J *et al.*, (1.996), *J. Virol.* 70: 520-532; Samulski R *et al.* (1.989), *J. Virol.* 63: 3.822-3.826; Patente de EE.UU. N° 5.252.479; Patente de EE.UU. N° 5.139.941; Solicitud de Patente Internacional N° WO 94/13788 y Solicitud de Patente Internacional N° WO 93/24641.
- 10 El activador que conduce la expresión de ARNds en un plásmido de ADN o vector vírico caracterizado en la invención puede ser una polimerasa I de ARN eucariota (por ejemplo, activador de ARN ribosómico), polimerasa II de ARN (por ejemplo, activador temprano de CMV o activador de actina o activador de ARNsn U1) o en general activador de polimerasa III de ARN (por ej., ARNsn U6 o activador de ARN 7SK) o un activador procariota, por ejemplo el activador T7, siempre que el plásmido de expresión también codifique la polimerasa de ARN T7 requerida para la transcripción de un activador de T7. El activador también puede dirigir la expresión transgen al páncreas (véase, por ejemplo, la secuencia reguladora de la insulina para páncreas (Bucchini *et al.*, 1.986, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 2.511-2.515)).

Además, la expresión del transgen se puede regular de manera precisa, por ejemplo, usando una secuencia reguladora inducible y sistemas de expresión tales como una secuencia reguladora que es sensible a ciertos reguladores fisiológicos, por ejemplo, niveles de glucosa circulantes u hormonas (Docherty *et al.*, 1.994, *FASEB J.* 8: 20-24). Dichos sistemas de expresión inducibles, adecuados para el control de la expresión transgen en células o en mamíferos incluyen la regulación por estrógeno, progesterona, tetraciclina, inductores químicos de la dimerización e isopropil-beta-D1-tiogalactopiranosido (EPTG). Un experto en la materia podría elegir la secuencia reguladora/activadora apropiada basándose en el uso deseado del transgen de ARNds.

25 En general, los vectores recombinantes capaces de expresar moléculas de ARNds se suministran como se describe a continuación y persisten en células fijadas como objetivo. Alternativamente, se pueden usar vectores víricos que proporcionen expresión transitoria de moléculas de ARNds. Dichos vectores se pueden administrar de manera repetida como sea necesario. Una vez expresados, los ARNds se unen a ARN fijado como objetivo y modulan su función o expresión. El suministro de vectores de expresión de ARNds puede ser sistémico, tal como por administración intravenosa o intramuscular, por administración a células fijadas como objetivo explantadas del paciente seguido por reintroducción al paciente o por cualquier otro medio que permita la introducción en una célula fijada como objetivo deseada.

Los plásmidos de ADN de expresión de ARNds se transfectan típicamente en células fijadas como objetivo como un complejo con portadores lipídicos catiónicos (por ej. Oligofectamina) o portadores de base lipídica no catiónicos (por ej. Transit-TKO™). Las transfecciones lipídicas múltiples para destrucciones mediadas por ARNds que fijan como objetivo diferentes regiones de un gen de TTR único o genes de TTR múltiples durante un periodo de una semana o más también se consideran por la invención. La introducción exitosa de vectores en células huésped se puede controlar usando diversos métodos conocidos. Por ejemplo, se puede señalar la transfección transitoria con un informador, tal como un marcador fluorescente, tal como Proteína Fluorescente Verde (GFP, por sus siglas en inglés). La transfección estable de células ex vivo se puede asegurar usando marcadores que proporcionen la célula transfectada con resistencia a factores medioambientales específicos (por ejemplo, antibióticos y fármacos), tales como resistencia al higromicina B.

También se pueden insertar moléculas de ARNds específicas de TTR en vectores y se pueden usar como vectores de tratamiento de genes para pacientes humanos. Se pueden suministrar vectores de tratamiento de genes a un individuo por, por ejemplo, inyección intravenosa, administración local (véase, La Patente de EE.UU. 5.328.470) o por inyección estereotáctica (véase por ej., Chen *et al.*, (1.994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 3.054-3.057). La preparación farmacéutica del vector de tratamiento de genes puede incluir el vector de tratamiento de genes en un diluyente aceptable o puede incluir una matriz de liberación retardada en que se embebe el vehículo de suministro de genes. Alternativamente, en el caso de que se produzca el vector de suministro de genes completo intacto de células recombinantes, por ejemplo, vectores retrovíricos, la preparación farmacéutica puede incluir una o más células que produzcan el sistema de suministro de genes.

III. Composiciones farmacéuticas que contienen ARNds.

En una realización, la invención proporciona composiciones farmacéuticas que contienen un ARNds de la invención y un portador farmacéuticamente aceptable. La composición farmacéutica que contiene el ARNds es útil para tratar una enfermedad o trastorno asociado a la expresión o actividad de un gen de TTR, tales como procesos patológicos mediados por expresión de TTR. Dichas composiciones farmacéuticas se formulan basándose en el modo de suministro. Un ejemplo son composiciones que se formulan para administración sistémica vía suministro parenteral, por ejemplo, por suministro intravenoso (IV). Otro ejemplo son composiciones que se formulan para suministro

directo al parénquima cerebral, por ejemplo, por infusión intravenosa en el cerebro, tal como por infusión intravenosa de bomba continua.

Las composiciones farmacéuticas caracterizadas en la presente memoria se administran en dosis suficientes para inhibir la expresión de genes TTR.

5 En general, una dosis adecuada de ARNds estará en el intervalo de 0,01 a 200,0 miligramos por kilogramo de peso corporal del receptor al día, en general en el intervalo de 1 a 50 mg por kilogramo de peso corporal al día. Por ejemplo, el ARNds se puede administrar a 0,0059 mg/kg, 0,01 mg/kg, 0,0295 mg/kg, 0,05 mg/kg, 0,0590 mg/kg, 0,163 mg/kg, 0,2 mg/kg, 0,3 mg/kg, 0,4 mg/kg, 0,5 mg/kg, 0,543 mg/kg, 0,5900 mg/kg, 0,6 mg/kg, 0,7 mg/kg, 0,8 mg/kg, 0,9 mg/kg, 1 mg/kg, 1,1 mg/kg, 1,2 mg/kg, 1,3 mg/kg, 1,4 mg/kg, 1,5 mg/kg, 1,628 mg/kg, 2 mg/kg, 3 mg/kg, 10

La dosis puede estar entre 0,01 y 0,2 mg/kg. Por ejemplo, el ARNds se puede administrar a una dosis de 0,01 mg/kg, 0,02 mg/kg, 0,3 mg/kg, 0,04 mg/kg, 0,05 mg/kg, 0,06 mg/kg, 0,07 mg/kg, 0,08 mg/kg, 0,09 mg/kg, 0,10 mg/kg, 0,11 mg/kg, 0,12 mg/kg, 0,13 mg/kg, 0,14 mg/kg, 0,15 mg/kg, 0,16 mg/kg, 0,17 mg/kg, 0,18 mg/kg, 0,19 mg/kg o 0,20 mg/kg.

15 La dosis puede estar entre 0,005 mg/kg y 1,628 mg/kg. Por ejemplo, el ARNds se puede administrar a una dosis de 0,0059 mg/kg, 0,0295 mg/kg, 0,0590 mg/kg, 0,163 mg/kg, 0,543 mg/kg, 0,5900 mg/kg o 1,628 mg/kg.

La dosis puede estar entre 0,2 mg/kg y 1,5 mg/kg. Por ejemplo, el ARNds se puede administrar a una dosis de 0,2 mg/kg, 0,3 mg/kg, 0,4 mg/kg, 0,5 mg/kg, 0,6 mg/kg, 0,7 mg/kg, 0,8 mg/kg, 0,9 mg/kg, 1 mg/kg, 1,1 mg/kg, 1,2 mg/kg, 1,3 mg/kg, 1,4 mg/kg o 1,5 mg/kg.

20 La composición farmacéutica se puede administrar una vez al día o el ARNds se puede administrar como dos, tres o más sub-dosis a intervalos apropiados a lo largo del día o incluso usar infusión intravenosa continua o suministrar a través de una formulación de liberación controlada. En ese caso, el ARNds contenido en cada sub dosis debe ser igualmente menor para conseguir la dosis diaria total. La unidad de dosificación también puede estar combinada para suministro durante varios días, por ejemplo, usando una formulación de liberación prolongada convencional que proporcione liberación prolongada del ARNds durante un periodo de varios días. Las formulaciones de liberación prolongada son conocidas en la técnica y son particularmente útiles para suministro de agentes en un sitio particular, tal como se podía usar con los agentes de la presente invención. En esta realización, la unidad de dosificación contiene un correspondiente múltiplo de la dosis diaria.

30 El efecto de una sola dosis sobre los niveles de TTR es larga duración, de manera que se administran dosis posteriores en intervalos de no más de 3, 4 o 5 días o en intervalos de no más de 1, 2, 3 ó 4 semanas o a intervalos de no más de 5, 6, 7, 8, 9 ó 10 semanas.

35 El experto apreciará que ciertos factores pueden influir en la dosis y sincronización requerida para tratar de manera eficaz a un individuo, incluyendo pero no limitándose a la importancia de la enfermedad o el trastorno, los tratamientos previos, la salud general y/o la edad del individuo y otras enfermedades presentes. Por otra parte, el tratamiento de un individuo con una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición puede incluir un solo tratamiento o a una serie de tratamientos. Los cálculos de dosis eficaces y los periodos de semidescomposición in vivo para los ARNds individuales incluidos por la invención se pueden realizar usando metodologías convencionales o sobre la base de ensayos in vivo usando un modelo animal apropiado, como se describe en otra parte en la presente memoria.

40 Los avances en genética en ratones han generado una serie de modelos en ratones para el estudio de diversas enfermedades humanas, tales como procesos patológicos mediados por expresión de la TTR. Dichos modelos se usan para ensayos in vivo de ARNds, así como para determinar una dosis terapéuticamente eficaz. Un modelo de ratón adecuado es, por ejemplo, un ratón que contiene un plásmido que expresa TTR humana. Otro modelo de ratón adecuado es un ratón transgénico que soporta un transgen que expresa TTR humana.

45 Los datos obtenidos a partir de ensayos en cultivos celulares y estudios en animales se pueden usar en la formulación de un intervalo de dosis para uso en seres humanos. La dosis de composiciones caracterizadas en la invención se encuentra en general dentro de un intervalo de concentraciones circulantes que incluye el ED50 con poca o ninguna toxicidad. La dosis puede variar dentro de este intervalo dependiendo de la forma farmacéutica empleada y la vía de administración utilizada. Para cualquier compuesto usado en los métodos caracterizados en la invención, una dosis terapéuticamente eficaz se puede estimar inicialmente a partir de ensayos en cultivos celulares. Se puede formular una dosis en modelos animales para conseguir un intervalo de concentración en plasma circulante del compuesto o, cuando sea apropiado, del producto polipeptídico de una secuencia fijada como objetivo (por ejemplo, consiguiendo una concentración disminuida del polipéptido) que incluya el IC50 (es decir, la concentración del compuesto de ensayo que consigue una inhibición medio máxima de los síntomas) cuando se determina en cultivo celular. Dicha información se puede usar para determinar de manera más precisa dosis útiles en seres humanos. Se pueden medir los niveles en plasma, por ejemplo, por cromatografía líquida de alta resolución.

Los ARNds caracterizados en la invención se pueden administrar en asociación con otros agentes conocidos eficaces en el tratamiento de procesos patológicos mediados por expresión de genes fijados como objetivo. En cualquier caso, el médico que lo administra puede ajustar la cantidad y la sincronización de la administración de ARNds sobre la base de los resultados observados usando medidas clásicas de eficacia conocidas en la técnica o descritas en la presente memoria.

Administración

La presente invención también incluye composiciones farmacéuticas y formulaciones que incluyen los compuestos de ARNds caracterizados en la invención. Las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden administrar de si se desea el tratamiento local o sistémico y dependiendo del área que se tiene que tratar. La administración puede ser tópica, por vía pulmonar, por ejemplo, por inhalación o insuflación de polvos o aerosoles, incluyendo por nebulizador; intratraqueal, intranasal, epidérmica y transdérmica, oral o parenteral. La administración parenteral incluye inyección intravenosa, intraarterial, subcutánea, intraperitoneal o intramuscular o infusión intravenosa o administración intracraneal, por ejemplo, intraparenquimal, intratecal o intraventricular.

El ARNds se puede suministrar de manera que se fije como objetivo un tejido particular, tal como el hígado (por ejemplo, los hepatocitos del hígado).

Se puede suministrar un ARNds que fija como objetivo TTR por medio de una cánula u otro dispositivo de suministro que tenga un extremo implantado en un tejido, por ejemplo, el cerebro, la sustancia negra, córtex, hipocampo, estriato, cuerpo calloso o globo pálido del cerebro. La cánula puede estar conectada a un depósito de la composición de ARNds. El flujo o el suministro puede estar mediado por una bomba, por ejemplo, una bomba osmótica o minibomba, tal como una bomba Alzet (Durect, Cupertino, CA). En una realización, se implanta una bomba y depósito en un área distante del tejido, por ejemplo, en el abdomen, y el suministro se efectúa por un conducto que conduce desde la bomba o depósito al sitio de liberación. La infusión intravenosa de la composición del ARNds en el cerebro puede ser durante varias horas o durante varios días, por ejemplo durante 1,2, 3, 5 ó 7 días o más. Los dispositivos para suministro al cerebro se describen, por ejemplo, en las Patentes de EE.UU. Nos. 6.093.180 y 5.814.014.

Las composiciones farmacéuticas y las formulaciones para administración tópica pueden incluir parches transdérmicos, pomadas, lociones, cremas, geles, gotas, supositorios, esprays, líquidos y polvos. Los portadores farmacéuticos convencionales, bases en polvo acuosas u oleosas, espesantes y similares pueden ser necesarios o deseables. También pueden ser útiles preservativos recubiertos, guantes y similares. Las formulaciones tópicas adecuadas incluyen aquéllas en que los ARNds caracterizados en la invención están mezclados con un agente de suministro tópico tal como lípidos, liposomas, ácidos grasos, ésteres de ácidos grasos, esteroides, agentes quelantes y tensioactivos. Los lípidos y los liposomas adecuados incluyen neutros (por ej., dioleoilfosfatidil DOPE etanolamina, dimiristoilfosfatidilcolina DMPC, diestearoilfosfatidilcolina) negativos (por ej., dimiristoilfosfatidilglicerol DMPG) y catiónicos (por ej., dioleoiltetrametilaminopropil DOTAP y dioleoilfosfatidiletanolamina DOTMA). Los ARNds caracterizados en la invención pueden estar encapsulados en liposomas o pueden formar complejos con los mismos, en particular con liposomas catiónicos. Alternativamente, los ARNds se pueden complejar con lípidos, en particular con lípidos catiónicos. Los ácidos grasos y ésteres adecuados incluyen, pero no se limitan a: ácido araquidónico, ácido oleico, ácido eicosanoico, ácido láurico, ácido caprílico, ácido cáprico, ácido mirístico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido linoleico, ácido linolénico, dicaprato, tricaprato, monooleína, dilaurina, 1-monocaprato de glicerilo, 1-dodecilazacicloheptan-2-ona, una acilcarnitina, una acilcolina o un éster alquílico C₁₋₁₀ (por ej., miristato de isopropilo IPM), monoglicérido, diglicérido o sal farmacéuticamente aceptable de los mismos. Se describen formulaciones tópicas con detalle en la Patente de EE.UU. N° 6.747.014, que se incorpora en la presente memoria como referencia.

Formulaciones de liposomas.

Hay muchas estructuras de tensioactivo organizadas además de microemulsiones que se han estudiado y usado para la formulación de fármacos. Estas incluyen monocapas, micelas, bicapas y vesículas. Las vesículas, tales como liposomas, han atraído gran interés debido a su especificidad y la duración de acción que ofrecen desde el punto de vista del suministro de fármaco. Como se usa la presente invención, el término "liposoma" significa una vesícula constituida por lípidos anfífilos dispuestos en una bicapa o bicapas esféricas.

Los liposomas son vesículas unilaminares o multilaminares que tienen una membrana formada de un material lipófilo y un interior acuoso. La porción acuosa contiene la composición que se tiene que suministrar. Los liposomas catiónicos poseen la ventaja de poder fusionarse a la pared celular. Los liposomas no catiónicos, aunque no pueden fusionarse tan eficazmente con la pared celular, son absorbidos por macrófagos in vivo.

Para cruzar la piel del mamífero intacta, las vesículas de lípido deben pasar por una serie de poros finos, cada uno con un diámetro menor que 50 nm, bajo la influencia de un gradiente transdérmico adecuado. Por lo tanto, es deseable usar un liposoma que sea altamente deformable y pueda pasar a través de dichos poros finos.

Más ventajas de los liposomas incluyen: los liposomas obtenidos de fosfolípidos naturales son biocompatibles y

- biodegradables; los liposomas pueden incorporar un amplio intervalo de fármacos solubles en agua y en lípidos; los liposomas pueden proteger fármacos encapsulados en sus compartimentos internos de metabolismo y degradación (Rosoff, en *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger y Banker (Eds.), 1.988, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N. Y., volumen 1, pág. 245). Son consideraciones importantes en la preparación de formulaciones de liposomas la carga superficial lipídica, el tamaño de la vesícula y el volumen acuoso de los liposomas.
- Los liposomas son útiles para la transferencia y el suministro de ingredientes activos al sitio de acción. Debido a que la membrana liposomal es estructuralmente similar a las membranas biológicas, cuando se aplican liposomas a un tejido, los liposomas empiezan a fundirse con las membranas celulares y a medida que progresa la fusión de liposoma y la célula, se vacía el contenido liposomal en la célula donde puede actuar el agente activo.
- Las formulaciones de liposomas han sido el foco de investigación extensa como el modo de suministro para muchos fármacos. Hay una evidencia creciente en que para administración tópica, los liposomas presentan diversas ventajas sobre otras formulaciones. Dichas ventajas incluyen efectos secundarios reducidos relacionados con la absorción sistémica alta del fármaco administrado, acumulación aumentada del fármaco administrado en el objetivo deseado y la capacidad para administrar una amplia variedad de fármacos, tanto hidrófilos como hidrófobos, a la piel.
- Diversos informes han detallado la capacidad de los liposomas para suministrar agentes incluyendo ADN de alto peso molecular a la piel. Los compuestos incluyendo analgésicos, anticuerpos, hormonas y los ADN de alto peso molecular han sido administrados a la piel. La mayoría de las aplicaciones dieron como resultado la fijación como objetivo de la epidermis superior.
- Los liposomas se encuentran en dos amplias clases. Los liposomas catiónicos son liposomas cargados positivamente que interactúan con las moléculas de ADN cargadas negativamente para formar un complejo estable. El complejo ADN cargado positivamente/liposoma se une a la superficie de la célula cargadas negativamente y se internaliza en un endosoma. Debido al pH ácido dentro del endosoma, los liposomas se rompen, liberando su contenido en el citoplasma celular (Wang *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1.987, 147, 980-985).
- Los liposomas que son sensibles al pH o están cargados negativamente, atrapan ADN en vez de complejarse con él. Puesto que tanto el ADN como el lípido están cargados de manera similar, tiene lugar repulsión en vez de formación de complejo. Sin embargo, algo de ADN es atrapado dentro del interior acuoso de estos liposomas. Los liposomas sensibles al pH se han usado para suministrar ADN codificador del gen timidina cinasa a monocapas de células en cultivo. La expresión del gen exógeno se detectó en las células fijadas como objetivo (Zhou *et al.*, *Journal of Controlled Release*, 1.992, 19, 269-274).
- Un tipo principal de composición de liposomas incluye fosfolípidos distintos de fosfatidilcolina de procedencia natural. Las composiciones de liposomas neutras, por ejemplo, se pueden formar a partir de dimiristoil fosfatidilcolina (DMPC) o dipalmitoil fosfatidilcolina (DPPC). Las composiciones de liposomas aniónicos generalmente se forman de dimiristoil fosfatidilglicerol, mientras que los liposomas fusogénicos aniónicos se forman principalmente de dioleoil fosfatidiletanolamina (DOPE). Otro tipo de composición de liposomas se forma de fosfatidilcolina (PC, por sus siglas en inglés) tal como, por ejemplo, PC de soja y PC de huevo. Otro tipo se forma de mezclas de fosfolípido y/o fosfatidilcolina y/o colesterol.
- Diversos estudios han evaluado el suministro tópico de formulaciones de fármacos de liposomas a la piel. La aplicación de liposomas que contienen interferón a piel de conejillo de indias dio como resultado una reducción de lesiones del herpes cutáneo mientras que el suministro de interferón por otros medios (por ejemplo, como una disolución o como una emulsión) fue ineficaz (Weiner *et al.*, *Journal of Drug Targeting*, 1.992, 2, 405-410). Además, un estudio adicional ensayó la eficacia del interferón administrado como parte de una formulación de liposomas para la administración de interferón usando un sistema acuoso y concluyó que la formulación de liposomas era superior a la administración acuosa (de Plessis *et al.*, *Antiviral Research*, 1.992, 18, 259-265).
- También se han examinado sistemas de liposomas no iónicos para determinar su utilidad en el suministro de fármacos a la piel, en particular sistemas que comprenden tensioactivo no iónico y colesterol. Se usaron formulaciones de liposomas no iónicos que comprenden Novasome™ I (dilaurato de glicerilo/colesterol/polioxietileno-10-estearil éter) y Novasome™ II (diestearato de glicerilo/colesterol/polioxietileno-10-estearil éter) para suministrar ciclosporina-A a la dermis de piel de ratón. Los resultados indicaron que dichos sistemas de liposomas no iónicos eran eficaces facilitando la deposición de ciclosporina-A en diferentes capas de la piel (Hu *et al.*, *S.T.P. Pharma. Sci.*, 1.994, 4, 6, 466).
- Liposomas también incluye liposomas “estabilizados estéricamente”, un término que, como se usa en la presente memoria, se refiere a liposomas que comprenden uno o más lípidos especializados que, cuando se incorporan a los liposomas, dan como resultado semividas de circulación aumentadas en relación a los liposomas que carecen de dichos lípidos especializados. Ejemplos de liposomas estabilizados estéricamente son aquéllos en que parte de la porción lipídica que forma la vesícula del liposoma (A) comprende uno o más glucolípidos, tales como monosialogangliósido G_{M1} o (B) se derivatiza con uno o más polímeros hidrófilos, tales como un resto de polietilenglicol (PEG). Aunque no se desea estar limitados por ninguna teoría particular, se piensa en la técnica que, al menos para liposomas estabilizados estéricamente que contienen gangliósidos, esfingomielina o lípidos

derivatizados de PEG, la semivida de circulación aumentada de estos liposomas estabilizados estéricamente procede de una absorción reducida en las células del sistema reticuloendotelial (RES) (Allen *et al.*, FEBS Letters, 1.987, 223, 42; Wu *et al.*, Cancer Research, 1.993, 53, 3.765).

5 Se conocen en la técnica diversos liposomas que comprenden uno o más glucolípidos. Papahadjopoulos *et al.* (Ann. N. Y. Acad. Sci., 1.987, 507, 64) indicaron la capacidad del monosialogangliósido GM₁, galactocerebrósido sulfato y fosfatidilinositol para mejorar las semividas en sangre de los liposomas. Estos hallazgos fueron expuestos por Gabizon *et al.* (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1.988, 85, 6.949). La Patente de EE.UU. N° 4.837.028 y la patente internacional WO 88/04924, ambas a Allen *et al.*, describen liposomas que comprenden (1) esfingomielina y (2) el gangliósido GM₁ o un éster de galactocerebrósido sulfato. La Patente de EE.UU. N° 5.543.152 (Webb *et al.*) describe liposomas que comprenden esfingomielina. Los liposomas que comprenden 1,2-sn-dimiristoilfosfatidilcolina se describen en la patente internacional WO 97/13499 (Lim *et al.*).

15 Se conocen en la técnica muchos liposomas que comprenden lípidos derivatizados con uno o más polímeros hidrófilos, y métodos de preparación de los mismos. Sunamoto *et al.* (Bull. Chem. Soc. Jpn., 1.980, 53, 2.778) describe liposomas que comprenden un detergente no iónico, 2C₁₂15G, que contiene un resto PEG. Illum *et al.* (FEBS Lett., 1.984, 167, 79) indicaron que el recubrimiento hidrófilo de partículas de poliestireno con glicoles poliméricos da como resultado semividas en sangre significativamente aumentadas. Los fosfolípidos sintéticos modificados por la unión de grupos carboxílicos de polialquilenglicoles (por ej., PEG) se describen por Sears (Patentes de EE.UU. N° 4.426.330 y 4.534.899). Klibanov *et al.* (FEBS Lett., 1990, 268, 235) describieron experimentos que demuestran que los liposomas que comprenden fosfatidiletanolamina (PE) derivatizada con PEG o estearato de PEG presentan aumentos significativos en las semividas de circulación en sangre. Blume *et al.* (Biochimica et Biophysica Acta, 1.990, 1.029, 91) extendieron tales observaciones a otros fosfolípidos derivatizados de PEG, por ejemplo, DSPE-PEG, formado de la combinación de diestearoilfosfatidiletanolamina (DSPE) y PEG. Los liposomas que tienen restos PEG ligados mediante enlaces covalentes en su superficie externa se describen en la Patente Europea N° EP 0 445 131 B1 y la Patente Internacional WO 90/04384 a Fisher. Las composiciones de liposomas que contienen 1-20 por ciento en moles de PE derivatizados con PEG y métodos para usar los mismos, se describen por Woodle *et al.* (Patentes de EE.UU. N° 5.013.556 y 5.356.633) y Martin *et al.* (Patente de EE.UU. N° 5.213.804 y Patente Europea N° EP 0 496 813 B1). Los liposomas que comprenden una serie de otros conjugados lípido-polímero se describen en la patente internacional WO 91/05545 y la Patente de EE.UU. N° 5.225.212 (ambas a Martin *et al.*) y en la patente internacional WO 94/20073 (Zalipsqui *et al.*). Los liposomas que comprenden lípidos de ceramida modificados con PEG se describen en la patente internacional WO 96/10391 (Choi *et al.*). La Patente de EE.UU. N° 5.540.935 (Miyazaki *et al.*) y la Patente de EE.UU. N° 5.556.948 (Tagawa *et al.*) describen liposomas que contienen PEG que se pueden derivatizar además con restos funcionales en sus superficies.

35 Se conoce en la técnica una serie de liposomas que comprenden ácidos nucleicos. La patente internacional WO 96/40062 a Tierry *et al.* describe métodos para encapsular ácidos nucleicos de alto peso molecular en liposomas. La Patente de EE.UU. N° 5.264.221 a Tagawa *et al.*, describe liposomas ligados a proteína y sostiene que el contenido de dichos liposomas puede incluir un ARNds. La Patente de EE.UU. N° 5.665.710 a Rahman *et al.*, describe algunos métodos para encapsular oligodesoxinucleótidos en liposomas. La patente internacional WO 97/04787 a Love *et al.*, describe liposomas que comprenden ARNds fijado como objetivo al gen raf.

40 Los transfersomas son otro tipo más de liposomas y son agregados de lípidos muy deformables que son candidatos atractivos para vehículos de suministro de fármacos. Los transfersomas se pueden describir como gotitas de lípido que son tan altamente deformables que pueden penetrar fácilmente por los poros que son más pequeños que la gotita. Los transfersomas son adaptables al entorno en que se usan, por ejemplo, se auto-optimizan (adaptable a la forma de los poros en la piel), auto-reparadores, logran con frecuencia sus objetivos sin fragmentación y con frecuencia se auto-cargan. Para preparar transfersomas es posible añadir activadores del borde superficial, normalmente tensioactivos, a una composición de liposomas clásica. Los transfersomas se han usado para suministrar albúmina de suero a la piel. El suministro mediado por transfersomas de albúmina de suero se ha demostrado que es tan eficaz como la inyección subcutánea de una disolución que contiene albúmina de suero.

45 Los tensioactivos encuentran amplia aplicación en formulaciones tales como emulsiones (incluyendo microemulsiones) y liposomas. La manera más común de clasificar y ordenar las propiedades de los muy diferentes tipos de tensioactivos, tanto naturales como sintéticos, es por el uso del equilibrio hidrófilo/lipófilo (HLB, por sus siglas en inglés). La naturaleza del grupo hidrófilo (también conocido como la "cabeza") proporciona el medio más útil para categorizar los diferentes tensioactivos usados en las formulaciones (Rieger, en Pharmaceutical Dosage Forms, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N. Y., 1.988, pág. 285).

50 Si la molécula de tensioactivos no está ionizada, se clasifica como un tensioactivo no iónico. Los tensioactivos no iónicos encuentran amplia aplicación en productos farmacéuticos y cosméticos y son utilizables por un amplio intervalo de valores de pH. En general, sus valores de HLB oscilan de 2 a aproximadamente 18 dependiendo de su estructura. Los tensioactivos no iónicos incluyen ésteres no iónicos tales como ésteres de etilenglicol, ésteres de propilenglicol, ésteres de glicerilo, ésteres de poliglicerilo, ésteres de sorbitán, ésteres de sacarosa y ésteres etoxilados. Las alcanolamidas y los éteres no iónicos tales como etoxilados de alcoholes grasos, alcoholes propoxilados y polímeros de bloque etoxilados/propoxilados también se incluyen en esta clase. Los tensioactivos de polioxietileno son los miembros más populares de la clase de tensioactivos no iónicos.

Si la molécula de tensioactivo soporta una carga negativa cuando se disuelve o se dispersa en agua, el tensioactivo se clasifica como aniónico. Los tensioactivos aniónicos incluyen carboxilatos tales como jabones, lactilatos de acilo, acilamidas de aminoácidos, ésteres de ácido sulfúrico tales como alquilsulfatos y alquilsulfatos etoxilados, sulfonatos tales como alquilbencenosulfonatos, isetionatos de acilo, tauratos de acilo y sulfosuccinatos y fosfatos. Los miembros más importantes de la clase de tensioactivos aniónicos son los alquilsulfatos y los jabones.

Si la molécula de tensioactivo soporta una carga positiva cuando se disuelve o se dispersa en agua, el tensioactivo se clasifica como catiónico. Los tensioactivos catiónicos incluyen sales de amonio cuaternario y aminas etoxiladas. Las sales de amonio cuaternario son los miembros más usados de esta clase.

Se la molécula de tensioactivo presenta la capacidad de soportar carga positiva o negativa, el tensioactivo se clasifica como anfótero. Los tensioactivos anfóteros incluyen derivados de ácido acrílico, alquilamidas sustituidas, N-alquilbetainas y fosfatidas.

El uso de tensioactivos en fármacos, formulaciones y en emulsiones ha sido revisado (Rieger, en *Pharmaceutical Dosage Forms*, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N. Y., 1.988, pág. 285).

Partículas lipídicas de ácido nucleico.

Un ARNs de la TTR caracterizado en la invención puede estar completamente encapsulado en la formulación lipídica, por ej., para formar un SPLP, pSPLP, SNALP u otra partícula lipídica de ácido nucleico. Como se usa en la presente memoria, el término "SNALP" se refiere a una partícula lipídica de ácido nucleico estable, incluyendo SPLP. Como se usa en la presente memoria, el término "SPLP" se refiere a una partícula lipídica de ácido nucleico que comprende ADN plásmido encapsulado dentro de una vesícula lipídica. Los SNALP y SPLP contienen típicamente un lípido catiónico, un lípido no catiónico y un lípido que evita la agregación de la partícula (por ejemplo, un conjugado PEG-lípido). Los SNALP y SPLP son extremadamente útiles para aplicaciones sistémicas, ya que presentan semividas de circulación prolongadas después de inyección intravenosa (i.v.) y se acumulan en sitios distales (por ejemplo, sitios físicamente separados del sitio de administración). Los SPLP incluyen "pSPLP," que incluyen un complejo de agente de condensación-ácido nucleico encapsulado como se explica en la Publicación de patente internacional PCT N° WO 00/03683. Las partículas de la presente invención tienen típicamente un diámetro medio de aproximadamente 50 nm a aproximadamente 150 nm, más típicamente aproximadamente 60 nm a aproximadamente 130 nm, más típicamente aproximadamente 70 nm a aproximadamente 110 nm, lo más típicamente aproximadamente 70 nm a aproximadamente 90 nm y son sustancialmente no tóxicas. Además, los ácidos nucleicos cuando están presentes en las partículas lipídicas de ácido nucleico de la presente invención son resistentes en disolución acuosa a la degradación con una nucleasa. Las partículas lipídicas de ácido nucleico y su método de preparación se describen en, por ejemplo, las Patentes de EE.UU. Nos. 5.976.567; 5.981.501; 6.534.484; 6.586.410; 6.815.432 y la Publicación de patente internacional PCT N° WO 96/40964.

La relación lípido a fármaco (relación masa/masa) (por ejemplo, relación de lípido a ARNs) puede estar en el intervalo de desde aproximadamente 1:1 a aproximadamente 50:1, de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 25:1, de aproximadamente 3:1 a aproximadamente 15:1, de aproximadamente 4:1 a aproximadamente 10:1, de aproximadamente 5:1 a aproximadamente 9:1 o aproximadamente 6:1 a aproximadamente 9:1.

El lípido catiónico puede ser, por ejemplo, cloruro de N,N-dioleil-N,N-dimetilamonio (DODAC), bromuro de N,N-diestearil-N,N-dimetilamonio (DDAB), cloruro de N-(1-(2,3-dioleiloiloxi)propil)-N,N,N-trimetilamonio (DOTAP), cloruro de N-(1-(2,3-dioleiloiloxi)propil)-N,N,N-trimetilamonio (DOTMA), N,N-dimetil-2,3-dioleiloiloxi)propilamina (DODMA), 1,2-DiLinoleiloiloxi-N,N-dimetilaminopropano (DLinDMA), 1,2-Dilinoiloleiloxi-N,N-dimetilaminopropano (DLinDMA), 1,2-Dilinoiloleilcarbamoiloxi-3-dimetilaminopropano (DLin-C-DAP), 1,2-Dilinoiloleiloxi-3-(dimetilamino)acetoxipropano (DLin-DAC), 1,2-Dilinoiloleiloxi-3-morfolinopropano (DLin-MA), 1,2-Dilinoiloleil-3-dimetilaminopropano (DLinDAP), 1,2-Dilinoiloleil-3-dimetilaminopropano (DLin-S-DMA), 1-Linoiloleil-2-linoiloleiloxi-3-dimetilaminopropano (DLin-2-DMAP), sal de cloruro de 1,2-Dilinoiloleiloxi-3-trimetilaminopropano (DLin-TMA.Cl), sal de cloruro de 1,2-Dilinoiloleil-3-trimetilaminopropano (DLin-TAP.Cl), 1,2-Dilinoiloleiloxi-3-(N-metilpiperazino)propano (DLin-MPZ) o 3-(N,N-Dilinoiloleilamino)-1,2-propanodiol (DLinAP), 3-(N,N-Dioleilamino)-1,2-propanodiol (DOAP), 1,2-Dilinoiloleiloxo-3-(2-N,N-dimetilamino)etoxipropano (DLin-EG-DMA), 1,2-Dilinoiloleiloxi-N,N-dimetilaminopropano (DLinDMA), 2,2-Dilinoiloleil-4-dimetilaminometil-[1,3]-dioxolano (DLin-K-DMA) o análogos de los mismos, (3aR,5s,6aS)-N,N-dimetil-2,2-di((9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienil)tetrahidro-3aH-ciclopenta[d][1,3]dioxol-5-amina (ALN100), 4-(dimetilamino)butanoato de (6Z,9Z,28Z,31Z)-heptatriaconta-6,9,28,31-tetraen-19-ilo (MC3), 1,1'-(2-(4-(2-(2-(bis(2-hidroxidodecil)amino)etil)(2-hidroxidodecil)amino)etil)piperazin-1-il)etilazanodil)didodecan-2-ol (Tech G1) o una mezcla de los mismos. El lípido catiónico puede comprender de aproximadamente 20% en moles a aproximadamente 50 % en moles o aproximadamente 40 % en moles de lípido total presente la partícula.

El compuesto 2,2-Dilinoiloleil-4-dimetilaminoetil-[1,3]-dioxolano se puede usar para preparar nanopartículas de lípido-ARNs. La síntesis de 2,2-Dilinoiloleil-4-dimetilaminoetil-[1,3]-dioxolano se describe en la solicitud de patente provisional de los Estados Unidos número 61/107.998 presentado el 23 de octubre de 2.008.

La partícula de lípido-ARNs puede incluir 40% de 2,2-Dilinoiloleil-4-dimetilaminoetil-[1,3]-dioxolano: 10% de DSPC: 40% de Colesterol: 10% de PEG-C-DOMG (porcentaje en moles) con un tamaño de partícula de $63,0 \pm 20$ nm y una

relación de ARNs/Lípido de 0,027.

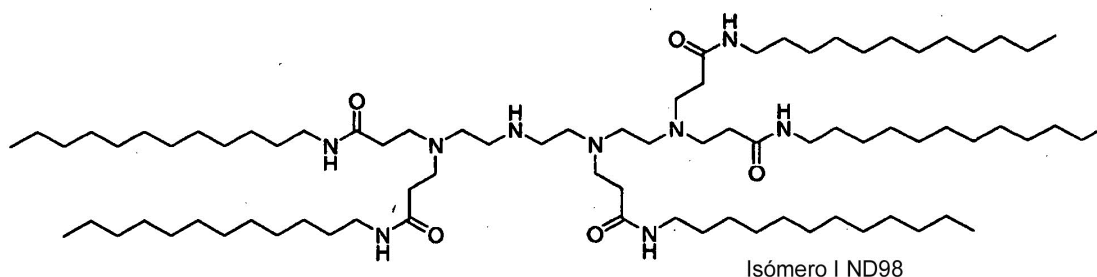
El lípido no catiónico puede ser un lípido aniónico o un lípido neutro incluyendo, pero no limitándose a, diestearoilfosfatidilcolina (DSPC), dioleoilfosfatidilcolina (DOPC), dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), dioleoilfosfatidilglicerol (DOPG), dipalmitoilfosfatidilglicerol (DPPG), dioleoil-fosfatidiletanolamina (DOPE), palmitoiloleoilfosfatidilcolina (POPC), palmitoiloleoilfosfatidiletanolamina (POPE), fosfatidiletanolamina 4-(N-maleimidometil)-ciclohexano-1-carboxilato de dioleilo (DOPE-mal), dipalmitoil fosfatidiletanolamina (DPPE), dimiristoilfosfoetanolamina (DMPE), diestearoil-fosfatidil-etanolamina (DSPE), 16-O-monometil PE, 16-O-dimetil PE, 18-1 -trans PE, 1 -estearoil-2-oleoil- fosfatidietanolamina (SOPE), colesterol o una mezcla de los mismos. El lípido no catiónico puede ser de aproximadamente 5 % en moles a aproximadamente 90 % en moles, aproximadamente 10 % en moles o aproximadamente 58 % en moles si se incluye el colesterol, del lípido total presente en la partícula.

El lípido conjugado que inhibe la agregación de partículas puede ser, por ejemplo, un polietilenglicol (PEG)-lípido incluyendo, sin limitación un PEG-diacilglicerol (DAG), un PEG-dialquioxipropilo (DAA), un PEG-fosfolípido, un PEG-ceramida (Cer) o una mezcla de los mismos. El conjugado PEG-DAA puede ser, por ejemplo, un PEG-dilauriloxipropilo (C₂), un PEG-dimiristiloxipropilo (C₄), un PEG-dipalmitiloxipropilo (C₆) o un PEG-diesteariloxipropilo (C₈). El lípido conjugado que evita la agregación de partículas puede ser de 0 % en moles a aproximadamente 20 % en moles o aproximadamente 2 % en moles del lípido total presente en la partícula.

La partícula lipídica de ácido nucleico puede incluir además colesterol en, por ejemplo, aproximadamente 10 % en moles a aproximadamente 60 % en moles o aproximadamente 48 % en moles de lípido total presente en la partícula.

LNP01

El lipidoide ND98-4HC1 (M 1.487) (Fórmula 1), Colesterol (Sigma-Aldrich) y PEG-Ceramida C16 (Avanti Polar Lipids) se pueden usar para preparar nanopartículas de lípido-ARNsi (es decir, partículas de LNP01). Las disoluciones madre de cada uno en etanol se pueden preparar como sigue: ND98, 133 mg/ml; Colesterol, 25 mg/ml, PEG-Ceramida C16, 100 mg/ml. Las disoluciones madre de ND98, Colesterol y PEG-Ceramida C16 se pueden combinar después en una relación molar, por ejemplo, 42:48:10. La disolución lipídica combinada se puede mezclar con ARNs acuoso (por ej., en acetato de sodio pH 5) de manera que la concentración final de etanol sea aproximadamente 35-45% y la concentración final de acetato de sodio sea aproximadamente 100-300 mM. Las nanopartículas de Lípido-ARNsi se forman típicamente de manera espontánea en el mezclamiento. Dependiendo de la distribución de tamaño de partícula deseado, la mezcla de nanopartículas resultante se puede extruir a través de una membrana de policarbonato (por ejemplo, 100 nm de corte) usando, por ejemplo, una extrusora de termocilindro, tal como Lipex Extruder (Northern Lipids, Inc). En algunos casos, se puede omitir la etapa de extrusión. La eliminación de etanol e intercambio de tampón simultáneo se pueden llevar a cabo, por ejemplo, por diálisis o filtración de flujo tangencial. Los tampones se pueden intercambiar, por ejemplo, con disolución salina tamponada con fosfato (PBS, por sus siglas en inglés) a aproximadamente pH 7, por ej., aproximadamente pH 6,9, aproximadamente pH 7,0, aproximadamente pH 7,1, aproximadamente pH 7,2, aproximadamente pH 7,3 o aproximadamente pH 7,4.



Fórmula 1

Se describen formulaciones LNP01, por ej., en la Publicación de la Solicitud de Patente Internacional N° WO 2008/042973.

Las formulaciones de lípido-ARNsi ejemplares adicionales son como sigue:

40

	Lípido Catiónico	Lípido Catiónico /lípido no catiónico /colesterol/Conjugado PEG-lípido Relación Lípido:RNAsi	Procedimiento
SNALP	1,2-Dilinoleniloxi-N,N-dimetilaminopropano (DLinDMA)	DLinDMA/DPPC/Colesterol/PEG-cDMA	
		(57,1/7,1/34,4/1,4)	
		lípido:ARNsi ~ 7:1	
SNALP-XTC	2,2-Dilinoleil-4-dimetilaminoetil-[1,3]-dioxolano (XTC)	XTC/DPPC/Colesterol/PEG-cDMA	
		57,1/7,1/34,4/1,4	
		lípido:ARNsi ~ 7:1	
LNP05	2,2-Dilinoleil-4-dimetilaminoetil-[1,3]-dioxolano (XTC)	XTC/DSPC/Colesterol/PEG-DMG	Extrusión
		57,5/7,5/31,5/3,5	
		lípido:ARNsi ~ 6:1	
LNP06	2,2-Dilinoleil-4-dimetilaminoetil-[1,3]-dioxolano (XTC)	XTC/DSPC/Colesterol/PEG-DMG	Extrusión
		57,5/7,5/31,5/3,5	
		lípido:ARNsi ~ 11: 1	
LNP07	2,2-Dilinoleil-4-dimetilaminoetil-[1,3]-dioxolano (XTC)	XTC/DSPC/Colesterol/PEG-DMG	Mezclamiento en línea
		60/7,5/31/1,5,	
		lípido:ARNsi ~ 6:1	
LNP08	2,2-Dilinoleil-4-dimetilaminoetil-[1,3]-dioxolano (XTC)	XTC/DSPC/Colesterol/PEG-DMG	Mezclamiento en línea
		60/7,5/31/1,5,	
		lípido:ARNsi ~ 11:1	
LNP09	2,2-Dilinoleil-4-dimetilaminoetil-[1,3]-dioxolano (XTC)	XTC/DSPC/Colesterol/PEG-DMG	Mezclamiento en línea
		50/10/38,5/1,5	
		Lípido:ARNsi 10:1	
LNP10	(3aR,5s,6aS)-N,N-dimetil-2,2-di((9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienil)tetrahidro-3aH-ciclopenta[d][1,3]dioxol-5-amina (ALN100)	ALN100/DSPC/Colesterol/PEG-DMG	Mezclamiento en línea
		50/10/38,5/1,5	
		Lípido:ARNsi 10:1	
LNP11	4-(Dimetilamino)butanoato (6Z,9Z,28Z,31Z)-	MC-3/DSPC/Colesterol/PEG-DMG	Mezclamiento

	Lípido Catiónico	Lípido Catiónico /lípido no catiónico /colesterol/Conjugado PEG-lípido Relación Lípido:RNAsi	Procedimiento
	heptatriaconta-6,9,28,31-tetraen-19-ilo (MC3)	50/10/38,5/1,5 Lípido:ARNsi 10:1	en línea
LNP12	1,1'-(2-(4-(2-((2-(bis(2-hidroxidodecil)amino)etil)(2-hidroxidodecil)amino)etil)piperazin-1-il)etilazanedil)didodecan-2-ol (Tech G1)	Tech G1/DSPC/Colesterol/PEG-DMG 50/10/38,5/1,5 Lípido:ARNsi 10:1	Mezclamiento en línea

Las formulaciones de LNP09 y formulaciones que comprenden XTC se describen, por ej., en la Patente Provisional de EE.UU. N° de Serie 61/239.686, presentada el 3 de septiembre de 2.009. Las formulaciones de LNP11 y las formulaciones que comprenden MC3 se describen, por ej., en la Patente Provisional de EE.UU. N° de Serie 61/244.834, presentada el 22 de septiembre de 2.009.

Las formulaciones preparadas por el método clásico o sin extrusión se pueden caracterizar de maneras similares. Por ejemplo, las formulaciones se caracterizan típicamente por inspección visual. Deberían ser disoluciones traslúcidas blanquecinas exentas de agregados o sedimento. El tamaño de partícula y la distribución de tamaños de partícula de nanopartículas lipídicas se pueden medir por dispersión de luz usando, por ejemplo, un Malvern Zetasizer Nano ZS (Malvern, USA). Las partículas deberían tener un tamaño de aproximadamente 20-300 nm, tal como 40-100 nm. La distribución de tamaños de partícula debería ser unimodal. La concentración de ARNsi total en la formulación, así como la fracción atrapada, se estima usando un ensayo de exclusión de colorante. Se puede incubar una muestra del ARNsi formulado con un colorante de unión de RNA, tal como Ribogreen (Sondas Moleculares) en presencia o ausencia de un tensioactivo de ruptura molecular de la formulación, por ejemplo, Tritón-X100 al 0,5%. Se puede determinar el ARNsi total en la formulación por la señal de la muestra que contiene el tensioactivo, respecto o a una curva estándar. Se determina la fracción atrapada por sustracción del contenido de ARNsi "libre" (cuando se mide por la señal en ausencia de tensioactivo) del contenido de ARNsi total. El ARNsi atrapado en porcentaje es típicamente >85%. Para la formulación de SNALP, el tamaño de partícula es al menos 30 nm, al menos 40 nm, al menos 50 nm, al menos 60 nm, al menos 70 nm, al menos 80 nm, al menos 90 nm, al menos 100 nm, al menos 110 nm y al menos 120 nm. El intervalo adecuado es típicamente aproximadamente al menos 50 nm a aproximadamente al menos 110 nm, aproximadamente al menos 60 nm a aproximadamente al menos 100 nm o aproximadamente al menos 80 nm a aproximadamente al menos 90 nm.

Las composiciones y las formulaciones para administración oral incluyen polvos o gránulos, micropartículas, nanopartículas, suspensiones o disoluciones en agua o medio no acuoso, cápsulas, cápsulas en gel, sobrecitos, comprimidos o minicompimidos. Pueden ser deseables espesantes, agentes saborizantes, diluyentes, emulsionantes, agentes auxiliares de dispersión o aglutinantes. En algunas realizaciones, las formulaciones orales son aquéllas en que los ARNds caracterizados en la invención se administran junto con uno o más tensioactivos y quelantes mejoradores de la penetración. Los tensioactivos adecuados incluyen ácidos grasos y/o ésteres o sales de los mismos, ácidos biliares y/o sales de los mismos. Los ácidos biliares/sales adecuados incluyen ácido quenodesoxicólico (CDCA, por sus siglas en inglés) y ácido ursodesoxicólico (UDCA, por sus siglas en inglés), ácido cólico, ácido deshidrocólico, ácido desoxicólico, ácido glucólico, ácido glicólico, ácido glicodesoxicólico, ácido taurocólico, ácido taurodesoxicólico, tauro-24,25-dihidro-fusidato de sodio y glicodihidrofusidato de sodio. Los ácidos grasos adecuados incluyen ácido araquidónico, ácido undecanoico, ácido oleico, ácido láurico, ácido caprílico, ácido cáprico, ácido mirístico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido linoleico, ácido linoléico, dicaprato, tricaprato, monooleína, dilaurina, 1-monocaprato de glicerilo, 1-dodecilazacicloheptan-2-ona, una acilcarnitina, una acilcolina o un monoglicérido, un diglicérido o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos (por ejemplo, sodio). En algunas realizaciones, se usan combinaciones de potenciadores de la penetración, por ejemplo, ácidos grasos/sales junto con ácidos biliares/sales. Potenciadores de la penetración adicionales incluyen polioxietileno-9-lauril éter, polioxietileno-20-cetil éter. Los ARNds caracterizados en la invención se pueden suministrar por vía oral, en forma granular incluyendo partículas secas pulverizadas o complejadas para formar micro o nanopartículas. Los agentes complejantes de ARNds incluyen poliaminoácidos; poliiminas; poliacrilatos; polialquilacrilatos, polioxetanos, polialquilcianoacrilatos; gelatinas cationizadas, albúminas, almidones, acrilatos, polietilenglicoles (PEG) y almidones; polialquilcianoacrilatos; poliiminas derivatizadas de DEAE, contaminantes, celulosas y almidones. Los agentes complejantes adecuados incluyen: quitosán, N-trimetilquitosán, poli-L-lisina, polihistidina, poliornitina, polisperminas, protamina, polivinilpiridina, politiódielaminometileno P (TDAE), poliaminoestireno (por ej., p-amino), poli(metilcianoacrilato), poli(etilcianoacrilato), poli(butilcianoacrilato), poli(isobutilcianoacrilato), poli(isohexilcianoacrilato), DEAE-metacrilato, DEAE-hexilacrilato, DEAE-acrilamida, DEAE-albúmina y DEAE-

dextrano, polimetilacrilato, polihexilacrilato, poli(D,L-ácido láctico), poli(DL-ácido láctico-co-glicólico (PLGA), alginato y polietilenglicol (PEG). Las formulaciones orales para los ARNdS y su preparación se describen con detalle en la Patente de EE.UU. 6.887.906, Publicación de Patente de EE.UU. N° 20030027780 y la Patente de EE.UU. N° 6.747.014, cada una de las cuales se incorpora en la presente memoria por referencia.

5 Las composiciones y formulaciones para administración parenteral, intraparenquimal (al cerebro), intratecal, intraventricular o intrahepática pueden incluir disoluciones acuosas estériles que también pueden contener tampones, diluyentes y otros aditivos adecuados tales como, pero no limitándose a, potenciadores de la penetración, compuestos portadores y otros portadores o excipientes farmacéuticamente aceptables.

10 Las composiciones farmacéuticas descritas incluyen disoluciones, emulsiones y formulaciones que contienen liposomas. Estas composiciones se pueden generar a partir de una variedad de componentes que incluyen, pero no se limitan a, líquidos preformados, sólidos autoemulsionables y semisólidos autoemulsionables. Se prefieren en particular las formulaciones que fijan como objetivo el hígado cuando se tratan trastornos hepáticos tales como carcinoma hepático.

15 Las formulaciones farmacéuticas de la presente invención, que se pueden presentar convenientemente en forma farmacéutica unitaria, se pueden preparar de acuerdo con técnicas convencionales conocidas en la industria farmacéutica. Tales técnicas incluyen la etapa de llevar a asociación los ingredientes activos con el portador o los portadores o excipiente o excipientes farmacéuticos. En general, las formulaciones se preparan llevando a asociación de manera uniforme y de manera íntima los ingredientes activos con portadores líquidos o portadores
20 sólidos finamente divididos o ambos, y después, si es necesario, conformar el producto.

Las composiciones de la presente invención se pueden formular en cualquiera de muchas formas farmacéuticas posibles tales como, pero no limitándose a, comprimidos, cápsulas, cápsulas de gel, jarabes líquidos, geles blandos, supositorios y enemas. Las composiciones de la presente invención también se pueden formular como suspensiones en medio acuoso, no acuoso o mixto. Las suspensiones acuosas pueden contener además sustancias que
25 aumentan la viscosidad de la suspensión incluyendo, por ejemplo, carboximetilcelulosa de sodio, sorbitol y/o dextrano. La suspensión puede contener también estabilizantes.

Emulsiones

Las composiciones de la presente invención se pueden preparar y formular como emulsiones. Las emulsiones son típicamente sistemas heterogéneos de un líquido dispersado en otro en la forma de gotitas normalmente que
30 exceden de 0,1 μm de diámetro (Idson, en *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1.988, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N. Y., volumen 1, pág. 199; Rosoff, en *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1.988, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N. Y., Volumen 1, pág. 245; Block in *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1.988, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N. Y., volumen 2, pág. 335; Higuchi et al., en *Remington's Pharmaceutical Sciences*, Mack Publishing Co., Easton, Pa.,
35 1.985, pág. 301). Las emulsiones son con frecuencia sistemas bifásicos que comprenden dos fases líquidas inmiscibles mezcladas íntimamente y dispersadas entre sí. En general, las emulsiones pueden ser de la variedad agua en aceite (w/o) o la variedad aceite en agua (o/w). Cuando una fase acuosa está finamente dividida en y dispersada como gotitas insignificantes en una fase oleosa volumétrica, la composición resultante se denomina una emulsión de agua en aceite (o/w). Alternativamente, cuando una fase oleosa está finamente dividida en y dispersada
40 como gotitas insignificantes en una fase acuosa volumétrica, la composición resultante se denomina una emulsión de aceite en agua (o/w). Las emulsiones pueden contener componentes adicionales además de las fases dispersadas y el fármaco activo que puede estar presente como una disolución en la fase acuosa, fase oleosa o ella misma como una fase separada. Los excipientes farmacéuticos tales como emulsionantes, estabilizantes, colorantes y antioxidantes también pueden estar presentes en las emulsiones cuando sea necesario. Las emulsiones
45 farmacéuticas también pueden ser emulsiones múltiples que están constituidas por más de dos fases tales como, por ejemplo, en el caso de emulsiones de aceite en agua en aceite (o/w/o) y agua en aceite en agua (w/o/w). Dichas formulaciones complejas con frecuencia proporcionan ciertas ventajas que no proporcionan las emulsiones binarias simples. Las emulsiones múltiples en que las gotitas de aceite individuales de una emulsión o/w encierran gotitas de agua pequeñas constituyen una emulsión w/o/w. Asimismo, un sistema de gotitas de aceite encerradas en glóbulos
50 de agua estabilizados en una fase continua oleosa proporciona una emulsión o/w/o.

Las emulsiones se caracterizan por poca o ninguna estabilidad termodinámica. Con frecuencia, la fase dispersada o discontinua de la emulsión se dispersa bien en la fase externa o continua y se mantiene de esta forma por medio de emulsionantes o la viscosidad de la formulación.

55 Cualquiera de las fases de la emulsión puede ser un semisólido o un sólido, como es el caso de bases y cremas de pomadas de estilo emulsión. Otros medios de estabilización de emulsiones implica el uso de emulsionantes que se pueden incorporar a cualquier fase de la emulsión. Los emulsionantes se pueden clasificar ampliamente en cuatro categorías: tensioactivo sintéticos, emulsionantes que se encuentran en la naturaleza, bases de absorción y sólidos finamente dispersados (Idson, en *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1.988, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N. Y., volumen 1, pág. 199).

Los tensioactivos sintéticos, también denominados como agentes tensioactivos, han encontrado amplia aplicabilidad de la formulación de emulsiones y se han revisado en la bibliografía (Rieger, en *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1.988, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N. Y., volumen 1, pág. 285; Idson, en *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N. Y., 1.988, volumen 1, pág. 199). Los tensioactivos son típicamente anfífilos y comprenden una porción hidrófila y una hidrófoba. La relación de la naturaleza hidrófila a la hidrófoba del tensioactivo se ha denominado el equilibrio hidrófilo/lipófilo (HLB) y es una herramienta valiosa en la categorización y selección de tensioactivos en la preparación de formulaciones. Los tensioactivos se pueden clasificar en diferentes clases basándose en la naturaleza del grupo hidrófilo: no iónico, aniónico, catiónico y anfótero (Rieger, en *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1.988, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N. Y., volumen 1, pág. 285).

Los emulsionantes que se encuentran en la naturaleza usados en formulaciones de emulsión incluyen: lanolina, cera de abejas, fosfatidas, lecitina y goma arábica. Las bases de absorción poseen propiedades hidrófilas de manera que pueden absorber agua para formar emulsiones w/o reteniendo aún sus consistencias semisólidas, tales como lanolina anhidra y vaselina hidrófila. Los sólidos finamente divididos también han sido usados como buenos emulsionantes especialmente junto con tensioactivos y en preparaciones viscosas. Estos incluyen sólidos inorgánicos polares, tales como hidróxidos de metal pesado, arcillas de no hinchamiento tales como: bentonita, atapulgita, hectorita, caolín, montmorillonita, silicato de aluminio coloidal y silicato de aluminio y magnesio coloidal, pigmentos y sólidos no polares tales como carbón o triestearato de glicerilo.

También se incluye una gran variedad de materiales no emulsionantes en formulaciones de emulsión y contribuyen a las propiedades de las emulsiones. Estos incluyen grasas, aceites, ceras, ácidos grasos, alcoholes grasos, ésteres grasos, humectantes, coloides hidrófilos, conservantes y antioxidantes (Block, en *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1.988, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N. Y., volumen 1, pág. 335; Idson, en *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1.988, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N. Y., volumen 1, pág. 199).

Los coloides hidrófilos o los hidrocoloides incluyen, gomas que se encuentran en la naturaleza y polímeros sintéticos tales como polisacáridos (por ejemplo, goma arábica, agar, ácido alginico, carragenina, goma guar, goma karaya y tragacanto), derivados de celulosa (por ejemplo, carboximetilcelulosa y carboxipropilcelulosa) y polímeros sintéticos (por ejemplo, carbómeros, éteres de celulosa y polímeros de carboxivinilo). Estos se dispersan o se hinchan en agua para formar disoluciones coloidales que estabilizan emulsiones por formación de películas interfaciales fuertes alrededor de las gotitas de fase dispersada y aumentando la viscosidad de la fase externa.

Como las emulsiones con frecuencia contienen una serie de ingredientes tales como carbohidratos, proteínas, esteroides y fosfatidas que pueden soportar fácilmente el crecimiento de microbios, estas formulaciones con frecuencia incorporan conservantes. Los conservantes comúnmente usados incluidos en formulaciones de emulsión incluyen metilparabeno, propilparabeno, sales de amonio cuaternario, cloruro de benzalconio, ésteres de ácido p-hidroxibenzoico y ácido bórico. También se añaden comúnmente antioxidantes para evitar el deterioro de la formulación. Los antioxidantes usados pueden ser eliminadores de radicales libres tales como: tocoferoles, galatos de alquilo, hidroxianisol butilado, hidroxitolueno butilado o agentes reductores tales como ácido ascórbico y metabisulfito de sodio y agentes sinérgicos antioxidantes tales como ácido cítrico, ácido tartárico y lecitina.

La aplicación de formulaciones de emulsión por vías dermatológica, oral y parenteral y métodos para su fabricación se han revisado en la bibliografía (Idson, en *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1.988, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N. Y., volumen 1, pág. 199). Las formulaciones de emulsión para suministro oral se han usado muy extensamente debido a la facilidad de formulación, así como desde un punto de vista de absorción y biodisponibilidad (Rosoff, en *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1.988, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N. Y., volumen 1, pág. 245; Idson, en *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1.988, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N. Y., volumen 1, pág. 199). Los laxantes a base de aceite de parafina, vitaminas solubles en aceite y preparaciones nutritivas altas en grasa son entre los materiales que se han administrado comúnmente por vía oral como emulsiones o/w.

Las composiciones de los ARNDs y los ácidos nucleicos se pueden formular como microemulsiones. Una microemulsión se puede definir como un sistema de agua, aceite y anfífilo que es una disolución líquida ópticamente isotrópica y termodinámicamente estable, única, (Rosoff, en *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1.988, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N. Y., volumen 1, pág. 245). Las microemulsiones típicamente son sistemas que se preparan dispersando primero un aceite en una disolución acuosa de tensioactivo y añadiendo después una cantidad suficiente de un cuarto componente, en general un alcohol de longitud de cadena intermedia para formar un sistema transparente. Por lo tanto, las microemulsiones también se han descrito como dispersiones isotrópicamente claras, termodinámicamente estables de dos líquidos inmiscibles que se estabilizan por películas interfaciales de moléculas tensioactivas (Leung and Shah, en: *Controlled Release of Drugs: Polymers and Aggregate Systems*, Rosoff, M., Ed., 1.989, VCH Publishers, Nueva York, páginas 185-215). Las microemulsiones se preparan comúnmente por una combinación de tres a cinco componentes que incluyen aceite, agua, tensioactivo, tensioactivo conjunto y electrólito. Si la microemulsión es del tipo agua en aceite (w/o) o uno de aceite en agua (o/w) depende de las propiedades del aceite y el tensioactivo usados y de la estructura y empaquetamiento geométrico de las cabezas polares y las colas hidrocarbonadas de las moléculas de tensioactivo (Schott, en *Remington's*

Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1.985, pág. 271).

5 La propuesta fenomenológica que utiliza diagramas de fase se ha estudiado extensamente y ha proporcionado un conocimiento comprensivo, para un experto en la materia, de cómo formular microemulsiones (Rosoff, en Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1.988, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N. Y., volumen 1, pág. 245; Block, en Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1.988, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N. Y., volumen 1, pág. 335). Comparado con emulsiones convencionales, las microemulsiones ofrecen la ventaja de solubilizar fármacos insolubles en agua en una formulación de gotitas termodinámicamente estables que se forman de manera espontánea.

10 Los tensioactivos usados en la preparación de microemulsiones incluyen, pero no se limitan a, tensioactivos iónicos, tensioactivos no iónicos, Brij 96, polioxietilenoil éteres, ésteres de ácido graso y poliglicerol, monolaurato de tetraglicerol (ML310), monooleato de tetraglicerol (MO310), monooleato de hexaglicerol (PO310), pentaoleato de hexaglicerol (PO500), monocaprato de decaglicerol (MCA750), monooleato de decaglicerol (MO750), sesquioleato de decaglicerol (SO750), decaoleato de decaglicerol (DAO750), solos o en asociación con tensioactivos conjuntos. El tensioactivo conjunto, normalmente un alcohol de cadena corta tal como etanol, 1-propanol y 1-butanol, sirve para
15 aumentar la fluidez interfacial por penetración en la película de tensioactivo y creando por consiguiente una película desordenada debido al espacio vacío generado entre las moléculas de tensioactivo. Las microemulsiones, sin embargo, se pueden preparar sin el uso de tensioactivos conjuntos y se conocen en la técnica sistemas de microemulsión autoemulsionables exentos de alcohol. La fase acuosa puede ser típicamente, pero no limitarse a, agua, una disolución acuosa del fármaco, glicerol, PEG300, PEG400, poligliceroles, propilenglicoles y derivados de etilenglicol. La fase oleosa puede incluir, pero no limitarse a, materiales tales como Captex 300, Captex 355, Capmul
20 MCM, ésteres de ácido graso, mono, di y tri-glicéridos de cadena media (C8-C12), ésteres de ácido graso y glicerilo polioxietilado, alcoholes grasos, glicéridos poliglicolizados, glicéridos C8-C10 poliglicolizados saturados, aceites vegetales y aceite de silicona.

25 Las microemulsiones son particularmente de interés desde el punto de vista de la solubilización de fármacos y la absorción mejorada de fármacos. Las microemulsiones a base de lípidos (ambas o/w y w/o) se han propuesto para mejorar la biodisponibilidad oral de los fármacos, incluyendo péptidos (Constantinides et al., Pharmaceutical Research, 1.994, 11, 1.385-1.390; Ritschel, Meth. Find. Exp. Clin. Pharmacol., 1.993, 13, 205). Las microemulsiones proporcionan ventajas de solubilización de fármacos mejorada, protección de fármacos de hidrólisis enzimática, posible mejora de la absorción de fármaco debido a alteraciones inducidas por tensioactivo en la fluidez y permeabilidad de la membrana, facilidad de preparación, facilidad de administración oral sobre formas farmacéuticas
30 sólidas, potencia clínica mejorada y toxicidad disminuida (Constantinides et al., Pharmaceutical Research, 1.994, 11, 1.385; Ho et al., J. Pharm. Sci., 1.996, 85, 138-143). Con frecuencia se pueden formar las microemulsiones de manera espontánea cuando se ponen juntos sus componentes a temperatura normal. Esto puede ser particularmente ventajoso cuando se formulan fármacos termolábiles, péptidos o los ARNds. Las microemulsiones también han sido eficaces en el suministro transdérmico de componentes activos en aplicaciones tanto cosméticas como farmacéuticas. Se espera que las composiciones y las formulaciones de microemulsión de la presente invención faciliten la absorción sistémica aumentada de los ARNds y los ácidos nucleicos del tubo digestivo, así como mejoren la absorción celular local de los ARNds y los ácidos nucleicos.

40 Las microemulsiones también pueden contener componentes y aditivos adicionales tales como monoestearato de sorbitán (Grill 3), Labrasol y potenciadores de la penetración para mejorar las propiedades de la formulación y mejorar la absorción de los ARNds y ácidos nucleicos de la presente invención. Los potenciadores de la penetración usados en las microemulsiones en la presente invención se pueden clasificar como pertenecientes a una de cinco amplias categorías --tensioactivos, ácidos grasos, sales biliares, agentes quelantes y no tensioactivos no quelantes (Lee et al., Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1.991, pág. 92). Cada una de estas clases ha sido
45 discutida anteriormente.

Potenciadores de la penetración

50 Se pueden emplear diversos potenciadores de la penetración para efectuar el suministro eficaz de ácidos nucleicos, en particular los ARNds, a la piel de los animales. La mayoría de los fármacos está presente en disolución en formas tanto ionizadas como no ionizadas. Sin embargo, normalmente sólo los fármacos solubles en lípidos o lipofílicos atravesar fácilmente las membranas celulares. Se ha descubierto que incluso los fármacos no lipofílicos pueden atravesar las membranas celulares si la membrana que se tiene que atravesar se trata con un potenciador de la penetración. Además de auxiliar en la difusión de fármacos no lipofílicos a través de membranas celulares, los potenciadores de la penetración también aumentan la permeabilidad de los fármacos lipofílicos.

55 Los potenciadores de la penetración se pueden clasificar como pertenecientes a una de cinco categorías amplias, es decir, tensioactivos, ácidos grasos, sales biliares, agentes quelantes y no tensioactivos no quelantes (Lee et al., Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1.991, pág. 92). Cada una de las clases mencionadas anteriormente de potenciadores de la penetración se describe a continuación con mayor detalle.

Los tensioactivos (o "agentes tensioactivos") son entidades químicas que, cuando se disuelven en una disolución acuosa, reducen la tensión superficial de la disolución o la tensión interfacial entre la disolución acuosa y otro líquido,

con el resultado que se aumenta la absorción de los ARNds por la mucosa. Además de sales biliares y ácidos grasos, estos potenciadores de la penetración incluyen, por ejemplo, laurilsulfato de sodio, polioxietilén-9-lauril éter y polioxietilén-20-cetil éter) (Lee et al., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1.991, pág. 92) y emulsiones perfluoroquímicas, tales como FC-43. Takahashi et al., *J. Pharm. Pharmacol.*, 1.988, 40, 252).

5 Ácidos grasos: diversos ácidos grasos y sus derivados que actúan como potenciadores de la penetración incluyen, por ejemplo, ácido oleico, ácido láurico, ácido cáprico (ácido n-decanoico), ácido mirístico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido linoleico, ácido linolénico, dicaprato, tricaprato, monooleína (1-monooleoil-rac-glicerol), dilaurina, ácido caprílico, ácido araquidónico, 1-monocaprato de glicerol, 1-dodecilazacicloheptan-2-ona, acilcarnitinas, acilcolinas, ésteres alquílicos C.sub.1-10 de los mismos (por ej., metílico, isopropílico y t-butílico) y mono- y diglicéridos de los mismos (es decir, oleato, laurato, caprato, miristato, palmitato, estearato, linoleato, etc.) (Lee et al., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1.991, pág. 92; Muranishi, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1.990, 7, 1-33; El Hariri et al., *J. Pharm. Pharmacol.*, 1.992, 44, 651-654).

15 Sales biliares: La función fisiológica de la bilis incluye el facilitamiento de la dispersión y absorción de lípidos y vitaminas solubles en grasa (Brunton, Capítulo 38 en: Goodman & Gilman's *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 9ª Ed., Hardman et al. Eds., McGraw-Hill, Nueva York, 1.996, págs. 934-935). Diversas sales biliares naturales, y sus derivados sintéticos, actúan como potenciadores de la penetración. Así, el término "sales biliares" incluye cualquiera de los componentes que se encuentran en la naturaleza de la bilis así como cualquiera de sus derivados sintéticos. Las sales biliares adecuadas incluyen, por ejemplo, ácido cólico (o su sal de sodio farmacéuticamente aceptable, colato de sodio), ácido de deshidrocólico (deshidrocolato de sodio), ácido desoxicólico (desoxicolato de sodio), ácido glucólico (glucolato de sodio), ácido glicólico (glicolato de sodio), ácido glicodesoxicólico (glicodesoxicolato de sodio), ácido taurocólico (taurocolato de sodio), ácido taurodesoxicólico (taurodesoxicolato de sodio), ácido quenodesoxicólico (quenodesoxicolato de sodio), ácido ursodesoxicólico (UDCA), tauro-24,25-dihidro-fusidato de sodio (STDHF), glicodihidrofusidato de sodio y polioxietilén-9-lauril éter (POE) (Lee et al., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1.991, página 92; Swinyard, Capítulo 39 En: *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18ª Ed., Gennaro, ed., Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1.990, páginas 782-783; Muranishi, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1.990, 7, 1-33; Yamamoto et al., *J. Pharm. Exp. Ther.*, 1.992, 263, 25; Yamashita et al., *J. Pharm. Sci.*, 1.990, 79, 579-583).

30 Agentes quelantes: Los agentes quelantes, como se usa en relación con la presente invención, se pueden definir como compuestos que eliminan iones metálicos de la disolución por formación de complejos con los mismos, con el resultado de que se mejora la absorción de los ARNds por la mucosa. Con respecto a su uso como potenciadores de la penetración en la presente invención, los agentes quelantes tienen la ventaja añadida de servir también como inhibidores de DNasa, ya que la mayoría de las nucleasas de ADN caracterizadas requieren un ión de metal divalente para la catálisis y se inhiben así por agentes quelantes (Jarrett, *J. Chromatogr.*, 1.993, 618, 315-339). Los agentes quelantes adecuados incluyen pero no se limitan a etilendiaminatetraacetato de sodio (AEDT), ácido cítrico, salicilatos (por ejemplo, salicilato de sodio, 5-metoxisalicilato y homovanilato), N-acil-derivados de colágeno, laureth-9 y N-aminoacil-derivados de beta-dicetonas (enaminas) (Lee et al., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1.991, página 92; Muranishi, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1.990, 7, 1-33; Buur et al., *J. Control Rel.*, 1.990, 14, 43-51).

40 No tensioactivos no quelantes: Como se usa en la presente memoria, compuestos potenciadores de la penetración no tensioactivos no quelantes se puede definir como compuestos que demuestran una actividad insignificante como agentes quelantes o como tensioactivos pero que sin embargo potencian la absorción de los ARNds por la mucosa alimentaria (Muranishi, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1.990, 7, 1-33). Esta clase de potenciadores de la penetración incluyen, por ejemplo, ureas cíclicas insaturadas, 1-alquil- y 1-alquenoilazacicloalcanona-derivados (Lee et al., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1.991, página 92) y agentes antiinflamatorios no esteroideos tales como diclofenac sodio, indometacina y fenilbutazona (Yamashita et al., *J. Pharm. Pharmacol.*, 1.987, 39, 621-626).

Portadores

50 Algunas composiciones de la presente invención también incorporan compuestos portadores en la formulación. Como se usa la presente memoria, "compuesto portador" o "portador" se puede referir a un ácido nucleico o análogo del mismo, que sea inerte, (es decir, no posea actividad biológica de por sí) pero se reconozca como un ácido nucleico, por ejemplo, por procedimientos que reduzcan la biodisponibilidad de un ácido nucleico con actividad biológica, por ejemplo, por degradación del ácido nucleico biológicamente activo o fomentando su eliminación de la circulación. La administración conjunta de un ácido nucleico y un compuesto portador, típicamente con un exceso de la última sustancia, puede dar como resultado una reducción sustancial de la cantidad de ácido nucleico recuperada en el hígado, riñón u otros depósitos extracirculatorios, presumiblemente debido a competición entre el compuesto portador y el ácido nucleico para un receptor común. Por ejemplo, la recuperación de un ARNds fosforotioato parcialmente en tejido hepático se puede reducir cuando se administra conjuntamente con poli(ácido inosínico), sulfato o de dextrano, poli(ácido citídico) o ácido 4-acetamido-4'isotiociano-estilbeno-2,2'-disulfónico (Miyao et al., *DsRNA Res. Dev.*, 1.995, 5, 115-121; Takakura et al., *DsRNA & Nucl. Acid Drug Dev.*, 1.996, 6, 177-183).

60

Excipientes

Al contrario que un compuesto portador, un "portador farmacéutico" o "excipiente", es un disolvente farmacéuticamente aceptable, agente de suspensión o cualquier otro vehículo farmacológicamente inerte para suministrar uno o más ácidos nucleicos a un animal. El excipiente puede ser líquido o sólido y se selecciona, teniendo en mente la manera de administración planeada, de manera que se proporcione el volumen, la consistencia, etc., deseados, cuando se combina con un ácido nucleico y los otros componentes de una composición farmacéutica determinada. Los portadores farmacéuticos típicos incluyen, pero no se limitan a, agentes aglutinantes (por ejemplo, almidón de maíz pregelatinizado, polivinilpirrolidona o hidroxipropilmetilcelulosa, etc.); cargas (por ejemplo, lactosa y otros azúcares, celulosa microcristalina, pectina, gelatina, sulfato de calcio, etilcelulosa, poliacrilatos o hidrogenofosfato de calcio, etc.); lubricantes (por ejemplo, estearato de magnesio, talco, sílice, dióxido de silicio coloidal, ácido esteárico, estearatos metálicos, aceites vegetales hidrogenados, almidón de maíz, polietilenglicoles, benzoato de sodio, acetato de sodio, etc.); disgregantes (por ejemplo, almidón, almidón glicolato de sodio, etc.) y agentes humectantes (por ejemplo, laurilsulfato de sodio, etc.).

También se pueden encontrar excipientes orgánicos o inorgánicos farmacéuticamente aceptables para administración no parenteral que no reaccionen perjudicialmente con ácidos nucleicos para formular las composiciones de la presente invención. Portadores farmacéuticamente aceptables adecuados incluyen, pero no se limitan a, agua, disoluciones de sal, alcoholes, polietilenglicoles, gelatina, lactosa, amilosa, estearato de magnesio, talco, ácido silícico, parafina viscosa, hidroximetilcelulosa, polivinilpirrolidona y similares.

Las formulaciones para administración tópica de ácidos nucleicos pueden incluir disoluciones acuosas estériles y no estériles, disoluciones no acuosas en disolventes comunes tales como alcoholes o disoluciones de los ácidos nucleicos en líquido o bases oleosas sólidas. Las disoluciones también pueden contener tampones, diluyentes y otros aditivos adecuados. Se pueden usar excipientes orgánicos o inorgánicos farmacéuticamente aceptables adecuados para administración no parenteral que no reaccionen perjudicialmente con ácidos nucleicos.

Excipientes farmacéuticamente aceptables adecuados incluyen, pero no se limitan a, agua, disoluciones de sal, alcohol, polietilenglicoles, gelatina, lactosa, amilosa, estearato de magnesio, talco, ácido silícico, parafina viscosa, hidroximetilcelulosa, polivinilpirrolidona y similares.

Otros componentes

Las composiciones de la presente invención pueden contener adicionalmente otros componentes adjuntos encontrados convencionalmente en composiciones farmacéuticas, a sus niveles de uso establecidos en la técnica. Así, por ejemplo, las composiciones pueden contener materiales farmacéuticamente activos compatibles, adicionales, tales como, por ejemplo, antiprurícticos, astringentes, anestésicos locales o agentes antiinflamatorios o pueden contener materiales adicionales útiles en la formulación de manera física de diversas formas farmacéuticas de las composiciones de la presente invención, tales como colorantes, agentes saborizantes, conservantes, antioxidantes, opacificantes, agentes espesantes y estabilizantes. Sin embargo, tales materiales, cuando se añaden, no deberían interferir excesivamente con las actividades biológicas de los componentes de las composiciones de la presente invención. Las formulaciones se pueden esterilizar y, si se desea, mezclar con agentes auxiliares, por ejemplo, lubricantes, conservantes, estabilizantes, agentes humectantes, emulsionantes, sales para influenciar en la presión osmótica, tampones, colorantes, saborizantes y/o sustancias aromáticas y similares que no interactúen perjudicialmente con el ácido o los ácidos nucleicos de la formulación.

Las suspensiones acuosas pueden contener sustancias que aumenten la viscosidad de la suspensión incluyendo, por ejemplo, carboximetilcelulosa de sodio, sorbitol y/o dextrano. La suspensión también puede contener estabilizantes.

Las composiciones farmacéuticas pueden incluir (a) uno o más compuestos de ARNs y (b) uno o más agentes biológicos anticitocinas que actúen por un mecanismo no ARNi. Ejemplos de tales componentes biológicos incluyen, componentes biológicos que fijan como objetivo IL1 β (por ej., anakinra), IL6 (tocilizumab) o TNF (etanercept, infliximab, adlimumab o certolizumab).

La toxicidad y la eficacia terapéutica de tales compuestos se puede determinar por procedimientos farmacéuticos clásicos en cultivos celulares o animales experimentales, por ejemplo, para determinar el LD50 (la dosis letal para el 50% de la población) y el ED50 (la dosis terapéuticamente eficaz en el 50% de la población). La relación de la dosis entre efectos tóxico y terapéutico es el índice terapéutico y se puede expresar como la relación LD50/ED50. Se prefieren los compuestos que presentan altos índices terapéuticos.

Los datos obtenidos de ensayos de cultivos celulares y estudios en animales se pueden usar en la formulación de un intervalo de dosificación para uso en seres humanos. La dosis de las composiciones caracterizadas en la invención se encuentra en general dentro de un intervalo de concentraciones de circulación que incluye el ED50 con poca o ninguna toxicidad. La dosis puede variar dentro de este intervalo dependiendo de la forma farmacéutica empleada y la vía de administración utilizada. Para cualquier compuesto usado en los métodos caracterizados en la invención, la dosis terapéuticamente eficaz se puede estimar inicialmente a partir de ensayos de cultivos celulares. Se puede

formular una dosis en modelos animales para conseguir un intervalo de concentración en plasma circulante del compuesto o, cuando se apropiado, del producto polipeptídico de una secuencia fijada como objetivo (por ejemplo, consiguiendo una concentración disminuida del polipéptido) que incluye el IC50 (es decir, la concentración del compuesto de ensayo que logra una inhibición medio máxima de los síntomas) como se determina en cultivo celular.

5 Tal información se puede usar para determinar con más precisión dosis útiles en seres humanos. Los niveles en plasma se pueden medir, por ejemplo, por cromatografía líquida de alta resolución.

Además de su administración, como se discutió anteriormente, los ARNdS caracterizados en la invención se pueden administrar en asociación con otros agentes conocidos eficaces en el tratamiento de procesos patológicos mediados por la expresión de la TTR. En cualquier caso, el médico administrador puede ajustar la cantidad y sincronizar la

10 administración de ARNdS sobre la base de los resultados observados usando medidas clásicas de eficacia conocidas en la técnica o descritas en la presente memoria.

Métodos para tratar enfermedades producidas por expresión de un gen de la TTR.

La invención se refiere en particular al uso de un ARNdS que fija como objetivo TTR y composiciones que contienen al menos uno de dicho ARNdS para el tratamiento de un trastorno o enfermedad mediado por TTR. De acuerdo con la invención, una amiloidosis por TTR se selecciona preferiblemente de: polineuropatía amiloidótica familiar (FAP),

15 cardiomiopatía amiloidótica familiar (FAC), amiloidosis leptomenígea/del SNC, forma de amiloidosis VII (también conocida como amiloidosis leptomenígea o meningocerebrovascular), hipertiroxinemia y amiloidosis cardíaca (también denominada amiloidosis sistémica senil (SSA, por sus siglas en inglés) y amiloidosis cardíaca senil (SCA, por sus siglas en inglés)).

20 La FIG. 15 ilustra los síntomas y las mutaciones en TTR asociados con neuropatía amiloidótica familiar, cardiomiopatía amiloidótica familiar y amiloidosis del SNC. La invención incluye composiciones y métodos para tratamiento de estas enfermedades y síntomas y se dirige a estas versiones mutantes de TTR.

Un ARNdS que fija como objetivo un gen de la TTR se usa también para tratamiento de síntomas y trastornos, tales como amiloidosis por TTR. Los sistemas asociados a dicha amiloidosis incluyen, por ejemplo, convulsiones,

25 demencia, mielopatía, polineuropatía, síndrome del túnel carpiano, insuficiencia autonómica, cardiomiopatía, disfunción gastrointestinal, (por ej., úlceras gástricas, diarrea, estreñimiento, malabsorción), pérdida de peso, hepatomegalia, adenopatías adenopatía, vacío, opacidades vítreas, insuficiencia renal (incluyendo proteinuria y fallo renal), nefropatía, disfunción de los nervios craneales, distrofia del entramado de la córnea e insuficiencia cardíaca congestiva con debilidad generalizada y dificultades respiratorias de retención de fluidos.

30 Debido a los efectos inhibidores sobre la expresión de la TTR, una composición de acuerdo con la invención o una composición farmacéutica preparada a partir de la misma puede mejorar la calidad de vida.

Se describe también el uso de un ARNdS o una composición farmacéutica del mismo, por ejemplo, para tratar una amiloidosis por TTR, junto con otros productos farmacéuticos y/o otros métodos terapéuticos, por ejemplo, con

35 productos farmacéuticos conocidos y/o métodos terapéuticos conocidos, tales como, por ejemplo, aquéllos que se emplean actualmente para tratar estos trastornos. En un ejemplo, un ARNdS que fija como objetivo TTR se puede administrar junto con un trasplante de hígado. En otros ejemplos, un ARNdS que fija como objetivo TTR se puede administrar junto con un producto farmacéutico o método terapéutico para tratar un síntoma de una enfermedad por TTR, tal como diuréticos, inhibidores de ACE (enzima de conversión de angiotensina), bloqueadores de los receptores de angiotensina (los ARB) o diálisis, por ejemplo, para tratamiento de la función renal.

40 El ARNdS y un agente terapéutico adicional se pueden administrar en la misma asociación, por ejemplo, por vía parenteral, o se puede administrar el agente terapéutico adicional como parte de una composición separada o por otro método descrito en la presente memoria.

También se describe un método para administrar un ARNdS que fija como objetivo TTR a un paciente con una enfermedad o trastorno mediado por expresión de TTR, tal como una amiloidosis por TTR, por ejemplo, FAP. La

45 administración del ARNdS puede estabilizar y mejorar la función neurológica periférica, por ejemplo, en un paciente con FAP. Se puede administrar a los pacientes una cantidad terapéutica del ARNdS, tal como 0,1 mg/kg, 0,2 mg/kg, 0,5 mg/kg, 1,0 mg/kg, 1,5 mg/kg, 2,0 mg/kg o 2,5 mg/kg de ARNdS. El ARNdS se puede administrar por infusión intravenosa durante un periodo de tiempo, tal como durante un periodo de 5 minutos, 10 minutos, 15 minutos, 20 minutos, 25 minutos, 60 minutos, 120 minutos o 180 minutos. La administración se repite, por ejemplo, sobre una

50 base es una base regular, tal como bisemanalmente (es decir, cada dos semanas) durante un mes, dos meses, tres meses, cuatro meses o más tiempo. Después de un régimen de tratamiento inicial, los tratamientos se pueden administrar sobre una base menos frecuente. Por ejemplo, después de administración bisemanalmente durante tres meses, la administración se puede repetir una vez al mes, durante seis meses o un año o más tiempo. La administración del ARNdS puede reducir los niveles de la TTR en la sangre o la orina del paciente por al menos 20%,

55 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80 % o 90% o más.

Antes de la administración de una dosis completa del ARNdS, se puede administrar a los pacientes una dosis menor, tal como una dosis que sea 5% de la dosis total y controlar los efectos secundarios, tales como una reacción alérgica

o un cambio en la función hepática. Por ejemplo, en los pacientes en los que se han controlado los cambios en la función hepática, es aceptable una incidencia baja de cambio en LFT (Ensayo de Función Hepática) (por ejemplo, una incidencia del 10-20% de LFT) es aceptable (por ejemplo, un aumento de 3 veces, reversible, en los niveles de ALT (alanina aminotransferasa) y/o AST (aspartato aminotransferasa)).

- 5 Muchas enfermedades y trastornos asociados a la TTR son hereditarios. Por lo tanto, se puede identificar un paciente con necesidad de un ARNs de TTR llevando una historia familiar. Un suministrador de asistencia sanitaria, tal como un doctor, enfermera o miembro de la familia, puede llevar una historia familiar antes de prescribir o administrar un ARNs de TTR. Se puede realizar también un ensayo de ADN en el paciente para identificar una mutación en el gen de la TTR, antes de que se administre al paciente un ARNs de TTR.
- 10 Se puede haber realizado una biopsia al paciente antes de recibir un ARNs de TTR. La biopsia puede ser, por ejemplo, en un tejido, tal como la mucosa gástrica, nervio periférico, piel, grasa abdominal, hígado o riñón, y la biopsia puede revelar placas amiloides, que son indicativas de un trastorno mediado por la TTR. En la identificación de placas amiloides, se administra al paciente un ARNs de TTR.

Métodos para inhibir la expresión de un gen de la TTR.

- 15 También se describe un método para inhibir la expresión de un gen de la TTR en un mamífero. El método incluye administrar una composición caracterizada en la invención al mamífero de manera que la expresión del gen de la TTR fijado como objetivo se silencie.

20 Cuando el organismo que se tiene que tratar es un mamífero tal como un ser humano, la composición se puede administrar por cualquier medio conocido en la técnica incluyendo, pero no limitándose a, vías oral o parenteral, incluyendo administración intracraneal (por ejemplo, intraventricular, intraparenquimal e intratecal), intravenosa, intramuscular, subcutánea, transdérmica, por las vías respiratorias (aerosol), nasal, rectal y tópica (incluyendo bucal y sublingual). En algunas realizaciones, las composiciones se administran por infusión intravenosa o inyección.

25 A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto en la materia a la que pertenece esta invención. Aunque se pueden usar en la práctica o ensayar métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente memoria, de los ARNs y métodos caracterizados en la invención, se describen a continuación métodos y materiales adecuados.

Ejemplo 1. Síntesis de ARNs.

Fuente de reactivos.

- 30 Cuando la fuente de un reactivo no se determina específicamente en la presente memoria, dichos reactivos se pueden obtener de cualquier suministrador de reactivos para biología molecular en una calidad/pureza estándar para aplicación en biología molecular.

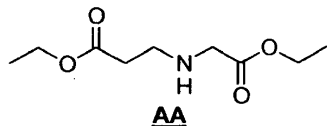
Síntesis de ARNs.

35 Se produjeron los ARN monocatenarios por síntesis en fase sólida en una escala de 1 μ mol usando un sintetizador Expedite 8909 (Applied Biosystems, Applied Deutschland GmbH, Darmstadt, Alemania) y vidrio de poro controlado (CPG, 500 Å, Proligo Biochemie GmbH, Hamburg, Alemania) como soporte sólido. El ARN y el ARN que contiene 2'-O-metil-nucleótido se generaron por síntesis en fase sólida empleando las correspondientes fosforamiditas y 2'-O-metil-fosforamiditas, respectivamente (Proligo Biochemie GmbH, Hamburg, Alemania). Estos bloques de construcción se incorporaron en sitios seleccionados dentro de la secuencia de la cadena de oligoribonucleótido usando la química de la nucleósido fosforamidita clásica tal como se describe en protocolos actuales en la química de los ácidos nucleicos, Beaucage, S. L. et al. (Edrs.), John Wiley & Sons, Inc., Nueva York, NY, USA. Se introdujeron uniones fosforotioato por sustitución de la disolución oxidante de yodo con una disolución del reactivo Beaucage (Chruachem Ltd, Glasgow, RU) en acetonitrilo (1%). Se obtuvieron reactivos auxiliares adicionales de Mallinckrodt Baker (Griesheim, Alemania).

45 La desprotección y purificación de los oligoribonucleótidos brutos por HPLC de intercambio aniónico se llevaron a cabo de acuerdo con los procedimientos establecidos. Se determinaron los rendimientos y concentraciones por absorción UV de una disolución del ARN respectivo a una longitud de onda de 260 nm usando un espectrofotómetro (DU 640B, Beckman Coulter GmbH, Unterschleißheim, Alemania). Se generó ARN bicatenario por mezclado de una disolución equimolar de hebras complementarias en tampón de hibridación (fosfato de sodio 20 mM, pH 6,8; cloruro de sodio 100 mM), se calentó en un baño de agua a 85 - 90°C durante 3 minutos y se enfrió a temperatura ambiente durante un periodo de 3-4 horas. Se almacenó la disolución de ARN hibridada a -20°C hasta su uso.

50 Para la síntesis de los ARNs 3'-colesterol-conjugados (en la presente memoria referidos como -Chol-3'), se usó un soporte sólido modificado de manera apropiada para síntesis de ARN. El soporte sólido modificado se preparó como sigue:

2-Azabutano-1,4-dicarboxilato de dietilo AA

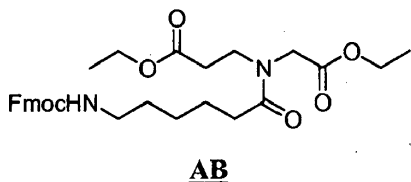


5

Se añadió una disolución acuosa 4,7 M de hidróxido de sodio (50 ml) a una disolución enfriada en hielo, agitada, de hidrocloreto de etilglicinato (32,19 g, 0,23 moles) en agua (50 ml). Después, se añadió acrilato de etilo (23,1 g, 0,23 moles) y se agitó la mezcla a temperatura ambiente hasta que se determinó la terminación de la reacción por TLC. Después de 19 h, la disolución se repartió con diclorometano (3 x 100 ml). Se secó la capa orgánica con sulfato de sodio anhidro, se filtró y se evaporó. Se destiló el residuo para proporcionar AA (28,8 g, 61%).

10

Éster etílico del ácido 3-{etoxicarbonilmetil-[6-(9H-fluoren-9-ilmetoxicarbonil-amino)-hexanoil]-amino}-propiónico AB

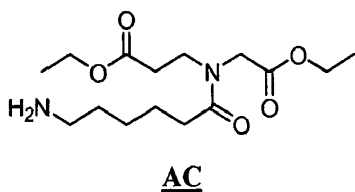


15

Se disolvió ácido Fmoc-6-amino-hexanoico (9,12 g, 25,83 mmoles) en diclorometano (50 ml) y se enfrió con hielo. Se añadió diisopropilcarbodiimida (3,25 g, 3,99 ml, 25,83 mmoles) a la disolución a 0°C. Fue seguido después por la adición Azabutano-1,4-dicarboxilato de dietilo (5 g, 24,6 mmoles) y dimetilaminopiridina (0,305 g, 2,5 mmoles). Se llevó la disolución a temperatura ambiente y se agitó además durante 6 h. La terminación de la reacción se determinó por TLC. Se concentró la mezcla de reacción a vacío y se añadió acetato de etilo para precipitar diisopropilurea. Se filtró la suspensión. Se lavó el líquido filtrado con ácido clorhídrico acuoso al 5%, bicarbonato de sodio al 5% y agua. Se secó la capa orgánica combinada sobre sulfato de sodio y se concentró para proporcionar el producto bruto que se purificó por cromatografía de columna (EtOAc/Hexanos al 50 %) para proporcionar 11,87 g (88%) de AB.

20

Éster etílico del ácido 3-[(6-amino-hexanoil)-etoxicarbonilmetil-amino]-propiónico AC

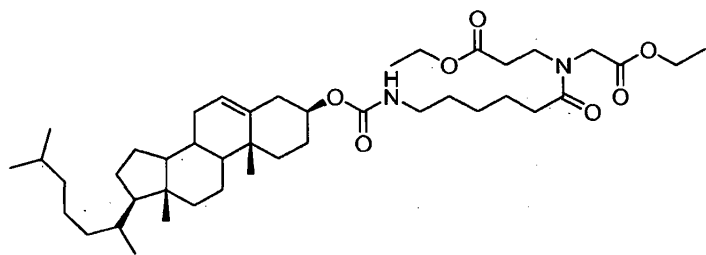


25

Se disolvió éster etílico del ácido 3-{etoxicarbonilmetil-[6-(9H-fluoren-9-ilmetoxicarbonilamino)-hexanoil]-amino}-propiónico AB (11,5 g, 21,3 mmoles) en piperidina al 20% en dimetilformamida a 0°C. Se continuó agitando la disolución durante 1 h. Se concentró la mezcla de reacción a vacío, se añadió agua al residuo y se extrajo el producto con acetato de etilo. Se purificó el producto bruto por conversión a su sal de hidrocloreto.

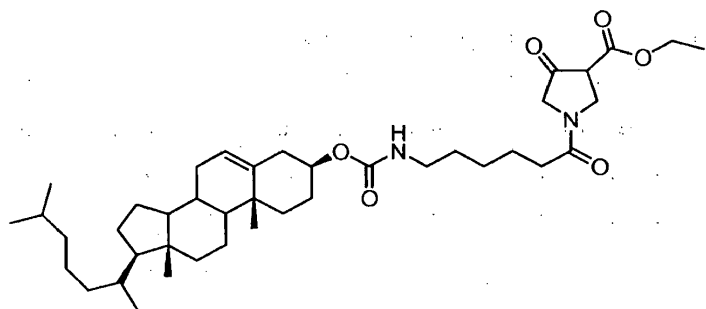
30

Éster etílico del ácido 3-({6-[17-(1,5-dimetil-hexil)-10,13-dimetil-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecahidro-1H-ciclopenta[a]fenantren-3-iloxicarbonilamino]-hexanoil}etoxicarbonilmetil-amino)-propiónico AD

**AD**

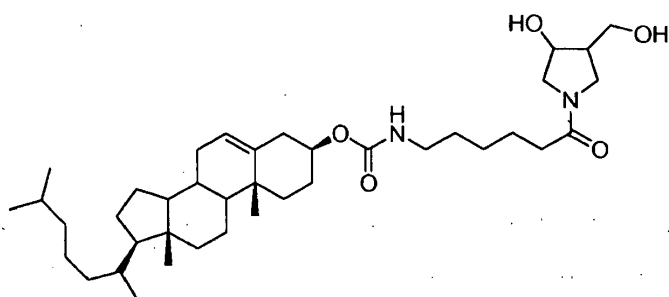
5 Se absorbió la sal de hidrocloreto de éster etílico del ácido 3-[(6-amino-hexanoil)-etoxicarbonilmetil-amino]-propiónico AC (4,7 g, 14,8 mmoles) en diclorometano. Se enfrió la suspensión a 0 °C sobre hielo. Se añadió a la suspensión de diisopropiltilamina (3,87 g, 5,2 ml, 30 mmoles). A la disolución resultante se añadió cloroforniato de colestero (6,675 g, 14,8 moles). Se agitó la mezcla de reacción durante la noche. Se diluyó la mezcla de reacción con diclorometano y se lavó con ácido clorhídrico al 10%. Se purificó el producto por cromatografía por desorción súbita (10,3 g, 92%).

10 Éster etílico del ácido 1-{6-[17-(1,5-dimetil-hexil)-10,13-dimetil-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecahidro-1H-ciclopenta[a]fenantren-3-ilo]carbonilamino]-hexanoil}-4-oxo-pirrolidin-3-carboxílico AE.

**AE**

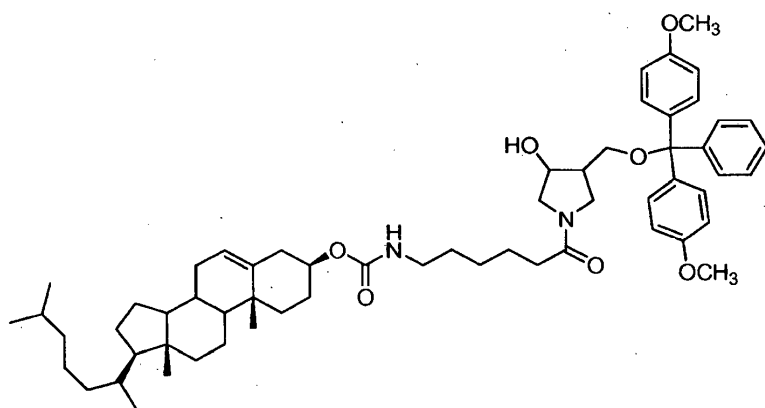
15 Se suspendió terc-butóxido de potasio (1,1 g, 9,8 mmoles) en 30 ml de tolueno seco. Se enfrió la mezcla a 0°C sobre hielo y se añadieron lentamente 5 g (6,6 mmoles) de diéster AD con agitación durante 20 minutos. Se mantuvo la temperatura por debajo de 5°C durante la adición. Se continuó con agitación durante 30 minutos a 0°C y se añadió 1 ml de ácido acético glacial, seguido inmediatamente por 4 g de NaH₂PO₄·H₂O en 40 ml de agua. Se extrajo la mezcla resultante dos veces con 100 ml de diclorometano cada vez y se lavaron los extractos orgánicos combinados dos veces con 10 ml de tampón de fosfato cada vez, se secó y se evaporó a sequedad. Se disolvió el residuo en 60 ml de tolueno, se enfrió a 0°C y se extrajo con tres porciones de 50 ml de tampón de carbonato de pH 9,5 frío. Se ajustaron los extractos acuosos a pH 3 con ácido fosfórico y se extrajo con cinco porciones de 40 ml de cloroformo que se combinaron, se secaron y se evaporaron a sequedad. Se purificó el residuo por cromatografía de columna usando acetato de etilo/hexano al 25% para proporcionar 1,9 g de b-cetoéster (39%).

25 Éster 17-(1,5-dimetil-hexil)-10,13-dimetil-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecahidro-1H-ciclopenta[a]fenantren-3-ílico del ácido [6-(3-hidroxi-4-hidroximetil-pirrolidin-1-il)-6-oxo-hexil]-carbámico AF.

**AF**

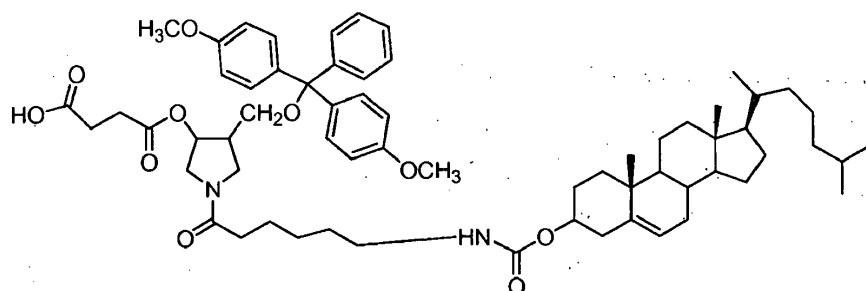
5 Se añadió gota a gota metanol (2 ml) durante un periodo de 1 h a una mezcla de reflujo de b-cetoéster AE (1,5 g, 2,2 mmoles) y borohidruro de sodio (0,226 g, 6 mmoles) en tetrahidrofurano (10 ml). Se continuó con agitación a temperatura de reflujo durante 1 h. Después de enfriar a temperatura ambiente, se añadió HCl 1 N (12,5 ml), se extrajo la mezcla con acetato de etilo (3 x 40 ml). Se secó la capa de acetato de etilo combinada sobre sulfato de sodio anhidro y se concentró a vacío para proporcionar el producto que se purificó por cromatografía de columna (MeOH/CHCl₃ al 10%) (89%).

10 Éster 17-(1,5-dimetil-hexil)-10,13-dimetil-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecahidro-1H-ciclopenta[a]fenantren-3-ílico del ácido (6-{3-[bis-(4-metoxi-fenil)-fenil-metoximetil]-4-hidroxi-pirrolidin-1-il}-6-oxo-hexil)-carbámico AG.

**AG**

15 Se secó diol AF (1,25 gm 1,994 mmoles) por evaporación con piridina (2 x 5 ml) a vacío. Se añadió con agitación piridina anhidra (10 ml) y cloruro de 4,4'-dimetoxitritilo (0,724 g, 2,13 mmoles). Se llevó a cabo la reacción a temperatura ambiente durante la noche. Se enfrió rápidamente la reacción por la adición de metanol. Se concentró la mezcla de reacción a vacío y se añadió al residuo diclorometano (50 ml). Se lavó la capa orgánica con bicarbonato de sodio acuoso 1 M. Se secó la capa orgánica sobre sulfato de sodio anhidro, se filtró y se concentró. Se retiró la piridina residual por evaporación con tolueno. Se purificó el producto bruto por cromatografía de columna (MeOH/Cloroformo al 2%, R_f = 0,5 en MeOH/CHCl₃ al 5%) (1,75 g, 95%).

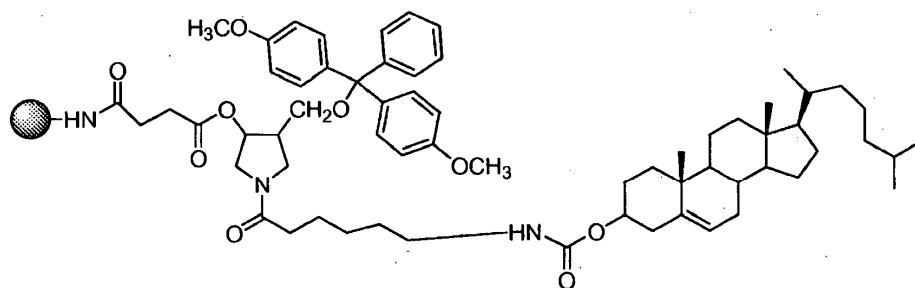
25 Éster mono-(4-[bis-(4-metoxi-fenil)-fenil-metoximetil]-1-{6-[17-(1,5-dimetil-hexil)-10,13-dimetil-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecahidro-1H-ciclopenta[a]fenantren-3-ilocarbonilamino]-hexanoil}-pirrolidin-3-ílico) del ácido succínico AH.

**AH**

5 Se mezcló compuesto AG (1,0 g, 1,05 mmoles) con anhídrido succínico (0,150 g, 1,5 mmoles) y DMAP (0,073 g, 0,6 mmoles) y se secó a vacío a 40 °C durante la noche. Se disolvió la mezcla en diclorometano anhidro (3 ml), se añadió trietilamina (0,318 g, 0,440 ml, 3,15 mmoles) y se agitó la disolución a temperatura ambiente en atmósfera de argón durante 16 h. Después se diluyó con diclorometano (40 ml) y se lavó con ácido cítrico acuoso enfriado en hielo (5 % en peso, 30 ml) y agua (2 X 20 ml). Se secó la fase orgánica sobre sulfato de sodio anhidro y se concentró a sequedad. Se usó el residuo como tal para la siguiente etapa.

CPG derivatizado de colesterol A1.

10

**AI**

15 Se disolvió Succinato AH (0,254 g, 0,242 mmoles) en una mezcla de diclorometano/acetonitrilo (3:2, 3 ml). A esa disolución se añadieron sucesivamente DMAP (0,0296 g, 0,242 mmoles) en acetonitrilo (1,25 ml), 2,2'-Ditio-bis(5-nitropiridina) (0,075 g, 0,242 mmoles) en acetonitrilo/dicloroetano (3:1, 1,25 ml). A la disolución resultante se añadió trifetilfosfina (0,064 g, 0,242 mmoles) en acetonitrilo (0,6 ml). La mezcla de reacción se volvió naranja brillante de color. Se agitó brevemente la disolución usando un agitador con movimiento de muñeca (5 minutos). Se añadió alquilamina de cadena larga-CPG (LCAA-CPG) (1,5 g, 61 mM). Se agitó la suspensión durante 2 h. Se filtró el CPG por un embudo sintetizado y se lavó con acetonitrilo, diclorometano y éter sucesivamente. Se enmascararon los grupos amino no reaccionados usando anhídrido acético/piridina. Se midió la carga lograda del CPG tomando medición UV (37 mM/g).

25 Se realizó la síntesis de los ARNs*i* soportando un grupo bisdecilamida de ácido 5'-12-dodecanoico (referido en la presente memoria como "5'-C32-") o un grupo 5'-colesteril-derivado (referido en la presente memoria como "5'-Chol-") como se describe en la patente internacional WO 2004/065601, excepto que, para el derivado de colesterilo, la etapa de oxidación se realizó usando el reactivo Beaucage para introducir una unión fosforotioato en el extremo 5' del oligómero de ácido nucleico.

Se representan a continuación las secuencias de ácidos nucleicos usando nomenclatura clásica y específicamente las abreviaturas en la Tabla 1.

30

Tabla 1: Abreviaturas de los monómeros de nucleótidos usados en la representación de secuencias de ácidos nucleicos. Se entenderá que estos monómeros, cuando están presentes en un oligonucleótido, están ligados mutuamente mediante enlaces 5'-3'-fosfodiéster.

Abreviatura	Nucleótido(s)
A	adenosina-3'-fosfato
C	citidina-3'-fosfato
G	guanosina-3'-fosfato
T	5-metiluridina-3'-fosfato
U	uridina-3'-fosfato
N	cualquier nucleótido (G, A, C o T)
a	2'-O-metiladenosina-3'-fosfato
c	2'-O-metilcitidina-3'-fosfato
g	2'-O-metilguanosina-3'-fosfato
u	2'-O-metiluridina-3'-fosfato
dT	2'-desoxitimidina-3'-fosfato
sT; sdT	2'-desoxi-timidina-5'fosfato-fosforotioato

5 Ejemplo 2A. Diseño de ARNsi de TTR.

Transcripciones

Se llevó a cabo el diseño de ARNsi para identificar ARNsi que fija como objetivo del gen de la transtiretina de ser humano (símbolo TTR) y rata (símbolo Ttr). El diseño usó las transcripciones de TTR NM_000371.2 (SEC ID N° 1.329) (ser humano) y NM_012681.1 (SEC ID N° 1.330) (rata) de la colección Refseq del NCBI. Se diseñaron los dúplex de ARNsi con 100% de identidad a sus respectivos genes de la TTR.

Diseño de ARNsi y predicción de especificidad.

Se determinó la especificidad prevista de todos los posibles 19meros de cada secuencia. Se usaron los ARNsi de la TTR en una búsqueda exhaustiva contra los transcriptomas humanos y de rata (definido como la serie de registros NM_ y XM_ dentro de la serie Refseq del NCBI) usando el algoritmo FASTA. La secuencia de comandos de Python 'offtargetFasta.py' se usó después para analizar las alineaciones y generar una puntuación basándose en la posición y el número de desajustes entre el ARNsi y cualquier transcripción potencial "fuera de lugar". La puntuación de fuera de lugar se ponderó para enfatizar las diferencias en la región "siembra" de los ARNsi, en las posiciones 2-9 del extremo 5' de la molécula. La puntuación de fuera de lugar se calcula como sigue: los desajustes entre el oligo y la transcripción se penalizan. Un desajuste en la región de siembra en las posiciones 2-9 del oligo se penaliza con 2,8; los desajustes en los sitios de escisión putativos 10 y 11 se penalizan con 1,2 y los desajustes en las posiciones 12-19 tienen una penalización de 1. Los desajustes en la posición 1 no se tienen en cuenta. La puntuación de fuera de lugar para cada par oligo-transcripción se calcula después sumando las penalizaciones de los desajustes. La proporción de fuera de lugar más baja de todos los pares oligo-transcripción se determina después y se usa en la clasificación posterior de oligos. Las dos hebras de ARNsi se asignan a una categoría de especificidad de acuerdo con las puntuaciones calculadas: una puntuación de 3 cualifica como altamente específico, igual a 3 como específico y entre 2,2 y 2,8 como moderadamente específico. En la elección de qué oligos sintetizar, se clasificaron las puntuaciones de fuera de lugar de la hebra complementaria desde alta a baja y se seleccionaron los 144 mejores pares oligo (puntuación de fuera de lugar más baja) de seres humanos y los mejores 26 pares de rata.

Selección de secuencia de ARNsi.

ES 2 543 004 T3

Se sintetizaron un total de 140 oligos de ARNs procedente de TTR humanos transcritos y 140 complementarios y se formaron dúplex. Se sintetizó un total de oligos de ARNs derivados de TTR de rata de 26 transcritos y 26 complementarios y se formaron dúplex. Los dúplex incluyendo los oligos se presentan en las Tablas 2-4 (TTR humana) y las Tablas 5-7 (TTR de rata).

5 Tabla 2. Números de identificación para ARNs de la TTR humano.

Véase la Tabla 4 para secuencias y modificaciones de oligos.

Dúplex #	Oligo Transcrito#	Oligo Complementario#
AD-18243	A-32153	A-32154
AD-18244	A-32155	A-32156
AD-18245	A-32157	A-32158
AD-18246	A-32159	A-32160
AD-18247	A-32163	A-32164
AD-18248	A-32165	A-32166
AD-18249	A-32167	A-32168
AD-18250	A-32169	A-32170
AD-18251	A-32171	A-32172
AD-18252	A-32175	A-32176
AD-18253	A-32177	A-32178
AD-18254	A-32179	A-32180
AD-18255	A-32181	A-32182
AD-18256	A-32183	A-32184
AD-18257	A-32187	A-32188
AD-18258	A-32189	A-32190
AD-18259	A-32191	A-32192
AD-18260	A-32193	A-32194
AD-18261	A-32195	A-32196
AD-18262	A-32199	A-32200
AD-18263	A-32201	A-32202
AD-18264	A-32203	A-32204
AD-18265	A-32205	A-32206

ES 2 543 004 T3

Dúplex #	Oligo Transcrito#	Oligo Complementario#
AD-18266	A-32207	A-32208
AD-18267	A-32211	A-32212
AD-18268	A-32213	A-32214
AD-18269	A-32215	A-32216
AD-18270	A-32217	A-32218
AD-18271	A-32219	A-32220
AD-18272	A-32221	A-32222
AD-18273	A-32223	A-32224
AD-18274	A-32225	A-32226
AD-18275	A-32227	A-32228
AD-18276	A-32229	A-32230
AD-18277	A-32231	A-32232
AD-18278	A-32233	A-32234
AD-18279	A-32235	A-32236
AD-18280	A-32237	A-32238
AD-18281	A-32239	A-32240
AD-18282	A-32241	A-32242
AD-18283	A-32243	A-32244
AD-18284	A-32247	A-32248
AD-18285	A-32249	A-32250
AD-18286	A-32251	A-32252
AD-18287	A-32253	A-32254
AD-18288	A-32255	A-32256
AD-18289	A-32259	A-32260
AD-18290	A-32261	A-32262
AD-18291	A-32263	A-32264

ES 2 543 004 T3

Dúplex #	Oligo Transcrito#	Oligo Complementario#
AD-18292	A-32265	A-32266
AD-18293	A-32267	A-32268
AD-18294	A-32269	A-32270
AD-18295	A-32271	A-32272
AD-18296	A-32273	A-32274
AD-18297	A-32275	A-32276
AD-18298	A-32277	A-32278
AD-18299	A-32279	A-32280
AD-18300	A-32281	A-32282
AD-18301	A-32283	A-32284
AD-18302	A-32285	A-32286
AD-18303	A-32287	A-32288
AD-18304	A-32289	A-32290
AD-18305	A-32291	A-32292
AD-18306	A-32295	A-32296
AD-18307	A-32297	A-32298
AD-18308	A-32299	A-32300
AD-18309	A-32301	A-32302
AD-18310	A-32303	A-32304
AD-18311	A-32307	A-32308
AD-18312	A-32309	A-32310
AD-18313	A-32311	A-32312
AD-18314	A-32313	A-32314
AD-18315	A-32315	A-32316
AD-18316	A-32319	A-32320
AD-18317	A-32321	A-32322

ES 2 543 004 T3

Dúplex #	Oligo Transcrito#	Oligo Complementario#
AD-18318	A-32323	A-32324
AD-18319	A-32325	A-32326
AD-18320	A-32327	A-32328
AD-18321	A-32331	A-32332
AD-18322	A-32333	A-32334
AD-18323	A-32335	A-32336
AD-18324	A-32337	A-32338
AD-18325	A-32339	A-32340
AD-18326	A-32341	A-32342
AD-18327	A-32343	A-32344
AD-18328	A-32345	A-32346
AD-18329	A-32347	A-32348
AD-18330	A-32349	A-32350
AD-18331	A-32351	A-32352
AD-18332	A-32353	A-32354
AD-18333	A-32355	A-32356
AD-18334	A-32357	A-32358
AD-18335	A-32359	A-32360
AD-18336	A-32363	A-32364
AD-18337	A-32367	A-32368
AD-18338	A-32369	A-32370
AD-18339	A-32371	A-32372
AD-18340	A-32373	A-32374
AD-18341	A-32375	A-32376
AD-18342	A-32379	A-32380
AD-18343	A-32381	A-32382

ES 2 543 004 T3

Dúplex #	Oligo Transcrito#	Oligo Complementario#
AD-18344	A-32383	A-32384
AD-18345	A-32385	A-32386
AD-18346	A-32387	A-32388
AD-18347	A-32391	A-32392
AD-18348	A-32393	A-32394
AD-18349	A-32395	A-32396
AD-18350	A-32397	A-32398
AD-18351	A-32399	A-32400
AD-18352	A-32401	A-32402
AD-18353	A-32403	A-32404
AD-18354	A-32405	A-32406
AD-18355	A-32407	A-32408
AD-18356	A-32409	A-32410
AD-18357	A-32411	A-32412
AD-18358	A-32415	A-32416
AD-18359	A-32417	A-32418
AD-18360	A-32419	A-32420
AD-18361	A-32421	A-32422
AD-18362	A-32423	A-32424
AD-18363	A-32427	A-32428
AD-18364	A-32429	A-32430
AD-18446	A-32161	A-32162
AD-18447	A-32173	A-32174
AD-18448	A-32185	A-32186
AD-18449	A-32197	A-32198
AD-18450	A-32209	A-32210

Dúplex #	Oligo Transcrito#	Oligo Complementario#
AD-18451	A-32245	A-32246
AD-18452	A-32257	A-32258
AD-18453	A-32293	A-32294
AD-18454	A-32305	A-32306
AD-18455	A-32317	A-32318
AD-18456	A-32329	A-32330
AD-18457	A-32361	A-32362
AD-19458	A-32365	A-32366
AD-18459	A-32377	A-32378
AD-18460	A-32389	A-32390
AD-18461	A-32401	A-32402
AD-18462	A-32413	A-32414
AD-18463	A-32425	A-32426

Tabla 3A. Secuencias de hebra transcrita y complementaria de ARNs de TTR humano.

Hebra: t= transcrita; c= complementaria; Posición: posición de base 5' en transcripción (NM_000371.2, SEC ID N° 1.329)

Hebra	Posición	Secuencia (5' a 3')	SEC ID N°	Secuencia con saliente de dinucleótido 3' (5' a 3')	SEC ID N°
t	100	CCGGUGAAUCCAAGUGUCC	1	CCGGUGAAUCCAAGUGUCCNN	281
c	118	GGACACUUGGAUUCACCGG	2	GGACACUUGGAUUCACCGGNN	282
t	11	ACUCAUUCUUGGCAGGAUG	3	ACUCAUUCUUGGCAGGAUGNN	283
c	29	CAUCCUGCCAAGAAUGAGU	4	CAUCCUGCCAAGAAUGAGUNN	284
T	111	AAGUGUCCUCUGAUGGUCA	5	AAGUGUCCUCUGAUGGUCANN	285
c	129	UGACCAUCAGAGGACACUJ	6	UGACCAUCAGAGGACACUUNN	286
T	13	UCAUUCUUGGCAGGAUGGC	7	UCAUUCUUGGCAGGAUGGCNN	287
c	31	GCCAUCCUGCCAAGAAUGA	8	GCCAUCCUGCCAAGAAUGANN	288
t	130	AAGUUCUAGAUGCUGUCCG	9	AAGUUCUAGAUGCUGUCCGNN	289

ES 2 543 004 T3

Hebra	Posición	Secuencia (5' a 3')	SEC ID N°	Secuencia con saliente de dinucleótido 3' (5' a 3')	SEC ID N°
c	148	CGGACAGCAUCUAGAACUU	10	CGGACAGCAUCUAGAACUUNN	290
t	132	GUUCUAGAUGCUGUCCGAG	11	GUUCUAGAUGCUGUCCGAGNN	291
c	150	CUCGGACAGCAUCUAGAAC	12	CUCGGACAGCAUCUAGAACNN	292
t	135	CUAGAUGCUGUCCGAGGCA	13	CUAGAUGCUGUCCGAGGCANN	293
c	153	UGCCUCGGACAGCAUCUAG	14	UGCCUCGGACAGCAUCUAGNN	294
t	138	GAUGCUGUCCGAGGCAGUC	15	GAUGCUGUCCGAGGCAGUCNN	295
c	156	GACUGCCUCGGACAGCAUC	16	GACUGCCUCGGACAGCAUCNN	296
t	14	CAUUCUUGGCAGGAUGGCU	17	CAUUCUUGGCAGGAUGGCUNN	297
c	32	AGCCAUCCUGCCAAGAAUG	18	AGCCAUCCUGCCAAGAAUGNN	298
t	140	UGCUGUCCGAGGCAGUCCU	19	UGCUGUCCGAGGCAGUCCUNN	299
c	158	AGGACUGCCUCGGACAGCA	20	AGGACUGCCUCGGACAGCANN	300
t	146	CCGAGGCAGUCCUGCCAUC	21	CCGAGGCAGUCCUGCCAUCNN	301
c	164	GAUGGCAGGACUGCCUCGG	22	GAUGGCAGGACUGCCUCGGNN	302
t	152	CAGUCCUGCCAUCA AUGUG	23	CAGUCCUGCCAUCA AUGUGNN	303
c	170	CACAUUGAUGGCAGGACUG	24	CACAUUGAUGGCAGGACUGNN	304
t	164	CAAUGUGGCCGUGCAUGUG	25	CAAUGUGGCCGUGCAUGUGNN	305
c	182	CACAUGCACGGCCACAUUG	26	CACAUGCACGGCCACAUUGNN	306
t	178	AUGUGUUCAGAAAGGCUGC	27	AUGUGUUCAGAAAGGCUGCNN	307
c	196	GCAGCCUUUCUGAACACAU	28	GCAGCCUUUCUGAACACAUNN	308
t	2	CAGAAGUCCACUCAUUCUU	29	CAGAAGUCCACUCAUUCUUNN	309
c	20	AAGAAUGAGUGGACUUCUG	30	AAGAAUGAGUGGACUUCUGNN	310
t	21	GGCAGGAUGGCUUCUCAUC	31	GGCAGGAUGGCUUCUCAUCNN	311
c	39	GAUGAGAAGCCAUCCUGCC	32	GAUGAGAAGCCAUCCUGCCNN	312
t	210	GAGCCAUUUGCCUCUGGGA	33	GAGCCAUUUGCCUCUGGGANN	313
c	228	UCCCAGAGGCAA AUGGCUC	34	UCCCAGAGGCAA AUGGCUCNN	314
t	23	CAGGAUGGCUUCUCAUCGU	35	CAGGAUGGCUUCUCAUCGUNN	315

ES 2 543 004 T3

Hebra	Posición	Secuencia (5' a 3')	SEC ID N°	Secuencia con saliente de dinucleótido 3' (5' a 3')	SEC ID N°
c	41	ACGAUGAGAAGCCAUCCUG	36	ACGAUGAGAAGCCAUCCUGNN	316
t	24	AGGAUGGCUUCUCAUCGUC	37	AGGAUGGCUUCUCAUCGUCNN	317
c	42	GACGAUGAGAAGCCAUCCU	38	GACGAUGAGAAGCCAUCCUNN	318
t	245	AGAGCUGCAUGGGCUCACA	39	AGAGCUGCAUGGGCUCACANN	319
c	263	UGUGAGCCCAUGCAGCUCU	40	UGUGAGCCCAUGCAGCUCUNN	320
t	248	GCUGCAUGGGCUCACAACU	41	GCUGCAUGGGCUCACAACUNN	321
c	266	AGUUGUGAGCCCAUGCAGC	42	AGUUGUGAGCCCAUGCAGCNN	322
t	25	GGAUGGCUUCUCAUCGUCU	43	GGAUGGCUUCUCAUCGUCUNN	323
c	43	AGACGAUGAGAAGCCAUCC	44	AGACGAUGAGAAGCCAUCCNN	324
t	251	GCAUGGGCUCACAACUGAG	45	GCAUGGGCUCACAACUGAGNN	325
c	269	CUCAGUUGUGAGCCCAUGC	46	CUCAGUUGUGAGCCCAUGCNN	326
t	253	AUGGGCUCACAACUGAGGA	47	AUGGGCUCACAACUGAGGANN	327
c	271	UCCUCAGUUGUGAGCCCAU	48	UCCUCAGUUGUGAGCCCAUNN	328
t	254	UGGGCUCACAACUGAGGAG	49	UGGGCUCACAACUGAGGAGNN	329
c	272	CUCCUCAGUUGUGAGCCCA	50	CUCCUCAGUUGUGAGCCCANN	330
t	270	GAGGAAUUUGUAGAAGGGA	51	GAGGAAUUUGUAGAAGGGANN	331
c	288	UCCCUUCUACAAAUUCCUC	52	UCCCUUCUACAAAUUCCUCNN	332
t	276	UUUGUAGAAGGGAUUACAA	53	UUUGUAGAAGGGAUUACANN	333
c	294	UGUAUAUCCCUUCUACAAA	54	UGUAUAUCCCUUCUACAAANN	334
t	277	UUGUAGAAGGGAUUACAAA	55	UUGUAGAAGGGAUUACAANN	335
c	295	UUGUAUAUCCCUUCUACAA	56	UUGUAUAUCCCUUCUACAANN	336
t	278	UGUAGAAGGGAUUACAAA	57	UGUAGAAGGGAUUACAANN	337
c	296	UUUGUAUAUCCCUUCUACA	58	UUUGUAUAUCCCUUCACANN	338
t	281	AGAAGGGAUUACAAAGUG	59	AGAAGGGAUUACAAAGUGNN	339
c	299	CACUUUGUAUAUCCCUUCU	60	CACUUUGUAUAUCCCUUCUNN	340
t	295	AAGUGGAAAUAGACACCAA	61	AAGUGGAAAUAGACACCAANN	341

ES 2 543 004 T3

Hebra	Posición	Secuencia (5' a 3')	SEC ID N°	Secuencia con saliente de dinucleótido 3' (5' a 3')	SEC ID N°
c	313	UUGGUGUCUAUUUCCACUU	62	UUGGUGUCUAUUUCCACUUNN	342
t	299	GGAAAUAGACACCAAUCU	63	GGAAAUAGACACCAAUCUNN	343
c	317	AGAUUUGGUGUCUAUUUCC	64	AGAUUUGGUGUCUAUUUCCNN	344
t	300	GAAAUAGACACCAAUCUU	65	GAAAUAGACACCAAUCUUNN	345
c	318	AAGAUUUGGUGUCUAUUUC	66	AAGAUUUGGUGUCUAUUUCNN	346
t	303	AUAGACACCAAUCUUACU	67	AUAGACACCAAUCUUACUNN	347
c	321	AGUAAGAUUUGGUGUCUAU	68	AGUAAGAUUUGGUGUCUAUNN	348
t	304	UAGACACCAAUCUUACUG	69	UAGACACCAAUCUUACUGNN	349
c	322	CAGUAAGAUUUGGUGUCUA	70	CAGUAAGAUUUGGUGUCUANN	350
t	305	AGACACCAAUCUUACUGG	71	AGACACCAAUCUUACUGGNN	351
c	323	CCAGUAAGAUUUGGUGUCU	72	CCAGUAAGAUUUGGUGUCUNN	352
t	317	UUACUGGAAGGCACUUGGC	73	UUACUGGAAGGCACUUGGCNN	353
c	335	GCCAAGUGCCUCCAGUAA	74	GCCAAGUGCCUCCAGUAANN	354
t	32	UUCUCAUCGUCUGCUCCUC	75	UUCUCAUCGUCUGCUCCUCNN	355
c	50	GAGGAGCAGACGAUGAGAA	76	GAGGAGCAGACGAUGAGAANN	356
t	322	GGAAGGCACUUGGCAUCUC	77	GGAAGGCACUUGGCAUCUCNN	357
c	340	GAGAUGCCAAGUGCCUUC	78	GAGAUGCCAAGUGCCUUCNN	358
t	326	GGCACUUGGCAUCUCCCCA	79	GGCACUUGGCAUCUCCCCANN	359
c	344	UGGGGAGAUGCCAAGUGCC	80	UGGGGAGAUGCCAAGUGCCNN	360
t	333	GGCAUCUCCCCAUUCCAUG	81	GGCAUCUCCCCAUUCCAUGNN	361
c	351	AUGGAAUGGGGAGAUGCCTT	82	AUGGAAUGGGGAGAUGCCTTNN	362
t	334	GCAUCUCCCCAUUCCAUGA	83	GCAUCUCCCCAUUCCAUGANN	363
c	352	UCAUGGAAUGGGGAGAUGC	84	UCAUGGAAUGGGGAGAUGCNN	364
t	335	CAUCUCCCCAUUCCAUGAG	85	CAUCUCCCCAUUCCAUGAGNN	365
c	353	CUCAUGGAAUGGGGAGAUG	86	CUCAUGGAAUGGGGAGAUGNN	366
t	336	AUCUCCCCAUUCCAUGAGC	87	AUCUCCCCAUUCCAUGAGCNN	367

ES 2 543 004 T3

Hebra	Posición	Secuencia (5' a 3')	SEC ID N°	Secuencia con saliente de dinucleótido 3' (5' a 3')	SEC ID N°
c	354	GCUCAUGGAAUGGGGAGAU	88	GCUCAUGGAAUGGGGAGAUNN	368
t	338	CUCCCCAUUCCAUGAGCAU	89	CUCCCCAUUCCAUGAGCAUNN	369
c	356	AUGCUC AUGGAAUGGGGAG	90	AUGCUC AUGGAAUGGGGAGNN	370
t	341	CCCAU UCCAUGAGCAUGCA	91	CCCAU UCCAUGAGCAUGCANN	371
c	359	UGCAUGCUC AUGGAAUGGG	92	UGCAUGCUC AUGGAAUGGGNN	372
t	347	CCAUGAGCAUGCAGAGGUG	93	CCAUGAGCAUGCAGAGGUGNN	373
c	365	CACCUCUGCAUGCUC AUGG	94	CACCUCUGCAUGCUC AUGGNN	374
t	352	AGCAUGCAGAGGUGGU AUU	95	AGCAUGCAGAGGUGGU AUUNN	375
c	370	AAUACCACCUCUGCAUGC U	96	AAUACCACCUCUGCAUGC UNN	376
t	354	CAUGCAGAGGUGGU AUUCA	97	CAUGCAGAGGUGGU AUUCANN	377
c	372	UGAAUACCACCUCUGCAUG	98	UGAAUACCACCUCUGCAUGNN	378
t	355	AUGCAGAGGUGGU AUUCAC	99	AUGCAGAGGUGGU AUUCACNN	379
c	373	GUGAAUACCACCUCUGCAU	100	GUGAAUACCACCUCUGCAUNN	380
t	362	GGUGGU AUUCACAGCCAAC	101	GGUGGU AUUCACAGCCAACNN	381
c	380	GUUGGCUGUGAAUACCACC	102	GUUGGCUGUGAAUACCACCNN	382
t	363	GUGGU AUUCACAGCCAACG	103	GUGGU AUUCACAGCCAACGNN	383
c	381	CGUUGGCUGUGAAUACCAC	104	CGUUGGCUGUGAAUACCACNN	384
t	364	UGGU AUUCACAGCCAACGA	105	UGGU AUUCACAGCCAACGANN	385
c	382	UCGUUGGCUGUGAAUACCA	106	UCGUUGGCUGUGAAUACCANN	386
t	365	GGU AUUCACAGCCAACGAC	107	GGU AUUCACAGCCAACGACNN	387
c	383	GUCGUUGGCUGUGAAUACC	108	GUCGUUGGCUGUGAAUACCNN	388
t	366	GU AUUCACAGCCAACGACU	109	GU AUUCACAGCCAACGACUNN	389
c	384	AGUCGUUGGCUGUGAAUAC	110	AGUCGUUGGCUGUGAAUACNN	390
t	367	UAUUCACAGCCAACGACUC	111	UAUUCACAGCCAACGACUCNN	391
c	385	GAGUCGUUGGCUGUGAAUA	112	GAGUCGUUGGCUGUGAAUANN	392
t	370	UCACAGCCAACGACUCCGG	113	UCACAGCCAACGACUCCGGNN	393

ES 2 543 004 T3

Hebra	Posición	Secuencia (5' a 3')	SEC ID N°	Secuencia con saliente de dinucleótido 3' (5' a 3')	SEC ID N°
c	388	CCGGAGUCGUUGGCUGUGA	114	CCGGAGUCGUUGGCUGUGANN	394
t	390	CCCCGCCGCUACACCAUUG	115	CCCCGCCGCUACACCAUUGNN	395
t	408	CAAUGGUGUAGCGGCGGGG	116	CAAUGGUGUAGCGGCGGGGNN	396
t	4	GAAGUCCACUCAUUCUUGG	117	GAAGUCCACUCAUUCUUGGNN	397
c	22	CCAAGAAUGAGUGGACUUC	118	CCAAGAAUGAGUGGACUUCNN	398
t	412	CCCUGCUGAGCCCCUACUC	119	CCCUGCUGAGCCCCUACUCNN	399
c	430	GAGUAGGGGCUCAGCAGGG	120	GAGUAGGGGCUCAGCAGGGNN	400
t	417	CUGAGCCCCUACUCCUAUU	121	CUGAGCCCCUACUCCUAUUNN	401
c	435	AAUAGGAGUAGGGGCUCAG	122	AAUAGGAGUAGGGGCUCAGNN	402
t	418	UGAGCCCCUACUCCUAUUC	123	UGAGCCCCUACUCCUAUUCNN	403
c	436	GAAUAGGAGUAGGGGCUCA	124	GAAUAGGAGUAGGGGCUCANN	404
t	422	CCCUACUCCUAUUCACC	125	CCCUACUCCUAUUCACCNN	405
c	440	GGUGGAAUAGGAGUAGGGG	126	GGUGGAAUAGGAGUAGGGGNN	406
t	425	CUACUCCUAUUCACCACG	127	CUACUCCUAUUCACCACGNN	407
c	443	CGUGGUGGAAUAGGAGUAG	128	CGUGGUGGAAUAGGAGUAGNN	408
t	426	UACUCCUAUUCACCACGG	129	UACUCCUAUUCACCACGGNN	409
c	444	CCGUGGUGGAAUAGGAGUA	130	CCGUGGUGGAAUAGGAGUANN	410
t	427	ACUCCUAUUCACCACGGC	131	ACUCCUAUUCACCACGGCNN	411
c	445	GCCGUGGUGGAAUAGGAGU	132	GCCGUGGUGGAAUAGGAGUNN	412
t	429	UCCUAUUCACCACGGCUG	133	UCCUAUUCACCACGGCUGNN	413
c	447	CAGCCGUGGUGGAAUAGGA	134	CAGCCGUGGUGGAAUAGGANN	414
t	432	UAUUCACCACGGCUGUCG	135	UAUUCACCACGGCUGUCGNN	415
c	450	CGACAGCCGUGGUGGAAUA	136	CGACAGCCGUGGUGGAAUANN	416
t	433	AUUCACCACGGCUGUCGU	137	*AUUCACCACGGCUGUCGUNN	417
c	451	ACGACAGCCGUGGUGGAAU	138	ACGACAGCCGUGGUGGAAUNN	418
t	437	CACCACGGCUGUCGUCACC	139	CACCACGGCUGUCGUCACCNN	419

ES 2 543 004 T3

Hebra	Posición	Secuencia (5' a 3')	SEC ID N°	Secuencia con saliente de dinucleótido 3' (5' a 3')	SEC ID N°
c	455	GGUGACGACAGCCGUGGUG	140	GGUGACGACAGCCGUGGUGNN	420
t	438	ACCACGGCUGUCGUCACCA	141	ACCACGGCUGUCGUCACCANN	421
c	456	UGGUGACGACAGCCGUGGU	142	UGGUGACGACAGCCGUGGUNN	422
t	439	CCACGGCUGUCGUCACCAA	143	CCACGGCUGUCGUCACCAANN	423
c	457	UUGGUGACGACAGCCGUGG	144	UUGGUGACGACAGCCGUGGNN	424
t	441	ACGGCUGUCGUCACCAAUC	145	ACGGCUGUCGUCACCAAUCNN	425
c	459	GAUUGGUGACGACAGCCGU	146	GAUUGGUGACGACAGCCGUNN	426
t	442	CGGCUGUCGUCACCAAUCC	147	CGGCUGUCGUCACCAAUCCNN	427
c	460	GGAUUGGUGACGACAGCCG	148	GGAUUGGUGACGACAGCCGNN	428
t	449	CGUCACCAAUCCCAAGGAA	149	CGUCACCAAUCCCAAGGAANN	429
c	467	UUCUUGGGAUUGGUGACG	150	UUCUUGGGAUUGGUGACGNN	430
t	455	CAAUCCCAAGGAAUGAGGG	151	CAAUCCCAAGGAAUGAGGGNN	431
c	473	CCCUCAUUCCUUGGGAUUG	152	CCCUCAUUCCUUGGGAUUGNN	432
t	491	CCUGAAGGACGAGGGAUGG	153	CCUGAAGGACGAGGGAUGGNN	433
c	509	CCAUCCUCGUCUUCAGG	154	CCAUCCUCGUCUUCAGGNN	434
t	497	GGACGAGGGAUGGGAUUUC	155	GGACGAGGGAUGGGAUUUCNN	435
c	515	GAAAUCCAUCCUCGUCC	156	GAAAUCCAUCCUCGUCCNN	436
t	5	AAGUCCACUCAUUCUUGGC	157	AAGUCCACUCAUUCUUGGCNN	437
c	23	GCCAAGAAUGAGUGGACUU	158	GCCAAGAAUGAGUGGACUUNN	438
t	508	GGGAUUUCAUGUAACCAAG	159	GGGAUUUCAUGUAACCAAGNN	439
c	526	CUUGGUUACAUGAAAUCCC	160	CUUGGUUACAUGAAAUCCCNN	440
t	509	GGAUUUUCAUGUAACCAAGA	161	GGAUUUUCAUGUAACCAAGANN	441
c	527	UCUUGGUUACAUGAAAUCC	162	UCUUGGUUACAUGAAAUCCNN	442
t	514	UCAUGUAACCAAGAGUAUU	163	UCAUGUAACCAAGAGUAUUNN	443
c	532	AAUACUCUUGGUUACAUGA	164	AAUACUCUUGGUUACAUGANN	444
t	516	AUGUAACCAAGAGUAUUC	165	AUGUAACCAAGAGUAUUCNN	445

ES 2 543 004 T3

Hebra	Posición	Secuencia (5' a 3')	SEC ID N°	Secuencia con saliente de dinucleótido 3' (5' a 3')	SEC ID N°
c	534	GGAAUACUCUUGGUUACAU	166	GGAAUACUCUUGGUUACAUNN	446
t	517	UGUAACCAAGAGUAUUCCA	167	UGUAACCAAGAGUAUUCCANN	447
c	535	UGGAAUACUCUUGGUUACA	168	UGGAAUACUCUUGGUUACANN	448
t	518	GUAACCAAGAGUAUUCCAU	169	GUAACCAAGAGUAUUCCAUNN	499
c	536	AUGGAAUACUCUUGGUUAC	170	AUGGAAUACUCUUGGUUACNN	450
t	54	UGCCUUGCUGGACUGGUAU	171	UGCCUUGCUGGACUGGUAUNN	451
c	72	AUACCAGUCCAGCAAGGCA	172	AUACCAGUCCAGCAAGGCANN	452
t	543	UAAAGCAGUGUUUUCACCU	173	UAAAGCAGUGUUUUCACCUNN	453
c	561	AGGUGAAAACACUGCUUUA	174	AGGUGAAAACACUGCUUUANN	454
t	55	GCCUUGCUGGACUGGUUU	175	GCCUUGCUGGACUGGUUUUNN	455
c	73	AAUACCAGUCCAGCAAGGC	176	AAUACCAGUCCAGCAAGGCNN	456
t	551	UGUUUUCACCUCAUAUGCU	177	UGUUUUCACCUCAUAUGCUNN	457
c	569	AGCAUAUGAGGUGAAAACA	178	AGCAUAUGAGGUGAAAACANN	458
t	552	GUUUUCACCUCAUAUGCUA	179	GUUUUCACCUCAUAUGCUNN	459
c	570	UAGCAUAUGAGGUGAAAAC	180	UAGCAUAUGAGGUGAAAACNN	460
t	553	UUUUCACCUCAUAUGCUAU	181	UUUUCACCUCAUAUGCUNN	461
c	571	AUAGCAUAUGAGGUGAAAA	182	AUAGCAUAUGAGGUGAAAANN	462
t	555	UUCACCUCAUAUGCUAUGU	183	UUCACCUCAUAUGCUNN	463
c	573	ACAUAGCAUAUGAGGUGAA	184	ACAUAGCAUAUGAGGUGAANN	464
t	557	CACCUCAUAUGCUAUGUUA	185	CACCUCAUAUGCUNN	465
c	575	UAACAUAGCAUAUGAGGUG	186	UAACAUAGCAUAUGAGGUGNN	466
t	56	CCUUGCUGGACUGGUUUUU	187	CCUUGCUGGACUGGUUUUNN	467
c	74	AAAUACCAGUCCAGCAAGG	188	AAAUACCAGUCCAGCAAGGNN	468
t	563	AUAUGCUAUGUUAGAAGUC	189	AUAUGCUAUGUUAGAAGUCNN	469
c	581	GACUUCUAACAUAGCAUAU	190	GACUUCUAACAUAGCAUAUNN	470
t	564	UAUGCUAUGUUAGAAGUCC	191	UAUGCUAUGUUAGAAGUCCNN	471

ES 2 543 004 T3

Hebra	Posición	Secuencia (5' a 3')	SEC ID N°	Secuencia con saliente de dinucleótido 3' (5' a 3')	SEC ID N°
c	582	GGACUUCUAACAUAGCAUA	192	GGACUUCUAACAUAGCAUANN	472
t	566	UGCUAUGUUAGAAGUCCAG	193	UGCUAUGUUAGAAGUCCAGNN	473
c	584	CUGGACUUCUAACAUAGCA	194	CUGGACUUCUAACAUAGCANN	474
t	57	CUUGCUGGACUGGUUUUG	195	CUUGCUGGACUGGUUUUGNN	475
c	75	CAAAUACCAGUCCAGCAAG	196	CAAAUACCAGUCCAGCAAGNN	476
t	578	AGUCCAGGCAGAGACAAUA	197	AGUCCAGGCAGAGACAAUANN	477
c	596	AUUGUCUCUGCCUGGACUTT	198	AUUGUCUCUGCCUGGACUTTNN	478
t	580	UCCAGGCAGAGACAAUAAA	199	UCCAGGCAGAGACAAUAAANN	479
c	598	UUUAUUGUCUCUGCCUGGA	200	UUUAUUGUCUCUGCCUGGANN	480
t	607	GUGAAAGGCACUUUUCAUU	201	GUGAAAGGCACUUUUCAUUNN	481
c	625	AAUGAAAAGUGCCUUUCAC	202	AAUGAAAAGUGCCUUUCACNN	482
t	62	UGGACUGGUUUUGUGUCU	203	UGGACUGGUUUUGUGUCUNN	483
c	80	AGACACAAAUACCAGUCCA	204	AGACACAAAUACCAGUCCANN	484
t	77	GUCUGAGGCUGGCCCUACG	205	GUCUGAGGCUGGCCCUACGNN	485
c	95	CGUAGGGCCAGCCUCAGAC	206	CGUAGGGCCAGCCUCAGACNN	486
t	79	CUGAGGCUGGCCCUACGGG	207	CUGAGGCUGGCCCUACGGGNN	487
c	97	CCCGUAGGGCCAGCCUCAG	208	CCCGUAGGGCCAGCCUCAGNN	488
t	81	GAGGCUGGCCCUACGGGCA	209	GAGGCUGGCCCUACGGGCANN	489
c	99	UGCCCGUAGGGCCAGCCUC	210	UGCCCGUAGGGCCAGCCUCNN	490
t	82	AGGCUGGCCCUACGGGCAC	211	AGGCUGGCCCUACGGGCACNN	491
c	100	GUGCCCGUAGGGCCAGCCU	212	GUGCCCGUAGGGCCAGCCUNN	492
t	84	GCUGGCCCUACGGGCACCG	213	GCUGGCCCUACGGGCACCGNN	493
c	102	CGGUGCCCGUAGGGCCAGC	214	CGGUGCCCGUAGGGCCAGCNN	494
t	85	CUGGCCCUACGGGCACCGG	215	CUGGCCCUACGGGCACCGGNN	495
c	103	CCGGUGCCCGUAGGGCCAG	216	CCGGUGCCCGUAGGGCCAGNN	496
t	87	GGCCCUACGGGCACCGGUG	217	GGCCCUACGGGCACCGGUGNN	497

ES 2 543 004 T3

Hebra	Posición	Secuencia (5' a 3')	SEC ID N°	Secuencia con saliente de dinucleótido 3' (5' a 3')	SEC ID N°
c	105	CACCGGUGCCCGUAGGGCC	218	CACCGGUGCCCGUAGGGCCNN	498
t	9	CCACUCAUUCUUGGCAGGA	219	CCACUCAUUCUUGGCAGGANN	499
c	27	UCCUGCCAAGAAUGAGUGG	220	UCCUGCCAAGAAUGAGUGGNN	500
t	90	CCUACGGGCACCGGUGAAU	221	CCUACGGGCACCGGUGAAUNN	501
c	108	AUUCACCGGUGCCCGUAGG	222	AUUCACCGGUGCCCGUAGGNN	502
t	91	CUACGGGCACCGGUGAAUC	223	CUACGGGCACCGGUGAAUCNN	503
c	109	GAUUCACCGGUGCCCGUAG	224	GAUUCACCGGUGCCCGUAGNN	504
t	92	UACGGGCACCGGUGAAUCC	225	UACGGGCACCGGUGAAUCCNN	505
c	110	GGAUUCACCGGUGCCCGUA	226	GGAUUCACCGGUGCCCGUANN	506
t	93	ACGGGCACCGGUGAAUCCA	227	ACGGGCACCGGUGAAUCCANN	507
c	111	UGGAUUCACCGGUGCCCGU	228	UGGAUUCACCGGUGCCCGUNN	508
t	97	GCACCGGUGAAUCCAAGUG	229	GCACCGGUGAAUCCAAGUGNN	509
c	115	CACUUGGAUUCACCGGUGC	230	CACUUGGAUUCACCGGUGCNN	510
t	98	CACCGGUGAAUCCAAGUGU	231	CACCGGUGAAUCCAAGUGUNN	511
c	116	ACACUUGGAUUCACCGGUG	232	ACACUUGGAUUCACCGGUGNN	512
t	167	UGUGGCCAUGCAUGUGUUC	233	UGUGGCCAUGCAUGUGUUCNN	513
c	185	GAACACAUGCAUGGCCACA	234	GAACACAUGCAUGGCCACANN	514
t	168	GUGGCCAUGCAUGUGUUCA	235	GUGGCCAUGCAUGUGUUCANN	515
c	186	UGAACACAUGCAUGGCCAC	236	UGAACACAUGCAUGGCCACNN	516
t	171	GCCAUGCAUGUGUUCAGAA	237	GCCAUGCAUGUGUUCAGAANN	517
c	189	UUCUGAACACAUGCAUGGC	238	UUCUGAACACAUGCAUGGCNN	518
t	432	UAUUCACCACGGCUGUCA	239	UAUUCACCACGGCUGUCANN	519
c	449	UGACAGCCGUGGUGGAAUA	240	UGACAGCCGUGGUGGAAUANN	520
t	447	GUCAUCACCAAUCCCAAGG	241	GUCAUCACCAAUCCCAAGGNN	521
c	465	CCUUGGGAUUGGUGAUGAC	242	CCUUGGGAUUGGUGAUGACNN	522
t	115	GUCCUCUGAUGGUCAAAGU	243	GUCCUCUGAUGGUCAAAGUNN	523

ES 2 543 004 T3

Hebra	Posición	Secuencia (5' a 3')	SEC ID N°	Secuencia con saliente de dinucleótido 3' (5' a 3')	SEC ID N°
c	133	ACUUUGACCAUCAGAGGAC	244	ACUUUGACCAUCAGAGGACNN	524
t	122	GAUGGUCAAAGUUCUAGAU	245	GAUGGUCAAAGUUCUAGAUNN	525
c	140	AUCUAGAACUUUGACCAUC	246	AUCUAGAACUUUGACCAUCNN	526
t	139	AUGCUGUCCGAGGCAGUCC	247	AUGCUGUCCGAGGCAGUCCNN	527
c	157	GGACUGCCUCGGACAGCAU	248	GGACUGCCUCGGACAGCAUNN	528
t	172	CCGUGCAUGUGUUCAGAAA	249	CCGUGCAUGUGUUCAGAAANN	529
c	190	UUUCUGAACACAUGCACGG	250	UUUCUGAACACAUGCACGGNN	530
t	238	AGUCUGGAGAGCUGCAUGG	251	AGUCUGGAGAGCUGCAUGGNN	531
c	256	CCAUGCAGCUCUCCAGACU	252	CCAUGCAGCUCUCCAGACUNN	532
t	252	CAUGGGCUCACAACUGAGG	253	CAUGGGCUCACAACUGAGGNN	533
c	270	CCUCAGUUGUGAGCCCAUG	254	CCUCAGUUGUGAGCCCAUGNN	534
t	33	UCUCAUCGUCUGCUCCUCC	255	UCUCAUCGUCUGCUCCUCCNN	535
c	51	GGAGGAGCAGACGAUGAGA	256	GGAGGAGCAGACGAUGAGANN	536
t	340	CCCCAUUCCAUGAGCAUGC	257	CCCCAUUCCAUGAGCAUGCNN	537
c	358	GCAUGCUC AUGGAAUGGGG	258	GCAUGCUC AUGGAAUGGGGNN	538
t	421	GCCCCUACUCCUAUUCCAC	259	GCCCCUACUCCUAUUCCACNN	539
c	439	GUGGAAUAGGAGUAGGGGC	260	GUGGAAUAGGAGUAGGGGCNN	540
t	431	CUAUUCCACCACGGCUGUC	261	CUAUUCCACCACGGCUGUCNN	541
c	449	GACAGCCGUGGUGGAAUAG	262	GACAGCCGUGGUGGAAUAGNN	542
t	440	CACGGCUGUCGUCACCAAU	263	CACGGCUGUCGUCACCAAUNN	543
c	458	AUUGGUGACGACAGCCGUG	264	AUUGGUGACGACAGCCGUGNN	544
t	496	AGGACGAGGGAUGGGAUUU	265	AGGACGAGGGAUGGGAUUUNN	545
c	514	AAAUCCCAUCCCUCGUCCU	266	AAAUCCCAUCCCUCGUCCUNN	546
t	556	UCACCUCAUAUGCUAUGUU	267	UCACCUCAUAUGCUAUGUUNN	547
c	574	AACAUAGCAUAUGAGGUGA	268	AACAUAGCAUAUGAGGUGANN	548
t	559	CCUCAUAUGCUAUGUUAGA	269	CCUCAUAUGCUAUGUUAGANN	549

ES 2 543 004 T3

Hebra	Posición	Secuencia (5' a 3')	SEC ID N°	Secuencia con saliente de dinucleótido 3' (5' a 3')	SEC ID N°
c	577	UCUAACAUAGCAUAUGAGG	270	UCUAACAUAGCAUAUGAGGNN	550
t	570	AUGUUAGAAGUCCAGGCAG	271	AUGUUAGAAGUCCAGGCAGNN	551
c	588	CUGCCUGGACUUCUAACAUC	272	CUGCCUGGACUUCUAACAUNN	552
t	78	UCUGAGGCUGGCCCUACGG	273	UCUGAGGCUGGCCCUACGGNN	553
c	96	CCGUAGGGCCAGCCUCAGA	274	CCGUAGGGCCAGCCUCAGANN	554
t	87	GGCCCUACGGGCACCGGUG	275	GGCCCUACGGGCACCGGUGNN	555
c	105	CACCGGUGCCCGUAGGGCC	276	CACCGGUGCCCGUAGGGCCNN	556
t	95	GGGCACCGGUGAAUCCAAG	277	GGGCACCGGUGAAUCCAAGNN	557
c	113	CUUGGAUUCACCGGUGCCC	278	CUUGGAUUCACCGGUGCCCN	558
t	167	CCAUGCAUGUGUUCAGAAA	279	CCAUGCAUGUGUUCAGAAANN	559
c	185	UUUCUGAACACAUGCAUGG	280	UUUCUGAACACAUGCAUGGNN	560

Tabla 3B. Secuencias de hebra transcrita y complementaria de ARNs de TTR humano.

Hebra: t= transcrita; c= complementaria; Posición: posición de base 5' en transcripción (NM_000371.2, SEC ID N° 1.329)

Hebra	Posición	Secuencia con saliente 3'desoxitimidina (5' a 3')	SEC ID N°
t	100	CCGGUGAAUCCAAGUGUCCdTdT	561
c	118	GGACACUUGGAUUCACCGdTdT	562
t	11	ACUCAUUCUUGGCAGGAUGdTdT	563
c	29	CAUCCUGCCAAGAAUGAGUdTdT	564
t	111	AAGUGUCCUCUGAUGGUCAdTdT	565
c	129	UGACCAUCAGAGGACACUdTdT	566
t	13	UCAUUCUUGGCAGGAUGGCdTdT	567
c	31	GCCAUCCUGCCAAGAAUGAdTdT	568
t	130	AAGUUCUAGAUGCUGUCCGdTdT	569
c	148	CGGACAGCAUCUAGAACUdTdT	570
t	132	GUUCUAGAUGCUGUCCGAGdTdT	571

ES 2 543 004 T3

Hebra	Posición	Secuencia con saliente 3'desoxitimidina (5' a 3')	SEC ID N°
c	150	CUCGGACAGCAUCUAGAACdTdT	572
t	135	CUAGAUGCUGUCCGAGGCAdTdT	573
c	153	UGCCUCGGACAGCAUCUAGdTdT	574
t	138	GAUGCUGUCCGAGGCAGUCdTdT	575
c	156	GACUGCCUCGGACAGCAUCdTdT	576
t	14	CAUUCUUGGCAGGAUGGCUdTdT	577
c	32	AGCCAUCCUGCCAAGAAUGdTdT	578
t	140	UGCUGUCCGAGGCAGUCCUdTdT	579
c	158	AGGACUGCCUCGGACAGCAdTdT	580
t	146	CCGAGGCAGUCCUGCCAUCdTdT	581
c	164	GAUGGCAGGACUGCCUCGGdTdT	582
t	152	CAGUCCUGCCAUCA AUGUGdTdT	583
c	170	CACAUUGAUGGCAGGACUGdTdT	584
t	164	CAAUGUGGCCGUGCAUGUGdTdT	585
c	182	CACAUGCACGGCCACAUUGdTdT	586
t	178	AUGUGUUCAGAAAGGCUGCdTdT	587
c	196	GCAGCCUUUCUGAACACAUdTdT	588
t	2	CAGAAGUCCACUCAUUCUdTdT	589
c	20	AAGAAUGAGUGGACUUCUGdTdT	590
t	21	GGCAGGAUGGCUUCUCAUCdTdT	591
c	39	GAUGAGAAGCCAUCCUGCCdTdT	592
t	210	GAGCCAUUUGCCUCUGGGAdTdT	593
c	228	UCCCAGAGGCAA AUGGCUCdTdT	594
t	23	CAGGAUGGCUUCUCAUCGUCdTdT	595
c	41	ACGAUGAGAAGCCAUCCUGdTdT	596
t	24	AGGAUGGCUUCUCAUCGUCdTdT	597

ES 2 543 004 T3

Hebra	Posición	Secuencia con saliente 3'desoxitimidina (5' a 3')	SEC ID N°
c	42	GACGAUGAGAAGCCAUCCUdTdT	598
t	245	AGAGCUGCAUGGGCUCACAdTdT	599
c	263	UGUGAGCCCAUGCAGCUCUdTdT	600
t	248	GCUGCAUGGGCUCACAACUdTdT	601
c	266	AGUUGUGAGCCCAUGCAGCdTdT	602
t	25	GGAUGGCUUCUCAUCGUCUdTdT	603
c	43	AGACGAUGAGAAGCCAUCCdTdT	604
t	251	GCAUGGGCUCACAACUGAGdTdT	605
c	269	CUCAGUUGUGAGCCCAUGCdTdT	606
t	253	AUGGGCUCACAACUGAGGAdTdT	607
c	271	UCCUCAGUUGUGAGCCCAUdTdT	608
t	254	UGGGCUCACAACUGAGGAGdTdT	609
c	272	CUCCUCAGUUGUGAGCCCAdTdT	610
t	270	GAGGAAUUUGUAGAAGGGAdTdT	611
c	288	UCCCUUCUACAAAUCCUCdTdT	612
t	276	UUUGUAGAAGGGAUUAUACAdTdT	613
c	294	UGUAUAUCCCUUCUACAAAdTdT	614
t	277	UUGUAGAAGGGAUUAUACAAdTdT	615
c	295	UUGUAUAUCCCUUCUACAAdTdT	616
t	278	UGUAGAAGGGAUUAUACAAAdTdT	617
c	296	UUUGUAUAUCCCUUCUACAdTdT	618
t	281	AGAAGGGAUUAUACAAAGUGdTdT	619
c	299	CACUUUGUAUAUCCCUUCUdTdT	620
t	295	AAGUGGAAAUAGACACCAAdTdT	621
c	313	UUGGUGUCUAUUUCCACUUdTdT	622
t	299	GGAAAUAGACACCAAAUCUdTdT	623

ES 2 543 004 T3

Hebra	Posición	Secuencia con saliente 3'desoxitimidina (5' a 3')	SEC ID N°
c	317	AGAUUUGGUGUCUAUUUCCdTdT	624
t	300	GAAAUAGACACCAAUUCUdTdT	625
c	318	AAGAUUUGGUGUCUAUUUCdTdT	626
t	303	AUAGACACCAAUUCUACUdTdT	627
c	321	AGUAAGAUUUGGUGUCUAUdTdT	628
t	304	UAGACACCAAUUCUACUGdTdT	629
c	322	CAGUAAGAUUUGGUGUCUAdTdT	630
t	305	AGACACCAAUUCUACUGGdTdT	631
c	323	CCAGUAAGAUUUGGUGUCUdTdT	632
t	317	UUACUGGAAGGCACUUGGCdTdT	633
c	335	GCCAAGUGCCUCCAGUAAAdTdT	634
t	32	UUCUCAUCGUCUGCUCdTdT	635
c	50	GAGGAGCAGACGAUGAGAAAdTdT	636
t	322	GGAAGGCACUUGGCAUCUCdTdT	637
c	340	GAGAUGCCAAGUGCCUCCdTdT	638
t	326	GGCACUUGGCAUCUCCCCAdTdT	639
c	344	UGGGGAGAUGCCAAGUGCCdTdT	640
t	333	GGCAUCUCCCCAUUCCAUGdTdT	641
c	351	AUGGAAUGGGGAGAUGCCTTdTdT	642
t	334	GCAUCUCCCCAUUCCAUGAdTdT	643
c	352	UCAUGGAAUGGGGAGAUGCdTdT	644
t	335	CAUCUCCCCAUUCCAUGAGdTdT	645
c	353	CUCAUGGAAUGGGGAGAUGdTdT	646
t	336	AUCUCCCCAUUCCAUGAGCdTdT	647
c	354	GCUCAUGGAAUGGGGAGAUdTdT	648
t	338	CUCCCCAUUCCAUGAGCAUdTdT	649

ES 2 543 004 T3

Hebra	Posición	Secuencia con saliente 3'desoxitimidina (5' a 3')	SEC ID N°
c	356	AUGCUC AUGGAAUGGGGAGdTdT	650
t	341	CCCAUCCAUGAGCAUGCAdTdT	651
c	359	UGCAUGCUC AUGGAAUGGGdTdT	652
t	347	CCAUGAGCAUGCAGAGGUGdTdT	653
c	365	CACCUCUGCAUGCUC AUGGdTdT	654
t	352	AGCAUGCAGAGGUGGUAUUdTdT	655
c	370	AAUACCACCUCUGCAUGCUdTdT	656
t	354	CAUGCAGAGGUGGUAUUCAdTdT	657
c	372	UGAAUACCACCUCUGCAUGdTdT	658
t	355	AUGCAGAGGUGGUAUUCAdTdT	659
c	373	GUGAAUACCACCUCUGCAUdTdT	660
t	362	GGUGGUAUUCACAGCCAACdTdT	661
c	380	GUUGGCUGUGAAUACCACCdTdT	662
t	363	GUGGUAUUCACAGCCAACGdTdT	663
c	381	CGUUGGCUGUGAAUACCACdTdT	664
t	364	UGGUAUUCACAGCCAACGAdTdT	665
c	382	UCGUUGGCUGUGAAUACCAdTdT	666
t	365	GGUAUUCACAGCCAACGACdTdT	667
c	383	GUCGUUGGCUGUGAAUACCdTdT	668
t	366	GUAUUCACAGCCAACGACUdTdT	669
c	384	AGUCGUUGGCUGUGAAUACdTdT	670
t	367	UAUUCACAGCCAACGACUCdTdT	671
c	385	GAGUCGUUGGCUGUGAAUAdTdT	672
t	370	UCACAGCCAACGACUCCGGdTdT	673
c	388	CCGGAGUCGUUGGCUGUGAdTdT	674
t	390	CCCCGCCGCUACACCAUUGdTdT	675

ES 2 543 004 T3

Hebra	Posición	Secuencia con saliente 3'desoxitimidina (5' a 3')	SEC ID N°
c	408	CAAUGGUGUAGCGGCGGGdTdT	676
t	4	GAAGUCCACUCAUUCUUGGdTdT	677
c	22	CCAAGAAUGAGUGGACUUCdTdT	678
t	412	CCCUGCUGAGCCCCUACUCdTdT	679
c	430	GAGUAGGGGCUCAGCAGGGdTdT	680
t	417	CUGAGCCCCUACUCCUAAUdTdT	681
c	435	AAUAGGAGUAGGGGCUCAGdTdT	682
t	418	UGAGCCCCUACUCCUAAUUCdTdT	683
c	436	GAAUAGGAGUAGGGGCUCAdTdT	684
t	422	CCCCUACUCCUAAUCCACCCdTdT	685
c	440	GGUGGAAUAGGAGUAGGGdTdT	686
t	425	CUACUCCUAAUCCACCACGdTdT	687
c	443	CGUGGUGGAAUAGGAGUAGdTdT	688
t	426	UACUCCUAAUCCACCACGGdTdT	689
c	444	CCGUGGUGGAAUAGGAGUAdTdT	690
t	427	ACUCCUAAUCCACCACGGCcdTdT	691
c	445	GCCGUGGUGGAAUAGGAGUdTdT	692
t	429	UCCUAAUCCACCACGGCUGdTdT	693
c	447	CAGCCGUGGUGGAAUAGGAdTdT	694
t	432	UAUCCACCACGGCUGUCGdTdT	695
c	450	CGACAGCCGUGGUGGAAUAdTdT	696
t	433	AUCCACCACGGCUGUCGUdTdT	697
c	451	ACGACAGCCGUGGUGGAAUdTdT	698
t	437	CACCACGGCUGUCGUCACCCdTdT	699
c	455	GGUGACGACAGCCGUGGUGdTdT	700
t	438	ACCACGGCUGUCGUCACCAAdTdT	701

ES 2 543 004 T3

Hebra	Posición	Secuencia con saliente 3'desoxitimidina (5' a 3')	SEC ID N°
c	456	UGGUGACGACAGCCGUGGUdTdT	702
t	439	CCACGGCUGUCGUCACCAAdTdT	703
c	457	UUGGUGACGACAGCCGUGGdTdT	704
t	441	ACGGCUGUCGUCACCAAUcTdT	705
c	459	GAUUGGUGACGACAGCCGUdTdT	706
t	442	CGGCUGUCGUCACCAAUCCdTdT	707
c	460	GGAUUGGUGACGACAGCCGdTdT	708
t	449	CGUCACCAAUCCCAAGGAAdTdT	709
c	467	UUCCUUGGGAUUGGUGACGdTdT	710
t	455	CAAUCCCAAGGAAUGAGGGdTdT	711
c	473	CCCUCAUCCUUGGGAUUGdTdT	712
t	491	CCUGAAGGACGAGGGAUGGdTdT	713
c	509	CCAUCCCUUGUCCUUCAGGdTdT	714
t	497	GGACGAGGGAUGGGAUUUCdTdT	715
c	515	GAAAUCCCAUCCCUUGUCCdTdT	716
t	5	AAGUCCACUCAUUCUUGGCdTdT	717
c	23	GCCAAGAAUGAGUGGACUUdTdT	718
t	508	GGGAUUUCAUGUAACCAAGdTdT	719
c	526	CUUGGUUACAUGAAAUCCdTdT	720
t	509	GGAUUUCAUGUAACCAAGAdTdT	721
c	527	UCUUGGUUACAUGAAAUCCdTdT	722
t	514	UCAUGUAACCAAGAGUAUUdTdT	723
c	532	AAUACUCUUGGUUACAUGAdTdT	724
t	516	AUGUAACCAAGAGUAUUCcTdT	725
c	534	GGAAUACUCUUGGUUACAUdTdT	726
t	517	UGUAACCAAGAGUAUUCcAdTdT	727

ES 2 543 004 T3

Hebra	Posición	Secuencia con saliente 3'desoxitimidina (5' a 3')	SEC ID N°
c	535	UGGAAUACUCUUGGUUACAdTdT	728
t	518	GUAACCAAGAGUAUCCAAdTdT	729
c	536	AUGGAAUACUCUUGGUUACdTdT	730
t	54	UGCCUUGCUGGACUGGUAdTdT	731
c	72	AUACCAGUCCAGCAAGGCAdTdT	732
t	543	UAAAGCAGUGUUUACCUdTdT	733
c	561	AGGUGAAAACACUGCUUUAdTdT	734
t	55	GCCUUGCUGGACUGGUAdTdT	735
c	73	AAUACCAGUCCAGCAAGGCdTdT	736
t	551	UGUUUUCACCUCAUAUGCUdTdT	737
c	569	AGCAUAUGAGGUGAAAACAdTdT	738
t	552	GUUUUCACCUCAUAUGCUAdTdT	739
c	570	UAGCAUAUGAGGUGAAAACdTdT	740
t	553	UUUUCACCUCAUAUGCUAdTdT	741
c	571	AUAGCAUAUGAGGUGAAAAdTdT	742
t	555	UUCACCUCAUAUGCUAUGUdTdT	743
c	573	ACAUAGCAUAUGAGGUGAAAdTdT	744
t	557	CACCUCAUAUGCUAUGUUAdTdT	745
c	575	UAACAUAGCAUAUGAGGUGdTdT	746
t	56	CCUUGCUGGACUGGUUUUdTdT	747
c	74	AAAUACCAGUCCAGCAAGGdTdT	748
t	563	AUAUGCUAUGUUAGAAGUCdTdT	749
c	581	GACUUCUAACAUAGCAUAdTdT	750
t	564	UAUGCUAUGUUAGAAGUCCdTdT	751
c	582	GGACUUCUAACAUAGCAUAdTdT	752
t	566	UGCUAUGUUAGAAGUCCAGdTdT	753

ES 2 543 004 T3

Hebra	Posición	Secuencia con saliente 3'desoxitimidina (5' a 3')	SEC ID N°
c	584	CUGGACUUCUAACAUAGCAAdTdT	754
t	57	CUUGCUGGACUGGUUUUGdTdT	755
c	75	CAAAUACCAGUCCAGCAAGdTdT	756
t	578	AGUCCAGGCAGAGACAAUAdTdT	757
c	596	AUUGUCUCUGCCUGGACUTTdTdT	758
t	580	UCCAGGCAGAGACAAUAAAdTdT	759
c	598	UUUAUUUGUCUCUGCCUGGAdTdT	760
t	607	GUGAAAGGCACUUUJCAUUDTdT	761
c	625	AAUGAAAAGUGCCUUUCACdTdT	762
t	62	UGGACUGGUUUUGUGUCUdTdT	763
c	80	AGACACAAAUACCAGUCCAdTdT	764
t	77	GUCUGAGGCUGGCCCUACGdTdT	765
c	95	CGUAGGGCCAGCCUCAGACdTdT	766
t	79	CUGAGGCUGGCCCUACGGGdTdT	767
c	97	CCCGUAGGGCCAGCCUCAGdTdT	768
t	81	GAGGCUGGCCCUACGGGCAdTdT	769
c	99	UGCCCGUAGGGCCAGCCUCdTdT	770
t	82	AGGCUGGCCCUACGGGCACdTdT	771
c	100	GUGCCCGUAGGGCCAGCCUdTdT	772
t	84	GCUGGCCCUACGGGCACCGdTdT	773
c	102	CGGUGCCCGUAGGGCCAGCdTdT	774
t	85	CUGGCCCUACGGGCACCGGdTdT	775
c	103	CCGGUGCCCGUAGGGCCAGdTdT	776
t	87	GGCCCUACGGGCACCGGUGdTdT	777
c	105	CACCGGUGCCCGUAGGGCCdTdT	778
t	9	CCACUCAUUCUUGGCAGGAdTdT	779

ES 2 543 004 T3

Hebra	Posición	Secuencia con saliente 3'desoxitimidina (5' a 3')	SEC ID N°
c	27	UCCUGCCAAGAAUGAGUGGdTdT	780
t	90	CCUACGGGCACCGGUGAAUdTdT	781
c	108	AUUCACCGGUGCCCGUAGGdTdT	782
t	91	CUACGGGCACCGGUGAAUCdTdT	783
c	109	GAUUCACCGGUGCCCGUAGdTdT	784
t	92	UACGGGCACCGGUGAAUCCdTdT	785
c	110	GGAUUCACCGGUGCCCGUAdTdT	786
t	93	ACGGGCACCGGUGAAUCCAdTdT	787
c	111	UGGAUUCACCGGUGCCCGUdTdT	788
t	97	GCACCGGUGAAUCCAAGUGdTdT	789
c	115	CACUUGGAUUCACCGGUGCdTdT	790
t	98	CACCGGUGAAUCCAAGUGUdTdT	791
c	116	ACACUUGGAUUCACCGGUGdTdT	792
t	167	UGUGGCCAUGCAUGUGUUCdTdT	793
c	185	GAACACAUGCAUGGCCACAdTdT	794
t	168	GUGGCCAUGCAUGUGUUCAdTdT	795
c	186	UGAACACAUGCAUGGCCACdTdT	796
t	171	GCCAUGCAUGUGUUCAGAAdTdT	797
c	189	UUCUGAACACAUGCAUGGCCdTdT	798
t	432	UAUUCACCACGGCUGUCAdTdT	799
c	449	UGACAGCCGUGGUGGAAUAdTdT	800
t	447	GUCAUCACCAAUCCCAAGGdTdT	801
c	465	CCUUGGGAUUGGUGAUGACdTdT	802
t	115	GUCCUCUGAUGGUCAAAGUdTdT	803
c	133	ACUUUGACCAUCAGAGGACdTdT	804
t	122	GAUGGUCAAAGUUCUAGAUdTdT	805

ES 2 543 004 T3

Hebra	Posición	Secuencia con saliente 3'desoxitimidina (5' a 3')	SEC ID N°
c	140	AUCUAGAACUUUGACCAUCdTdT	806
t	139	AUGCUGUCCGAGGCAGUCCdTdT	807
c	157	GGACUGCCUCGGACAGCAUdTdT	808
t	172	CCGUGCAUGUGUUCAGAAAdTdT	809
c	190	UUUCUGAACACAUGCACGGdTdT	810
t	238	AGUCUGGAGAGCUGCAUGGdTdT	811
c	256	CCAUGCAGCUCUCCAGACUdTdT	812
t	252	CAUGGGCUCACAACUGAGGdTdT	813
c	270	CCUCAGUUGUGAGCCCAUGdTdT	814
t	33	UCUCAUCGUCUGCUCCUCCdTdT	815
c	51	GGAGGAGCAGACGAUGAGAdTdT	816
t	340	CCCCAUUCCAUGAGCAUGCdTdT	817
c	358	GCAUGCUCUAUGGAAUGGGGdTdT	818
t	421	GCCCCUACUCCUAUUCCACdTdT	819
c	439	GUGGAAUAGGAGUAGGGGCdTdT	820
t	431	CUAUUCCACCACGGCUGUCdTdT	821
c	449	GACAGCCGUGGUGGAAUAGdTdT	822
t	440	CACGGCUGUCGUCACCAAUdTdT	823
c	458	AUUGGUGACGACAGCCGUGdTdT	824
t	496	AGGACGAGGGAUGGGAUUUdTdT	825
c	514	AAAUCCCAUCCUCGUCCUdTdT	826
t	556	UCACCUCAUAUGCUAUGUUdTdT	827
c	574	AACAUAGCAUAUGAGGUGAdTdT	828
t	559	CCUCAUAUGCUAUGUUAGAdTdT	829
c	577	UCUAACAUAGCAUAUGAGGdTdT	830
t	570	AUGUUAGAAGUCCAGGCAGdTdT	831

ES 2 543 004 T3

Hebra	Posición	Secuencia con saliente 3'desoxitimidina (5' a 3')	SEC ID N°
c	588	CUGCCUGGACUUCUAACAuTdT	832
t	78	UCUGAGGCUGGCCCUACGGdTdT	833
c	96	CCGUAGGGCCAGCCUCAGAdTdT	834
t	87	GGCCCUACGGGCACCGGUGdTdT	835
c	105	CACCGGUGCCCGUAGGGCCdTdT	836
t	95	GGCACCGGUGAAUCCAAGdTdT	837
c	113	CUUGGAUUCACCGGUGCCdTdT	838
t	167	CCAUGCAUGUGUUCAGAAAdTdT	839
c	185	UUUCUGAACACAUGCAUGGdTdT	840

Tabla 4. Secuencias de hebra transcrita y complementaria químicamente modificadas de ARNs de TTR humano.

Véase la Tabla 2 para dúplex #. Hebra: t= transcrita; c= complementaria; Posición: posición de base 5' en la transcripción (NM_000371.2, SEC ID N° 1.329).

Hebra	Oligo #	Posición	Secuencia (5' a 3')	SEC ID N°
t	A-32153	100	ccGGuGAAuccAAGuGuccdTdT	841
c	A-32154	118	GGAcACUUGGAUucACCGGdTdT	842
t	A-32155	11	AcucAuucuuGGcAGGAuGdTdT	843
c	A-32156	29	cAUCCUGCcAAGAAUGAGUdTdT	844
t	A-32157	111	AAGuGuccucuGAuGGucAdTdT	845
c	A-32158	129	UGACcAUcAGAGGAcACUuTdTdT	846
t	A-32163	13	ucAuucuuGGcAGGAuGGcdTdT	847
c	A-32164	31	GCcAUCCUGCcAAGAAUGAdTdT	848
t	A-32165	130	AAGuucuAGAuGcuGuccGdTdT	849
c	A-32166	148	CGGAcAGcAUCuAGAACUuTdTdT	850
t	A-32167	132	GuucuAGAuGcuGuccGAGdTdT	851
c	A-32168	150	CUCGGAcAGcAUCuAGAACdTdT	852
t	A-32169	135	cuAGAuGcuGuccGAGGcAdTdT	853

ES 2 543 004 T3

Hebra	Oligo #	Posición	Secuencia (5' a 3')	SEC ID N°
c	A-32170	153	UGCCUCGGAcAGcAUCuAGdTdT	854
t	A-32171	138	GAuGcuGuccGAGGcAGucdTdT	855
c	A-32172	156	GACUGCCUCGGAcAGcAUCdTdT	856
t	A-32175	14	cAuucuuGGcAGGAuGGcudTdT	857
c	A-32176	32	AGCcAUCCUGCcAAGAAUGdTdT	858
t	A-32177	140	uGcuGuccGAGGcAGuccdTdT	859
c	A-32178	158	AGGACUGCCUCGGAcAGcAdTdT	860
t	A-32179	146	ccGAGGcAGuccuGccAucdTdT	861
c	A-32180	164	GAUGGcAGGACUGCCUCGGdTdT	862
t	A-32181	152	cAGuccuGccAucAAuGuGdTdT	863
c	A-32182	170	cAcAUUGAUGGcAGGACUGdTdT	864
t	A-32183	164	cAAuGuGGccGuGcAuGuGdTdT	865
c	A-32184	182	cAcAUGcACGGCcAcAUUGdTdT	866
t	A-32187	178	AuGuGuucAGAAAGGcuGcdTdT	867
c	A-32188	196	GcAGCCUUUCUGAAcAcAUdTdT	868
t	A-32189	2	cAGAAGuccAcucAuucudTdT	869
c	A-32190	20	AAGAAUGAGUGGACUUCUGdTdT	870
t	A-32191	21	GGcAGGAuGGcuucucAucdTdT	871
c	A-32192	39	GAUGAGAAGCcAUCCUGCCdTdT	872
t	A-32193	210	GAGccAuuuGccucuGGAdTdT	873
c	A-32194	228	UCCcAGAGGcAAAUGGCUCdTdT	874
t	A-32195	23	cAGGAuGGcuucucAucGudTdT	875
c	A-32196	41	ACGAUGAGAAGCCAUCCUGdTdT	876
t	A-32199	24	AGGAuGGcuucucAucGucdTdT	877
c	A-32200	42	GACGAUGAGAAGCcAUCCUdTdT	878
t	A-32201	245	AGAGcuGcAuGGGcucAcAdTdT	879

ES 2 543 004 T3

Hebra	Oligo #	Posición	Secuencia (5' a 3')	SEC ID N°
c	A-32202	263	UGUGAGCCcAUGcAGCUCUdTdT	880
t	A-32203	248	GcuGcAuGGGcucAcAAcudTdT	881
c	A-32204	266	AGUUGUGAGCCcAUGcAGCdTdT	882
t	A-32205	25	GGAuGGcuucucAucGucudTdT	883
c	A-32206	43	AGACGAUGAGAAGCcAUCCdTdT	884
t	A-32207	251	GcAuGGGcucAcAAcuGAGdTdT	885
c	A-32208	269	CUcAGUUGUGAGCCcAUGCdTdT	886
t	A-32211	253	AuGGGcucAcAAcuGAGGAdTdT	887
c	A-32212	271	UCCUcAGUUGUGAGCCcAUdTdT	888
t	A-32213	254	uGGGcucAcAAcuGAGGAGdTdT	889
c	A-32214	272	CUCCUcAGUUGUGAGCCcAdTdT	890
t	A-32215	270	GAGGAAuuuGuAGAAGGGAdTdT	891
c	A-32216	288	UCCCUUCuAcAAAUUCCUCdTdT	892
t	A-32217	276	uuuGuAGAAGGGAuAuAcAdTdT	893
c	A-32218	294	UGuAuAUCCCUUCuAcAAAdTdT	894
t	A-32219	277	uuGuAGAAGGGAuAuAcAAAdTdT	895
c	A-32220	295	UUGuAuAUCCCUUCuAcAAAdTdT	896
t	A-32221	278	uGuAGAAGGGAuAuAcAAAdTdT	897
c	A-32222	296	UUUGuAuAUCCCUUCuAcAdTdT	898
t	A-32223	281	AGAAGGGAuAuAcAAAGuGdTdT	899
c	A-32224	299	cACUUUGuAuAUCCCUUCUdTdT	900
t	A-32225	295	AAGuGGAAAuAGAcAccAAAdTdT	901
c	A-32226	313	UUGGUGUCuAUUUCcACUUDdTdT	902
t	A-32227	299	GGAAAuAGAcAccAAAucudTdT	903
c	A-32228	317	AGAUUUGGUGUCuAUUUCcAdTdT	904
t	A-32229	300	GAAAuAGAcAccAAAucuudTdT	905

ES 2 543 004 T3

Hebra	Oligo #	Posición	Secuencia (5' a 3')	SEC ID N°
c	A-32230	318	AAGAUUUGGUGUCuAUUUCdTdT	906
t	A-32231	303	AuAGAcAccAAAucuuAcudTdT	907
c	A-32232	321	AGuAAGAUUUGGUGUCuAUdTdT	908
t	A-32233	304	uAGAcAccAAAucuuAcuGdTdT	909
c	A-32234	322	cAGuAAGAUUUGGUGUCuAdTdT	910
t	A-32235	305	AGAcAccAAAucuuAcuGGdTdT	911
c	A-32236	323	CcAGuAAGAUUUGGUGUCUdTdT	912
t	A-32237	317	uuAcuGGAAGGcAcuGGcdTdT	913
c	A-32238	335	GCcAAGUGCCUUCcAGuAAdTdT	914
t	A-32239	32	uucucAucGucuGcuccucdTdT	915
c	A-32240	50	GAGGAGcAGACGAUGAGAAdTdT	916
t	A-32241	322	GGAAGGcAcuGGcAucucdTdT	917
c	A-32242	340	GAGAUGCcAAGUGCCUUCdTdT	918
t	A-32243	326	GGcAcuGGcAucucuccAdTdT	919
c	A-32244	344	UGGGGAGAUGCcAAGUGCCdTdT	920
t	A-32247	333	GGcAucucucccAuuccAuGdTdT	921
c	A-32248	351	cAUGGAAUGGGGAGAUGCdTdT	922
t	A-32249	334	GcAucucucccAuuccAuGAdTdT	923
c	A-32250	352	UcAUGGAAUGGGGAGAUGCdTdT	924
t	A-32251	335	cAucucucccAuuccAuGAGdTdT	925
c	A-32252	353	CUcAUGGAAUGGGGAGAUGdTdT	926
t	A-32253	336	AucucucccAuuccAuGAGcdTdT	927
c	A-32254	354	GCUcAUGGAAUGGGGAGAUdTdT	928
t	A-32255	338	cucucccAuuccAuGAGcAudTdT	929
c	A-32256	356	AUGCUcAUGGAAUGGGGAGdTdT	930
t	A-32259	341	cccAuuccAuGAGcAuGcAdTdT	931

ES 2 543 004 T3

Hebra	Oligo #	Posición	Secuencia (5' a 3')	SEC ID N°
c	A-32260	359	UGcAUGCUcAUGGAAUGGGdTdT	932
t	A-32261	347	ccAuGAGcAuGcAGAGGuGdTdT	933
c	A-32262	365	cACCUCUGcAUGCUcAUGGdTdT	934
t	A-32263	352	AGcAuGcAGAGGuGGuAuudTdT	935
c	A-32264	370	AAuACcACCUCUGcAUGCUdTdT	936
t	A-32265	354	cAuGcAGAGGuGGuAuucAdTdT	937
c	A-32266	372	UGAAuACcACCUCUGcAUGdTdT	938
t	A-32267	355	AuGcAGAGGuGGuAuucAcdTdT	939
c	A-32268	373	GUGAAuACcACCUCUGcAUdTdT	940
t	A-32269	362	GGuGGuAuucAcAGccAAcTdT	941
c	A-32270	380	GUUGGCUGUGAAuACcACCdTdT	942
t	A-32271	363	GuGGuAuucAcAGccAAcGdTdT	943
c	A-32272	381	CGUUGGCUGUGAAuACcAcTdT	944
t	A-32273	364	uGGuAuucAcAGccAAcGAdTdT	945
c	A-32274	382	UCGUUGGCUGUGAAuACcAdTdT	946
t	A-32275	365	GGuAuucAcAGccAAcGAcTdT	947
c	A-32276	383	GUCGUUGGCUGUGAAuACCdTdT	948
t	A-32277	366	GuAuucAcAGccAAcGAcudTdT	949
c	A-32278	384	AGUCGUUGGCUGUGAAuACdTdT	950
t	A-32279	367	uAuucAcAGccAAcGAcudTdT	951
c	A-32280	385	GAGUCGUUGGCUGUGAAuAdTdT	952
t	A-32281	370	ucAcAGccAAcGAcuccGGdTdT	953
c	A-32282	388	CCGGAGUCGUUGGCUGUGAdTdT	954
t	A-32283	390	ccccGccGcuAcAccAuGdTdT	955
c	A-32284	408	cAAUGGUGuAGCGGCGGGdTdT	956
t	A-32285	4	GAAGuccAcucAuucuuGGdTdT	957

ES 2 543 004 T3

Hebra	Oligo #	Posición	Secuencia (5' a 3')	SEC ID N°
c	A-32286	22	CcAAGAAUGAGUGGACUUCdTdT	958
t	A-32287	412	cccuGcuGAGcccuAcucdTdT	959
c	A-32288	430	GAGuAGGGGCUcAGcAGGGdTdT	960
t	A-32289	417	cuGAGcccuAcuccuAuudTdT	961
c	A-32290	435	AAuAGGAGuAGGGGCUcAGdTdT	962
t	A-32291	418	uGAGcccuAcuccuAuucdTdT	963
c	A-32292	436	GAAuAGGAGuAGGGGCUcAdTdT	964
t	A-32295	422	cccuAcuccuAuuccAccdTdT	965
c	A-32296	440	GGUGGAAuAGGAGuAGGGGdTdT	966
t	A-32297	425	cuAcuccuAuuccAccAcGdTdT	967
c	A-32298	443	CGUGGUGGAAuAGGAGuAGdTdT	968
t	A-32299	426	uAcuccuAuuccAccAcGGdTdT	969
c	A-32300	444	CCGUGGUGGAAuAGGAGuAdTdT	970
t	A-32301	427	AcuccuAuuccAccAcGGcdTdT	971
c	A-32302	445	GCCGUGGUGGAAuAGGAGUdTdT	972
t	A-32303	429	uccuAuuccAccAcGGcuGdTdT	973
c	A-32304	447	cAGCCGUGGUGGAAuAGGAdTdT	974
t	A-32307	432	uAuuccAccAcGGcuGucGdTdT	975
c	A-32308	450	CGAcAGCCGUGGUGGAAuAdTdT	976
t	A-32309	433	AuuccAccAcGGcuGucGudTdT	977
c	A-32310	451	ACGAcAGCCGUGGUGGAAUdTdT	978
t	A-32311	437	cAccAcGGcuGucGucAccdTdT	979
c	A-32312	455	GGUGACGAcAGCCGUGGUGdTdT	980
t	A-32313	438	AccAcGGcuGucGucAccAdTdT	981
c	A-32314	456	UGGUGACGAcAGCCGUGGUdTdT	982
t	A-32315	439	ccAcGGcuGucGucAccAAdTdT	983

ES 2 543 004 T3

Hebra	Oligo #	Posición	Secuencia (5' a 3')	SEC ID N°
c	A-32316	457	UUGGUGACGAcAGCCGUGGdTdT	984
t	A-32319	441	AcGGcuGucGucAccAAucdTdT	985
c	A-32320	459	GAUUGGUGACGAcAGCCGUdTdT	986
t	A-32321	442	cGGcuGucGucAccAAuccdTdT	987
c	A-32322	460	GGAUUGGUGACGAcAGCCGdTdT	988
t	A-32323	449	cGucAccAAucccAAGGAAdTdT	989
c	A-32324	467	UUCCUUGGGAUUGGUGACGdTdT	990
t	A-32325	455	cAAucccAAGGAAuGAGGGdTdT	991
c	A-32326	473	CCCUcAUUCCUUGGGAUUGdTdT	992
t	A-32327	491	ccuGAAGGAcGAGGGAuGGdTdT	993
c	A-32328	509	CcAUCCCUCGUCCUuAGGdTdT	994
t	A-32331	497	GGAcGAGGGAuGGAAuuuCdTdT	995
c	A-32332	515	GAAAUCCcAUCCCUCGUCCdTdT	996
t	A-32333	5	AAGuccAcucAuucuuGGcdTdT	997
c	A-32334	23	GCcAAGAAUGAGUGGACUuTdTdT	998
t	A-32335	508	GGGAuuucAuGuAAccAAGdTdT	999
c	A-32336	526	CUUGGUuAcAUGAAAUCCcdTdT	1.000
t	A-32337	509	GGAAuuucAuGuAAccAAGAdTdT	1.001
c	A-32338	527	UCUUGGUuAcAUGAAAUCCdTdT	1.002
t	A-32339	514	ucAuGuAAccAAGAGuAuudTdT	1.003
c	A-32340	532	AAuACUCUUGGUuAcAUGAdTdT	1.004
t	A-32341	516	AuGuAAccAAGAGuAuuccdTdT	1.005
c	A-32342	534	GGAAuACUCUUGGUuAcAUdTdT	1.006
t	A-32343	517	uGuAAccAAGAGuAuuccAdTdT	1.007
c	A-32344	535	UGGAAuACUCUUGGUuAcAdTdT	1.008
t	A-32345	518	GuAAccAAGAGuAuuccAudTdT	1.009

ES 2 543 004 T3

Hebra	Oligo #	Posición	Secuencia (5' a 3')	SEC ID N°
c	A-32346	536	AUGGAAuACUCUUGGUuACdTdT	1.010
t	A-32347	54	uGccuuGcuGGAcuGGuAudTdT	1.011
c	A-32348	72	AuACcAGUCcAGcAAGGcAdTdT	1.012
t	A-32349	543	uAAAGcAGuGuuuucAccudTdT	1.013
c	A-32350	561	AGGUGAAAACACUGCUUuAdTdT	1.014
t	A-32351	55	GccuuGcuGGAcuGGuAuudTdT	1.015
c	A-32352	73	AAuACcAGUCcAGcAAGGCdTdT	1.016
t	A-32353	551	uGuuuucAccucAuAuGcudTdT	1.017
c	A-32354	569	AGcAuAUGAGGUGAAAACdTdT	1.018
t	A-32355	552	GuuuucAccucAuAuGcuAdTdT	1.019
c	A-32356	570	uAGcAuAUGAGGUGAAAACdTdT	1.020
t	A-32357	553	uuuucAccucAuAuGcuAudTdT	1.021
c	A-32358	571	AuAGcAuAUGAGGUGAAAAdTdT	1.022
t	A-32359	555	uucAccucAuAuGcuAuGudTdT	1.023
c	A-32360	573	AcAuAGcAuAUGAGGUGAAAdTdT	1.024
t	A-32363	557	cAccucAuAuGcuAuGuuAdTdT	1.025
c	A-32364	575	uAAcAuAGcAuAUGAGGUGdTdT	1.026
t	A-32367	56	ccuuGcuGGAcuGGuAuuudTdT	1.027
c	A-32368	74	AAuACcAGUCcAGcAAGGdTdT	1.028
t	A-32369	563	AuAuGcuAuGuuAGAAGucdTdT	1.029
c	A-32370	581	GACUUCuAAcAuAGcAuAUdTdT	1.030
t	A-32371	564	uAuGcuAuGuuAGAAGuccdTdT	1.031
c	A-32372	582	GGACUUCuAAcAuAGcAuAdTdT	1.032
t	A-32373	566	uGcuAuGuuAGAAGuccAGdTdT	1.033
c	A-32374	584	CUGGACUUCuAAcAuAGcAdTdT	1.034
t	A-32375	57	cuuGcuGGAcuGGuAuuuGdTdT	1.035

ES 2 543 004 T3

Hebra	Oligo #	Posición	Secuencia (5' a 3')	SEC ID N°
c	A-32376	75	cAAAUACcAGUCcAGcAAGdTdT	1.036
t	A-32379	578	AGuccAGGcAGAGAcAAuAdTdT	1.037
c	A-32380	596	uAUUGUCUCUGCCUGGACUdTdT	1.038
t	A-32381	580	uccAGGcAGAGAcAAuAAAdTdT	1.039
c	A-32382	598	UUuAUUGUCUCUGCCUGGAdTdT	1.040
t	A-32383	607	GuGAAAGGcAcuuuucAuudTdT	1.041
c	A-32384	625	AAUGAAAAGUGCCUUUcACdTdT	1.042
t	A-32385	62	uGGAcuGGuAuuuGuGucudTdT	1.043
c	A-32386	80	AGAcAcAAAUACcAGUCcAdTdT	1.044
t	A-32387	77	GucuGAGGcuGGcccuAcGdTdT	1.045
c	A-32388	95	CGuAGGGCcAGCCUcAGACdTdT	1.046
t	A-32391	79	cuGAGGcuGGcccuAcGGGdTdT	1.047
c	A-32392	97	CCCGuAGGGCcAGCCUcAGdTdT	1.048
t	A-32393	81	GAGGcuGGcccuAcGGGcAdTdT	1.049
c	A-32394	99	UGCCCGuAGGGCcAGCCUCdTdT	1.050
t	A-32395	82	AGGcuGGcccuAcGGGcAcdTdT	1.051
c	A-32396	100	GUGCCCGuAGGGCcAGCCUdTdT	1.052
t	A-32397	84	GcuGGcccuAcGGGcAccGdTdT	1.053
c	A-32398	102	CGGUGCCCGuAGGGCcAGCdTdT	1.054
t	A-32399	85	cuGGcccuAcGGGcAccGGdTdT	1.055
c	A-32400	103	CCGGUGCCCGuAGGGCcAGdTdT	1.056
t	A-32401	87	GGcccuAcGGGcAccGGuGdTdT	1.057
c	A-32402	105	cACCGGUGCCCGuAGGGCCdTdT	1.058
t	A-32403	9	ccAcucAuucuuGGcAGGAdTdT	1.059
c	A-32404	27	UCCUGCcAAGAAUGAGUGGdTdT	1.060
t	A-32405	90	ccuAcGGGcAccGGuGAAudTdT	1.061

ES 2 543 004 T3

Hebra	Oligo #	Posición	Secuencia (5' a 3')	SEC ID N°
c	A-32406	108	AUUcACCGGUGCCCGuAGGdTdT	1.062
t	A-32407	91	cuAcGGGcAccGGuGAAucdTdT	1.063
c	A-32408	109	GAUUcACCGGUGCCCGuAGdTdT	1.064
t	A-32409	92	uAcGGGcAccGGuGAAuccdTdT	1.065
c	A-32410	110	GGAUUcACCGGUGCCCGuAdTdT	1.066
t	A-32411	93	AcGGGcAccGGuGAAuccAdTdT	1.067
c	A-32412	111	UGGAUUcACCGGUGCCCGUdTdT	1.068
t	A-32415	97	GcAccGGuGAAuccAAGuGdTdT	1.069
c	A-32416	115	cACUUGGAUUcACCGGUGCdTdT	1.070
t	A-32417	98	cAccGGuGAAuccAAGuGdTdT	1.071
c	A-32418	116	AcACUUGGAUUcACCGGUGdTdT	1.072
t	A-32419	167	uGuGGccAuGcAuGuGuucdTdT	1.073
c	A-32420	185	GAAcAcAUGcAUGGcAcAdTdT	1.074
t	A-32421	168	GuGGccAuGcAuGuGuucAdTdT	1.075
c	A-32422	186	UGAAcAcAUGcAUGGcAcAdTdT	1.076
t	A-32423	171	GccAuGcAuGuGuucAGAAdTdT	1.077
c	A-32424	189	UUCUGAAcAcAUGcAUGGcAdTdT	1.078
t	A-32427	432	uAuuccAccAcGGcuGucAdTdT	1.079
c	A-32428	449	UGAcAGCCGUGGUGGAAuAdTdT	1.080
t	A-32429	447	GucAucAccAAuccAAGdTdT	1.081
c	A-32430	465	CCUUGGGAUUGGUGAUGACdTdT	1.082
t	A-32159	115	GuccucuGAuGGucAAAGuAdTdT	1.083
c	A-32160	133	ACUUUGACcAuAGAGGACdTdT	1.084
t	A-32161	122	GAuGGucAAAGuucAGAuAdTdT	1.085
c	A-32162	140	AUCuAGAACUUUGACcAUCdTdT	1.086
t	A-32173	139	AuGcuGuccGAGGcAGuccdTdT	1.087

ES 2 543 004 T3

Hebra	Oligo #	Posición	Secuencia (5' a 3')	SEC ID N°
c	A-32174	157	GGACUGCCUCGGAcAGcAUdTdT	1.088
t	A-32185	172	ccGuGcAuGuGuucAGAAAdTdT	1.089
c	A-32186	190	UUUCUGAAcAcAUGcACGGdTdT	1.090
t	A-32197	238	AGucuGGAGAGcuGcAuGGdTdT	1.091
c	A-32198	256	CcAUGcAGCUCUCcAGACUdTdT	1.092
t	A-32209	252	cAuGGGcucAcAAcuGAGdTdT	1.093
c	A-32210	270	CCUcAGUUGUGAGCCcAUGdTdT	1.094
t	A-32245	33	ucucAucGucuGcuccuccdTdT	1.095
c	A-32246	51	GGAGGAGcAGACGAUGAGAdTdT	1.096
t	A-32257	340	ccccAuuccAuGAGcAuGcdTdT	1.097
c	A-32258	358	GcAUGCUcAUGGAAUGGGGdTdT	1.098
t	A-32293	421	GccccuAcuccuAuuccAcdTdT	1.099
c	A-32294	439	GUGGAAuAGGAGuAGGGGCdTdT	1.100
t	A-32305	431	cuAuuccAccAcGGcuGucdTdT	1.101
c	A-32306	449	GAcAGCCGUGGUGGAAuAGdTdT	1.102
t	A-32317	440	cAcGGcuGucGucAccAAudTdT	1.103
c	A-32318	458	AUUGGUGACGAcAGCCGUGdTdT	1.104
t	A-32329	496	AGGAcGAGGGAuGGGAuuudTdT	1.105
c	A-32330	514	AAAUCCcAUCCCUCGUCCUdTdT	1.106
t	A-32361	556	ucAccucAuAuGcuAuGuudTdT	1.107
c	A-32362	574	AAcAuAGcAuAUGAGGUGAdTdT	1.108
t	A-32365	559	ccucAuAuGcuAuGuuAGAdTdT	1.109
c	A-32366	577	UCuAAcAuAGcAuAUGAGGdTdT	1.110
t	A-32377	570	AuGuuAGAAGuccAGGcAGdTdT	1.111
c	A-32378	588	CUGCCUGGACUUCuAAcAUdTdT	1.112
t	A-32389	78	ucuGAGGcuGGcccuAcGGdTdT	1.113

ES 2 543 004 T3

Hebra	Oligo #	Posición	Secuencia (5' a 3')	SEC ID N°
c	A-32390	96	CCGuAGGGCcAGCCUcAGAdTdT	1.114
t	A-32401	87	GGccuAcGGGcAccGGuGdTdT	1.115
c	A-32402	105	cACCGGUGCCCGuAGGGCCdTdT	1.116
t	A-32413	95	GGGcAccGGuGAAuccAAGdTdT	1.117
c	A-32414	113	CUUGGAUUcACCGGUGCCcTdT	1.118
t	A-32425	167	ccAuGcAuGuGuucAGAAAdTdT	1.119
c	A-32426	185	UUUCUGAAcAcAUGcAUGGdTdT	1.120

Tabla 5: Números de identificación para los ARNs de TTR de rata.

Véase la Tabla 7 para las secuencias.

Dúplex #	Oligo Transcrito#	Oligo Complementario#
AD-18529	A-32745	A-32746
AD-18530	A-32747	A-32748
AD-18531	A-32749	A-32750
AD-18532	A-32751	A-32752
AD-18533	A-32753	A-32754
AD-18534	A-32755	A-32756
AD-18535	A-32757	A-32758
AD-18536	A-32759	A-32760
AD-18537	A-32761	A-32762
AD-18538	A-32763	A-32764
AD-18539	A-32159	A-32160
AD-18540	A-32765	A-32766
AD-18541	A-32767	A-32768
AD-18542	A-32769	A-32770
AD-18543	A-32771	A-32772
AD-18544	A-32773	A-32774

Dúplex #	Oligo Transcrito#	Oligo Complementario#
AD-18545	A-32775	A-32776
AD-18546	A-32777	A-32778
AD-18547	A-32779	A-32780
AD-18548	A-32781	A-32782
AD-18549	A-32783	A-32784
AD-18550	A-32785	A-32786
AD-18551	A-32787	A-32788
AD-18552	A-32791	A-32792
AD-18553	A-32793	A-32794
AD-18554	A-32795	A-32796

Tabla 6A. Secuencias de hebra transcrita y complementaria para los ARNs de TTR de rata.

Hebra: t= transcrita; c= complementaria; Posición: posición de base 5' en la transcripción (NM_012681.1, SEC ID N° 1.330).

Hebra	Posición	Secuencia (5' a 3')	SEC ID N°	Secuencia con 3' dinucleotide overhang (5' a 3')	SEC ID N°
t	115	GUCCUCUGAUGGUCAAAGU	1.121	GUCCUCUGAUGGUCAAAGUNN	1.173
c	133	ACUUUGACCAUCAGAGGAC	1.122	ACUUUGACCAUCAGAGGACNN	1.174
t	537	UUCUUGCUCUAUAAACCGU	1.123	UUCUUGCUCUAUAAACCGUNN	1.175
c	555	ACGGUUUUAUAGAGCAAGAA	1.124	ACGGUUUUAUAGAGCAAGAANN	1.176
t	543	CUCUAUAAACCGUGUUAGC	1.125	CUCUAUAAACCGUGUUAGCNN	1.177
c	561	GCUAACACGGUUUUAUAGAG	1.126	GCUAACACGGUUUUAUAGAGNN	1.178
t	392	UCGCCACUACACCAUCGCA	1.127	UCGCCACUACACCAUCGCANN	1.179
c	410	UGCGAUGGUGUAGUGGCGA	1.128	UGCGAUGGUGUAGUGGCGANN	1.180
t	538	UCUUGCUCUAUAAACCGUG	1.129	UCUUGCUCUAUAAACCGUGNN	1.181
c	556	CACGGUUUUAUAGAGCAAGA	1.130	CACGGUUUUAUAGAGCAAGANN	1.182
t	541	UGCUCUAUAAACCGUGUUA	1.131	UGCUCUAUAAACCGUGUANN	1.183
c	559	UAACACGGUUUUAUAGAGCA	1.132	UAACACGGUUUUAUAGAGCANN	1.184

ES 2 543 004 T3

Hebra	Posición	Secuencia (5' a 3')	SEC ID N°	Secuencia con 3' dinucleotide overhang (5' a 3')	SEC ID N°
t	532	CAGUGUUCUUGCUCUAUAA	1.133	CAGUGUUCUUGCUCUAUAANN	1.185
c	550	UUAUAGAGCAAGAACACUG	1.134	UUAUAGAGCAAGAACACUGNN	1.186
t	542	GCUCUAUAAACCGUGUUAG	1.135	GCUCUAUAAACCGUGUUAGNN	1.187
c	560	CUAACACGGUUUUAUAGAGC	1.136	CUAACACGGUUUUAUAGAGCNN	1.188
t	134	CCUGGAUGCUGUCCGAGGC	1.137	CCUGGAUGCUGUCCGAGGCNN	1.189
c	152	GCCUCGGACAGCAUCCAGG	1.138	GCCUCGGACAGCAUCCAGGNN	1.190
t	119	UCUGAUGGUCAAAGUCCUG	1.139	UCUGAUGGUCAAAGUCCUGNN	1.191
c	137	CAGGACUUUGACCAUCAGA	1.140	CAGGACUUUGACCAUCAGANN	1.192
t	241	CUGGAGAGCUGCACGGGCU	1.141	CUGGAGAGCUGCACGGGCUNN	1.193
c	259	AGCCCGUGCAGCUCUCCAG	1.142	AGCCCGUGCAGCUCUCCAGNN	1.194
t	544	UCUAUAAACCGUGUUAGCA	1.143	UCUAUAAACCGUGUUAGCANN	1.195
c	562	UGCUAACACGGUUUUAUAGA	1.144	UGCUAACACGGUUUUAUAGANN	1.196
t	530	AACAGUGUUCUUGCUCUAU	1.145	AACAGUGUUCUUGCUCUAUNN	1.197
c	548	AUAGAGCAAGAACACUGUU	1.146	AUAGAGCAAGAACACUGUUNN	1.198
t	118	CUCUGAUGGUCAAAGUCCU	1.147	CUCUGAUGGUCAAAGUCCUNN	1.199
c	136	AGGACUUUGACCAUCAGAG	1.148	AGGACUUUGACCAUCAGAGNN	1.200
t	140	UGCUGUCCGAGGCAGCCCU	1.149	UGCUGUCCGAGGCAGCCUNN	1.201
c	158	AGGGCUGCCUCGGACAGCA	1.150	AGGGCUGCCUCGGACAGCANN	1.202
t	239	GUCUGGAGAGCUGCACGGG	1.151	GUCUGGAGAGCUGCACGGGNN	1.203
c	257	CCCGUGCAGCUCUCCAGAC	1.152	CCCGUGCAGCUCUCCAGCNN	1.204
t	531	ACAGUGUUCUUGCUCUAUA	1.153	ACAGUGUUCUUGCUCUAUANN	1.205
c	549	UAUAGAGCAAGAACACUGU	1.154	UAUAGAGCAAGAACACUGUNN	1.206
t	117	CCUCUGAUGGUCAAAGUCC	1.155	CCUCUGAUGGUCAAAGUCCNN	1.207
c	135	GGACUUUGACCAUCAGAGG	1.156	GGACUUUGACCAUCAGAGGNN	1.208
t	131	AGUCCUGGAUGCUGUCCGA	1.157	AGUCCUGGAUGCUGUCCGANN	1.209
c	149	UCGGACAGCAUCCAGGACU	1.158	UCGGACAGCAUCCAGGACUNN	1.210

ES 2 543 004 T3

Hebra	Posición	Secuencia (5' a 3')	SEC ID N°	Secuencia con 3' dinucleotide overhang (5' a 3')	SEC ID N°
t	217	UUGCCUCUGGGAAGACCGC	1.159	UUGCCUCUGGGAAGACCGCNN	1.211
c	235	GCGGUCUUCCCAGAGGCAA	1.160	GCGGUCUUCCCAGAGGCAANN	1.212
t	242	UGGAGAGCUGCACGGGCUC	1.161	UGGAGAGCUGCACGGGCUCNN	1.213
c	260	GAGCCCGUGCAGCUCUCCA	1.162	GAGCCCGUGCAGC UCUCANN	1.214
t	244	GAGAGCUGCACGGGCUCAC	1.163	GAGAGCUGCACGGGCUCACNN	1.215
c	262	GUGAGCCCGUGCAGCUCUC	1.164	GUGAGCCCGUGCAGCUCUCNN	1.216
t	246	GAGCUGCACGGGCUCACCA	1.165	GAGCUGCACGGGCUCACCANN	1.217
c	264	UGGUGAGCCCGUGCAGCUC	1.166	UGGUGAGCCCGUGCAGCUCNN	1.218
t	399	UACACCAUCGCAGCCUGC	1.167	UACACCAUCGCAGCCUGNN	1.219
c	417	GCAGGGCUGCGAUGGUGUA	1.168	GCAGGGCUGCGAUGGUGUANN	1.220
t	132	GUCCUGGAUGCUGUCCGAG	1.169	GUCCUGGAUGCUGUCCGAGNN	1.221
c	150	CUCGGACAGCAUCCAGGAC	1.170	CUCGGACAGCAUCCAGGACNN	1.222
t	245	AGAGCUGCACGGGCUCACC	1.171	AGAGCUGCACGGGCUCACCNN	1.223
c	263	GGUGAGCCCGUGCAGCUCU	1.172	GGUGAGCCCGUGCAGCUCUNN	1.224

Tabla 6B. Secuencias de hebra transcrita y complementaria para los ARNs de TTR de rata.

Hebra: t= transcrita; c= complementaria; Posición: posición de base 5' en transcripción (NM_012681.1, SEC ID N° 1.330)

Hebra	Posición	Secuencia con saliente 3'desoxitimidina (5' a 3')	SEC ID N°
t	115	GUCCUCUGAUGGUCAAAGUdTdT	1.225
c	133	ACUUUGACCAUCAGAGGACdTdT	1.226
t	537	UUCUJGCUCUAUAAACCGUdTdT	1.227
c	555	ACGGUUUAUAGAGCAAGAAdTdT	1.228
t	543	CUCUAUAAACCGUGUUAGCdTdT	1.229
c	561	GCUAACACGGUUUAUAGAGdTdT	1.230
t	392	UCGCCACUACACCAUCGCAdTdT	1.231
c	410	UGCGAUGGUGUAGUGGCGAdTdT	1.232

ES 2 543 004 T3

Hebra	Posición	Secuencia con saliente 3'desoxitimidina (5' a 3')	SEC ID N°
t	538	UCUUGCUCUAUAAACCGUGdTdT	1.233
c	556	CACGGUUUAUAGAGCAAGAdTdT	1.234
t	541	UGCUCUAUAAACCGUGUAdTdT	1.235
c	559	UAACACGGUUUAUAGAGCAdTdT	1.236
t	532	CAGUGUUCUUGCUCUAUAAdTdT	1.237
c	550	UUAUAGAGCAAGAACACUGdTdT	1.238
t	542	GCUCUAUAAACCGUGUAGdTdT	1.239
c	560	CUAACACGGUUUAUAGAGCdTdT	1.240
t	134	CCUGGAUGCUGUCCGAGGCdTdT	1.241
c	152	GCCUCGGACAGCAUCCAGGdTdT	1.242
t	119	UCUGAUGGUCAAAGUCCUGdTdT	1.243
c	137	CAGGACUUUGACCAUCAGAdTdT	1.244
t	241	CUGGAGAGCUGCACGGGCUdTdT	1.245
c	259	AGCCCGUGCAGCUCUCCAGdTdT	1.246
t	544	UCUAUAAACCGUGUAGCAdTdT	1.247
c	562	UGCUAACACGGUUUAUAGAdTdT	1.248
t	530	AACAGUGUUCUUGCUCUAUdTdT	1.249
c	548	AUAGAGCAAGAACACUGUdTdT	1.250
t	118	CUCUGAUGGUCAAAGUCCUdTdT	1.251
c	136	AGGACUUUGACCAUCAGAGdTdT	1.252
t	140	UGCUGUCCGAGGCAGCCCUdTdT	1.253
c	158	AGGGCUGCCUCGGACAGCAdTdT	1.254
t	239	GUCUGGAGAGCUGCACGGGdTdT	1.255
c	257	CCCGUGCAGCUCUCCAGACdTdT	1.256
t	531	ACAGUGUUCUUGCUCUAUAdTdT	1.257
c	549	UAUAGAGCAAGAACACUGUdTdT	1.258

ES 2 543 004 T3

Hebra	Posición	Secuencia con saliente 3'desoxitimidina (5' a 3')	SEC ID N°
t	117	CCUCUGAUGGUCAAAGUCCdTdT	1.259
c	135	GGACUUUGACCAUCAGAGGdTdT	1.260
t	131	AGUCCUGGAUGCUGUCCGAdTdT	1.261
c	149	UCGGACAGCAUCCAGGACUdTdT	1.262
t	217	UUGCCUCUGGGAAGACCGCdTdT	1.263
c	235	GCGGUCUUCCCAGAGGCAAdTdT	1.264
t	242	UGGAGAGCUGCACGGGCUCdTdT	1.265
c	260	GAGCCCGUGCAGCUCUCCAdTdT	1.266
t	244	GAGAGCUGCACGGGCUCACdTdT	1.267
c	262	GUGAGCCCGUGCAGCUCUCdTdT	1.268
t	246	GAGCUGCACGGGCUCACCAdTdT	1.269
c	264	UGGUGAGCCCGUGCAGCUCdTdT	1.270
t	399	UACACCAUCGCAGCCUGCdTdT	1.271
c	417	GCAGGGCUGCGAUGGUGUAdTdT	1.272
t	132	GUCCUGGAUGCUGUCCGAGdTdT	1.273
c	150	CUCGGACAGCAUCCAGGACdTdT	1.274
t	245	AGAGCUGCACGGGCUCACCDdTdT	1.275
c	263	GGUGAGCCCGUGCAGCUCUdTdT	1.276

Tabla 7. Secuencias de hebra transcrita y complementaria químicamente modificadas para los ARNs de TTR de rata.

5 Véase la Tabla 5 para dúplex # (nombre ARNs). Hebra: t= transcrita; c= complementaria; Posición: posición de base 5' en transcripción (NM_012681.1, SEC ID N° 1.330)

Hebra	Oligo #	Posición	Secuencia (5' a 3')	SEC ID N°
t	A-32159	115	GuccucuGAuGGucAAAGudTdT	1.277
c	A-32160	133	ACUUUGACcAUcAGAGGACdTdT	1.278
t	A-32745	537	uucuuGcucuAuAAAccGudTdT	1.279
c	A-32746	555	ACGGUUuAuAGAGcAAGAAdTdT	1.280

ES 2 543 004 T3

Hebra	Oligo #	Posición	Secuencia (5' a 3')	SEC ID Nº
t	A-32747	543	cucuAuAAAaccGuGuuAGcdTdT	1.281
c	A-32748	561	GCuAAcACGGUuAuAGAGdTdT	1.282
t	A-32749	392	ucGccAcuAcAccAucGcAdTdT	1.283
c	A-32750	410	UGCGAUGGUGuAGUGGCGAdTdT	1.284
t	A-32751	538	ucuuGcucuAuAAAaccGuGdTdT	1.285
c	A-32752	556	cACGGUuAuAGAGcAAGAdTdT	1.286
t	A-32753	541	uGcucuAuAAAaccGuGuuAdTdT	1.287
c	A-32754	559	uAAcACGGUuAuAGAGcAdTdT	1.288
t	A-32755	532	cAGuGuucuuGcucuAuAAdTdT	1.289
c	A-32756	550	UuAuAGAGcAAGAAcACUGdTdT	1.290
t	A-32757	542	GcucuAuAAAaccGuGuuAGdTdT	1.291
c	A-32758	560	CuAAcACGGUuAuAGAGCdTdT	1.292
t	A-32759	134	ccuGGAuGcuGuccGAGGcdTdT	1.293
c	A-32760	152	GCCUCGGAcAGcAUCcAGGdTdT	1.294
t	A-32761	119	ucuGAuGGucAAAGuccuGdTdT	1.295
c	A-32762	137	cAGGACUUUGACcAUCAGAdTdT	1.296
t	A-32763	241	cuGGAGAGcuGcAcGGGcudTdT	1.297
c	A-32764	259	AGCCCGUGcAGCUCUCcAGdTdT	1.298
t	A-32765	544	ucuAuAAAaccGuGuuAGcAdTdT	1.299
c	A-32766	562	UGCuAAcACGGUuAuAGAdTdT	1.300
t	A-32767	530	AAcAGuGuucuuGcucuAudTdT	1.301
c	A-32768	548	AuAGAGcAAGAAcACUGUuTdTdT	1.302
t	A-32769	118	cucuGAuGGucAAAGuccudTdT	1.303
c	A-32770	136	AGGACUUUGACcAUCAGAGdTdT	1.304
t	A-32771	140	uGcuGuccGAGGcAGcccudTdT	1.305
c	A-32772	158	AGGGCUGCCUCGGAcAGcAdTdT	1.306

ES 2 543 004 T3

Hebra	Oligo #	Posición	Secuencia (5' a 3')	SEC ID N°
t	A-32773	239	GucuGGAGAGcuGcAcGGGdTdT	1.307
c	A-32774	257	CCCGUGcAGCUCUCcAGACdTdT	1.308
t	A-32775	531	AcAGuGuucuuGcucuAuAdTdT	1.309
c	A-32776	549	uAuAGAGcAAGAAcACUGUdTdT	1.310
t	A-32777	117	ccucuGAuGGucAAAGuccdTdT	1.311
c	A-32778	135	GGACUUUGACcAUcAGAGGdTdT	1.312
t	A-32779	131	AGuccuGGAuGcuGuccGAdTdT	1.313
c	A-32780	149	UCGGAcAGcAUCcAGGACUdTdT	1.314
t	A-32781	217	uuGccucuGGGAAGAccGcdTdT	1.315
c	A-32782	235	GCGGUCUJCCcAGAGGcAAdTdT	1.316
t	A-32783	242	uGGAGAGcuGcAcGGGcucdTdT	1.317
c	A-32784	260	GAGCCCGUGcAGCUCUCcAdTdT	1.318
t	A-32785	244	GAGAGcuGcAcGGGcucAcdTdT	1.319
c	A-32786	262	GUGAGCCCGUGcAGCUCUCdTdT	1.320
t	A-32787	246	GAGcuGcAcGGGcucAccAdTdT	1.321
c	A-32788	264	UGGUGAGCCCGUGcAGCUCdTdT	1.322
t	A-32791	399	uAcAccAucGcAGcccuGcdTdT	1.323
c	A-32792	417	GcAGGGCUGCGAUGGUGuAdTdT	1.324
t	A-32793	132	GuccuGGAuGcuGuccGAGdTdT	1.325
c	A-32794	150	CUCGGAcAGcAUCcAGGACdTdT	1.326
t	A-32795	245	AGAGcuGcAcGGGcucAccdTdT	1.327
c	A-32796	263	GGUGAGCCCGUGcAGCUCUdTdT	1.328

Síntesis de secuencias de TTR.

Se sintetizaron secuencias de TTR en un sintetizador MerMade 192 en escala de 1 µmol. Para todas las secuencias en la lista, se aplicó la química 'endlight' como se detalla continuación.

- 5
- Todas las pirimidinas (citosina y uridina) en la hebra transcrita fueron reemplazadas con correspondientes 2'-O-Metil-bases (2' O-Metil C y 2'-O-Metil U).
 - En la hebra complementaria, las pirimidinas adyacentes a (hacia la posición 5') ribo A nucleósido fueron

reemplazadas con sus correspondientes 2-O-Metil-nucleósidos.

- Se introdujo una extensión dTdT de dos bases en el extremo 3' de ambas secuencias transcrita y complementaria.
- La fila de la secuencia se convirtió en una fila de texto para hacerla compatible para carga en el programa informático de síntesis MerMade 192.

La síntesis de secuencias TTR usó síntesis de oligonucleótidos soportados en sólido usando la química de la fosforamidita. La síntesis de las secuencias anteriores se realizó en escala 1 um en placas de 96 pozos. Las disoluciones de amidita se prepararon a concentración 0,1 M y se usó etiltiotetrazol (0,6 M en acetonitrilo) como activador.

Las secuencias sintetizadas se escindieron y se desprotegeron en placas de 96 pozos, usando metilamina en la primera etapa y trietilamina. 3HF en la segunda etapa. Las secuencias brutas así obtenida se precipitaron usando mezcla de acetona: etanol y el botón se volvió a suspender en tampón de acetato de sodio 0,5 M. Se analizaron las muestras de cada secuencia por LC-MS y los datos de masa resultantes confirmaron la identidad de las secuencias. También se analizó una serie seleccionada de muestras por cromatografía IEX.

La siguiente etapa en el procedimiento fue la purificación. Todas las secuencias se purificaron en un sistema de purificación AKTA explorer usando una columna Source 15Q. Se recogió un único pico correspondiente a la secuencia de longitud completa en el eluyente y se analizó con posterioridad la pureza por cromatografía de intercambio iónico.

Se desalaron las secuencias purificadas en una columna Sephadex G25 usando purificador AKTA. Se analizó la concentración y la pureza en las secuencias de TTR desaladas. Después se hibridaron las hebras solas para formar ARNds-TTR.

Ejemplo 2B: Identificación sistemática in vitro de los ARNsi de TTR para supresión de ARNm.

Se ensayó en los ARNds que fijan como objetivo TTR humano (Tabla 2) la inhibición de expresión de TTR endógena en células HepG2 y Hep3B, usando ensayos de qPCR (PCR en tiempo real) y ADNb (ADN ramificado) para cuantificar ARNm de TTR. Se sintetizó ARNds que fija como objetivo TTR de roedores (Tabla 5) y se ensayó la inhibición de expresión de TTR endógena usando ensayos de ADNb en células H.4.II.E. Se usaron los resultados de los ensayos de dosis única para seleccionar una subserie de dúplex de ARNds de TTR para experimentos de respuesta a la dosis para calcular los IC50. Se usaron los resultados de IC50 para seleccionar los ARNds de TTR para ensayo adicional.

Cultivo celular y transinfecciones:

Se cultivaron células de estirpes celulares de hepatocitos HepG2, Hep3B y H.4.II.E (ATCC, Manassas, VA) a cerca de confluencia a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5% en medio Eagle modificado de Dulbecco (ATCC) enriquecido con FBS al 10%, estreptomycin y glutamina (ATCC) antes de liberarse de la placa por tripsinización. También se cultivaron células H.4.II.E en medio esencial mínimo de Earle. Se llevó a cabo transinfección inversa por adición de 5 µl de Opti-MEM a 5 µl de dúplex de ARNsi por pozo en una placa de 96 pozos junto con 10 µl de Opti-MEM más 0,2 µl de Lipofectamine RNAiMax por pozo (Invitrogen, Carlsbad CA. cat # 13778-150) y se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos. Después se añadieron 80 µl de medio de crecimiento completo con antibióticos que contenían 4x10⁴ células (HepG2), 2x10⁴ (Hep3B) o 2x10⁴ (H.4.II.E). Se incubaron las células durante 24 horas previamente a purificación de ARN. Se realizaron experimentos de dosis única a concentración de dúplex final 10 nM y se realizaron experimentos de respuesta a la dosis con 10; 1; 0,5; 0,1; 0,05; 0,01; 0,005; 0,001; 0,0005; 0,0001; 0,00005; 0,00001 nM.

Aislamiento de ARN total usando Estuche de Aislamiento de ARN Total MagMAX-96 (Applied Biosystems, Foster City CA, parte #: AM 1.830):

Se recogieron células y se lisaron en 140 µl de disolución de Lisis/Unión después se mezclaron durante 1 minuto a 89 rad/s (850 rpm) usando un Eppendorf Thermomixer (la velocidad de mezclamiento fue la misma durante todo el procedimiento). Se añadieron veinte microlitros de perlas magnéticas al lisado de células y se mezcló durante 5 minutos. Se capturaron perlas magnéticas usando soporte magnético y se eliminó el sobrenadante sin alterar a las perlas. Después de eliminar el sobrenadante, se lavaron las perlas magnéticas con Disolución de Lavado 1 (isopropanol añadido) y se mezcló durante 1 minuto. Se capturaron las perlas de nuevo y se eliminó el sobrenadante. Después se lavaron las perlas con 150 µl de Disolución de Lavado 2 (Etanol añadido), se capturó y eliminó el sobrenadante. Después se añadieron 50 µl de mezcla de DNasa (tampón de DNasa MagMax turbo y DNasa Turbo) a las perlas y se mezclaron durante 10 a 15 minutos. Después de mezclamiento, se añadieron 100 µl de Disolución de Unión de Nuevo de ARN y se mezclaron durante 3 minutos. Se retiró el sobrenadante y se lavaron las perlas magnéticas de nuevo con 150 µl de Disolución de Lavado 2 y se mezclaron durante 1 minuto y se eliminó completamente el sobrenadante. Se mezclaron las perlas magnéticas durante 2 minutos a sequedad antes de que se eluyera ARN con 50 µl de agua.

Síntesis de ADNc usando estuche de transcripción inversa de ADNc de alta capacidad AB1 (Applied Biosystems, Foster City, CA, Cat #4368813):

5 Se añadió una mezcla patrón de 2 µl de Tampón x10, 0,8 µl de dNTP x25, 2 µl de cebadores Aleatorios, 1 µl de Transcriptasa Inversa, 1 µl de inhibidor de RNasa y 3,2 µl de H₂O por reacción a 10 µl de ARN total. Se generó ADNc usando un termociclador Bio-Rad C-1000 o S-1000 (Hercules, CA) por las siguientes etapas: 25°C 10 min, 37°C 120 min, 85°C 5 s, mantenido a 4°C.

PCR de tiempo real:

10 Se añadieron 2 µl de ADNc a un mezclador maestro de 1 µl de Sonda 18S TaqMan (Applied Biosystems Cat # 4319413E), 1 µl de sonda TaqMan de TTR (Applied Biosystems cat # HS00174914 M1) y 10 µl de Mezcla Maestra de PCR TaqMan Universal (Applied Biosystems Cat #4324018) por pozo en una placa de 96 pozos MicroAmp Optical (Applied Biosystems cat # 4326659). Se realizó PCR en tiempo real en un sistema de PCR en tiempo real ABI 7000 Prism o uno ABI 7900HT (Applied Biosystems) usando el ensayo $\Delta\Delta$ Ct(RQ). Todas las reacciones se realizaron por triplicado.

15 Se analizaron los datos en tiempo real usando el método $\Delta\Delta$ Ct y se normalizaron a ensayos realizados a partir de células transfectadas con Oligo fluorescente BlockIT 10 nM (Invitrogen Cat # 2013) o AD-1955 10 nM (un dúplex de control que fija como objetivo el gen de luciferasa no de mamífero) para calcular el cambio de plegamiento.

Ensayos de ADN ramificado-QuantiGene 1.0 (Panomics, Fremont, CA. cat #: QG0004)-Usado para identificar sistemáticamente duplex específicos de roedores.

20 Se transfectaron células H.4.II.E (ATCC) con ARNsi 10 nM. Después de eliminar el medio, se lisaron H.4.II.E en 100 µl de mezcla de Lisis Diluida (una mezcla de 1 volumen de mezcla de Lisis, 2 volúmenes de agua exenta de nucleasa y 10 µl de Proteinasa-K por ml para la concentración final de 20 mg/ml) después se incubaron a 65°C durante 35 minutos. Después, se añadieron 80 µl Conjunto de Sondas de Trabajo (una mezcla de sonda de TTR o GAPDH) y se añadieron 20 µl de lisado de células a la Placa de Captura. Se incubaron las Placas de Captura a 53°C \pm 1°C durante la noche (aproximadamente 16-20 h). Se lavaron las Placas de Captura 3 veces con Tampón de Lavado x1 (una mezcla de agua exenta de nucleasa, Componente de Tampón 1 y Componente de Tampón de Lavado 2), se secó después por centrifugación durante 1 minuto a 105 rad/s (1.000 rpm). Se añadieron 100 µl de Reactivo de Trabajo Multiplicador a la Placa de Captura, que se selló después y se incubó durante 1 h a 46°C \pm 1°C. Se repitieron las etapas de lavado y secado durante 1 hora de incubación y se añadieron 100 µl de reactivo de disolución de Etiquetado. Se lavó después la placa, se secó y se añadieron 100 µl de sustrato (una mezcla de laurilsulfato de litio y disolución de Sustrato). Se pusieron las Placas de Captura en la incubadora durante 30 minutos a 46°C \pm 1°C. Se retiraron después las Placas de Captura de la incubadora y se incubaron a temperatura ambiente durante 30 minutos. Finalmente, se leyeron las Placas de Captura usando el Luminómetro Victor (Perkin Elmer, Waltham, MA).

35 Ensayos de ADN ramificado-QuantiGene 2.0 (Panomics cat #: QS0011): Usado para identificar sistemáticamente todos los demás duplex.

40 Después de una incubación de 24 horas a la dosis o las dosis establecidas, se retiraron los medios y se lisaron las células en 100 µl de Mezcla de Lisis (1 volumen de mezcla de lisis, 2 volúmenes de agua exenta de nucleasa y 10 µl de Proteinasa-K/ml para una concentración final de 20 mg/ml) se incubaron después a 65°C durante 35 minutos. Después se añadieron 20 µl de Conjunto de Sondas de Trabajo (sonda de TTR para fijar como objetivo genes y GAPDH para control endógeno) y se añadieron después 80 µl de lisado de células a las Placas de Captura. Las Placas de Captura se incubaron a 55°C \pm 1°C (aprox. 16-20 h). Al día siguiente, se lavaron las Placas de Captura 3 veces con Tampón de Lavado x1 (agua exenta de nucleasa, Componente de Tampón 1 y Componente de Tampón de Lavado 2), después se secó por centrifugación durante 1 minuto a 240 g. Se añadieron 100 µl de Reactivo de Trabajo pre-Multiplicador a las Placas de Captura, que se sellaron con hoja de aluminio y se incubaron durante 1 hora a 55°C \pm 1°C. Después de una incubación de 1 hora, se repitió la etapa de lavado, después se añadieron 100 µl de Reactivo de Trabajo Multiplicador. Después de 1 hora, se repitieron las etapas de lavado y secado y se añadieron 100 µl de sonda de Etiquetado. Se incubaron las placas de captura 50°C \pm 1°C durante 1 hora. Después se lavaron las placas con Tampón de lavado x1 y se secaron y después se añadieron 100 µl de Sustrato a las Placas de Captura. Se leyeron las Placas de Captura usando el Luminómetro SpectraMax (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) después de 5 a 15 minutos de incubación.

Análisis de datos de ADNb:

Se analizaron los datos de ADNb por (i) sustracción del fondo medio de cada muestra por triplicado, (ii) promedio de los valores de GAPDH (sonda de control) y TTR (sonda experimental) por triplicado resultantes y después (iii) tomando la relación: (sonda experimental-fondo)/(sonda de control-fondo).

55 Resultados

Se presenta un resumen de los resultados de la dosis única e IC50 para ARNs - TTR (ARNsi de la TTR) a

continuación en la Tabla 8. Los resultados de la dosis única se expresan como % de ARNm de la TTR respecto al control, ensayado en células HepG2. Se determinaron los IC50 en células HepG2 y/o Hep3B, como se indicó.

Tabla 8. Resultados de dosis única e IC50 de identificaciones sistemáticas *in vitro* de los ARNsi de la TTR.

ND: no datos; * indica resultados que representan promedio de dos experimentos.

Dúplex #	Dosis Única a 10 nM % relativo a control		IC50 (nM)			
	HepG2		HepG2		Hep3B	
	qPCR	ADNb	qPCR	ADNb	qPCR	ADNb
AD-18243	50,35	141,53	ND	ND	ND	ND
AD-18244	64,26	158,55	ND	ND	ND	ND
AD-18245	56,89	107,22	ND	ND	ND	ND
AD-18246	10,53	32,51 *	0,265	0,086	ND	ND
AD-18247	125,56	69,57	ND	ND	ND	ND
AD-18248	127,78	66,97	ND	ND	ND	ND
AD-18249	48,77	48,76	ND	ND	ND	ND
AD-18250	96,94	86,42	ND	ND	ND	ND
AD-18251	170,41	129,15	ND	ND	ND	ND
AD-18252	73,52	81,90	ND	ND	ND	ND
AD-18253	25,25	61,25	ND	ND	ND	ND
AD-18254	95,13	103,96	ND	ND	ND	ND
AD-18255	119,46	ND	ND	ND	ND	ND
AD-18256	42,64	95,67	ND	ND	ND	ND
AD-18257	146,25	141,75	ND	ND	ND	ND
AD-18258	10,20	13,41*	0,007	0,005	0,004	0,005
AD-18259	9,30	20,91 *	0,102	0,005	ND	ND
AD-18260	125,37	81,36	ND	ND	ND	ND
AD-18261	14,27	19,40*	0,210	ND	ND	ND
AD-18262	84,95	104,05	ND	ND	ND	ND
AD-18263	16,32	23,25*	0,110	ND	ND	ND
AD-18264	104,18	83,69	ND	ND	ND	ND

ES 2 543 004 T3

Dúplex #	Dosis Única a 10 nM % relativo a control		IC50 (nM)			
	HepG2		HepG2		Hep3B	
	qPCR	ADNb	qPCR	ADNb	qPCR	ADNb
AD-18265	41,62	64,87	ND	ND	ND	ND
AD-18266	39,98	110,53	ND	ND	ND	ND
AD-18267	149,64	ND	ND	ND	ND	ND
AD-18268	152,93	174,04	ND	ND	ND	ND
AD-18269	37,27	92,28	ND	ND	ND	ND
AD-18270	99,44	164,75	ND	ND	ND	ND
AD-18271	18,89	28,33*	0,503	0,004	ND	ND
AD-18272	128,32	132,58	ND	ND	ND	ND
AD-18273	115,78	201,95	ND	ND	ND	ND
AD-18274	8,97	20,04*	0,009	0,176	0,036	0,012
AD-18275	4,09	22,25*	0,026	0,118	ND	ND
AD-18276	19,73	45,22*	0,198	0,677	ND	ND
AD-18277	10,55	26,31*	0,121	0,426	ND	ND
AD-18278	108,86	116,26	ND	ND	ND	ND
AD-18279	66,59	ND	ND	ND	ND	ND
AD-18280	103,26	170,52	ND	ND	ND	ND
AD-18281	87,98	123,88	ND	ND	ND	ND
AD-18282	82,47	140,32	ND	ND	ND	ND
AD-18283	106,54	182,78	ND	ND	ND	ND
AD-18284	106,93	151,78	ND	ND	ND	ND
AD-18285	26,58	60,05*	ND	0,089	ND	ND
AD-18286	109,95	173,66	ND	ND	ND	ND
AD-18287	54,23	155,45	ND	ND	ND	ND
AD-18288	73,52	174,09	ND	ND	ND	ND

ES 2 543 004 T3

Dúplex #	Dosis Única a 10 nM % relativo a control		IC50 (nM)			
	HepG2		HepG2		Hep3B	
	qPCR	ADNb	qPCR	ADNb	qPCR	ADNb
AD-18289	103,36	174,76	ND	ND	ND	ND
AD-18290	17,06	52,04*	1,253	0,181	ND	ND
AD-18291	7,71	169,29*	1,304	0,019	ND	ND
AD-18292	7,51	210,03*	0,604	0,005	ND	ND
AD-18293	3,61	62,53*	0,078	0,003	ND	ND
AD-18294	111,53	107,56	ND	ND	ND	ND
AD-18295	115,88	105,37	ND	ND	ND	ND
AD-18296	57,03	38,03	ND	ND	ND	ND
AD-18297	87,69	73,87	ND	ND	ND	ND
AD-18298	10,39	7,25*	0,455	0,008	ND	ND
AD-18299	18,79	18,06*	0,895	0,014	ND	ND
AD-18300	108,70	ND	ND	ND	ND	ND
AD-18301	114,22	70,50	ND	ND	ND	ND
AD-18302	116,19	122,40	ND	ND	ND	ND
AD-18303	124,89	ND	ND	ND	ND	ND
AD-18304	132,99	89,54	ND	ND	ND	ND
AD-18305	153,10	ND	ND	ND	ND	ND
AD-18306	159,22	ND	ND	ND	ND	ND
AD-18307	116,83	84,57	ND	ND	ND	ND
AD-18308	156,72	87,80	ND	ND	ND	ND
AD-18309	113,22	101,97	ND	ND	ND	ND
AD-18310	132,33	ND	ND	ND	ND	ND
AD-18311	161,68	92,92	ND	ND	ND	ND
AD-18312	103,01	71,17	ND	ND	ND	ND

ES 2 543 004 T3

Dúplex #	Dosis Única a 10 nM % relativo a control		IC50 (nM)			
	HepG2		HepG2		Hep3B	
	qPCR	ADNb	qPCR	ADNb	qPCR	ADNb
AD-18313	120,65	53,26	ND	ND	ND	ND
AD-18314	116,33	ND	ND	ND	ND	ND
AD-18315	115,13	ND	ND	ND	ND	ND
AD-18316	118,73	122,34	ND	ND	ND	ND
AD-18317	114,03	121,10	ND	ND	ND	ND
AD-18318	80,85	122,57	ND	ND	ND	ND
AD-18319	119,14	148,87	ND	ND	ND	ND
AD-18320	22,86	55,43*	ND	0,023	0,403	ND
AD-18321	6,44	31,56*	0,001	0,033	ND	ND
AD-18322	54,21	100,46	ND	ND	ND	ND
AD-18323	6,37	28,71 *	0,005	0,023	ND	ND
AD-18324	2,53	15,98*	0,002	0,006	0,005	0,014
AD-18325	2,52	11,96*	0,001	0,016	ND	ND
AD-18326	18,34	43,16*	0,025	0,186	ND	ND
AD-18327	18,28	13,90*	0,044	0,215	ND	ND
AD-18328	4,53	26,04*	0,003	0,004	0,006	0,006
AD-18329	96,93	131,54	ND	ND	ND	ND
AD-18330	11,80	45,18*	0,0004	0,010	0,020	ND
AD-18331	117,77	163,07	ND	ND	ND	ND
AD-18332	11,53	35,09*	0,001	0,076	0,065	ND
AD-18333	12,24	46,94*	0,001	0,115	0,075	ND
AD-18334	16,27	55,28*	0,0004	0,181	1,071	ND
AD-18335	53,52	112,80	ND	ND	ND	ND
AD-18336	6,39	33,00*	0,001	0,112	0,081	ND

ES 2 543 004 T3

Dúplex #	Dosis Única a 10 nM % relativo a control		IC50 (nM)			
	HepG2		HepG2		Hep3B	
	qPCR	ADNb	qPCR	ADNb	qPCR	ADNb
AD-18337	51,77	105,33	ND	ND	ND	ND
AD-18338	48,21	102,86	ND	ND	ND	ND
AD-18339	6,48	26,56*	0,004	0,002	0,018	0,029
AD-18340	4,53	30,76*	0,002	0,002	ND	ND
AD-18341	31,27	100,41	ND	ND	ND	ND
AD-18342	7,60	42,89*	ND	0,016	0,076	ND
AD-18343	3,42	17,45*	ND	0,001	ND	ND
AD-18344	75,08	134,31	ND	ND	ND	ND
AD-18345	13,62	42,75*	0,002	0,013	ND	ND
AD-18346	59,25	121,10	ND	ND	ND	ND
AD-18347	91,23	139,54	ND	ND	ND	ND
AD-18348	89,95	159,29	ND	ND	ND	ND
AD-18349	108,01	144,96	ND	ND	ND	ND
AD-18350	123,65	125,87	ND	ND	ND	ND
AD-18351	108,36	104,02	ND	ND	ND	ND
AD-18352	87,82	128,72	ND	ND	ND	ND
AD-18353	14,40	65,77	0,012	0,027	ND	ND
AD-18354	99,27	123,53	ND	ND	ND	ND
AD-18355	135,04	150,88	ND	ND	ND	ND
AD-18356	100,76	178,96	ND	ND	ND	ND
AD-18357	125,30	162,85	ND	ND	ND	ND
AD-18358	103,15	136,01	ND	ND	ND	ND
AD-18359	34,74	140,48	ND	ND	ND	ND
AD-18360	103,86	146,86	ND	ND	ND	ND

Dúplex #	Dosis Única a 10 nM % relativo a control		IC50 (nM)			
	HepG2		HepG2		Hep3B	
	qPCR	ADNb	qPCR	ADNb	qPCR	ADNb
AD-18361	105,74	152,74	ND	ND	ND	ND
AD-18362	106,96	188,22	ND	ND	ND	ND
AD-18363	124,22	58,46	ND	ND	ND	ND
AD-18364	113,75	66,87	ND	ND	ND	ND
AD-18446	29,73	13,30	ND	ND	ND	ND
AD-18447	109,74	53,63	ND	ND	ND	ND
AD-18448	22,96	8,81	ND	ND	ND	ND
AD-18449	112,59	50,11	ND	ND	ND	ND
AD-18450	89,41	34,89	ND	ND	ND	ND
AD-18451	74,35	23,88	ND	ND	ND	ND
AD-18452	125,25	54,86	ND	ND	ND	ND
AD-18453	126,98	56,31	ND	ND	ND	ND
AD-18454	113,88	52,48	ND	ND	ND	ND
AD-18455	163,00	48,89	ND	ND	ND	ND
AD-18456	15,70	10,52	ND	ND	ND	ND
AD-18457	12,86	8,22	ND	ND	ND	ND
AD-18458	13,00	7,00	ND	ND	ND	ND
AD-18459	14,41	10,72	ND	ND	ND	ND
AD-18460	121,16	74,87	ND	ND	ND	ND
AD-18461	100,53	71,87	ND	ND	ND	ND
AD-18462	47,75	29,35	ND	ND	ND	ND
AD-18463	58,98	44,79	ND	ND	ND	ND

Los datos de respuesta a la dosis usados para identificar el IC50 para 5 ARNds-TTR (AD-18258, AD-18274, AD-18324, AD-18328 y AD-18339), se presentan con detalle a continuación en la Tabla 9. Se determinó que los 5 ARNsi tenían pM IC50. Los datos de IC50 para los ARNds en la Tabla 8 es un sumario de los datos presentados en la Tabla 9 a continuación.

Tabla 9. Datos de respuesta a la dosis para 5 ARNs –TTR.

		% inhibición relativa a control AD-1955													
Dúplex AD-18258		Dosis de dúplex (nM)													
Tipo célula	Método de detección	10	1	0,5	0,1	0,05	0,01	0,005	0,001	0,0005	0,0001	0,00005	0,00001	IC50 (nM)	
HepG2	qPCR	14,4	14,1	16,2	23,9	27,26	40,19	68,46	78,1	74,48	104,37	98,28	113,68	0,007	
HepG2	ADNb	14,3	14,5	11,1	12,8	18,82	19,77	51,21	56,03	63,63	58,35	43,64	51,05	0,005	
Hep3B	qPCR	11,9	8,62	12,4	16,4	28,35	30,49	58,36	54,57	81,26	89,43	81,85	101,87	0,004	
Hep3B	ADNb	7,65	7,5	11,3	12,6	28,85	27,89	64,57	73,48	72,03	91,44	86,71	89,31	0,005	
		% inhibición relativa a control AD-1955													
Dúplex AD-18274		Dosis de dúplex (nM)													
Tipo célula	Método de detección	10	1	0,5	0,1	0,05	0,01	0,005	0,001	0,0005	0,0001	0,00005	0,00001	IC50 (nM)	
HepG2	qPCR	6,68	8,45	11,7	24,2	42,08	49,89	56,95	62,99	64,47	54,92	67,39	72,67	0,009	
HepG2	ADNb	27,5	69	25,2	34,2	73,03	103,4	121,57	97,31	154,93	156,7	Nd	152,25	0,176	
Hep3B	qPCR	7,58	17	15,6	43,9	42,22	60,55	78,8	77,81	79,97	85,84	86,13	83,99	0,036	
Hep3B	ADNb	3,77	4,92	7,51	15	35,21	51,66	72,45	70,12	78,31	77,52	90,72	83,01	0,012	
		% inhibición relativa a control AD-1955													
Dúplex AD-18324		Dosis de dúplex (nM)													
Tipo célula	Método de detección	10	1	0,5	0,1	0,05	0,01	0,005	0,001	0,0005	0,0001	0,00005	0,00001	IC50 (nM)	
HepG2	qPCR	2,07	2,27	2,74	6,36	8,18	15,23	28,82	52,79	90,86	94,72	116,07	98,97	0,002	
HepG2	ADNb	14,5	7,88	11,8	15,9	17,2	46,44	40,4	91,86	0	95,57	0	52,15	0,006	
Hep3B	qPCR	2,07	3,48	5,76	16,2	18,73	44,54	49,77	68,88	63,48	76,61	74,7	77,83	0,005	
Hep3B	ADNb	3,48	3,8	5,15	15,2	30,84	55,36	74,75	99,39	88,89	110,83	96,55	110,26	0,014	

		% inhibición relativa a control AD-1955												
Dúplex AD-18328		Dosis de dúplex (nM)												
Tipo célula	Método de detección	10	1	0,5	0,1	0,05	0,01	0,005	0,001	0,0005	0,0001	0,00005	0,00001	IC50 (nM)
HepG2	qPCR	5,85	3,97	3,32	5,62	8	16,75	55,01	39,76	122,41	102,37	114,02	124,09	0,003
HepG2	ADNb	12,3	10,7	10,7	11,9	20,06	25	69,52	57,29	112,28	98,14	142,26	148,92	0,004
Hep3B	qPCR	3,17	5,52	11,7	13,8	27,68	39,58	61,21	61,87	90,51	87,56	106,03	108,72	0,006
Hep3B	ADNb	3,08	3,66	4,19	7,25	21,05	22,1	73,74	63,19	105,55	96,27	105,97	96,46	0,006
		% inhibición relativa a control AD-1955												
Dúplex AD-18339		Dosis de dúplex (nM)												
Tipo célula	Método de detección	10	1	0,5	0,1	0,05	0,01	0,005	0,001	0,0005	0,0001	0,00005	0,00001	IC50 (nM)
HepG2	qPCR	6,27	7,28	Nd	11	15,25	38,69	38,78	71,7	84,09	62,2	75,61	85,46	0,004
HepG2	ADNb	15,1	8,14	5,13	6,89	12,17	32,14	42,98	64,01	60,76	79,95	81,97	95,43	0,002
Hep3B	qPCR	8,3	9,47	13,2	34,5	44,54	77,38	81,04	81,41	93,95	81,04	75,61	78,28	0,018
Hep3B	ADNb	10,5	9,43	11,7	27,1	44,88	72,32	79,88	79,6	87,46	96,53	95,13	89,88	0,029

5 Un resumen de los resultados de dosis única para ARNs – TTR específico de roedores (ARNsi de TTR) se presenta a continuación en la Tabla 10. Los resultados de la dosis única se expresan como %ARNm de TTR relativo a control, ensayado en células H.4.II.E de rata, después de transinfección de ARNs de TTR específico de roedores a 10 nM. Estos resultados muestran que algunos ARNs de TTR específicos de roedores son eficaces en la supresión de ARNm de TTR de rata endógeno *in vitro*.

Table 10. Resultados de dosis única de detección sistemática *in vitro* de los ARNs-TTR específicos de roedores (ARNsi de TTR).

Dúplex #	% Relativo a control a 10 nM	Dúplex #	% Relativo a control a 10 nM
AD-18529	19,83	AD-18542	6,3
AD-18530	44,49	AD-18543	16,46
AD-18531	6,01	AD-18544	17,55
AD-18532	24,06	AD-18545	3,53
AD-18533	37,78	AD-18546	2,75

Dúplex #	% Relativo a control a 10 nM	Dúplex #	% Relativo a control a 10 nM
AD-18534	8,19	AD-18547	7,01
AD-18535	10,18	AD-18548	5,02
AD-18536	16,13	AD-18549	1,61
AD-18537	15,88	AD-18550	9,58
AD-18538	19,93	AD-18551	7,74
AD-18539	49,24	AD-18552	3,74
AD-18540	2,99	AD-18553	50,39
AD-18541	1,32	AD-18554	111,06

Ejemplo 3. Ensayo *in vitro* de ARNsi de TTR para inducción de TNF- α y secreción de IFN- α .

Para evaluar el potencial para inmunoestimulación, se ensayaron los ARNsi de TTR *in vitro* para inducción de TNF- α y secreción de IFN- α .

- 5 Se aislaron PBMC humanas de capas leucocíticas recién recogidas obtenidas de donadores sanos (Research Blood Components, Inc., Boston, MA) por centrifugación de densidad Ficoll-Hypaque estándar. Se sembraron células recién aisladas (1×10^5 /pozo/100 μ l) en placas de 96 pozos y se cultivaron en medio RPMI 1640 GlutaMax (Invitrogen) enriquecido con suero fetal bovino inactivado por calor al 10% y antibióticos/antimicótico al 1% (Invitrogen).
- 10 Se transfectaron los ARNsi en PBMC usando reactivo de transfección DOTAP (Roche Applied Science). Se diluyó primero el DOTAP en Opti-MEM (Invitrogen) durante 5 minutos antes de mezcla con un volumen igual de Opti-MEM que contenía el ARNsi. Se incubaron complejos de ARNsi/DOTAP como se especificó por las instrucciones del fabricante y se añadió con posterioridad a PBMC (50 μ l/pozo) que se cultivaron después durante 24 horas. Se incluyeron en todos los ensayos ARNsi de control positivo y negativo. Se usó AD-5048 como un ARNsi de control positivo. AD-5048 corresponde a una secuencia que fija como objetivo Apolipoproteína B humana (Soutschek *et al.*, 2.004) y provoca secreción de tanto IFN- α como TNF- α en este ensayo. AD-1955, que no provoca secreción de IFN- α y TNF- α en este ensayo, se usó como un ARNsi de control negativo. Se usaron todos los ARNsi a una concentración final de 133 nM. La relación de ARN a reactivo de transfección fue 16,5 pmoles por μ g de DOTAP.
- 15 Se detectaron y se cuantificaron las citocinas en sobrenadantes de cultivo con un estuche ELISA comercialmente disponible para IFN- α (BMS216INST) y TNF- α (BMS223INST), ambos de Bender MedSystems (Viena, Austria). La inducción de citocinas de ARNsi de TTR se expresa como porcentaje de IFN- α o TNF- α producido relativo al AD-5048 de ARNsi de control positivo.
- 20 Los resultados de estimulación de IFN- α y TNF- α para una serie de ARNsi de TTR se presentan en la FIG. 1 (media de pozos por cuadruplicado \pm SD) y a continuación en la Tabla 11 (porcentaje comparado con AD-5048). Ninguno de los ARNsi de TTR evaluado indujo secreción significativa de TNF- α o IFN- α mediante las PBMC humanas cultivadas.
- 25

Tabla 11. Resultados de estimulación de IFN- α y TNF- α para ARNsi de TTR.

Dúplex #	IFN- α (% de AD-5048)	TNF- α (% de AD-5048)
AD-18246	0	4
AD-18258	0	0
AD-18259	0	0

ES 2 543 004 T3

Dúplex #	IFN-α (% de AD-5048)	TNF-α (% de AD-5048)
AD-18261	0	0
AD-18263	0	0
AD-18271	0	0
AD-18274	2	1
AD-18275	0	0
AD-18276	0	0
AD-18277	0	0
AD-18285	0	0
AD-18290	0	0
AD-18291	0	0
AD-18292	0	0
AD-18293	0	0
AD-18298	0	0
AD-18299	0	0
AD-18320	0	0
AD-18321	0	0
AD-18323	0	0
AD-18324	0	0
AD-18325	0	0
AD-18326	0	0
AD-18327	0	0
AD-18328	0	0
AD-18330	0	0
AD-18332	1	0
AD-18333	0	1
AD-18334	0	1

Dúplex #	IFN- α (% de AD-5048)	TNF- α (% de AD-5048)
AD-18336	1	0
AD-18339	0	0
AD-18340	0	0
AD-18342	0	0
AD-18343	0	0
AD-18345	0	0
AD-18353	0	0
AD-18448	0	0
AD-18456	0	0
AD-18457	0	0
AD-18458	0	0
AD-18459	0	0

5 Se seleccionaron los cinco ARNs que fijan como objetivo TTR de plomo (ARNsi de TTR) basándose en los IC50s en el intervalo de pM en las estirpes celulares de hepatocitos humanos HepG2 y Hep3B, y la ausencia de actividad inmuoestimuladora. Los dúplex sin ningún desajuste es más probable que consigan precipitación significativa de las transcripciones fijadas como objetivo que los dúplex con desajustes entre el oligo y el ARNm. Para permitir mejor la interpretación de los datos de toxicología de especies cruzadas y para tener la aplicabilidad más amplia a pacientes humanos, se prefieren en general los dúplex que tienen una identidad del 100% en genes ortólogos de rata, mono cynomolgus y ser humano y que no fijan como objetivo regiones con polimorfismos conocidos. Se seleccionaron los 10 cincos compuestos de plomo basándose en IC50 en estirpes celulares de hepatocitos en el intervalo de pM, la ausencia de actividad inmuoestimuladora, especificidad de las transcripciones de TTR humanas y ausencia de polimorfismos conocidos (mutaciones) en la región del ARNm fijado como objetivo por el dúplex. En el caso de TTR, no se encontraron oligos de 19 bases con completa identidad en ser humano, rata y mono cynomolgus. Un resumen de estos datos se presenta en la Tabla 12, que también incluye información sobre mutaciones de TTR conocidas en la región fijada como objetivo por el dúplex y reactividad de especies cruzadas.

15 Tabla 12. Sumario de datos para los cinco ARNs de TTR más potentes.

Dúplex #	IC50 (qPCR): nM HepG2	IC50 (ADNb): nM HepG2	IFN α /TNF α	Mutaciones no cubiertas	Reactividad especies cruzadas
AD-18258	0,007	0,005	Negativo	Ninguna (región no codificadora)	Cyno: 1 desajuste @ posición 14 A a G Rata: no homología en ninguna posición
AD-18274	0,009	0,176	Negativo	Lys70Asn; Val71Ala; Ile73Val; Asp74His	Cyno: no desajuste Rata: no homología en ninguna posición
AD-18324	0,002	0,006	Negativo	Ninguna (región no	Cyno: no desajuste

Dúplex #	IC50 (qPCR): nM HepG2	IC50 (ADNb): nM HepG2	IFNa/TNFa	Mutaciones no cubiertas	Reactividad especies cruzadas
				codificadora)	Rata: no homología en ninguna posición
AD-18328	0,003	0,004	Negativo	Ninguna (región no codificadora)	Cyno: no desajuste
					Rata: 7 desajustes
AD-18339	0,004	0,002	Negativo	Ninguna (región no codificadora)	Ninguna

Ejemplo 4. Reducción *in vivo* de ARNm de TTR hepático y proteína TTR en plasma por LNP01-18324, LNP01-18328 y LNP01-18246 en ratones transgénicos.

5 Se eligieron dos ARNs de TTR, AD-18324 y AD-18328, para evaluación *in vivo*. Estos dúplex presentaron un silenciamiento dependiente de la dosis potente *in vitro* en estirpes celulares de hepatocitos (por ej., HepG2). La FIG. 2A y la FIG. 2B muestran las respuestas a la dosis en células HepG2 después de transfección con AD-18324 (FIG. 2A) o AD-18328 (FIG. 2B) donde se expresan las dosis en nM en el eje x y las respuestas se expresan como fracción ARNm de TTR restante respecto o al control, en el eje y. En las células HepG2, los IC50 de AD-18324 y AD-18328 se determinaron que eran 2 pM y 3 pM, respectivamente. Los sitios fijados como objetivo de TTR para ambos
10 candidatos de ARNs de plomo están en la región no traducida 3' del ARNm de la TTR, en una región donde en no han indicado mutaciones en la bibliografía.

Las secuencias de cada hebra de los dos candidatos de plomo se reproducen a continuación a partir de las Tablas. Hebra: t= transcrita; c= complementaria; Posición: posición de base 5' en la transcripción NM_000371.2.

Dúplex #	Hebra	Oligo #	Posición *	Secuencia 5' a 3'	SEC ID N°
AD-18324	t	A-32337	509	GGAAuucAuGuAAccAAGAdTdT	1.001
AD-18324	c	A-32338	527	UCUUGGUuAcAUGAAUCCdTdT	1.002
AD-18328	t	A-32345	518	GuAAccAAGAGuAuuccAudTdT	1.009
AD-18328	c	A-32346	536	AUGGAAuACUCUUGGUuACdTdT	1.010

15 Además, se eligió un ARNs de la TTR de reacción cruzada de roedores, AD-18246, para evaluación adicional *in vivo*. AD-18246 fija como objetivo una secuencia que comienza en la posición 88 del marco de lectura abierto, donde hay tres mutaciones indicadas en la bibliografía. Se muestra una curva de respuesta a la dosis para AD-18246 en células HepG2 en la FIG. 3. AD-18246 es sustancialmente menos potente que AD-18324 y AD-18328; el IC50 de AD-18246 se determinó que era 265 pM.

20 Se administraron AD-18324, AD-18328 y AD-18246 a ratones transgénicos después de formulación en LNP01. A ratones transgénicos H129-mTTR-KO/iNOS-KO/hTTR de 3-5 meses (inhibición de transtiretina de ratón/inhibición de óxido nítrico-sintasa inducible/transtiretina transgénica humana) se les administraron por vía intravenosa (IV) 200 µl de ARNs específico de transtiretina formulada de LNP01 (AD-18324, AD-18328 o AD-18246), ARNs de control formulado de LNP01 que fija como objetivo el gen de la luciferasa de no mamífero (AD-1955) o PBS vía la vena
25 caudal a concentraciones de 1,0 mg/kg, 3,0 mg/kg o 6,0 mg/kg para ARNs AD-18324 y AD-18328, 3,0 mg/kg para ARNs AD-18246 y 6,0 mg/kg para ARNs AD-1955. LNP01 es una formulación lipídica constituida por ND98, Colesterol y PEG-Ceramida C16.

Después de aproximadamente cuarenta horas, se anestesiaron los ratones con 200 µl de ketamina y después se sangraron cortando la arteria caudal derecha. Se aisló sangre completa y se aisló plasma y se almacenó a -80°C
30 hasta el ensayo. Se recogió tejido hepático, se ultracongeló y se almacenó a -80°C hasta el tratamiento.

Se evaluó la eficacia del tratamiento por (i) medición de ARNm de TTR en el hígado a las 48 horas postdosis y (ii) medición de proteína TTR en plasma en el presangrado y a las 48 horas postdosis. Se ensayaron los niveles de

ARNm hepático de la TTR utilizando los ensayos de ADN Ramificado -QuantiGene 2.0 (Panomics cat #: QS0011). En resumen, se molieron muestras hepáticas de ratón y se prepararon lisados de tejido. Se incubó la mezcla de lisis hepática (una mezcla de 1 volumen de mezcla de lisis, 2 volúmenes de agua exenta de nucleasa y 10 μ l de Proteinasa-K/ml para una concentración final de 20 mg/ml) a 65°C durante 35 minutos. Después se añadieron 20 μ l de Conjunto de Sondas de Trabajo (sonda de TTR para fijar como objetivo gen y GAPDH para control endógeno) y 80 μ l de lisado de tejido a la Placa de Captura. Las Placas de Captura se incubaron a 55 °C \pm 1 °C (aprox. 16-20 h). Al día siguiente, se lavó la Placa de Captura 3 veces con Tampón de Lavado x1 (agua exenta de nucleasa, Componente de Tampón 1 y Componente de Tampón de Lavado 2), después se secó por centrifugación durante 1 minuto a 240 g. Se añadieron 100 μ l de Reactivo de Trabajo preMultiplicador a la Placa de Captura, que se selló con hoja de aluminio y se incubó durante 1 hora a 55°C \pm 1°C. Después de 1 hora de incubación, se repitió la etapa de lavado, después se añadieron 100 μ l de Reactivo de Trabajo Multiplicador. Después de 1 hora, se repitieron las etapas de lavado y secado, y se añadieron 100 μ l de Sonda de Etiquetado. Se incubaron placas de captura 50 °C \pm 1 °C durante 1 hora. Después se lavó la placa con tampón de lavado x1, se secó y se añadieron 100 μ l de Sustrato a la Placa de Captura. Se leyeron las Placas de Captura usando el Luminómetro SpectraMax después de una incubación de 5 a 15 minutos. Se analizaron los datos de ADN por sustracción del fondo promedio de cada muestra por triplicado, promediando los valores de GAPDH (sonda de control) y TTR (sonda experimental) por triplicado resultantes y calculando después la relación: (sonda experimental-fondo)/(sonda de control-fondo).

Se ensayaron los niveles en plasma de la TTR utilizando el estuche comercialmente disponible "Estuche ELISA de Prealbúmina Humana AssayMax" (AssayPro, St. Charles, MO, Catálogo # EP3010-1) según las directrices del fabricante. En resumen, se diluyó el plasma de ratón 1:10.000 en diluyentes de mezcla x1 y se añadieron las placas precubiertas junto con patrones del estuche y se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente seguido por lavados x5 con tampón de lavado del estuche. Se añadieron cincuenta microlitros de anticuerpo de prealbúmina biotinilado a cada pozo y se incubó durante 1 h a temperatura ambiente, seguido por lavados x5 con tampón de lavado. Se añadieron cincuenta microlitros de conjugado de estreptavidina-peroxidasa a cada pozo y se incubaron las placas durante 30 minutos a temperatura ambiente seguido por lavado como se prescribió previamente. Se desarrolló la reacción por la adición de 50 μ l/pozo de sustrato de cromogen e incubación durante 10 minutos a temperatura ambiente con detención de la reacción por la adición de 50 μ l/pozo de disolución de detención. Se leyó la absorbancia a 450 nm en una lectora de microplacas Versamax (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) y se analizaron los datos utilizando el paquete de programas informáticos Softmax 4.6 (Molecular Devices).

Se encontró que LNP01-18324 y LNP01-18328 reducían los niveles de ARNm de TTR hepático (FIG. 4A) y proteína TTR en plasma (FIG. 4B) de una manera dependiente de la dosis con administración de bolo IV. Se determinó que el ED50 de ARNm de LNP01-18328 era \sim 1 mg/kg mientras se determinó que el ED50 de LNP01-18324 era \sim 2 mg/kg. Los efectos de LNP01-18324 y LNP01-18328 fueron específicos, debido a que el control, LNP01-1955 a 6 mg/kg, no afectaba significativamente a los niveles de ARNm de TTR hepático, cuando se compara con el grupo PBS. LNP01-18324 y LNP01-18328 redujeron los niveles de proteína TTR en plasma relativo al grupo PBS, con potencias que fueron similares a las de los niveles de ARNm de la TTR. A 3 mg/kg, LNP01-18246 redujeron los niveles de ARNm de TTR hepático en una extensión menor que 3 mg/kg de LNP01-18324 o LNP01-18328.

Estos resultados demuestran que LNP01-18324 y LNP1-18328, administrados por bolo IV, reducen sustancialmente el ARNm de TTR humano expresado por el hígado de ratón transgénico, que da como resultado reducción de la proteína TTR humana en la circulación.

Ejemplo 5. Reducción *in vivo* de ARNm de TTR natural en hígado de primate no humano por SNALP-18324 y SNALP-18328.

Para evaluar la eficacia de ARNsi de TTR AD-18324 y AD-18328 en primates no humanos sobre los niveles de ARNm de TTR hepático, se formularon los ARNsi en SNALP y se administraron por infusión intravenosa IV de 15 minutos. Se administró a monos cynomolgus (*Macaca fascicularis*) (2 a 5 kg, 3 animales por grupo) infusiones intravenosas IV de 15 minutos de SNALP-18324 (0,3; 1,0 ó 3,0 mg/kg), SNALP-18328 (0,3; 1 ó 3 mg/kg) o SNALP-1955 (3 mg/kg, con ARNsi de control negativo AD-1955 que fija como objetivo el gen luciferasa no mamífero). A las cuarenta y ocho horas postdosis, se anestesia de Hong los monos con pentobarbital sódico y se sangraron. El tejido hepático para determinación de ARNm de TTR se recogió, se ultracongeló y se almacenó a -80°C hasta tratamiento.

Se ensayaron los niveles de ARNm de TTR en el hígado utilizando un ensayo de y Ramificado diseñado de costumbre, utilizando la tecnología QuantiGene1.0. En resumen, se molieron muestras hepáticas de mono y se prepararon lisados de tejido. Se incubó la mezcla de lisis hepática (1 volumen de mezcla de lisis, 2 volúmenes de agua exenta de nucleasa y 10 μ l de Proteinasa-K/ml para una concentración final de 20 mg/ml) a 65°C durante 35 minutos. Después se añadieron 20 μ l de Conjunto de Sondas de Trabajo (sonda de TTR para fijar como objetivo gen y GAPDH para control endógeno) y 80 μ l de lisado de tejido a la Placa de Captura. Las Placas de Captura se incubaron a 55°C \pm 1°C (aprox. 16-20 h). Al día siguiente, se lavaron las Placas de Captura tres veces con Tampón de Lavado x1 (agua exenta de nucleasa, Componente de Tampón 1 y Componente de Tampón de Lavado 2), después se secó por centrifugación durante 1 minuto a 240 g. Se añadieron 100 μ l de Reactivo de Trabajo preMultiplicador a la Placa de Captura, que se selló con hoja de aluminio y se incubó durante 1 hora a 55°C \pm 1°C. Después de 1 hora de incubación, se repitió la etapa de lavado y después se añadieron 100 μ l de Reactivo de Trabajo Multiplicador. Después de 1 hora, se repitieron las etapas de lavado y secado y se añadieron 100 μ l de

Sonda de Etiquetado. Se incubaron las placas de captura 50 °C ±1 °C durante 1 hora. Después se lavaron las placas con Tampón de Lavado x1 y se secó y se añadieron después 100 µl de Sustrato a la Placa de Captura. Se leyeron las Placas de Captura usando el Luminómetro SpectraMax después de una incubación de 5 a 15 minutos. Se analizaron los datos de ADN_b por (i) sustracción del fondo promedio de cada muestra por triplicado, (ii) promediando los valores de GAPDH (sonda de control) y TTR (sonda experimental) y después (iii) tomando la relación: (sonda experimental-fondo)/(sonda de control-fondo).

Los resultados se muestran en la FIG. 5. SNALP-18324 y SNALP-18328 redujeron los niveles de ARNm de TTR en el hígado de una manera dependiente de la dosis, comparado con el SNALP-1955 de control negativo. Se determinó que los ED₅₀ de ARNm de SNALP-18328 y SNALP-18324 eran ~0,3 y ~ 1 mg/kg, respectivamente.

Estos resultados demuestran que SNALP-18324 y SNALP-18328 fueron eficaces para suprimir ARNm de TTR natural en hígado de primate no humano cuando se administró por infusión intravenosa IV.

Ejemplo 6. Reducción *in vivo* reducción de ARNm de TTR mutante (V30M) y proteína por SNALP-18328 en el ratón transgénico.

Para evaluar la eficacia de ARNsi de la TTR AD-18328 en ARNm de TTR mutante (V30M) en el hígado y proteína de TTR mutante (V30M) en el suero, se formuló AD-18328 en SNALP y se administra por bolo IV a ratones transgénicos V30M hTTR. Se administraron a ratones transgénicos V30M hTTR (5 animales/ grupo) de 8 a 12 semanas, por vía intravenosa (IV) 200 µl de SNALP-18328 (0,03; 0,3 ó 3 mg/kg), SNALP-1955 (3 mg/kg, con ARNsi AD-1955 de control negativo que fija como objetivo el gen de luciferasa de no mamífero) o PBS. Los ratones usados fueron la cepa *Mus musculus* H129-hTTR KO del Institute of Molecular and Cellular Biology, Porto, Portugal. En resumen se cruzaron ratones transgénicos hTTR H129 con ratones TTR KO endógenos H129 (cero ratones para generar los ratones transgénicos H129-hTTR, en un fondo de TTR de ratón nulo (Maeda, S., (2.003), Use of genetically altered mice to study the role of serum amyloid P component in amyloid deposition. *Amyloid Suppl.* 1, 17-20).

A las 48 horas postinyección, se proporcionó a los animales en los cinco grupos de tratamiento una dosis letal de ketamina/xilazina. Se recogieron muestras de suero y se almacenaron a -80 °C hasta análisis. Se recogió tejido hepático, se ultracongeló y se almacenó a -80 °C hasta tratamiento.

Para cuantificación de ARNm de TTR, se cultivó tejido hepático congelado en polvo y se prepararon lisados. Se determinaron los niveles de ARNm de TTR relativos a los de ARNm de GAPDH en los lisados usando un ensayo de ADN ramificado (QuantiGene Reagent System, Panomics, Fremont, CA). En resumen, se usó el ensayo QuantiGene (Genospectra) para cuantificar los niveles de ARNm en lisados de tejido de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El nivel medio de ARNm de TTR se normalizó al nivel medio de ARNm de GAPDH para cada muestra. Las medias del grupo de los valores normalizados se normalizaron después además al valor medio para el grupo tratado con PBS, para obtener el nivel relativo de expresión de ARNm de TTR.

Para cuantificación de proteínas TTR, se ensayo suero usando el Estuche ELISA de Prealbúmina Assaymax de AssayPro (St. Charles, MO) según el protocolo del fabricante.

Los resultados se muestran en la FIG. 6A y la FIG. 6B para ARNm hepático y proteína en suero, respectivamente. Ratones transgénicos V30M hTTR tratados con SNALP-18328 presentaban una disminución dependiente de la dosis y significativa en los niveles de ARNm de TTR hepáticos relativos al grupo de control PBS, logrando una reducción máxima de 97% ($p < 0,001$) a 3 mg/kg de SNALP-18328 y una reducción del 50% (ED₅₀) a ~ 0,15 mg/kg de SNALP-18328. También se suprimió la proteína TTR en suero de una manera dependiente de la dosis, con una reducción máxima de proteína TTR en suero de 99% ($p < 0,01$) (relativo a los niveles de predosis) a 3 mg/kg de SNALP-18328, consistente con la reducción en los niveles de ARNm de TTR. SNALP-1955 a 3 mg/kg no presentó un efecto estadísticamente significativo sobre los niveles de ARNm de TTR o proteína, comparado con PBS.

Estos resultados demuestran que SNALP-18328, cuando se administra IV, es activo en la supresión de ARNm de TTR V30M mutante en el hígado de ratón transgénico, que da como resultado reducción de proteína TTR V30M mutante en la circulación.

Ejemplo 7. Durabilidad de ARNm de TTR y supresión de proteína por SNALP-18328 en el ratón transgénico.

Para evaluar la durabilidad de ARNm de TTR y supresión de proteína por SNALP-18328, se formuló AD-18328 en SNALP y se administró por bolo IV a ratones transgénicos V30M hTTR. En diversos instantes de tiempo post-dosis, se cuantificaron los niveles de ARNm de TTR hepáticos y los niveles de proteína TTR en suero. Se administró a ratones transgénicos V30M hTTR de 8 a 12 semanas (4 animales / grupo) por vía intravenosa (IV) 200 µl de SNALP-18328 (1 mg/kg) o SNALP-1955 (1 mg/kg) con ARNsi de control negativo AD-1955 que fija como objetivo el gen de luciferasa de no mamífero). Los ratones usados fueron H129-hTTR KO de la cepa *Mus musculus* del Institute of Molecular and Cellular Biology, Porto, Portugal. En resumen, se cruzaron ratones transgénicos hTTR H129 con ratones TTR KO endógenos H129 (ratones nulos para generar los ratones transgénicos H129-hTTR, en un fondo de TTR de ratón nulo (Maeda, S., (2.003), Use of genetically altered mice to study the role of serum amyloid P component in amyloid deposition. *Amyloid Suppl.* 1, 17-20). Los días 3, 8, 15 ó 22 post-dosis, se proporcionó a los animales en

ambos grupos de tratamiento una dosis letal de ketamina/xilazina. Se recogieron muestras en suero y se almacenaron a -80 °C hasta análisis. Se recogió tejido hepático, se ultracongeló y se almacenó a -80 °C hasta tratamiento.

5 Para cuantificación de ARNm de TTR, se cultivó tejido hepático congelado en polvo y se prepararon lisados. Se determinaron los niveles de ARNm de TTR relativos a los de ARNm de GAPDH en los lisados usando un ensayo de ADN ramificado (QuantiGene Reagent System, Panomics, Fremont, CA). En resumen, se usó el ensayo QuantiGene (Genospectra) para cuantificar los niveles de ARNm en lisados de muestras de tejido de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El nivel medio de ARNm de TTR se normalizó al nivel medio de ARNm de GAPDH para cada muestra. Las medias del grupo de los valores normalizados se normalizaron después además al valor medio para el grupo tratado con PBS, para obtener el nivel relativo de expresión de ARNm de TTR.

10 Para cuantificación de proteínas TTR, se ensayó suero usando el Estuche ELISA de Prealbúmina Assaymax de AssayPro (St. Charles, MO) según el protocolo del fabricante.

15 Los resultados se muestran en la FIG. 7A y la FIG. 7B para ARNm hepático y proteína en suero, respectivamente. Una administración de bolo única IV única de SNALP-18328 en los ratones transgénicos V30M hTTR dio como resultado una inhibición duradera de los niveles de ARNm de TTR en el hígado y los niveles de proteína TTR en el suero. Comparado con el grupo de control (1 mg/ml de SNALP-1955), una administración IV única de SNALP-18328 a 1 mg/kg redujo significativamente en los niveles de ARNm de TTR relativos a los Días 3, 8, 15 y 22 postdosis por 96% ($p < 0,001$), 90% ($p < 0,001$), 82% ($p < 0,001$) y 73% ($p < 0,001$), respectivamente, y no volvió a los niveles de referencia a la terminación del estudio (Día 22 postdosis). Los niveles de proteína también disminuyeron con una reducción máxima de TTR en suero de 97% ($p < 0,001$) (relativo a SNALP-1955) el Día 3 postdosis. Los Días 8, 15 y 22 postdosis, se suprimieron los niveles de proteína TTR por 72% ($p < 0,05$), 32% ($p < 0,05$) y 40% ($p < 0,001$), respectivamente, relativo a SNALP-1955.

20 Estos resultados demuestran que una sola administración IV de SNALP-18328 produce supresión duradera de ARNm hepático fijado como objetivo que los niveles de proteína en suero en el ratón transgénico V30M hTTR, con reducciones significativas de tanto ARNm de TTR hepático como y proteína TTR en suero el día 22 postdosis.

25 Ejemplo 8. Durabilidad de supresión de proteína TTR en suero por SNALP-18328 en el primate no humano.

Para evaluar la durabilidad de supresión de proteína TTR en suero por SNALP-18328, se formuló AD-18328 en SNALP y se administró por infusión intravenosa IV a primates no humanos. En diversos instantes de tiempo postdosis, se cuantificaron los niveles de proteína TTR en suero.

30 Se administró a monos cynomolgus (*Macaca fascicularis*) ($n = 5$ animales / grupo para grupos de SNALP-18328 y $n = 3$ animales/grupo para SNALP-1955 y grupos PBS) una infusión intravenosa IV de 15 minutos de SNALP-18328 (0,3; 1 ó 3 mg/kg), SNALP-1955 (3 mg/kg) con ARNsi de control negativo AD-1955 que fija como objetivo el gen luciferasa de no mamífero o PBS. Los Días 0, 1, 2, 3, 4, 5, 7, 10 y 14 de la fase de dosificación, se recogieron muestras de suero y se almacenaron a -80 °C hasta análisis.

35 Se usó análisis por métodos Western para evaluar los niveles de proteína TTR en muestras de suero. Las muestras de suero de cada grupo se mezclaron y se diluyeron 1:1 con tampón de muestra Laemmli (se añadió β -mercaptoetanol a una dilución 1:20). Se calentaron las muestras a 95°C durante 10 minutos. Se cargaron 12,5 μ l de cada muestra en cada vía de un gel prep al 10-20% Criterion (Biorad, Hercules; CA) y se separó por SDS-PAGE a 120 V durante 1,5 h, después se transfirió a una membrana de nitrocelulosa usando un sistema semiseco a 15 V durante 1 hora. Se bloqueó la mancha durante la noche a 4°C en tampón de bloqueo LiCOR (Lincoln, NE) diluido 1:1 con PBS x1. Se analizó la mancha primero con anticuerpos primarios (anti-TTR de cabra de Santa Cruz (Santa Cruz, CA) a una dilución de 1:1.000 diluido en tampón de bloqueo LiCOR /PBS en un balancín durante 1 h a temperatura ambiente. Las manchas se lavaron X 4 con PBS + Tween 20 al 0,2% (10 minutos por lavado). Se añadieron los anticuerpos secundarios etiquetados fluorescentes (anti-cabra 680 nm de Invitrogen (Carlsbad, CA) a una dilución de 1:10.000 en tampón de bloqueo LiCOR/PBS y se incubó la mancha durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de incubación, se lavaron las manchas X 4 con PBS + Tween 20 al 0,2% seguido por un lavado con PBS 1X. Se usó el Sistema de Formación de Imagen de Infrarrojos Odyssey de Li-COR para detectar las bandas de proteínas. El monómero de TTR migra a 15 kDa.

40 Los resultados se muestran en la FIG. 8. Los niveles de proteína TTR en suero mostraron una reducción dependiente de la dosis con 1 ó 3 mg/kg de SNALP-18328, cuando se compara con niveles predosis (Día 0). La duración de la supresión, después de una única administración IV de SNALP-18328 es al menos 14 días después de 1 ó 3 mg/kg de SNALP-18328 de tratamiento.

45 Estos resultados demuestran que una sola administración IV de SNALP-18328 produce una supresión durable de proteína TTR en la circulación en el primate no humano (*Macaca fascicularis*), con reducción significativa de proteína TTR a los 14 días postdosis.

55 Ejemplo 9: Reducción *in vivo* de TTR mutante (V30M) en tejidos periféricos por SNALP-18328 en el ratón transgénico.

Para evaluar la eficacia de SNALP-18328 en la reducción de TTR en tejidos periféricos, se evaluaron ratones transgénicos hTTR V30M/HSF-1 con tinción inmunohistoquímica para TTR. Se administró a ratones transgénicos hTTR V30M/HSF-1 de dos meses (Maeda, S., (2003), Use of genetically altered mice to study the role of serum amyloid P component in amyloid deposition. *Amyloid Suppl.* 1, 17-20) un bolo IV de 3 mg/kg de SNALP-18328 (12 animales), 3 mg/kg de SNALP-1955 (con ARNsi de control negativo AD-1955 que fija como objetivo el gen luciferasa no de mamífero, 4 animales) o PBS (4 animales) cada dos semanas durante un total de cuatro dosis los días 0, 14, 28 y 42. Se evaluaron los niveles de ARNm hepático de TTR y la inmunoreactividad de TTR en múltiples tejidos periféricos a las 8 semanas después de la primera dosis el día 56.

Se anestesiaron los ratones con 1 mg/kg de medetomidina y se les proporcionó una dosis letal de ketamina. Se recogieron los tejidos y órganos de interés. Para inmunohistoquímica, se fijaron esófago (E), estómago (S), intestino (duodeno (I1) y colon (I4)), nervio (N) y ganglios de la raíz dorsal (D) en formalina tamponada neutra y se embebieron en parafina. Para detección de la TTR, anticuerpo primario de la TTR anti-humano de conejo (1:1.000, DAKO, Dinamarca) y anticuerpo secundario conjugado con biotina anti-conejo (1:20 Sigma, USA) fueron seguidos por etiquetado con extravidina (1:20, Sigma, USA) para colorear la proteína de TTR. La reacción se desarrolló con 3-amino-9-etilcarboxol, AEC (Sigma, USA). El análisis semi-cuantitativo de extensiones inmunohistoquímicas se realizó usando un programa Scion image quant que mide el área ocupada por el color de reacción del sustrato y normaliza este valor al área de imagen total. Los valores medios de % de área ocupada se muestran con la correspondiente desviación estándar. Se evaluó cada tejido animal en cuatro diferentes áreas. La presencia de TTR humana en ganglios parasimpáticos del estómago y el intestino se estudió por doble tinción inmunofluorescente con TTR anti-humana de conejo (1:1.000, DAKO, Dinamarca) y anti-PGP9.5 de ratón (1:40, Serotec, USA) como los anticuerpos primarios; los anticuerpos secundarios fueron, respectivamente: Alexa Fluor 488 anti-conejo (Molecular probes, RU) y Alexa Fluor 568 anti-conejo de cabra (Molecular probes, RU). Se montaron las extensiones con vectashield (Vector) y se visualizaron en un microscopio de Sistema Cell Observer de Zeiss (Carl Zeiss, Alemania) provisto de filtros para FITC y rodamina.

Los resultados se representaron gráficamente en la FIG. 9. Al contrario que con animales tratados con PBS y SNALP-1955, los animales tratados con SNALP-18328 presentaron una reducción significativa de inmunoreactividad de TTR en todos los tejidos examinados (esófago (E), estómago (S), intestino (duodeno (I1) y colon (I4)), nervio (N) y ganglios de la raíz dorsal (D)).

Estos resultados demuestran que la administración de SNALP-18328 a ratones transgénicos hTTR V30M/HSF-1 produce una reducción significativa de la proteína TTR en tejidos y órganos periféricos, incluyendo esófago, estómago, intestino (duodeno y colon), nervios y ganglios de la raíz dorsal.

Ejemplo 10. Reducción *in vivo* de ARNm de TTR natural en el hígado de primate no humano por XTC-SNALP-18328.

Para evaluar la eficacia de la nueva formulación de nanopartículas de lípidos XTC-SNALP para suministro de ARNsi en primate no humano, se formuló ARNsi de TTR AD-18328 en XTC-SNALP (XTC-SNALP-18328) y se administró por infusión intravenosa IV de 15 minutos y se cuantificó el ARNm de TTR hepático. Se administró a monos cynomolgus (*Macaca fascicularis*) infusiones intravenosas IV de 15 minutos de XTC-SNALP-18328 (0,03; 0,1; 0,3 ó 1 mg/kg) o XTC-SNALP-1955 (1 mg/kg, con ARNsi de control negativo AD-1955 que fija como objetivo el gen luciferasa no de mamífero). A las cuarenta y ocho horas postdosis, se anestesiaron los monos con pentobarbital sódico y se sangraron. Se recogió tejido hepático para determinación de ARNm de TTR, se ultracongeló y se almacenó a -80 °C hasta tratamiento. Los métodos usados para cuantificación de ARNm de TTR en tejido hepático fueron similares a los descritos en el Ejemplo 5 anteriormente.

Los resultados se muestran en la FIG. 10. XTC-SNALP -18328 redujo los niveles de ARNm de TTR en el hígado de una manera dependiente de la dosis, comparado con el XTC-SNALP -1955 de control negativo. Se determinó que el ED50 de ARNm era ~ 0,1 mg/kg de XTC-SNALP -18328.

Estos resultados demuestran que XTC-SNALP-18328 es eficaz en la supresión de ARNm de TTR en hígado de primate no humano cuando se administra por infusión intravenosa IV.

Ejemplo 11: Reducción *in vivo* de ARNm de TTR natural en el hígado de primate no humano por LNP09-18328 y LNP11-18328.

Para evaluar la eficacia de dos nuevas formulaciones de nanopartículas de lípidos, LNP09 y LNP11, para suministro de ARNsi en primate no humano, se formuló ARNsi de la TTR AD-18328 en LNP09 (LNP09-18328) o LNP11 (LNP11-18328) y se administró por infusión intravenosa IV de 15 minutos y se ensayaron los niveles de ARNm de TTR hepático y de proteína TTR en suero. Se administraron a monos cynomolgus (*Macaco fascicularis*) infusiones intravenosas IV de 15 minutos de LNP09-18328 (0,03; 0,1 ó 0,3 mg/kg), LNP11-18328 (0,03; 0,1 ó 0,3 mg/kg) o PBS. Se recogieron muestras de biopsias de hígado a las 48 h postdosis, se ultracongelaron y se almacenaron a -80 °C hasta tratamiento. Se recogió suero antes de dosificación (presangrado) y los Días 1, 2, 4, 7, 14, 21 y 28 post-dosificación y se almacenaron a -80 °C hasta tratamiento. Los métodos usados para cuantificación de ARNm de TTR y la evaluación de proteína TTR en suero fueron similares a los descritos en los Ejemplos 5 y 8 anteriores.

Los resultados se muestran en la FIG. 11A para ARNm y en la FIG. 11B y FIG. 11C para proteína. Los animales tratados con LNP09-18328 y LNP11-18328 mostraron una disminución dependiente de la dosis en los niveles de ARNm de TTR en el hígado, logrando una reducción máxima a 0,3 mg/kg de ~ 85% (LNP09-18328) y ~ 90% (LNP11-18328) de ARNm relativo al control de PBS. Se determinó que el ED50 de ARNm era ~ 0,02 mg/kg para ambos LNP09-18328 y LNP11-18328. El Día 7 postdosis, las muestras de suero también presentaron una reducción dependiente de la dosis de proteína TTR para 0,1 y 0,3 mg/kg de LNP09-18328 y LNP1-18328, comparado con niveles de control de PBS. La FIG. 11C muestra una disminución en los niveles de proteína TTR con una dosis de 0,3 mg/kg de LNP09-18328 que persistió durante al menos 28 días postdosis, cuando se compara con el grupo de control de PBS y cuando se compara con las muestras presangradas.

Estos resultados demuestran que LNP09-18328 y LNP11-18328 son eficaces en la supresión de ARNm de TTR natural en hígado de primate no humano y proteína TTR natural en la circulación, cuando se administra por infusión intravenosa IV. Además, la supresión con LN09-18328 es duradera, persistiendo durante al menos 28 días después de infusión intravenosa IV.

Ejemplo 12. Síntesis de secuencias de TTR mosaico.

Se designó una serie de dúplex de TTR ("dúplex en mosaico") que fijaban como objetivo el gen de la TTR cerca de la región fijada como objetivo de AD-18328, que fija como objetivo el gen de la TTR humano empezando en el nucleótido 628 de NM_000371.3.

En los ejemplos a continuación, la numeración que representa la posición de la base 5' de un ARNsi en la transcripción se basa en NM_000371.3 (FIG. 12; SEC ID N° 1.331). En los ejemplos mostrados a continuación, la numeración para ARNsi que fija como objetivo ARNsi humano está basada en NM_000371.2 (FIG. 13A). NM_000371.3 extiende la secuencia de la 5' UTR por 110 bases comparado con NM_000371.2, como se muestra en la FIG. 14. Así, como un ejemplo, la posición de partida de AD-18328 es 628 en NM_000371.3 y 518 en NM_000371.2 (FIG. 14).

Se sintetizaron secuencias de TTR en mosaico en un sintetizador MerMade 192 en escala de 1 umol. Para todas las secuencias en la lista, se aplicó la química 'endolight' como se detalla continuación.

- Todas las pirimidinas (citosina y uridina) en la hebra transcrita contenían 2'-O-Metil-bases (2' O-Metil C y 2'-O-Metil U).
- En la hebra complementaria, las pirimidinas adyacentes a (hacia la posición 5') ribo A nucleósido fueron reemplazadas con sus correspondientes 2-O-Metil-nucleósidos.
- Se introdujo una extensión dTdT de dos bases en el extremo 3' de ambas secuencias transcrita y complementaria.
- La fila de la secuencia se convirtió en una fila de texto para hacerla compatible para carga en el programa informático de síntesis MerMade 192.

Síntesis, escisión y desprotección:

La síntesis de secuencias TTR usó síntesis de oligonucleótidos soportados en sólido usando la química de la fosoramidita. La síntesis de las secuencias se realizó en escala 1 um en placas de 96 pozos. Las disoluciones de amidita se prepararon a concentración 0,1 M y se usó etiltiotetrazol (0,6 M en Acetonitrilo) como activador. Las secuencias sintetizadas se escindieron y se desprotegeron en placas de 96 pozos, usando metilamina en la primera etapa y reactivo de fluoruro en la segunda etapa. Las secuencias brutas se precipitaron usando mezcla de acetona: etanol (80:20) y el botón se volvió a suspender en tampón de acetato de sodio 0,2 M. Se analizaron las muestras de cada secuencia por LC-MS para confirmar la identidad, UV para cuantificación y una serie de muestras seleccionada por cromatografía IEX para determinar la pureza.

Purificación y desalación:

Las secuencias de TTR en mosaico se purificaron en un sistema de purificación AKTA explorer usando una columna Source 15Q. Se mantuvo una temperatura de la columna de 65 °C durante la purificación. Se realizó la inyección y recogida de la muestra en placas de 96 pozos (1,8 ml-de profundidad del pozo). Se recogió un único pico correspondiente a la secuencia de longitud completa en el eluyente. Se desalaron las secuencias purificadas en una columna Sephadex G25 usando purificador AKTA. Se analizó la concentración en las secuencias de TTR desaladas (por medición UV a A260) y la pureza (por HPLC de intercambio iónico). Se sometieron después a hibridación las hebras solas.

Hebras solas y dúplex de TTR:

Se presenta una lista detallada de dúplex en mosaico de TTR y correspondientes hebras únicas (transcrita y complementaria) en la tabla a continuación (Tabla 13).

ES 2 543 004 T3

Tabla 13: Dúplex en mosaico de TTR y correspondientes hebras únicas.

Hebra: t= transcrita; c= complementaria; Posición: posición de base 5' en transcripción (NM_000371.3, SEC ID N° 1.331).

Dúplex #	Posición	Oligo #	Hebra	Secuencia (5' a 3'')	SEC ID N°
AD-18323	618	A-32335	T	GGGAuuucAuGuAAccAAGdTdT	1.332
		A-32336	C	CUUGGUuAcAUGAAAUCCdTdT	1.333
AD-18324	619	A-32337	T	GGAUuuucAuGuAAccAAGAdTdT	1.334
		A-32338	C	UCUUGGUuAcAUGAAAUCCdTdT	1.335
AD-23000	620	A-42927	T	GAuuucAuGuAAccAAGAGdTdT	1.336
		A-42928	C	CUCUUGGUuAcAUGAAAUcTdTdT	1.337
AD-23001	621	A-42929	T	AuuucAuGuAAccAAGAGudTdT	1.338
		A-42930	C	ACUCUUGGUuAcAUGAAAUdTdT	1.339
AD-23002	622	A-42931	T	uuucAuGuAAccAAGAGuAdTdT	1.340
		A-42932	C	uACUCUUGGUuAcAUGAAAdTdT	1.341
AD-23003	623	A-42933	T	uucAuGuAAccAAGAGuAudTdT	1.342
		A-42934	C	AuACUCUUGGUuAcAUGAAAdTdT	1.343
AD-18325	624	A-32339	T	ucAuGuAAccAAGAGuAuudTdT	1.344
		A-32340	C	AAuACUCUUGGUuAcAUGAdTdT	1.345
AD-23004	625	A-42935	T	cAuGuAAccAAGAGuAuucdTdT	1.346
		A-42936	C	GAAuACUCUUGGUuAcAUGdTdT	1.347
AD-18326	626	A-32341	T	AuGuAAccAAGAGuAuuccdTdT	1.348
		A-32342	C	GGAAuACUCUUGGUuAcAUdTdT	1.349
AD-18327	627	A-32343	T	uGuAAccAAGAGuAuuccAdTdT	1.350
		A-32344	C	UGGAAuACUCUUGGUuAcAdTdT	1.351
AD-23005	628	A-42937	T	uAAccAAGAGuAuuccAuudTdT	1.352
		A-42938	C	AAUGGAAuACUCUUGGUuAdTdT	1.353
AD-23006	629	A-42939	T	AAccAAGAGuAuuccAuudTdT	1.354
		A-42940	C	AAAUGGAAuACUCUUGGUUdTdT	1.355

ES 2 543 004 T3

Dúplex #	Posición	Oligo #	Hebra	Secuencia (5' a 3'')	SEC ID N°
AD-23007	631	A-42941	T	AccAAGAGuAuuccAuuuudTdT	1.356
		A-42942	C	AAAAUGGAAuACUCUUGGUdTdT	1.357
AD-23008	632	A-42943	T	ccAAGAGuAuuccAuuuuudTdT	1.358
		A-42944	C	AAAAAUGGAAuACUCUUGGdTdT	1.359
AD-23009	633	A-42945	T	cAAGAGuAuuccAuuuuuAdTdT	1.360
		A-42946	C	uAAAAAUGGAAuACUCUUGdTdT	1.361
AD-23010	634	A-42947	T	AAGAGuAuuccAuuuuuAcdTdT	1.362
		A-42948	C	GuAAAAAUGGAAuACUCUUdTdT	1.363
AD-23011	635	A-42949	T	AGAGuAuuccAuuuuuAcudTdT	1.364
		A-42950	C	AGuAAAAAUGGAAuACUCUdTdT	1.365
AD-23012	636	A-42951	T	GAGuAuuccAuuuuuAcuAdTdT	1.366
		A-42952	C	uAGuAAAAAUGGAAuACUCdTdT	1.367
AD-23013	637	A-42953	T	AGuAuuccAuuuuuAcuAAdTdT	1.368
		A-42954	C	UuAGuAAAAAUGGAAuACUdTdT	1.369
AD-23014	638	A-42955	T	GuAuuccAuuuuuAcuAAAAdTdT	1.370
		A-42956	C	UUuAGuAAAAAUGGAAuACdTdT	1.371
AD-23015	639	A-42957	T	uAuuccAuuuuuAcuAAAGdTdT	1.372
		A-42958	C	CUUuAGuAAAAAUGGAAuAdTdT	1.373
AD-23016	640	A-42959	T	AuuccAuuuuuAcuAAAGcdTdT	1.374
		A-42960	C	GCUUuAGuAAAAAUGGAAUdTdT	1.375
AD-23017	641	A-42961	T	uuccAuuuuuAcuAAAGcAdTdT	1.376
		A-42962	C	UGCUUuAGuAAAAAUGGAAAdTdT	1.377
AD-23018	642	A-42963	T	uccAuuuuuAcuAAAGcAGdTdT	1.378
		A-42964	C	CUGCUUuAGuAAAAAUGGAdTdT	1.379
AD-23019	643	A-42965	T	ccAuuuuuAcuAAAGcAGudTdT	1.380
		A-42966	C	ACUGCUUuAGuAAAAAUGGdTdT	1.381

ES 2 543 004 T3

Dúplex #	Posición	Oligo #	Hebra	Secuencia (5' a 3'')	SEC ID N°
AD-23020	644	A-42967	T	cAuuuuuAcuAAAGcAGuGdTdT	1.382
		A-42968	C	cACUGCUUuAGuAAAAUgdTdT	1.383
AD-23021	645	A-42969	T	AuuuuuAcuAAAGcAGuGdTdT	1.384
		A-42970	C	AcACUGCUUuAGuAAAAUdTdT	1.385
AD-23022	646	A-42971	T	uuuuuAcuAAAGcAGuGuudTdT	1.386
		A-42972	C	AAcACUGCUUuAGuAAAAAdTdT	1.387
AD-23023	647	A-42973	T	uuuuAcuAAAGcAGuGuudTdT	1.388
		A-42974	C	AAAcACUGCUUuAGuAAAAAdTdT	1.389
AD-23024	648	A-42975	T	uuuAcuAAAGcAGuGuuudTdT	1.390
		A-42976	C	AAAAcACUGCUUuAGuAAAAdTdT	1.391
AD-23025	649	A-42977	T	uuAcuAAAGcAGuGuuuudTdT	1.392
		A-42978	C	GAAAAcACUGCUUuAGuAAdTdT	1.393
AD-23026	650	A-42979	T	uAcuAAAGcAGu Guu uucAdTdT	1.394
		A-42980	C	UGAAAAcACUGCUUuAGuAdTdT	1.395
AD-23027	651	A-42981	T	AcuAAAGcAGuGuuuucAcdTdT	1.396
		A-42982	C	GUGAAAAcACUGCUUuAGUdTdT	1.397
AD-23028	652	A-42983	T	cuAAAGcAGuGuuuucAccdTdT	1.398
		A-42984	C	GGUGAAAAcACUGCUUuAGdTdT	1.399
AD-18330	653	A-32349	T	uAAAGcAGuGuuuucAccdTdT	1.400
		A-32350	C	AGGUGAAAAcACUGCUUuAdTdT	1.401
AD-23029	654	A-42985	T	AAAGcAGuGuuuucAccdTdT	1.402
		A-42986	C	GAGGUGAAAAcACUGCUUuUdTdT	1.403
AD-23030	655	A-42987	T	AAGcAGuGuuuucAcccAdTdT	1.404
		A-42988	C	UGAGGUGAAAAcACUGCUUdTdT	1.405
AD-23031	656	A-42989	T	AGcAGuGuuuucAcccAdTdT	1.406
		A-42990	C	AUGAGGUGAAAAcACUGCUdTdT	1.407

Dúplex #	Posición	Oligo #	Hebra	Secuencia (5' a 3'')	SEC ID Nº
AD-18328	628	A-32345	T	GuAAccAAGAGuAuuccAudTdT	1.408
		A-32346	C	AUGGAAuACUCUUGGUuACdTdT	1.409

Ejemplo 13. Identificación sistemática *in vitro* de ARNsi en mosaico de TTR.

Se ensayaron dúplex de TTR en mosaico en células Hep3B para inhibición de expresión de TTR endógena usando ensayos de PCR en tiempo real.

- 5 Cultivo celular y transfección: se cultivaron células Hep3B (ATCC, Manassas, VA) a cerca de confluencia a 37 °C en una atmósfera de CO₂ al 5% en Medio Esencial Mínimo de Eagle (EMEM, ATCC) enriquecido con FBS al 10%, estreptomycin y glutamina (ATCC) antes de que se liberara de la placa por tripsinización. Se llevó a cabo transfección inversa por adición de 5 µl de Opti-MEM a 5 µl de cada ARNsi en pozos individuales de una placa de 96 pozos. A estos 10 µl de Opti-MEM más 0,2 µl de Lipofectamina se añadió RNAiMax por pozo (Invitrogen, Carlsbad CA. cat # 13778-150) y se incubó la mezcla a temperatura ambiente durante 15 minutos. Se añadieron después 80 µl de medio de cultivo completo descrito anteriormente, pero sin antibiótico conteniendo 2,0 x10⁴ células Hep3B. Se incubaron las células durante 24 horas previamente a purificación de ARN. Los experimentos se realizaron a concentración final de dúplex 0,1 ó 10 nM.

- 15 Aislamiento de ARN total usando Estuche de Aislamiento de ARN Total MagMAX-96 (Applied Biosystems, Foster City CA, parte #: AM 1.830): Se recogieron células y se lisaron en 140 µl de Disolución de Lisis/Unión después se mezclaron durante 1 minuto a 89 rad/s (850 rpm) usando un Termomezclador Eppendorf (la velocidad de mezclamiento fue la misma durante todo el procedimiento). Se añadieron veinte microlitros de perlas magnéticas al lisado de células y se mezcló durante 5 minutos. Se capturaron perlas magnéticas usando soporte magnético y se eliminó el sobrenadante sin alterar las perlas. Después de eliminar el sobrenadante, se lavaron las perlas magnéticas con Disolución de Lavado 1 (isopropanol añadido) y se mezcló durante 1 minuto. Se capturaron las perlas de nuevo y se eliminó el sobrenadante. Después se lavaron las perlas con 150 µl de Disolución de Lavado 2 (Etanol añadido), se capturó y eliminó el sobrenadante. Después se añadieron 50 µl de mezcla de DNasa (tampón de DNasa MagMax turbo y DNasa Turbo) a las perlas y se mezclaron durante 10 a 15 minutos. Después de mezclamiento, se añadieron 100 µl de Disolución de Unión de Nuevo de ARN y se mezclaron durante 3 minutos. Se retiró el sobrenadante y se lavaron las perlas magnéticas de nuevo con 150 µl de Disolución de Lavado 2 y se mezclaron durante 1 minuto y se eliminó completamente el sobrenadante. Se mezclaron las perlas magnéticas durante 2 minutos a sequedad antes de que se eluyera ARN con 50 µl de agua.

- 30 Síntesis de ADNc usando estuche de transcripción inversa de ADNc de alta capacidad ABI (Applied Biosystems, Foster City, CA, Cat #4368813): Se añadió una mezcla patrón de 2 µl de Tampón x10, 0,8 µl de dNTP x25, 2 µl de cebadores Aleatorios, 1 µl de Transcriptasa Inversa, 1 µl de inhibidor de RNasa y 3,2 µl de H₂O por reacción a 10 µl de ARN total. Se generó ADNc usando un termociclador Bio-Rad C-1000 o S-1000 (Hercules, CA) por las siguientes etapas: 25°C 10 min, 37°C 120 min, 85°C 5 s, mantenido a 4°C.

- 35 PCR de tiempo real: Se añadieron 2 µl de ADNc a un mezclador maestro que contenía 0,5 µl de Sonda TaqMan GAPDH (Applied Biosystems Cat # 4326317E), 0,5 µl de sonda TaqMan de TTR (Applied Biosystems cat # HS00174914 M1) y 10 µl de Mezcla Maestra de Sondas Roche (Roche Cat 04887301001) por pozo en una placa de 384 pozos LightCycler 480 (Roche cat # 0472974001). Se realizó PCR en tiempo real en una máquina PCR de Tiempo Real LightCycler 480 (Roche). Cada dúplex se ensayó en dos transfecciones independientes y cada transfección se ensayó por duplicado.

- 40 Se analizaron los datos en tiempo real usando el método $\Delta\Delta$ Ct. Se normalizó cada muestra para expresión GAPDH y se valoraron inhibiciones relativas a células transfectadas con el dúplex no fijado como objetivo AD-1955. La Tabla 14 muestra la inhibición de TTR usando los ARNsi. Los datos se expresan como el porcentaje de mensaje restante relativo a las células fijadas como objetivo con AD-1955.

Muchos pero no todos los ARNds de TTR en mosaico, que fijan como objetivo TTR cerca del objetivo de AD-18328, redujeron el ARNm de la TTR por al menos 70% cuando se transfectaron en células Hep3B a 0,1 nM.

- 45 Tabla 14: Inhibición de TTR por ARNds en mosaico que fija como objetivo TTR cerca del objetivo de AD-18328.

ES 2 543 004 T3

Dúplex #	% mensaje restante 0,1 nM	% SD 0,1 nM	% mensaje restante 10 nM	% SD 10 nM
AD-18323	6,7	1,90	1,7	0,02
AD-18324	1,8	0,58	0,9	0,10
AD-23000	5,5	0,93	2,1	0,87
AD-23001	15,2	4,89	4,9	1,74
AD-23002	3,1	1,12	1,4	0,55
AD-23003	17,3	3,13	1,7	0,06
AD-18325	1,5	0,27	1,4	0,66
AD-23004	9,0	0,15	10,5	0,96
AD-18326	22,0	1,85	7,6	0,78
AD-18327	11,6	2,64	9,6	1,67
AD-18328	1,1	0,70	0,6	0,16
AD-23005	0,8	0,31	0,6	0,21
AD-23006	1,5	0,46	1,2	0,43
AD-23007	2,4	0,91	1,9	0,46
AD-23008	0,6	0,10	0,8	0,26
AD-23009	1,0	0,13	0,9	0,22
AD-23010	60,1	15,66	66,2	22,71
AD-23011	56,5	16,99	53,6	4,70
AD-23012	7,7	2,36	7,7	3,25
AD-23013	7,0	0,64	8,0	1,06
AD-23014	0,7	0,01	0,6	0,10
AD-23015	15,4	0,25	16,5	7,07
AD-23016	27,1	0,37	6,7	1,80
AD-23017	4,5	1,26	1,4	0,40
AD-23018	44,6	9,45	7,5	1,09

ES 2 543 004 T3

Dúplex #	% mensaje restante 0,1 nM	% SD 0,1 nM	% mensaje restante 10 nM	% SD 10 nM
AD-23019	2,2	0,68	0,8	0,10
AD-23020	52,7	6,45	29,7	1,17
AD-23021	95,4	16,16	45,0	3,00
AD-23022	70,1	3,01	60,8	12,11
AD-23023	2,7	1,12	1,8	0,07
AD-23024	1,7	0,30	1,8	0,33
AD-23025	64,2	13,21	10,5	1,34
AD-23026	1,9	0,15	1,9	0,78
AD-23027	2,5	0,21	1,6	0,49
AD-23028	6,7	4,41	1,2	0,50
AD-18330	6,0	0,56	5,7	1,15
AD-23029	4,5	0,47	1,6	0,10
AD-23030	3,9	0,25	3,3	0,84
AD-23031	3,4	0,78	1,7	0,02

Ejemplo 14. Evaluación de duración de infusión intravenosa sobre la eficacia de una administración intravenosa única de SNALP-18534 en ratas Sprague-Dawley.

Objetivos

- 5 Para determinar el efecto de la duración de la infusión intravenosa sobre la eficacia de una única infusión IV de SNALP-18534 sobre los niveles de ARNm de TTR hepático en ratas Sprague-Dawley.

Tabla 15: Abreviaturas y definiciones usadas.

SNALP-18534	ARNsi específico de transtiretina de roedores formulado en SNALP
SNALP-1955	ARNsi específico de luciferasa no de mamífero formulado en SNALP

- 10 Las secuencias de las hebras transcrita y complementaria de AD-18534 se reproducen a continuación a partir de las tablas anteriores:

Hebra	Oligo #	Posición	Secuencia 5' a 3'	SEC ID N°
t	A-32755	532	cAGuGuucuuGcucuAuAAdTdT	1.289
c	A-32756	550	UuAuAGAGcAAGAAcACUGdTdT	1.290

Materiales de estudio.

Artículo o artículos de ensayo.

5 SNALP-18534 está constituido por un ARNsi que fija como objetivo ARNm de TTR de roedores (AD-18534), formulado en partículas lipídicas de ácido nucleico estables (SNALP) para suministro a tejidos fijados como objetivo. La formulación de SNALP (partícula lipídica) consta de un aminolípido nuevo (DLinDMA), un lípido PEGilado (mPEG2000-C-DMA), un lípido neutro (DPPC) y colesterol. La relación de lípido: ácido nucleico en la formulación de SNALP es aproximadamente 5,8:1 (p:p). SNALP-1955 contiene un ARNsi que fija como objetivo el ARNm de luciferasa no de mamífero, se formula con la partícula lipídica idéntica como SNALP-18534 y sirve como un control no farmacológicamente activo. Los niveles de dosis se expresan como mg/kg basado en el peso de contenido en ARNsi.

Diseño del estudio y procedimientos.

Animales y administración del artículo de ensayo:

15 El estudio estuvo constituido por 9 grupos de ratas Sprague-Dawley (4 machos/ grupo). Se dejó que los animales tuvieran al menos un periodo de aclimatación de 2 días antes del estudio y todos los animales tenían 7 semanas al inicio de la dosificación. La dosis administrada se calculó basándose en los datos de peso corporal recogidos previamente a la dosificación del Día 1. Se administraron los artículos de ensayo y de control como una infusión intravenosa IV única de 15 minutos, 1 hora, 2 horas o 3 horas vía la vena caudal usando una cánula 24G de 1,9 cm (3/4") sellada con un septo de Sitio de Inyección Baxter vía un agujero de mariposa un Terumo 27G a una bomba de jeringa Baxter AS40A. El volumen de dosis fue 3 ml/kg, la velocidad de infusión intravenosa fue 12 ml/kg/h y se movieron libremente los animales en las jaulas durante la dosificación. Se dividieron las ratas en nueve grupos de tratamiento y se les administró una infusión intravenosa IV de SNALP-18534, SNALP-1955 o PBS como se muestra en la Tabla 16:

Tabla 16: Grupos de dosificación de animales de ensayo.

Grupo	N	Artículo de Ensayo	Duración de la infusión intravenosa	Dosis
A	4	PBS	15 minutos	---
B	4	PBS	3 horas	---
C	4	SNALP -1955	1 hora	1 mg/kg
D	4	SNALP -1955	2 horas	1 mg/kg
E	4	SNALP -1955	3 horas	1 mg/kg
F	4	SNALP-18534	15 minutos	1 mg/kg
G	4	SNALP-18534	1 hora	1 mg/kg
H	4	SNALP-18534	2 horas	1 mg/kg
I	4	SNALP-18534	3 horas	1 mg/kg

25 Recogida de tejido y aislamiento de ARN:

30 El Día 0, se anestesiaron los animales por inhalación de isoflurano y se recogieron muestras de sangre predosificación en tubos de separador de suero por sangrado retro-orbital. Se dejó que las muestras de sangre coagularan a temperatura ambiente durante aproximadamente 30 minutos antes de centrifugación a 4°C. Después se almacenaron las muestras de suero a -80 °C hasta que se realizó el análisis. El Día 3, se proporcionó a los animales en los nueve grupos de tratamiento una dosis letal de ketamina/xilazina. Se recogió sangre vía caudal vena cava en tubos de separación de suero y se dejó coagular a temperatura ambiente durante aproximadamente 30 minutos antes de centrifugación a 4°C. Se almacenaron las muestras de suero a -80 °C hasta que se realizó el análisis. Se recogió el tejido de hígado y se congeló instantáneamente en nieve carbónica. El tejido de hígado congelado se cultivó y se prepararon lisados de tejido para cuantificación de ARNm en hígado.

Cuantificación de ARNm de la TTR:

Se determinaron los niveles de ARNm de TTR relativos a los de ARNm de GAPDH en los lisados mediante ensayos de ADN ramificado (QuantiGene Reagent System, Panomics, Fremont, CA). En resumen, se usó el ensayo QuantiGene (Genospectra) para cuantificar los niveles de ARNm en lisados de muestras de tejidos de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El nivel medio de ARNm de TTR fue normalizado al nivel medio de ARNm de GAPDH para cada muestra.

Para obtener el nivel relativo de expresión de ARNm de TTR, se normalizaron después los valores medios del grupo para grupos tratados con SNALP-1955 y SNALP-18534 con duraciones de infusión intravenosa de 15 minutos, 1 hora y 2 horas, al valor medio para el grupo tratado con PBS con infusión intravenosa de 15 minutos mientras que los valores medios del grupo para grupos tratados con SNALP-1955 y SNALP-18534 con duración de infusión intravenosa de 3 horas fueron normalizados después al valor medio para el grupo tratado con PBS con duración de la infusión intravenosa de 3 horas.

Resultados

Como se muestra en la FIG. 16, una infusión IV única de 1 mg/kg de SNALP-18534 con diferentes duraciones de la infusión intravenosa de 15 minutos a 3 horas da como resultado una inhibición comparable de los niveles de ARNm de la TTR en el hígado medido dos días después de la dosificación. Una infusión intravenosa IV única de 1 mg/kg de SNALP-18534 también mostró regulación hacia abajo de la TTR duradera más de 29 días después de una infusión intravenosa IV única de 15 minutos, cuando se compara con control de SNALP-1955 (datos no mostrados). Comparado con el grupo tratado con PBS, una infusión intravenosa IV única de 15 minutos, 1 hora, 2 horas o 2 horas de SNALP-18534 a 1 mg/kg redujo significativamente los niveles de expresión de ARNm de la TTR relativos por 94% ($p < 0,001$), 94% ($p < 0,001$), 92% ($p < 0,001$) y 93% ($p < 0,001$), respectivamente. La especificidad de la actividad de SNALP-18534 se demostró por la ausencia de inhibición objetivo significativa por administración de SNALP-1955 vía infusión intravenosa IV de 1 hora, 2 horas o 3 horas al mismo nivel de dosis.

Conclusiones

Este estudio demuestra que variar la duración de la infusión intravenosa desde 15 minutos hasta 3 horas no afecta a la eficacia de una administración IV única de 1 mg/kg de SNALP-18534 en ratas, como se evaluó por reducción de los niveles de ARNm de TTR en el hígado.

Ejemplo 15. Reducción *in vivo* de ARNm de TTR natural en el hígado de rata por LNP07-18534 y LNP08-18534.

Para evaluar la eficacia de 2 nuevas formulaciones de nanopartículas de lípidos, LNP07 y LNP08, para suministro de ARNsi en la rata, se formuló ARNsi de la TTR específico de roedores, AD-18534, en LNP07 (LNP07-18534) o LNP08 (LNP08-18534) y se administró por infusión intravenosa IV de 15 minutos y se cuantificó ARNm de TTR en el hígado. Se administraron a ratas Sprague-Dawley (4 animales por grupo) infusiones intravenosas IV de 15 minutos de LNP07-18534 ((0,03; 0,1, 0,3 1 mg/kg), LNP08-18534 (0,01, 0,03; ó 0,1 mg/kg) o LNP07-1955 (1 mg/kg) ó LNP078-1955 (0,1 mg/kg) que contenían el ARNsi de control negativo AD-1955 que fija como objetivo el gen de luciferasa de no mamífero. Cuarenta y ocho horas más tarde, se practicó la eutanasia a los animales y se recogió tejido hepático, se ultracongeló y se almacenó a -80 °C hasta tratamiento.

Para cuantificación de ARNm de TTR, se molió tejido hepático congelado en polvo, y se prepararon lisados. Se determinaron los niveles de ARNm de TTR relativos a los de ARNm de GAPDH en los lisados usando un ensayo de ADN ramificado (QuantiGene Reagent System, Panomics, Fremont, CA). En resumen, se usó el ensayo QuantiGene (Genospectra) para cuantificar los niveles de ARNm en lisados de muestra de tejido de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El nivel medio de ARNm de TTR fue normalizado al nivel medio de ARNm de GAPDH para cada muestra. Las medias del grupo de los valores normalizados se normalizaron después además al valor medio para el grupo tratado con PBS, para obtener el nivel relativo de expresión de ARNm de TTR.

Los resultados se muestran en la FIG. 17. LNP07-18534 redujo los niveles de ARNm de TTR en el hígado de una manera dependiente de la dosis, con 94% de supresión de ARNm de TTR a 1 mg/kg. El efecto fue específico, puesto que el LNP07-1955 de control negativo a 1 mg/kg no afectó significativamente a los niveles de ARNm de TTR comparado con el control de PBS. Se determinó que el ED50 de ARNm era ~ 0,05 mg/kg de LNP07-18534. LNP08-18534 redujo los niveles de ARNm de TTR en el hígado de una manera dependiente de la dosis, con supresión del 86% de ARNm de la TTR a 0,1 mg/kg. El efecto fue específico, puesto que el LNP08-1955 de control negativo a 0,1 mg/kg no afectó significativamente a los niveles de ARNm de la TTR comparado con el control de PBS. Se determinó que el ED50 del ARNm era ~ 0,02 mg/kg de LNP08-18534.

Estos resultados demuestran que LNP07-18534 y LNP08-18534 son eficaces en la supresión de ARNm de TTR natural en la rata cuando se administra por infusión intravenosa IV y que LNP07 y LNP08 son formulaciones eficaces para suministrar ARNsi al hígado.

Ejemplo 16: Reducción de ARNm de la TTR hepático por una administración intravenosa única de LNP09-18534 o LNP11-18534 en ratas Sprague-Dawley.

Objetivo:

5 Para evaluar la eficacia de dos nuevas formulaciones de nanopartículas lipídicas (LNP, por sus siglas en inglés) para suministro del ARNsi específico de la TTR de roedores, AD-18534 en la rata Sprague-Dawley para reducir los niveles de ARNm de TTR hepático (natural) endógeno. Se dosificó por vía intravenosa a las ratas vía una infusión intravenosa de 15 minutos 0,01, 0,03, 0,1 ó 0,3 mg/kg de LNP09-18534, LNP11-18534 o disolución salina tamponada con fosfato (PBS) y se ensayaron los niveles de ARNm hepático de la TTR a las 48 horas post-tratamiento.

Material y métodos:

10 Formulación de LNP09: (XTC/DSPC/Chol/PEG₂₀₀₀-C14) = 50/10/38,5/1,5% en moles; Lípido:ARNsi ~ 11:1.
Formulación de LNP11: (MC3/DSPC/Chol/PEG₂₀₀₀-C14) = 50/10/38,5/1,5 % en moles; Lípido:ARNsi ~ 11,1.

15 Recogida de tejido y aislamiento de ARN: El Día 3, se proporcionó a los animales en todos los grupos de tratamiento una dosis letal de ketamina/xilazina. Se recogió sangre vía caudal vena cava en tubos de separación de suero y después se dejó que coagulara a temperatura ambiente durante aproximadamente 30 minutos antes de centrifugación a 4 °C. Se almacenaron las muestras de suero a -80 °C hasta futuro análisis. Se recogieron tejidos de hígado y se congelaron instantáneamente sobre nieve carbónica. Se molió tejido de hígado congelado y se prepararon lisados de tejido para cuantificación de ARNm de hígado.

20 Cuantificación de ARNm de TTR: Se determinaron los niveles de ARNm de TTR relativos a los de ARNm de GAPDH en los lisados usando un ensayo de ADN ramificado (QuantiGene Reagent System, Panomics, Fremont, CA). En resumen, se usó el ensayo QuantiGene (Genospectra) para cuantificar los niveles de ARNm en lisados de muestra de tejido de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El nivel medio de ARNm de TTR fue normalizado al nivel medio de ARNm de GAPDH para cada muestra. Los valores medios de los grupos fueron normalizados después al valor medio para el grupo tratado con PBS, para obtener el nivel relativo de expresión de ARNm de TTR.

Resultados:

25 Como se muestra en la FIG. 18, por el contrario a los animales tratados con PBS, los animales tratados con LNP09-18534 y LNP11-18534 presentaron una disminución significativa dependiente de la dosis en los niveles de ARNm de TTR en el hígado, alcanzando una reducción máxima de ~ 90% de reducción de ARNm para grupos formulados con tanto LNP09 como LNP11, relativo al grupo de control de PBS a 0,3 mg/kg y una dosis que consigue una reducción del 50% (ED₅₀) de < 0,03 mg/kg para LNP11-18534 y < 0,1 mg/kg para LNP09-18534.

Conclusiones

30 Este estudio demuestra que una infusión intravenosa IV única de 15 minutos de LNP09-18534 o LNP11-18534 en ratas Sprague-Dawley da como resultado una reducción dependiente de la dosis de ARNm de TTR del hígado. Estos datos demuestran la eficacia de LNP09-18328 y LNP11-18328 era reducción del ARNm de TTR (natural) expresado de manera endógena con los niveles de ED50 de <0,03 y <0,1 mg/kg para LNP11-18534 y LNP09-18534, respectivamente.

35 Ejemplo 17: Inhibición de TTR en seres humanos.

Se trató un individuo humano con ARNs fijado como objetivo a un gen de la TTR para inhibir la expresión del gen de la TTR para tratar una afección.

Se selecciona o identifica un individuo con necesidad de tratamiento. El individuo puede presentar un trastorno hepático, amiloidosis por transtiretina y/o un hígado trasplantado.

40 La identificación del individuo puede tener lugar en un contexto clínico o en cualquier otra parte, por ejemplo, en la casa del individuo por el propio uso del individuo de un estuche de autoensayo.

45 En el instante cero, se administra al individuo una primera dosis adecuada de un ARNsi anti-TTR. Se formula el ARNs como se describe en la presente memoria. Después de un periodo de tiempo después de la primera dosis, por ejemplo, 7 días, 14 días y 21 días, se evaluó el estado del individuo, por ejemplo, midiendo la función hepática. Esta medición puede ir acompañada de una medición de la expresión de TTR en dicho individuo y/o los productos del ARNsi exitoso de fijación como objetivo de ARNm de la TTR. También se pueden medir otros criterios relevantes. El número y la concentración de las dosis se ajustan de acuerdo con las necesidades del individuo.

50 Después de tratamiento, se reduce la velocidad de crecimiento del tumor del individuo relativa a la velocidad que existe previamente al tratamiento o relativa a la velocidad medida en un individuo afectado de manera similar pero no tratado.

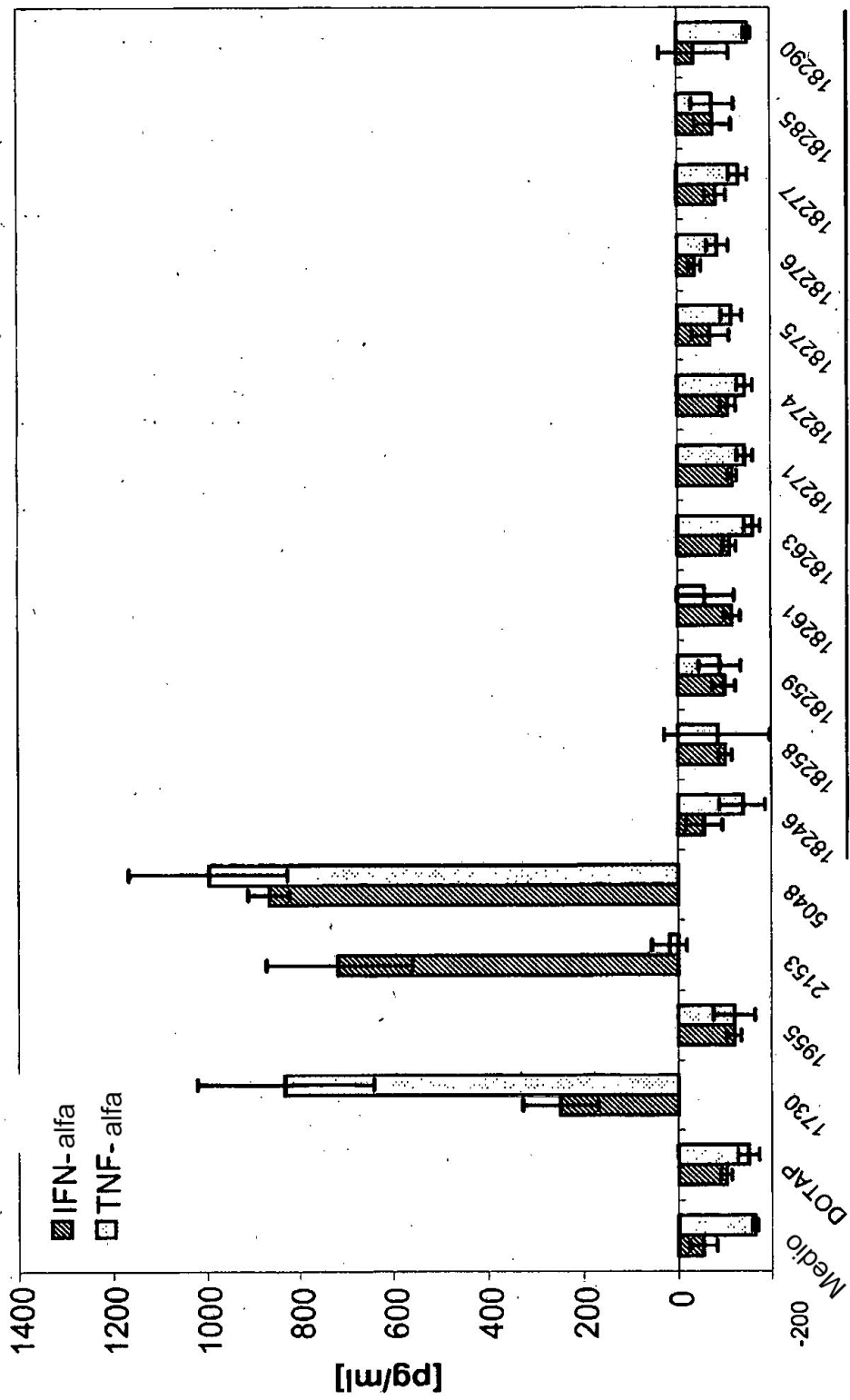
REIVINDICACIONES

1. Un ácido ribonucleico bicatenario (ARNds) para inhibir la expresión de transtiretina (TTR), en el que dicho ARNds comprende una hebra transcrita y una hebra complementaria, comprendiendo la hebra complementaria una región complementaria a una parte de un ARNm que codifica transtiretina (TTR), en el que dicha región de complementariedad tiene 19 nucleótidos de longitud, la hebra complementaria comprende la SEC ID N° 170 y cada hebra del ARNds tiene 19, 20, 21, 22, 23 ó 24 nucleótidos de longitud.
2. El ARNds según la reivindicación 1, en el que:
- (a) la hebra transcrita consta de la SEC ID N° 449 y la hebra complementaria consta de la SEC ID N° 450;
 - (b) la hebra transcrita consta de la SEC ID N° 729 y la hebra complementaria consta de la SEC ID N° 730 o
 - (c) la hebra transcrita consta de la SEC ID N° 1.009 y la hebra complementaria consta de la SEC ID N° 1.010.
3. El ARNds según la reivindicación 1, en el que la hebra transcrita comprende la SEC ID N° 169.
4. El ARNds según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicho ARNds comprende al menos un nucleótido modificado.
5. El ARNds según la reivindicación 4, en el que al menos uno de dichos nucleótidos modificados se elige del grupo de: un nucleótido 2'-O-metilo-modificado, un nucleótido que comprende un grupo 5'-fosforotioato, un nucleótido terminal ligado a un derivado de colesterilo o un grupo bisdecilamida de ácido dodecanoico, un nucleótido 2'-desoxi-2'-fluoro-modificado, un nucleótido 2'-desoxi-modificado, un nucleótido bloqueado, un nucleótido abásico, un nucleótido 2'-amino-modificado, un nucleótido 2'-alquil-modificado, nucleótido de morfolino, un fosforamidato y un nucleótido que comprende base no natural.
6. El ARNds según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el ARNds está conjugado a un ligando.
7. El ARNds según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el ARNds se formula en una formulación de lípidos.
8. Un ácido ribonucleico bicatenario (ARNds) para inhibir la expresión de transtiretina (TTR), en el que dicho ARNds comprende una hebra complementaria que comprende una región complementaria a 19 nucleótidos de 618-648 nucleótidos de la SEC ID N° 1.331 y en el que dicha hebra complementaria empareja base con la guanina en la posición 628 de la SEC ID N° 1.331.
9. Un vector que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica ambas hebras del ARNds según las reivindicaciones 1 a 8.
10. Una célula
- (a) que contiene el ARNds según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 o
 - (b) que comprende el vector según la reivindicación 9.
11. Una composición farmacéutica para inhibir la expresión de un gen de la TTR que comprende el ARNds según las reivindicaciones 1 a 8 y un portador farmacéuticamente aceptable.
12. Un método para inhibir la expresión de la TTR en una célula, comprendiendo el método:
- (a) poner en contacto la célula con el ARNds según las reivindicaciones 1 a 8 y
 - (b) mantener la célula producida en la etapa (a) durante un tiempo suficiente para obtener la degradación de la transcripción de ARNm de un gen de la TTR, inhibiendo de ese modo la expresión del gen de la TTR en la célula;
- siempre que se excluya cualquier método de tratamiento del cuerpo del ser humano o del animal por terapia.
13. Un ARNds según las reivindicaciones 1 a 8, para uso en el tratamiento en un ser humano de un trastorno mediado por expresión de la TTR, en el que:
- (a) el ser humano presenta amiloidosis por transtiretina y/o
 - (b) el ser humano presenta un trastorno hepático.
14. El ARNds para uso según la reivindicación 13, en el que dicho ARNds se tiene que administrar al ser humano a

aproximadamente 0,01; 0,1; 0,3; 0,5; 1,0; 2,5 ó 5,0 mg/kg.

- 5 15. El ARNds para uso según la reivindicación 13 ó 14, en el que el ser humano recibe adicionalmente un método terapéutico para tratar una amiloidosis por TTR, el método terapéutico seleccionado del grupo que consiste en: diuréticos, inhibidores de la enzima de conversión de angiotensina, bloqueadores de los receptores de angiotensina, diálisis o un trasplante de hígado.
16. El ARNds para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 15, en el que dicha amiloidosis por transtiretina se selecciona de: polineuropatía amiloidótica familiar (FAP), cardiomiopatía amiloidótica familiar (FAC), amiloidosis leptomenígea/del SNC, amiloidosis sistémica senil (SSA) y amiloidosis cardíaca senil (SCA).
- 10 17. El ARNds para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 16, en el que el ARNds se administra al ser humano a intervalos de no más de 1, 2, 3 o 4 semanas.
18. El ARNds para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 17, en el que dicho ARNds se tiene que administrar por vía intravenosa o por infusión intravenosa durante un tiempo de 15 minutos.

15



ARNsi candidato

FIG. 1

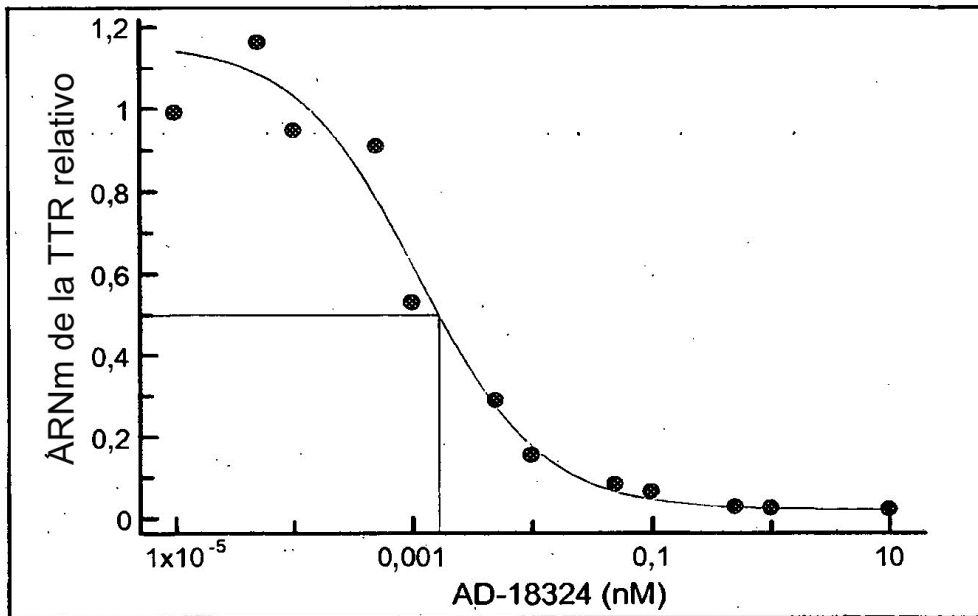


FIG. 2A

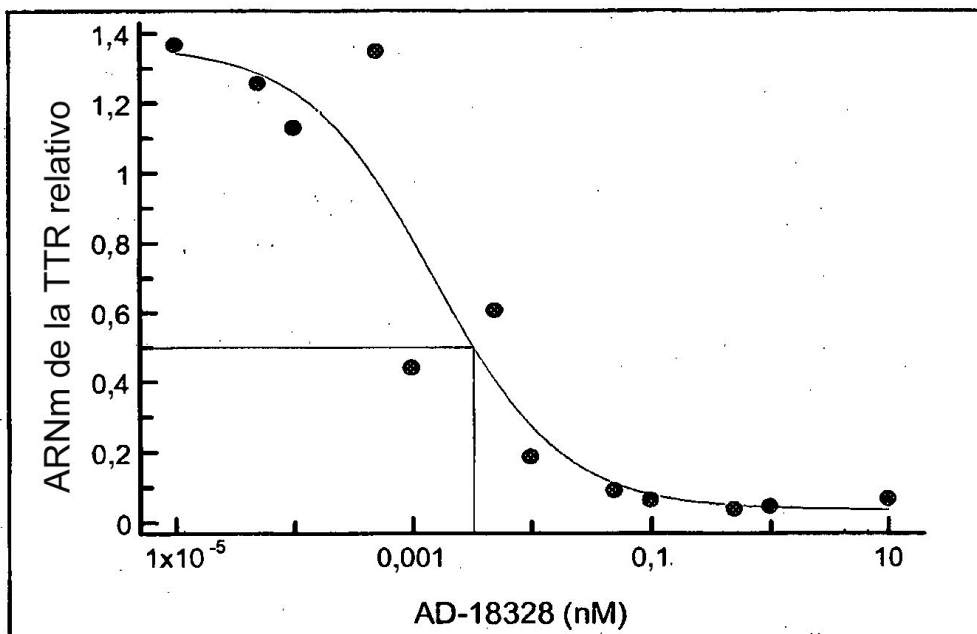


FIG. 2B

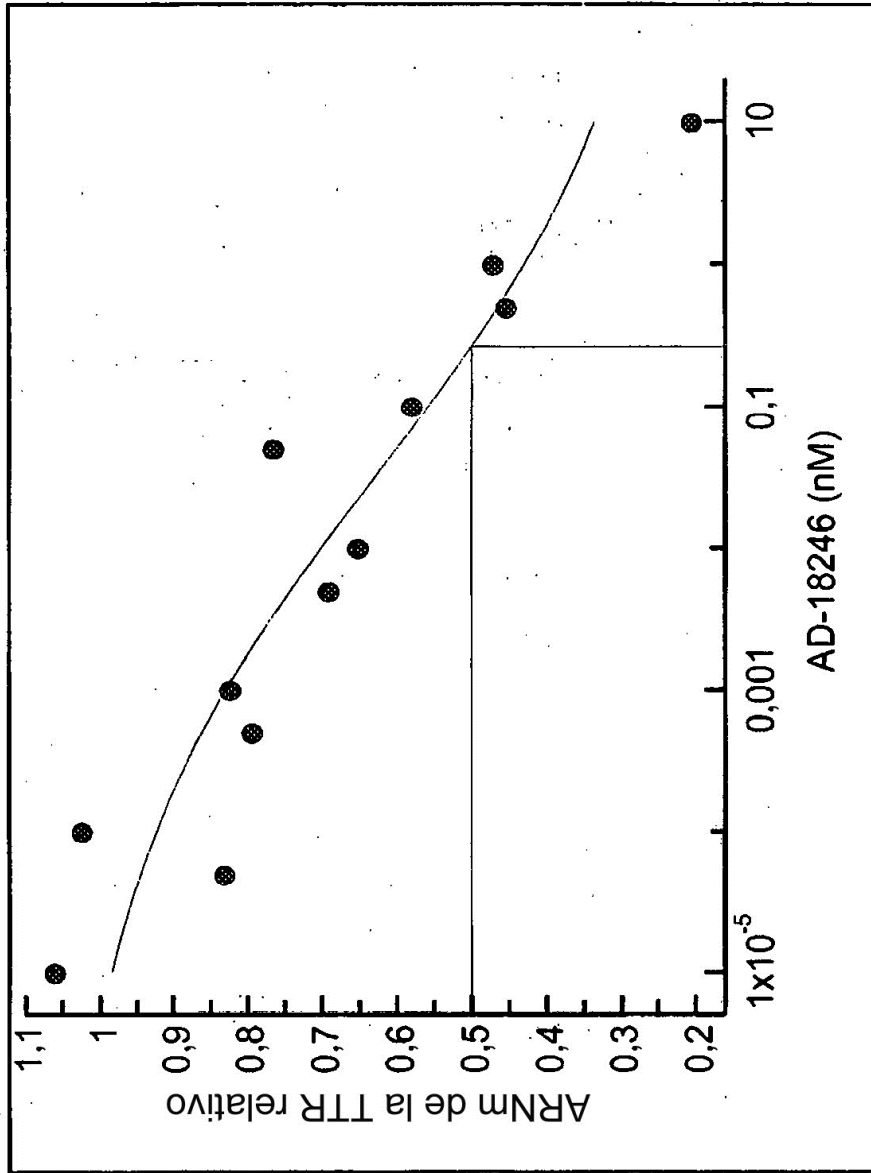


FIG. 3

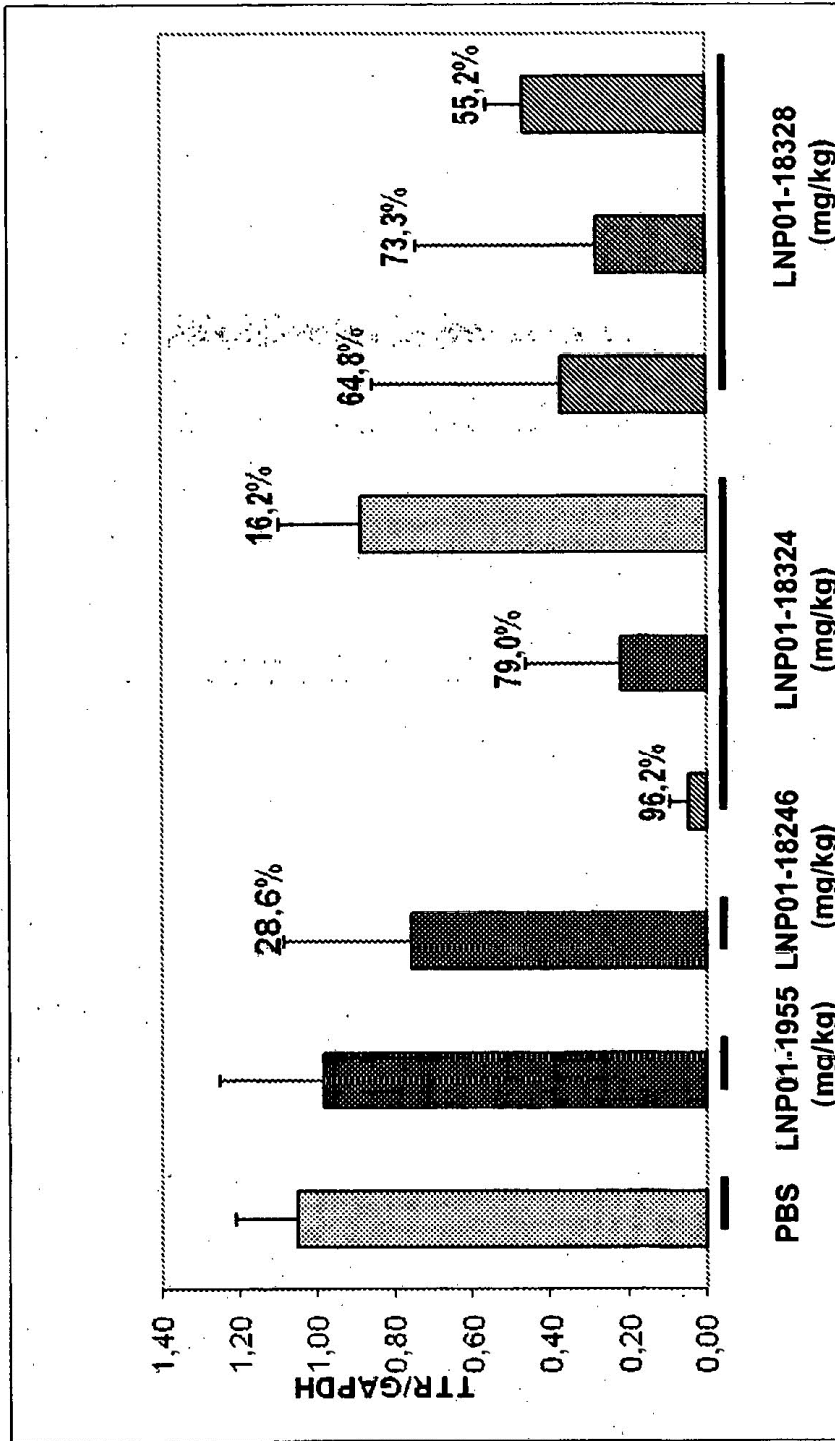


FIG. 4A

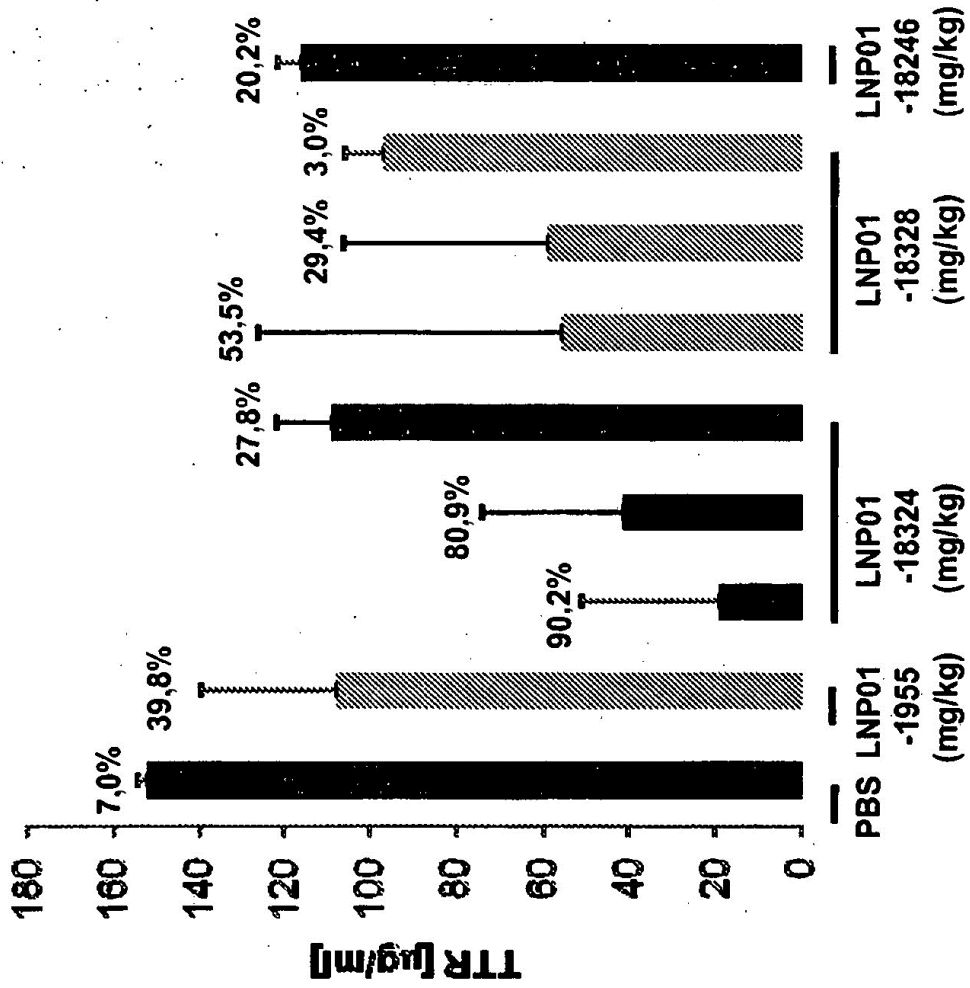


FIG. 4B

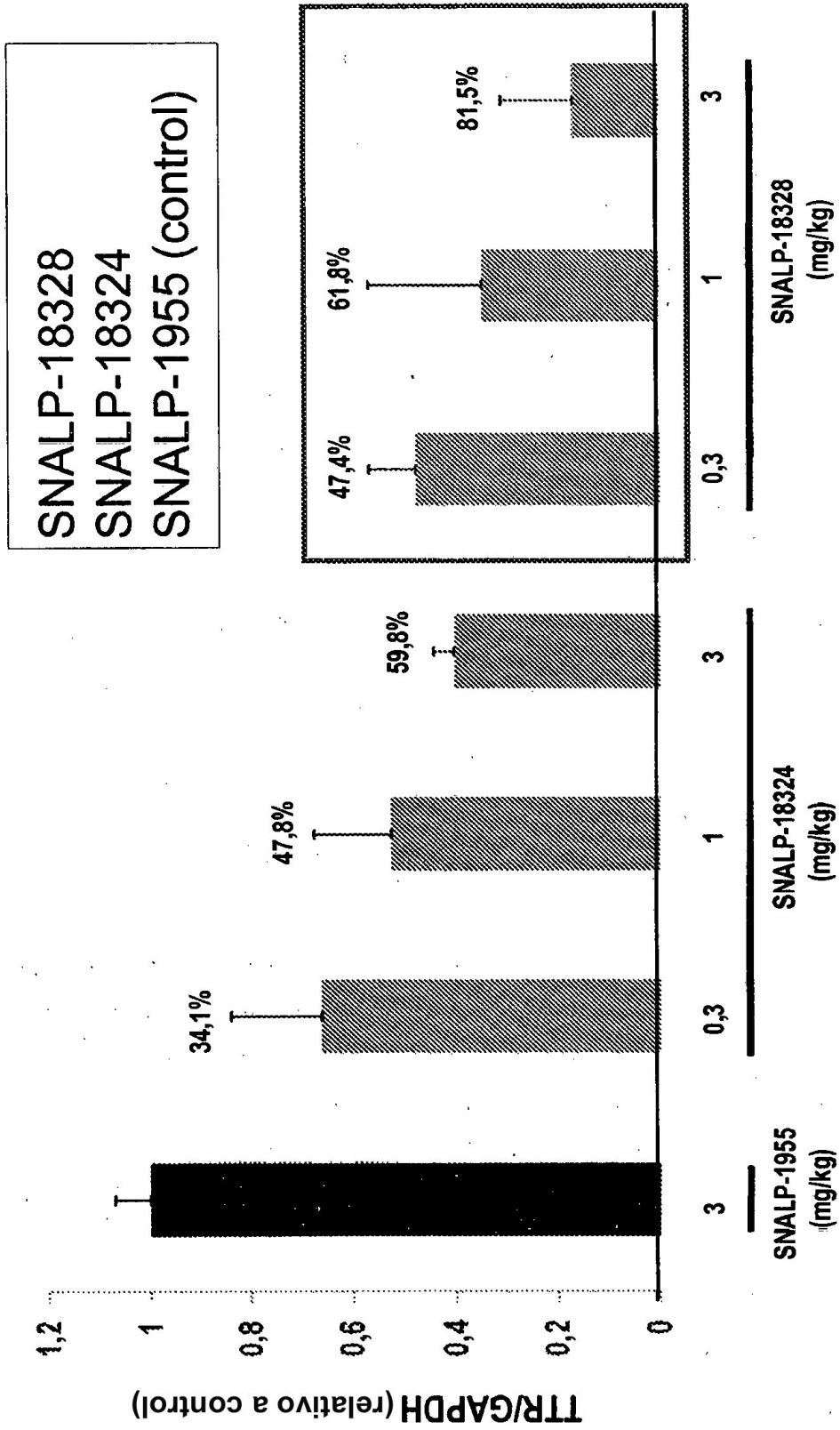


FIG. 5

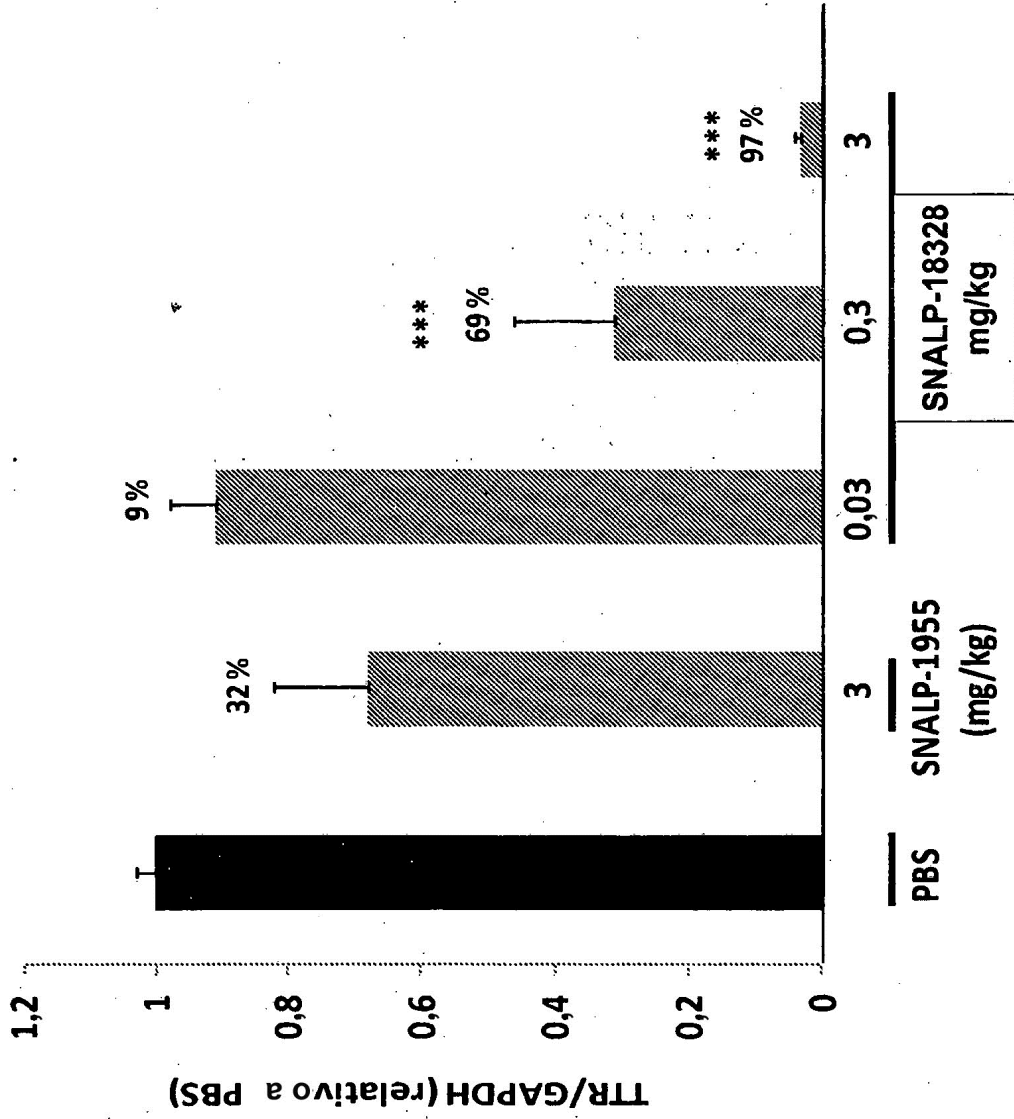


FIG. 6A

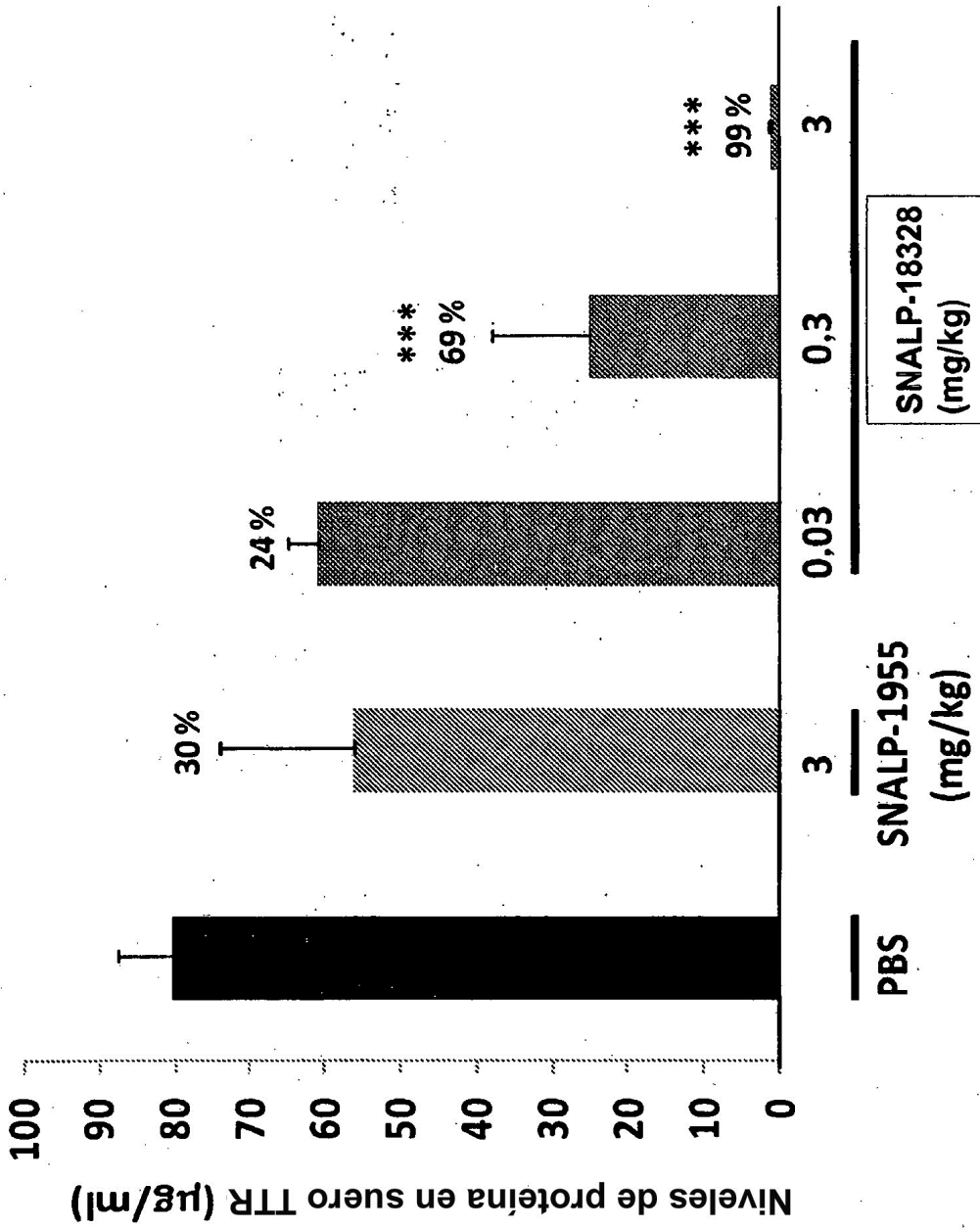


FIG. 6B

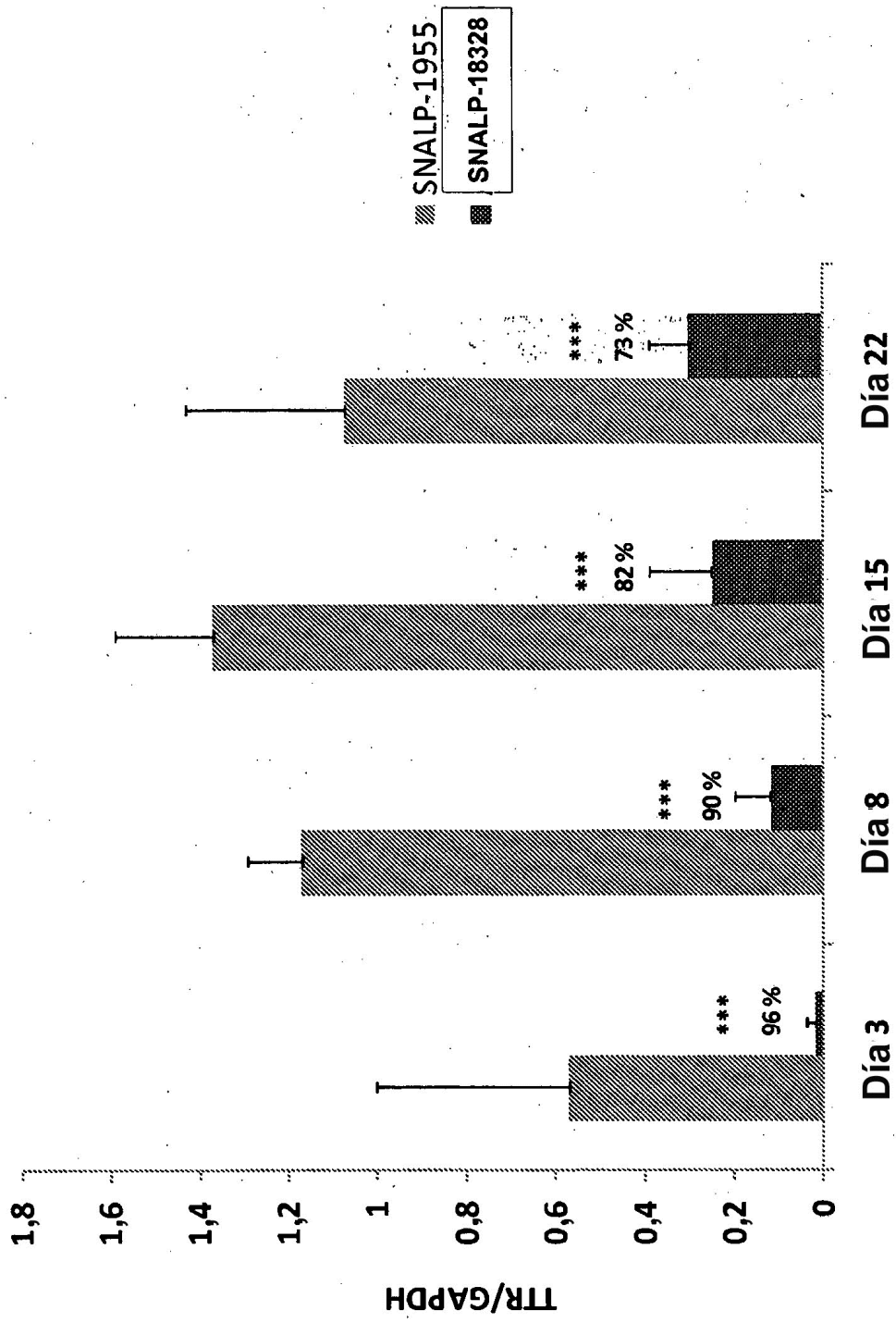


FIG. 7A

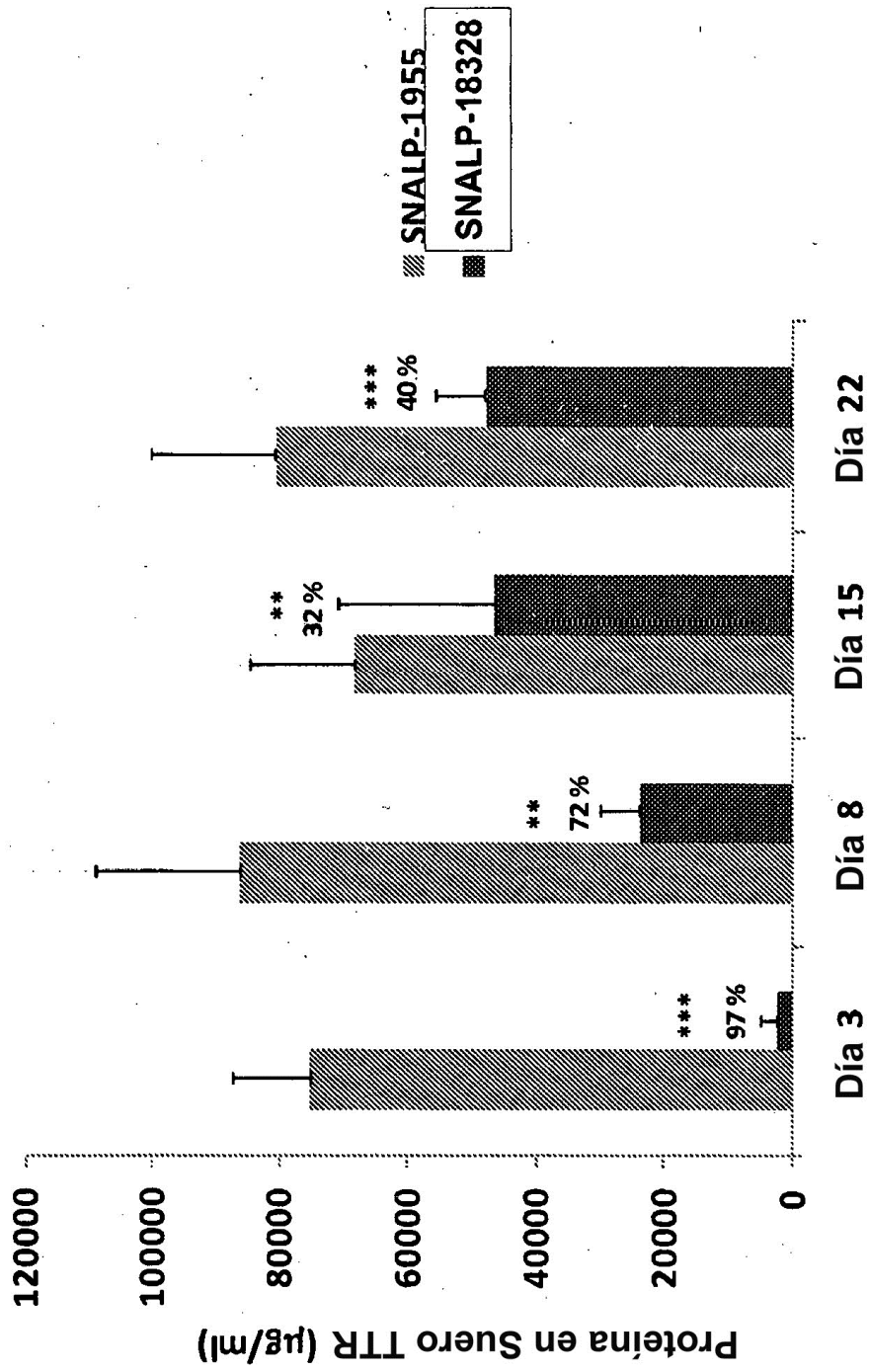


FIG. 7B

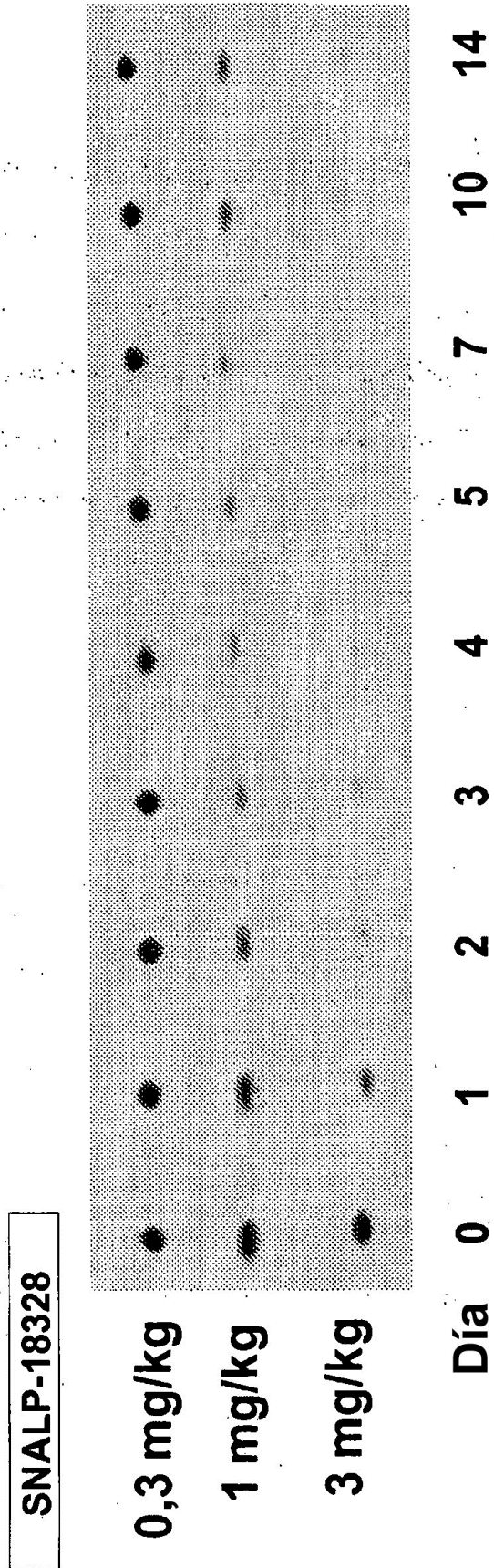


FIG. 9

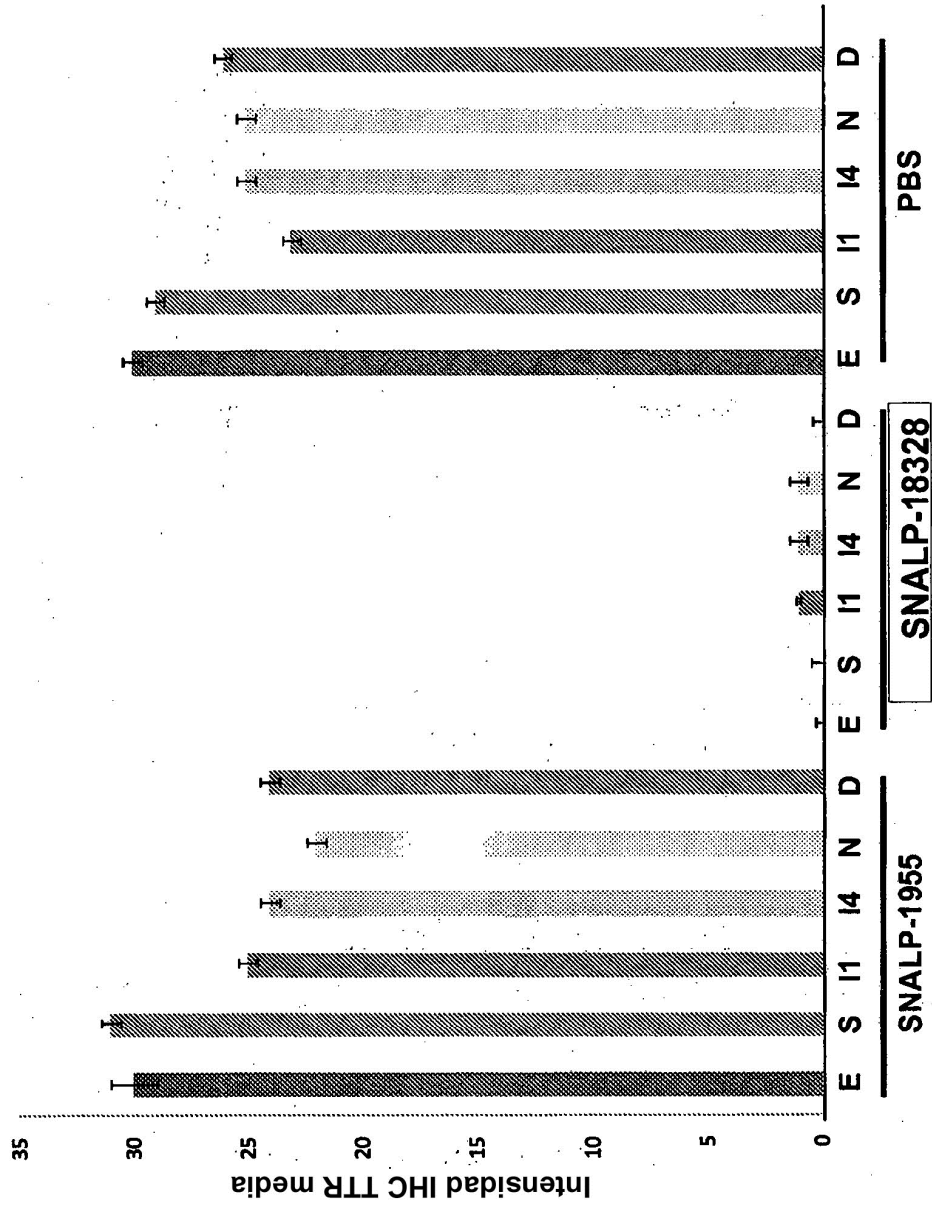


FIG. 9

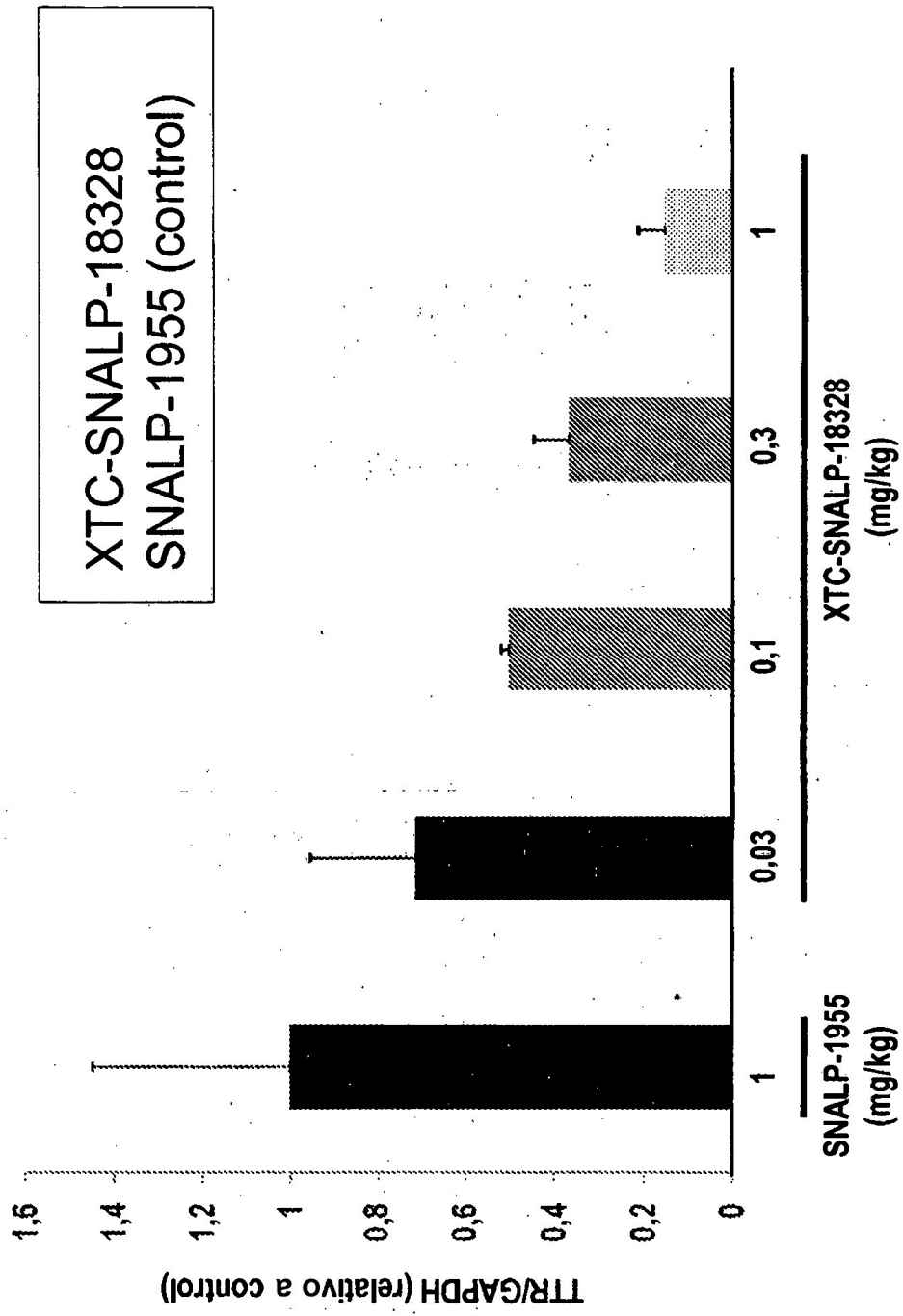


FIG. 10

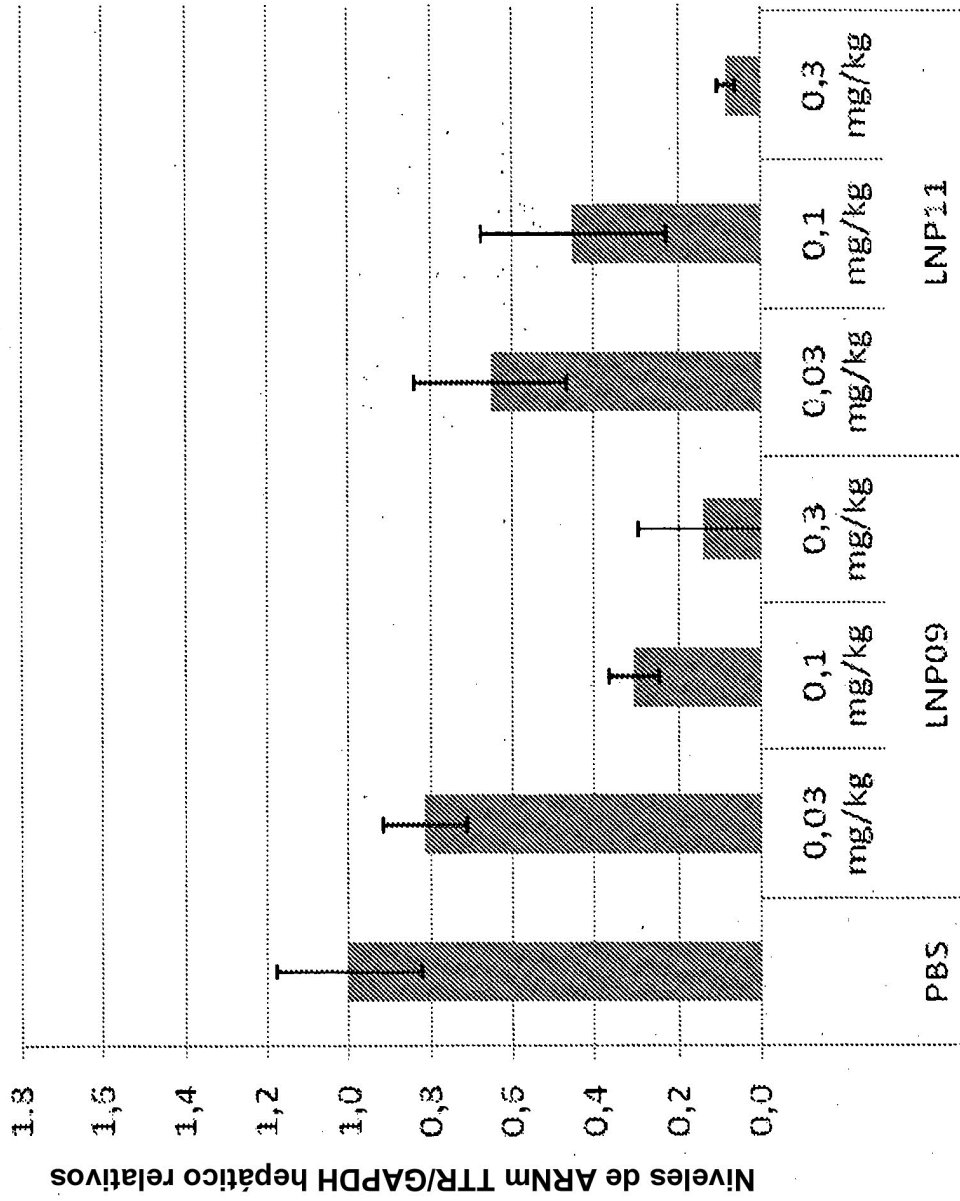


FIG. 11A

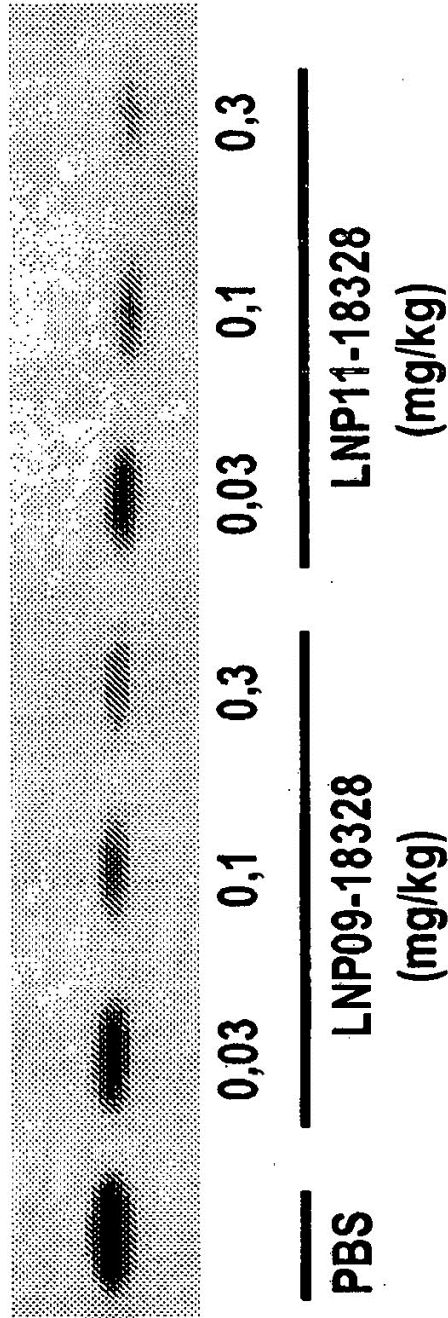
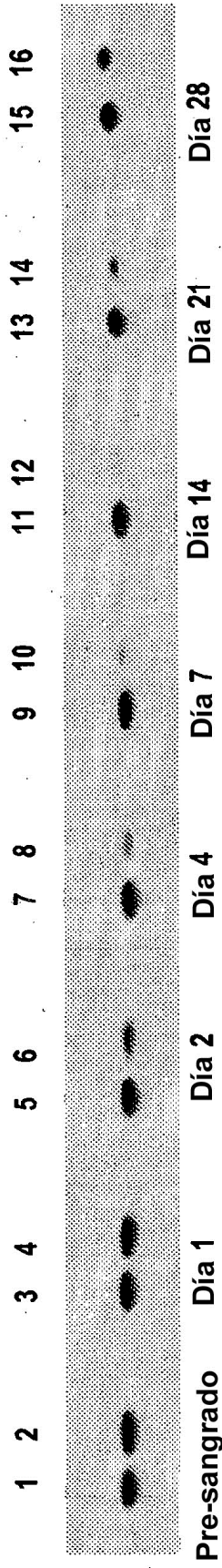


FIG. 11B



Viales 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 y 15: PBS animales
Viales 2, 4, 6, 8, 10, 14 y 16: 0,3 mg/kg LNP09-18328

FIG. 11C

gttgactaag	tcaataatca	gaatcagcag
gtttgcagtc	agattggcag	ggataagcag
cctagctcag	gagaagtgag	tataaaagcc
ccaggctggg	agcagccatc	acagaagtcc
actcattctt	ggcaggatgg	cttctcatcg
tctgctcctc	ctctgccttg	ctggactggg
at ttgtgtct	gaggctggcc	ctacgggcac
cgg tgaatcc	aagtgtcctc	tgatgggtcaa
agttctagat	gctgtccgag	gcagtcctgc
catcaatgtg	gccgtgcatg	tgttcagaaa
ggctgctgat	gacacctggg	agccatttgc
ctctgggaaa	accagtgagt	ctggagagct
gcatgggctc	acaactgagg	aggaatttgt
agaagggata	tacaaagtgg	aaatagacac
caaatcttac	tggaaaggcac	ttggcatctc
cccattccat	gagcatgcag	aggtgggtatt
cacagccaac	gactccggcc	cccgccgcta
caccattgcc	gccctgctga	gcccctactc
ctattccacc	acggctgtcg	tcaccaatcc
caaggaatga	gggacttctc	ctccagtgga
cctgaaggac	gagggatggg	at t tcatgta
accaagagta	ttccattttt	actaaagcag
tg t t t t c a c c	tcatatgcta	tg t t a g a a g t
ccaggcagag	acaataaaac	at t c c t g t g a
aaggcacttt	tcattccact	t t a a c t t g a t
t t t t t a a a t t	cccttattgt	c c c t t c c a a a
aaaaagagaa	tcaaaaatttt	a c a a a g a a t c
aaaggaattc	tagaaagtat	c t g g g c a g a a
cgctaggaga	gatccaaatt	t c c a t t g t c t
tgcaagcaaa	gcacgtatta	a a t a t g a t c t
gcagccatta	aaaagacaca	t t c t g t a a a a
aaaaaaaa	(SEC ID N°	1331)

FIG. 12

FIG. 13A

ACAGAAGTCCACTCATTCTTGGCAGGATGGCTTCTCATCGTCTGCTCCTCCT
CTGCCTTGCTGGACTGGTATTTGTGTCTGAGGCTGGCCCTACGGGCACCGGT
GAATCCAAGTGTCTCTGATGGTCAAAGTTCTAGATGCTGTCCGAGGCAGTC
CTGCCATCAATGTGGCCGTGCATGTGTTCAGAAAGGCTGCTGATGACACCTG
GGAGCCATTTGCCTCTGGGAAAACCAGTGAGTCTGGAGAGCTGCATGGGCTC
ACAACTGAGGAGGAATTTGTAGAAGGGATATACAAAGTGGAAATAGACACCA
AATCTTACTGGAAGGCACTTGGCATCTCCCCATTCCATGAGCATGCAGAGGT
GGTATTCACAGCCAACGACTCCGGCCCCCGCCGCTACACCATTGCCGCCCTG
CTGAGCCCCTACTCCTATTCCACCACGGCTGTCGTCACCAATCCCAAGGAAT
GAGGGACTTCTCCTCCAGTGGACCTGAAGGACGAGGGATGGGATTTTCATGTA
ACCAAGAGTATTCCATTTTTACTAAAGCAGTGTTTTACCTCATATGCTATG
TTAGAAGTCCAGGCAGAGACAATAAAACA^TTTCCTGTGAAAGGCACTTTTCAT
TCCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA (SEC ID N° 1329)

FIG. 13B

CCTGACAGGATGGCTTCCCTTCGCCTGTTCCCTCCTCTGCCTCGCTGGACTGA
TATTTGCGTCTGAAGCTGGCCCTGGGGTGCTGGAGAATCCAAGTGTCTCT
GATGGTCAAAGTCCTGGATGCTGTCCGAGGCAGCCCTGCTGTTCGATGTGGCC
GTGAAAGTGTTCAAAGGACTGCAGACGGAAGCTGGGAGCCGTTTGCCTCTG
GGAAGACCGCCGAGTCTGGAGAGCTGCACGGGCTCACCACAGATGAGAAGTT
CACGGAAGGGGTGTACAGGGTAGAACTGGACACCAAATCATACTGGAAGGCT
CTTGGCATTTC^CCCATTCCATGAATACGCAGAGGTGGTTTTACAGCCAATG
ACTCTGGTCATCGCCACTACACCATCGCAGCCCTGCTCAGCCCGTACTCCTA
CAGCACCCTGCTGTCGTCAGTAACCC^CCAGA^ACTGAGGGACCCAGCCACG
AGGACCAAGATCTTGCCAAAGCAGTAGCTCCCATTTGTA^CTGAAACAGTGTT
CTTGCTCTATAAACCGTGTTAGCAACTCGGGAAGATGCCGTGAAACGTTCTT
ATTAAACCACCTTTATTTCA^TTC
(SEC ID N° 1330)

ES 2 543 004 T3

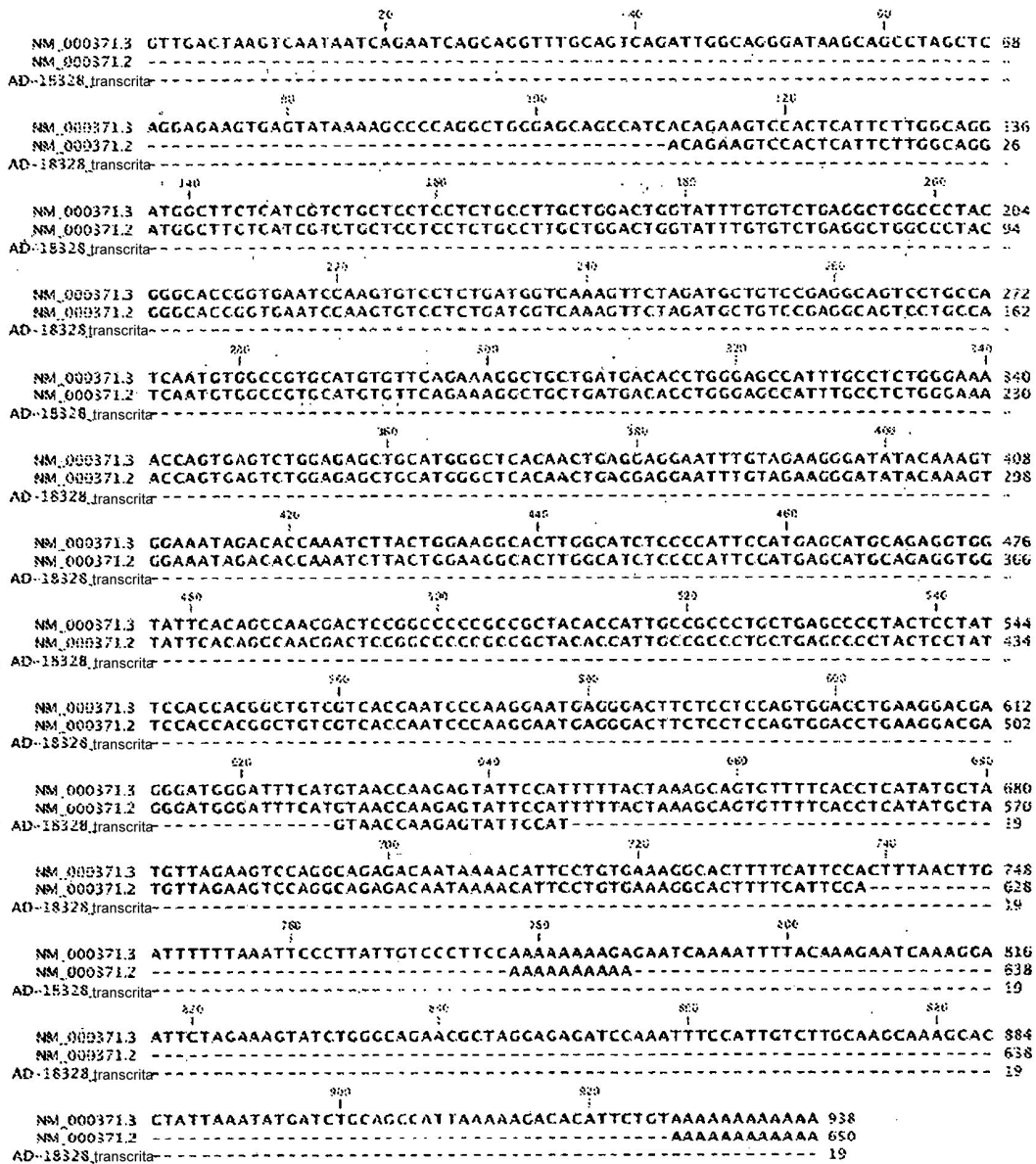


FIG. 14

Fenotipo	Características	Genotipos (mutación asociada en TTR)
Neuropatía amiloidótica familiar (FAP)	<p>Temprana: Impotencia Polineuropatía sensorimotora de las piernas Síndrome del túnel carpiano Disfunción autonómica Estreñimiento/Diarrea</p> <p>Tardía: Cardiomiopatía Opacidades vítreas Nefropatía</p>	<p>V28M L58H V30M L58R K70N Y78F I84S Y114H V30A K35N G47V S50R T60A Y114C</p>
Cardiomiopatía amiloidótica familiar (FAC)	<p>Cardiomegalia Fallo cardíaco congestivo Anormalidades de conducción arritmias Angina Muerte súbita</p>	<p>D18N D18E V20I P24S E42D A45T T49P S50I H56R I68L A81T Q92K R103S L111M V122I T60A</p>
Amiloidosis SNC (CNSA)	<p>Demencia, ataxia, espasticidad, convulsiones, hemorragia (intracerebelar y/o subaracnoides), psicosis, hidrocefalia</p>	<p>L12P D18G A25T V30G A36P G53E F64S Y69H Y114C</p>

FIG. 15

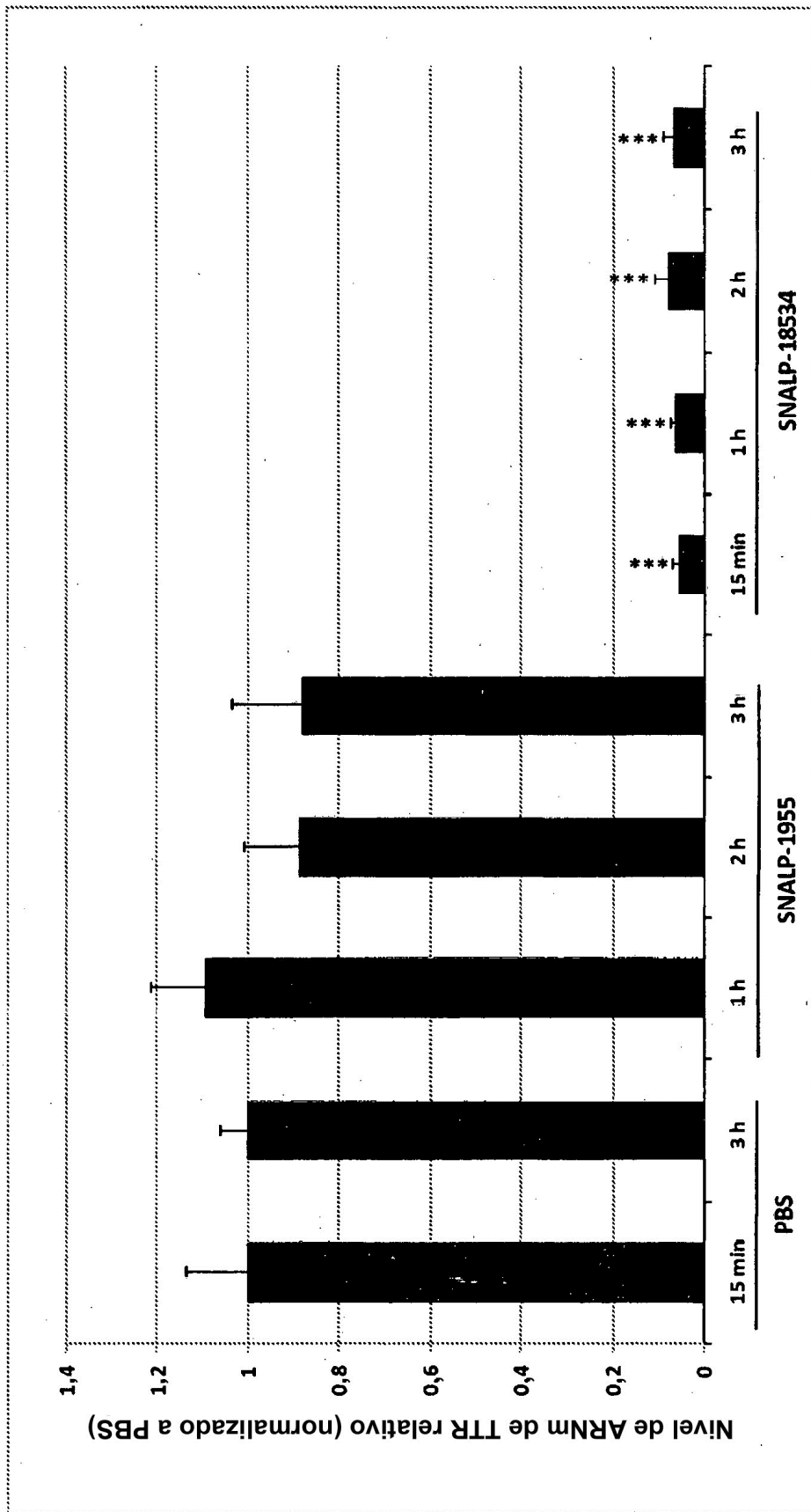


FIG. 16

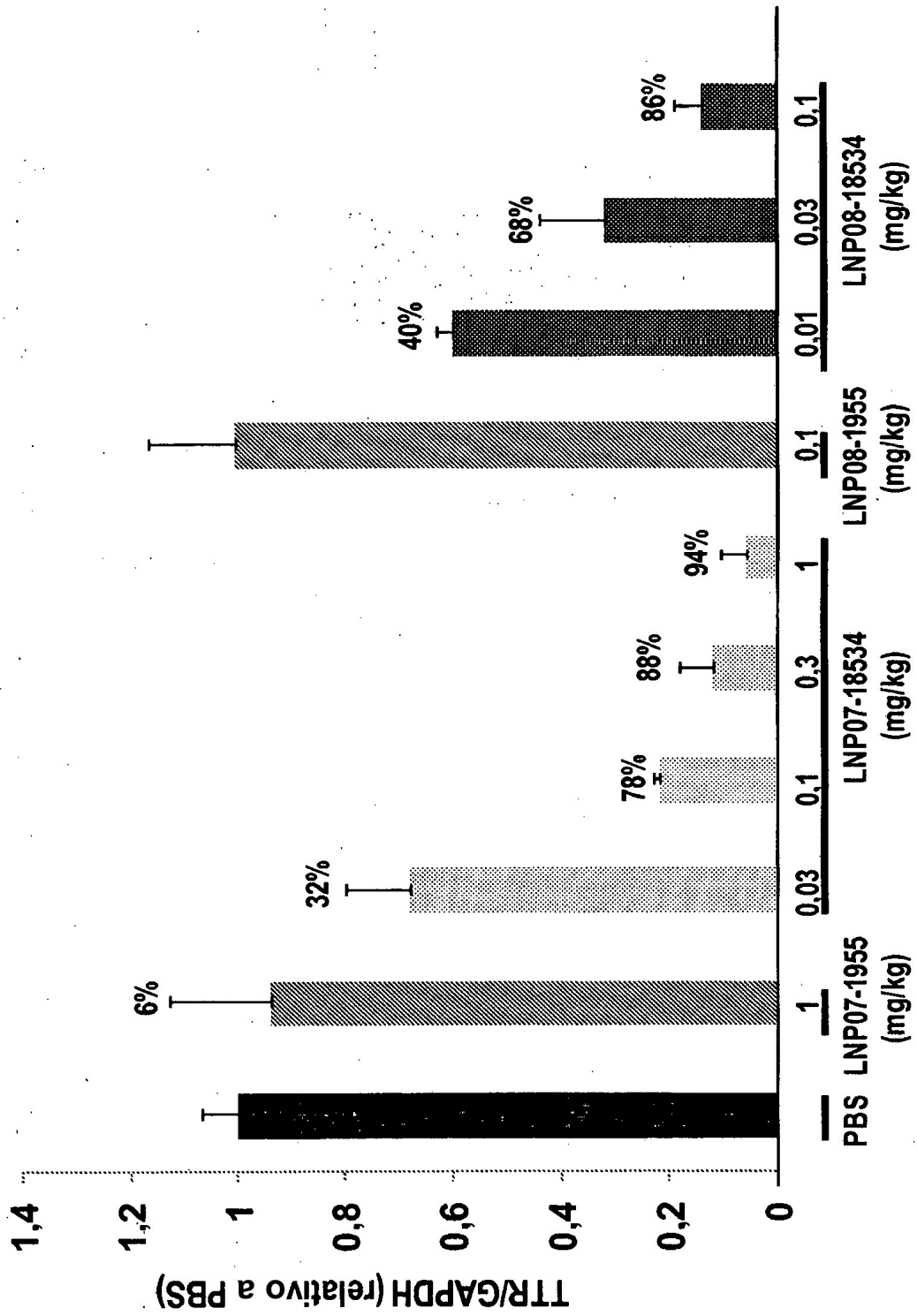


FIG. 17

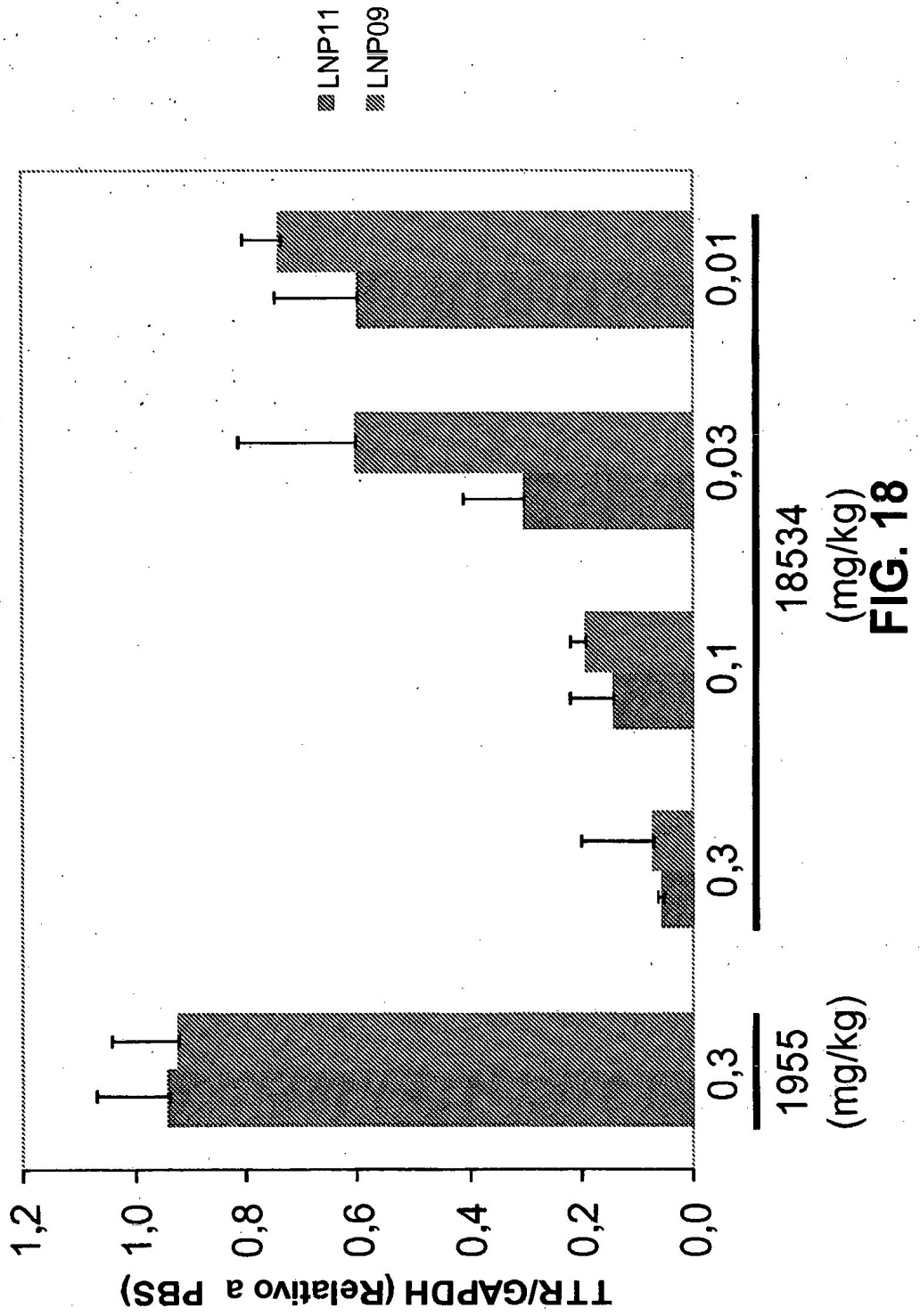


FIG. 18