



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) BR 112013025006-2 B1



(22) Data do Depósito: 28/03/2012

(45) Data de Concessão: 15/06/2021

(54) Título: COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA PARA INIBIR A EXPRESSÃO DE UM GENE DE TMPRSS6, MÉTODO PARA INIBIÇÃO DA EXPRESSÃO DE TMPRSS6 EM UMA CÉLULA, E USO DE ÁCIDOS RIBONUCLEICOS FITA DUPLA

(51) Int.Cl.: A61K 48/00; C12N 15/11; A61K 9/127.

(52) CPC: A61K 48/00; C12N 15/11; A61K 9/127.

(30) Prioridade Unionista: 09/12/2011 US 61/568,942; 29/03/2011 US 61/468,830.

(73) Titular(es): ALNYLAM PHARMACEUTICALS, INC..

(72) Inventor(es): DAVID BUMCROT; BRIAN BETTERN COURT; IVANKA TOUDJARSKA.

(86) Pedido PCT: PCT US2012030786 de 28/03/2012

(87) Publicação PCT: WO 2012/135246 de 04/10/2012

(85) Data do Início da Fase Nacional: 27/09/2013

(57) Resumo: ÁCIDO RIBONUCLEICO DE FILAMENTO DUPLO (dsRNA), CÉLULA, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA PARA INIBIR EXPRESSÃO DE UM GENE DE TMPRSS6, MÉTODO DE INIBIÇÃO D E EXPRESSÃO DE TMPRSS6 EM UMA CÉLULA, USO DO DSRNA E VETOR QUE CODIFICA PELO MENOS UM FILAMENTO DE UM dsRNA. A invenção se refere a composições de ácido ribonucleico de filamento duplo (dsRNA) que atuam no método de inibição específica da expressão do gene TMPRSS6 em uma célula. A invenção também se refere a uma composição farmacêutica, um vetor que codifica pelo menos um filamento de um dsRNA e ao uso do dsRNA no tratamento de doenças e afecções patológicas ocasionadas pela expressão de TMPRSS6.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA PARA INIBIR A EXPRESSÃO DE UM GENE DE TMPRSS6, MÉTODO PARA INIBIÇÃO DA EXPRESSÃO DE TMPRSS6 EM UMA CÉLULA, E USO DE ÁCIDOS RIBONUCLEICOS FITA DUPLA**".

Referência Cruzada a Pedidos Relacionados

[0001] Este pedido do pedido provisório U.S. 61/468.830, depositado em 29 de março de 2011, e o pedido provisório U.S. 61/568.942, depositado em 9 de dezembro de 2011. Esses pedidos anteriores são incorporados a título de referência à presente invenção em sua totalidade.

Campo da Invenção

[0002] A invenção refere-se à inibição específica da expressão do gene TMPRSS6.

Antecedentes da Invenção

[0003] O TMPRSS6 (Transmembrana Protease, Serina 6) codifica uma serina protease tipo II e é expresso principalmente no fígado. O TMPRSS6 influencia os níveis de ferro no fígado através da ligação e da degradação proteolítica do ativador de hepcidina e do HJV de co-receptor de BMP (hemojuvelina), que ocasiona diminuição dos níveis de hepcidina.

[0004] O TMPRSS6 consiste em uma cauda intracitoplasmática N-terminal curta, um domínio de transmembrana tipo II, uma região de haste composta por dois domínios CUB extracelulares (fator de complemento C1s/C1r, fator de crescimento embriônico de ouriço-do-mar e BMP (proteína morfogenética óssea)), três domínios LDLR (receptor de lipoproteína de baixa densidade classe A) e um domínio de protease da serina similar a tripsina C-terminal. Também existem sítios de consenso para N-glicosilação no domínio extracelular, e um sítio de fosforilação potencial na região da cauda intracitoplasmática.

Sumário da Invenção

[0005] São descritos no presente documento composições e métodos que efetuam a clivagem mediada por complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC) de transcrições de RNA do gene TMPRSS6, como em uma célula ou mamífero. Também são descritos composições e métodos para o tratamento de doenças e afecções patológicas ocasionadas pela expressão de um gene TMPRSS6, como um distúrbio caracterizado pela abundância de ferro (por exemplo, talassemia, por exemplo, uma β -talassemia intermediária ou uma α -talassemia). Também são descritos composições e métodos para diminuir ou evitar a mobilização ou absorção de ferro, melhorando assim a sobrecarga de ferro em determinadas afecções patológicas. Os métodos e composições aqui descritos são úteis, em geral, para o tratamento de hemocromatose (acúmulo de ferro no corpo).

[0006] Conforme usado no presente documento, o termo "iRNA" refere-se a um agente que contém RNA tal como o termo é aqui definido, e que media a clivagem direcionada de um transcrito de RNA através de uma rota de complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC). Em uma modalidade, um iRNA conforme aqui descrito inibe a expressão de TMPRSS6 em uma célula ou mamífero. Alternativamente, em outra modalidade, um iRNA aumenta os níveis da expressão de TMPRSS6 em uma célula ou mamífero.

[0007] Os iRNAs incluídos nas composições aqui apresentadas abrangem um RNA de fita dupla (dsRNA) que tem uma fita de RNA (a fita antissenso) que tem uma região que tem 30 nucleotídeos ou menos, em geral, 19 a 24 nucleotídeos de comprimento, que é substancialmente complementar a pelo menos **parte** de um transcrito de mRNA de um gene TMPRSS6. Em uma modalidade, o dsRNA compreende uma região de pelo menos 15 nucleotídeos contíguos.

[0008] Em uma modalidade, um iRNA para a inibição da expressão de um gene TMPRSS6 inclui **pelo menos duas sequências que**

são complementares entre si. O iRNA inclui uma fita senso que tem uma primeira sequência e uma fita antissenso que tem uma segunda sequência. **A fita antissenso inclui** uma sequência de nucleotídeos que é substancialmente complementar a pelo menos parte de um mRNA que codifica TMPRSS6, e a região de complementariedade tem 30 nucleotídeos ou menos, e pelo menos 15 nucleotídeos de comprimento. Em geral, o iRNA tem 19 a 24, por exemplo, 19 a 21 nucleotídeos de comprimento. Em algumas modalidades, o iRNA tem de cerca de 15 a cerca de 25 nucleotídeos de comprimento, e, em outras modalidades, o iRNA tem de cerca de 25 a cerca de 30 nucleotídeos de comprimento. O iRNA, mediante contato com uma célula que expressa TMPRSS6, inibe a expressão de um gene TMPRSS6 em pelo menos 10%, pelo menos 20%, pelo menos 25%, pelo menos 30%, pelo menos 35% ou pelo menos **40%** ou mais, como quando analisado por um método conforme aqui descrito. Em uma modalidade, o iRNA de TMPRSS6 é formulado em uma partícula lipídica de ácido nucleico estável (SNALP).

[0009] Em uma modalidade, um iRNA aqui apresentado inclui uma **primeira sequência de um dsRNA que é selecionado do grupo que consiste nas sequências senso das Tabelas 2, 3 ou 4 e uma segunda sequência** que é selecionada do grupo que consiste nas sequências antissenso correspondentes das Tabelas 2, 3 ou 4. **As moléculas de iRNA aqui apresentadas podem incluir nucleotídeos de ocorrência natural ou podem incluir** pelo menos um nucleotídeo modificado, que inclui, mas não se limita a um nucleotídeo modificado de 2'-O-metila, um nucleotídeo que tem um grupo 5'-fosforotioato e um nucleotídeo terminal ligado a um derivado de colesterila. Alternativamente, o nucleotídeo modificado pode ser escolhido do grupo de: um nucleotídeo modificado de 2'-desoxi-2'-fluoro, um nucleotídeo 2'-desoxi-modificado, um nucleotídeo fechado, um nucleotídeo abási-

co, nucleotídeo 2'-amino-modificado, nucleotídeo 2'-alquila-modificado, nucleotídeo morfolino, um fosforamidato e uma base não natural que compreende nucleotídeo. Em geral, tal sequência modificada será baseada em uma **primeira sequência do dito iRNA** selecionado do grupo que consiste nas **sequências senso das Tabelas 2, 3 ou 4** e uma **segunda sequência selecionada** do grupo que consiste nas sequências antissenso das Tabelas 2, 3 ou 4.

[00010] Em uma modalidade, um iRNA aqui apresentado inclui uma fita senso de um dsRNA de TMPRSS6 que tem uma sequência selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NO:111, SEQ ID NO:455, SEQ ID NO:109, SEQ ID NO:524, SEQ ID NO:89, SEQ ID NO:494, SEQ ID NO:445, SEQ ID NO:592, SEQ ID NO:47 e SEQ ID NO:540; e uma fita antissenso que consiste em uma sequência selecionada do grupo que consiste em SEQ ID NO:112, SEQ ID NO:456, SEQ ID NO:110, SEQ ID NO:525, SEQ ID NO:90, SEQ ID NO:495, SEQ ID NO:446, SEQ ID NO:593, SEQ ID NO:48 e SEQ ID NO:541.

[00011] Em outra modalidade, uma composição contendo um TMPRSS6 de direcionamento de dsRNA é administrada em um indivíduo que tem níveis elevados de ferro, por exemplo, níveis elevados de ferro no fígado. Um indivíduo que tem níveis elevados de ferro pode ser identificado como um indivíduo que tem níveis elevados de ferro sérico (por exemplo, mais de 350 µg/dl, mais de 500 µg/dl ou mais de 1.000 µg/dl ou mais), níveis elevados de ferritina sérica, ou um nível de saturação de transferrina maior do que 40%, maior do que 45%, maior do que 50%, maior do que 60% ou mais.

[00012] A sobrecarga média a moderada de ferro é indicada por níveis de ferritina sérica de 300 a 2.500 µg/l, enquanto os níveis >2.500 µg/l estão associados a um risco aumentado de doença cardíaca. Mostrou-se que o nível de ferritina sérica >1.000 µg/l estava associado a consequências adversas na sobrecarga de ferro primária e

secundária. Os níveis de ferritina sérica maiores do que 200 µg/l em mulheres no período da pré-menopausa, e 300 µg/l em homens e mulheres no período de pós-menopausa indicam sobrecarga de ferro primária devido à hemocromatose, e níveis de ferritina maiores do que 1.000 µg/l sugerem tipicamente lesão no fígado devido à sobrecarga de ferro. Um indivíduo que tem um nível de ferritina sérica maior do que 300 µg/l, 500 µg/l, 1000 µg/l, 1.500 µg/l, 2.000 µg/l ou 2.500 µg/l ou mais é um candidato para o tratamento com um TMPRSS6 de direcionamento de dsRNA.

[00013] Em outra modalidade, uma composição contendo um TMPRSS6 de direcionamento de dsRNA é administrada em um indivíduo que tem níveis elevados de transferrina, por exemplo, níveis de transferrina maiores do que 400 mg/dl, maiores do que 500 mg/dl, maiores do que 1.000 mg/dl ou mais)

[00014] Os níveis de ferro também podem ser medidos por um teste TIBC (Capacidade de Ligação de Ferro Total). O teste TIBC mede a quantidade de ferro que o sangue conteria se os níveis de transferrina estivessem totalmente saturados. Visto que a transferrina é produzida pelo fígado, a TIBC pode ser usada para monitorar a nutrição e o funcionamento do fígado. Um indivíduo que tem valores de TIBC maiores do que 400 µg/dl, maiores do que 500 µg/dl ou maiores do que 1.000 µg/dl ou mais é um candidato para o tratamento com um TMPRSS6 de direcionamento de dsRNA.

[00015] Em uma modalidade, a administração do dsRNA diminui os níveis de ferro, por exemplo, no fígado, ou no soro, em pelo menos 5%, por exemplo, em pelo menos 10%, em pelo menos 15%, pelo menos 20%, pelo menos 25%, pelo menos 30%, pelo menos 40%, pelo menos 50%, ou pelo menos 60%, ou mais. Em algumas modalidades, um ou mais dentre os níveis de ferritina sérica, níveis de transferrina sérica, níveis de saturação de transferrina ou valores de TIBC são di-

minuídos em pelo menos 5%, pelo menos 10%, pelo menos 15%, pelo menos 20%, pelo menos 25%, pelo menos 30%, pelo menos 40%, pelo menos 50%, ou pelo menos 60%, ou mais, em comparação a níveis de pré-tratamento. Em outra modalidade, a diminuição nos níveis de ferro, a diminuição nos níveis de ferritina sérica, a diminuição nos níveis de transferrina ou saturação de transferrina ou a diminuição nos valores de TIBC é mantida por pelo menos 5, 10, 20, 30 ou 40 dias ou mais.

[00016] Em uma modalidade, indivíduo é selecionado, pelo menos em parte, na base da necessidade (em oposição à mera seleção de um paciente em razão de quem possa estar em necessidade) de diminuir os níveis de ferro.

[00017] Em uma modalidade, um iRNA conforme aqui descrito direciona um transcrito de RNA de TMPRSS6 de tipo selvagem, e, em outra modalidade, o iRNA direciona um transcrito mutante (por exemplo, um RNA de TMPRSS6 que contém uma variante alélica). Por exemplo, um iRNA apresentado na invenção pode direcionar uma variante polimórfica, como um polimorfismo de nucleotídeo único (SNP), de TMPRSS6. Em outra modalidade, o iRNA direciona um transcrito de TMPRSS6 de tipo selvagem e uma mutante. Em ainda outra modalidade, o iRNA direciona uma variante de transcrito de TMPRSS6.

[00018] Em uma modalidade, um iRNA apresentado na invenção direciona uma região não codificante de um transcrito de RNA de TMPRSS6, como a região não traduzida-5' ou 3'.

[00019] Em uma modalidade, um iRNA apresentado na invenção é aplicado ao fígado, por exemplo, hepatócitos do fígado ou células de Kupffer, por exemplo, células de Kupffer hipertróficas.

[00020] Em um aspecto, as modalidades apresentadas na invenção fornecem uma célula contendo pelo menos um dos iRNAs apresentados na invenção. A célula é, em geral, uma célula de mamífero, como

uma célula humana.

[00021] Em outro aspecto, as modalidades apresentadas na invenção fornecem uma composição farmacêutica para a inibição da expressão de um gene TMPRSS6 em um organismo, em geral, um indivíduo humano. A composição inclui, tipicamente, um ou mais dos iRNAs aqui descritos e um veículo farmacêuticamente aceitável ou veículo de aplicação. Em uma modalidade, a composição é usada para o tratamento de um distúrbio que ocasiona níveis aumentados de ferro, por exemplo, hemocromatose. Por exemplo, a composição é útil para o tratamento de uma talassemia, como β -talassemia intermediária.

[00022] Em outra modalidade, a composição farmacêutica é formulada para a administração de um regime de dosagem aqui descrito, por exemplo, não mais que uma vez a cada dois meses, não mais que uma vez por mês, não mais que duas vezes por mês, não mais que uma vez a cada quatro semanas, não mais que uma vez a cada três semanas, não mais que uma vez a cada duas semanas ou não mais que uma vez por semana. Em outra modalidade, a administração da composição farmacêutica pode ser mantida por um mês ou mais, por exemplo, um, dois, três, ou seis meses, ou um ano, ou cinco anos, ou dez anos, ou mais, incluindo o tempo de vida remanescente de um indivíduo.

[00023] Em outra modalidade, uma composição contendo um iRNA aqui descrito, por exemplo, um TMPRSS6 de direcionamento de dsRNA, é administrada com um agente terapêutico de não iRNA, como um agente conhecido para tratar hemocromatose, ou um distúrbio que ocasiona hemocromatose, como uma talassemia. Por exemplo, um iRNA apresentado na invenção pode ser administrado com um agente para o tratamento de uma β talassemia, por exemplo, β -talassemia intermediária, ou outro distúrbio associado a níveis aumentados de ferro.

[00024] Em outra modalidade, um iRNA de TMPRSS6 é administrado a um paciente, e, então, o agente de não iRNA é administrado ao paciente (ou vice-versa). Em outra modalidade, um iRNA de TMPRSS6 e o agente terapêutico de não iRNA são administrados ao mesmo tempo. Em uma modalidade, o agente é, por exemplo, um agente que afeta os níveis de ferro, como um quelante de ferro (por exemplo, desferrioxamina), ou ácido fólico.

[00025] Em outro aspecto, é fornecido no presente documento um método para a inibição da expressão de um gene TMPRSS6 em uma célula através da realização das etapas a seguir:

(a) introduzir na célula um ácido ribonucleico de fita dupla (dsRNA), em que o dsRNA inclui pelo menos duas sequências que são complementares entre si. O dsRNA tem uma fita senso que tem uma primeira sequência e uma fita antissenso que tem uma segunda sequência; a fita antissenso tem uma região de complementariedade que é substancialmente complementar a pelo menos uma parte de um mRNA que codifica TMPRSS6, e onde a região de complementariedade tem 30 nucleotídeos ou menos, isto é, 15 a 30 nucleotídeos de comprimento, e, em geral, 19 a 24 nucleotídeos de comprimento, e onde o dsRNA, mediante contato com uma célula que expressa TMPRSS6, inibe a expressão de um gene TMPRSS6 em pelo menos 10%, de preferência, pelo menos 20%, pelo menos 30%, pelo menos 40% ou mais; e

(b) manter a célula produzida na etapa (a) por tempo suficiente para obter degradação do transcrito de mRNA do gene TMPRSS6, inibindo assim a expressão de um gene TMPRSS6 na célula.

[00026] Em outro aspecto, a invenção fornece métodos e composições úteis para a ativação da expressão de um gene TMPRSS6 em uma célula ou mamífero.

[00027] Em outro aspecto, a invenção fornece um método para a modulação da expressão de um gene TMPRSS6 em uma célula através da realização das etapas a seguir:

(a) introduzir na célula o ácido ribonucleico de fita dupla (dsRNA), em que o dsRNA inclui **pelo menos duas sequências que são complementares entre si. O dsRNA tem uma fita senso que tem uma primeira sequência e uma fita antissenso que tem uma segunda sequência; a fita** antissenso tem uma região de complementariedade que é substancialmente complementar a pelo menos uma parte de um mRNA que codifica TMPRSS6, e onde a região de complementariedade tem 30 nucleotídeos ou menos, isto é, 15 a 30 nucleotídeos de comprimento, e, em geral, 19 a 24 nucleotídeos de comprimento, e onde o dsRNA, mediante contato com uma célula que expressa TMPRSS6, modula a expressão de um gene TMPRSS6 em pelo menos 10%, de preferência pelo menos 20%, pelo menos 30%, pelo menos **40%** ou mais; e

(b) manter a célula produzida na etapa (a) por tempo suficiente para obter degradação ou proteção do transcrito de mRNA do gene TMPRSS6, modulando assim a expressão de um gene TMPRSS6 na célula.

[00028] Em uma modalidade, o método serve para a inibição da expressão de gene em uma célula do fígado, como um hepatócito, ou uma célula de Kupffer. Em outra modalidade, o método serve para a ativação da expressão de gene em uma célula do fígado.

[00029] Em outros aspectos, a invenção fornece métodos para o tratamento de, prevenção, reversão ou manipulação de processos patológicos mediados por expressão de TMPRSS6, como um distúrbio associado à hemocromatose. Em uma modalidade, o método inclui a administração a um paciente em necessidade de tal tratamento, prevenção, reversão ou manipulação, de uma quantidade terapêutica ou

profilaticamente eficaz de um ou mais dos iRNAs apresentados na invenção. Em uma modalidade, o paciente tem uma talassemia, como β -talassemia intermediária. Em outra modalidade, a administração do TMPRSS6 de direcionamento de iRNA alivia ou atenua a severidade de pelo menos um sintoma de um distúrbio mediado por TMPRSS6 no paciente, como um sintoma associado à sobrecarga de ferro, por exemplo, dor nas articulações, dor abdominal ou fraqueza.

[00030] Em um aspecto, a invenção fornece um vetor para a inibição da expressão de um gene TMPRSS6 em uma célula. Em uma modalidade, o vetor inclui pelo menos uma sequência regulatória ligada de modo operacional a uma sequência de nucleotídeos que codifica pelo menos uma fita de um iRNA conforme aqui descrito.

[00031] Em outro aspecto, a invenção fornece uma célula contendo um vetor para a inibição da expressão de um gene TMPRSS6 em uma célula. O vetor inclui uma sequência regulatória ligada de modo operacional a uma sequência de nucleotídeos que codifica pelo menos uma fita de um dos iRNAs conforme aqui descrito.

[00032] Em ainda outro aspecto, a invenção fornece uma composição contendo um iRNA de TMPRSS6, em combinação a um segundo iRNA que direciona um segundo gene envolvido em uma doença patológica, e útil para o tratamento da doença, por exemplo, uma β -talassemia. Por exemplo, um segundo iRNA pode direcionar um regulador negativo de hepcidina, como um fator induzível por hipóxia, por exemplo, um HIF-1a ou HIF-2a; GDF15; ou TWSG1. Em uma modalidade, o segundo iRNA direciona um gene envolvido em um segundo distúrbio que resulta da β -talassemia. Por exemplo, o segundo iRNA pode direcionar um gene envolvido em diabetes mellitus, trombose ou osteopenia.

[00033] Os detalhes de várias modalidades da invenção são apresentados na descrição abaixo. Outros recursos, objetivos e vantagens

da invenção se tornarão evidentes a partir da descrição e dos desenhos, e das reivindicações.

Descrição dos Desenhos

[00034] A Figura 1 é a sequência de mRNA de TMPRSS6 humano (Seq. Ref. NM_153609.2, GI:56682967, Registro datado de 23 de janeiro de 2011, SEQ ID NO:1).

[00035] As Figuras 2A e 2B descrevem a potência de dois siRNAs de direcionamento de TMPRSS6 quimicamente modificados na redução de expressão de gene TMPRSS6 em hepatócitos de camundongo primários.

[00036] As Figuras 3A e 3B descrevem o efeito de siRNA-1 de LNP-TMPRSS6 (AD-46273) e siRNA-2 de LNP-TMPRSS6 (AD-46286), em expressão de gene TMPRSS6 e HAMP1, respectivamente, em camundongos WT C57BL/6.

[00037] A Figura 4 descreve a duração dos efeitos mediados por siRNA de TMPRSS6 na expressão de gene TMPRSS6, na expressão de gene HAMP1 e nos níveis de ferro sérico em camundongos WT C57BL/6.

[00038] A Figura 5 descreve o nível de silenciamento mediado por siRNA de TMPRSS6 de TMPRSS6 necessário para manter os efeitos mediados por siRNA de TMPRSS6 na expressão de gene HAMP1 e nos níveis de ferro sérico em camundongos WT C57BL/6.

[00039] As Figuras 6A e 6B descrevem o efeito de silenciamento mediado por siRNA de TMPRSS6 de TMPRSS6 sob parâmetros hematológicos em camundongos WT C57BL/6. A Figura 6A descreve o efeito de silenciamento mediado por siRNA de TMPRSS6 de TMPRSS6 em hemoglobina (HBG) em camundongos WT C57BL/6 6 horas, 24 horas, 48 horas, 72 horas, 7 dias e 14 dias após a administração. A Figura 6B descreve o efeito de silenciamento mediado por siRNA de TMPRSS6 de TMPRSS6 em hematócrito em camundongos

WT C57BL/6 6 horas, 24 horas, 48 horas, 72 horas, 7 dias e 14 dias após a administração.

[00040] A Figura 7 descreve o efeito de silenciamento mediado por siRNA de TMPRSS6 de TMPRSS6 sob parâmetros de ferro sérico em camundongos talassêmicos (Th3/+), incluindo níveis de ferro sérico, níveis de capacidade de ligação de ferro insaturado (UIBC) e níveis de saturação de transferrina.

[00041] As Figuras 8A a 8C descrevem os efeitos de silenciamento mediado por siRNA de TMPRSS6 de TMPRSS6 sob parâmetros de reticulócito e eritrócito em camundongos talassêmicos (Th3/+). A Figura 8A descreve o efeito sob o número de reticulócitos (%), a Figura 8B descreve o efeito sob o teor de hemoglobina de reticulócitos (CHr) e a Figura 8C descreve o efeito sob o número de células vermelhas de sangue maduras.

[00042] As Figuras 9A a 9D descrevem o efeito de silenciamento mediado por siRNA de TMPRSS6 de TMPRSS6 sob parâmetros hematológicos em camundongos talassêmicos (Th3/+). A Figura 9A descreve o efeito sob níveis de hematócrito (HCT), a Figura 9B descreve o efeito sob a hemoglobina (HGB), a Figura 9C descreve o efeito sob a largura da distribuição de célula vermelha de sangue (RBC) (RDW) e a Figura 9D descreve o efeito sob o valor de corpúsculo médio (MCV).

[00043] As Figuras 10A a 10C descrevem o efeito de silenciamento mediado por siRNA de TMPRSS6 de TMPRSS6 sob o teor de ferro no baço e no fígado em camundongos talassêmicos (Th3/+). A Figura 10A descreve o efeito sob o teor de ferro no baço total, a Figura 10B descreve o efeito sob peso do baço e a Figura 10C descreve o efeito de silenciamento mediado por siRNA de TMPRSS6 de TMPRSS6 sob a concentração de ferro no fígado.

Descrição Detalhada da Invenção

[00044] São descritos no presente documento iRNAs e métodos de

uso dos mesmos para a inibição da expressão de um gene TMPRSS6 em uma célula ou um mamífero onde o iRNA direciona um gene TMPRSS6. Também são fornecidos composições e métodos para o tratamento de doenças e afecções patológicas ocasionadas pela expressão de gene TMPRSS6, como afecções associadas a níveis elevados de ferro. iRNA direciona a degradação de sequência específica de mRNA através de um processo conhecido como interferência de RNA (RNAi). Em uma modalidade alternativa, o iRNA ativa a expressão de um gene TMPRSS6 em uma célula ou mamífero, onde o iRNA direciona um gene TMPRSS6.

[00045] O TMPRSS6 exerce um papel fundamental na homeostase do ferro como um inibidor de expressão de gene HAMP. O gene HAMP codifica a hepcidina de hormônio do fígado, que é um regulador central de homeostase do ferro. A hepcidina se liga à proteína ferroportina exportadora de ferro (FPN1), que está localizada principalmente em enterócitos, hepatócitos e macrófagos absorventes. A hepcidina que se liga ao domínio extracelular de ferroportina leva à internalização e à degradação de ferroportina, diminuindo assim a absorção de ferro na dieta do intestino, e a liberação de ferro de macrófagos e hepatócitos. A expressão de gene HAMP pode ser estimulada em resposta ao ferro através de cascata de transdução de sinal dependente de Mães Contra Proteína Decapentaplégica (SMAD)/ Proteína Morfogénica Óssea (BMP) mediada pela hemojuvelina de correceptor de BMP (HJV). O papel principal de TMPRSS6 na regulação de HAMP está na inibição de aumento dos níveis de HAMP mediado por BMP. O TMPRSS6 inibe o aumento dos níveis de HAMP mediado por BMP através da clivagem da HJV de correceptor de BMP, que é essencial para o aumento dos níveis de HAMP mediado por BMP; evitando assim a sinalização de BMP, o deslocamento de SMAD para o núcleo e a ativação transcricional de HAMP.

[00046] Diversos estudos de seres humanos e camundongos confirmaram o papel do TMPRSS6 na regulação de HAMP e na homeostase do ferro (Du *et al.* Science 2008, Vol. 320, páginas 1.088 a 1.092; Folgueras *et al.* Blood 2008, Vol. 112, páginas 2.539 a 45). Os estudos mostraram que a perda de mutações de função em TMPRSS6 pode levar ao aumento nos níveis de expressão de hepcidina, ocasionando uma anemia por deficiência de ferro herdada denominada anemia por deficiência de ferro por ferro refratário (IRIDA) (Finberg. Seminars in Hematology 2009, Vol. 46, páginas 378 a 86), que é caracterizada por níveis elevados de hepcidina, anemia microcítica hipocrômica, volume corpuscular médio baixo (MCV), saturação de transferrina baixa, absorção insatisfatória de ferro oral e resposta incompleta a ferro por via parenteral. No entanto, mostrou-se que a perda de mutações de função em reguladores positivos de HAMP (por exemplo, BMP1, BMP4 e HFE) diminui os níveis de expressão de hepcidina e ocasiona distúrbios de sobrecarga de ferro (Milet *et al.* Am J Hum Gen 2007, Vol. 81, páginas 799 a 807; Finberg *et al.* Blood 2011, Vol. 117, páginas 4.590 a 9). Nos distúrbios de sobrecarga de ferro primária, conjuntamente denominados hemocromatose hereditária (HH), em anemias caracterizadas por hematopoiese ineficaz massiva e na sobrecarga de ferro (hemocromatose secundária), como β -talassemia intermediária (TI), os níveis de hepcidina são baixos apesar de concentrações elevadas de ferro sérico e reservas de ferro. Um modelo de camundongo de β -talassemia intermediária demonstrou que a perda de expressão de TMPRSS6 leva a níveis elevados de hepcidina (Finberg 2010 Oral Presentation: "TMPRSS6, an inhibitor of Hepatic BMP/Smad Signaling, is required for Hepcidin Suppression and Iron Loading in a Mouse Model of β -Thalassemia. American Society of Hematology Annual Meeting 2010, Resumo Nº:164).

[00047] A presente invenção descreve métodos e composições de

iRNA para a modulação da expressão de um gene TMPRSS6. Em determinadas modalidades, a expressão de TMPRSS6 é reduzida ou inibida com o uso de um iRNA de TMPRSS6 específico, levando assim ao aumento da expressão de HAMP, e níveis diminuídos de ferro sérico. Dessa forma, a inibição de expressão de gene TMPRSS6 ou atividade com o uso das composições de iRNA apresentadas na invenção pode ser uma abordagem útil para terapias destinadas a redução dos níveis de ferro em um indivíduo. Tal inibição pode ser útil para o tratamento de distúrbios associados a níveis elevados de ferro, como hemocromatose ou talassemia, por exemplo, β -talassemia.

[00048] Os iRNAs das composições aqui descritas incluem uma fita de RNA (a fita antissenso) que tem uma região que tem 30 nucleotídeos ou menos de comprimento, isto é, 15 a 30 nucleotídeos de comprimento, em geral, 19 a 24 nucleotídeos de comprimento, cuja região é substancialmente complementar a pelo menos **parte** de um transcrito de mRNA de um gene TMPRSS6. O uso desses iRNAs permite a degradação direcionada de mRNAs de genes que estão implicados em patologias associadas à expressão de TMPRSS6 em mamíferos. Dosagens muito baixas de iRNAs de TMPRSS6 podem mediar, em particular, específica e eficientemente a RNAi, resultando em inibição significativa de expressão de um gene TMPRSS6. Com o uso de ensaio à base de células, os presentes inventores demonstraram que TMPRSS6 de direcionamento de iRNAs podem mediar específica e eficientemente RNAi, resultando em inibição significativa de expressão de um gene TMPRSS6. Dessa forma, os métodos e composições incluindo esses iRNAs são úteis para o tratamento de processos patológicos que podem ser mediados por diminuição dos níveis de TMPRSS6, como no tratamento de um distúrbio que ocasiona níveis elevados de ferro, por exemplo, uma hemocromatose, ou uma β -talassemia, por exemplo, β -talassemia intermediária. A descrição deta-

lhada a seguir descreve como produzir e utilizar as composições contendo iRNAs para a inibição da expressão de um gene TMPRSS6, bem como as composições e métodos para o tratamento de doenças e distúrbios ocasionados pela expressão desse gene.

[00049] As modalidades das composições farmacêuticas aqui apresentadas também incluem um iRNA que tem uma fita antissenso que compreende uma região que tem 30 nucleotídeos ou menos de comprimento, em geral, 19 a 24 nucleotídeos de comprimento, cuja região é **substancialmente complementar a pelo menos parte** de um transcrito de RNA de um gene TMPRSS6, juntamente com um veículo farmacêuticamente aceitável. As modalidades das composições apresentadas na invenção também incluem um iRNA que tem uma fita antissenso que tem uma região de complementariedade que tem 30 nucleotídeos ou menos de comprimento, em geral, 19 a 24 nucleotídeos de comprimento, e é **substancialmente complementar a pelo menos parte** de um transcrito de RNA de um gene TMPRSS6.

[00050] Consequentemente, em alguns aspectos, são apresentadas as composições farmacêuticas contendo um iRNA de TMPRSS6 e um veículo farmacêuticamente aceitável, os métodos de utilização das composições para a inibição da expressão de um gene TMPRSS6 e os métodos de utilização das composições farmacêuticas para o tratamento de doenças ocasionadas pela expressão de um gene TMPRSS6 na invenção.

I. Definições

[00051] Por conveniência, é fornecido abaixo o significado de determinados termos e frases usadas no relatório descritivo, exemplos e reivindicações anexas. Se houver uma discrepância aparente entre o uso de um termo em outras partes desse relatório descritivo e sua definição fornecida nessa seção, a definição nessa seção deve prevalecer.

[00052] "G", "C", "A", "T" e "U" representam, cada um, em geral, um

nucleotídeo que contém guanina, citosina, adenina, timidina e uracila como uma base, respectivamente. No entanto, será compreendido que o termo "ribonucleotídeo" ou "nucleotídeo" também pode se referir a um nucleotídeo modificado, conforme adicionalmente detalhado abaixo, ou uma porção de substituição suplente. O versado está bem ciente de que a guanina, a citosina, a adenina e a uracila podem ser substituídas por outras porções sem alterar substancialmente as propriedades de emparelhamento de base de um oligonucleotídeo que compreende um nucleotídeo que porta tal porção de substituição. Por exemplo, sem limitação, um nucleotídeo que compreende inosina como sua base pode emparelhar a base com nucleotídeos contendo adenina, citosina ou uracila. Por conseguinte, os nucleotídeos contendo uracila, guanina ou adenina podem ser substituídos nas sequências de nucleotídeos de dsRNA aqui apresentados por um nucleotídeo contendo, por exemplo, inosina. Em outro exemplo, a adenina e a citosina em qualquer local no oligonucleotídeo podem ser substituídas por guanina e uracila, respectivamente, para formar emparelhamento de base G-U Wobble com o mRNA alvo. As sequências contendo tais porções de substituição são adequadas para as composições e métodos aqui descritos.

[00053] Conforme usado no presente documento, "Transmembrana Protease, Serina 6" ("TMPSSR6") se refere a um polipeptídeo particular expresso em uma célula. TMPRSS6 também é conhecida como matriptase-2, IRIDA (anemia por deficiência de ferro de ferro refratário), transmembrana protease da serina 6, transmembrana serina protease 6 tipo II e proteinase matriptase-2 da serina de mosaico ligado à membrana. TMPRSS6 é uma proteína de transmembrana tipo II de protease da serina com aproximadamente 899 aminoácidos de comprimento. TMPRSS6 contém múltiplos domínios, por exemplo, um domínio interno curto, um domínio de transmembrana, um domínio de

enteropeptidase/proteína do esperma de ouriço-do-mar/domínio de agrina (SEA), dois domínios de fator de complemento/fator de crescimento embriogênico de ouriço/BMP (CUB), três domínios de LDL-R classe A (LDLa) e um domínio de protease da serina similar à tripsina com tríade His-Asp-Ser conservada (HDS). A sequência de um transcrito de mRNA de TMPRSS6 humana pode ser encontrada em NM_153609.2 (SEQ ID NO:1) (Figura 1).

[00054] Conforme usado no presente documento, o termo "iRNA" refere-se a um agente que contém RNA tal como o termo é aqui definido, e que media a clivagem direcionada de um transcrito de RNA através de uma rota de complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC). Em uma modalidade, um iRNA conforme aqui descrito efetua a inibição da expressão de TMPRSS6. Alternativamente, em outra modalidade, um iRNA conforme aqui descrito ativa a expressão de TMPRSS6.

[00055] Conforme usado no presente documento, "sequência alvo" refere-se a uma porção contígua da sequência de nucleotídeos de uma molécula de mRNA formada durante a transcrição de um gene TMPRSS6, incluindo RNA mensageiro (mRNA) que é um produto de processamento de RNA de um produto de transcrição primária. A porção alvo da sequência será pelo menos grande o suficiente para servir como um substrato para clivagem de iRNA direcionada em ou próxima àquela porção. Por exemplo, a sequência alvo terá, em geral, de 9 a 36 nucleotídeos de comprimento, por exemplo, 15 a 30 nucleotídeos de comprimento, incluindo todas as subfaixas entre isso. Como exemplos não limitadores, a sequência alvo pode ter de 15 a 30 nucleotídeos, 15 a 26 nucleotídeos, 15 a 23 nucleotídeos, 15 a 22 nucleotídeos, 15 a 21 nucleotídeos, 15 a 20 nucleotídeos, 15 a 19 nucleotídeos, 15 a 18 nucleotídeos, 15 a 17 nucleotídeos, 18 a 30 nucleotídeos, 18 a 26 nucleotídeos, 18 a 23 nucleotídeos, 18 a 22 nucleotí-

deos, 18 a 21 nucleotídeos, 18 a 20 nucleotídeos, 19 a 30 nucleotídeos, 19 a 26 nucleotídeos, 19 a 23 nucleotídeos, 19 a 22 nucleotídeos, 19 a 21 nucleotídeos, 19 a 20 nucleotídeos, 20 a 30 nucleotídeos, 20 a 26 nucleotídeos, 20 a 25 nucleotídeos, 20 a 24 nucleotídeos, 20 a 23 nucleotídeos, 20 a 22 nucleotídeos, 20 a 21 nucleotídeos, 21 a 30 nucleotídeos, 21 a 26 nucleotídeos, 21 a 25 nucleotídeos, 21 a 24 nucleotídeos, 21 a 23 nucleotídeos ou 21 a 22 nucleotídeos.

[00056] Conforme usado no presente documento, o termo "fita que compreende uma sequência" se refere a um oligonucleotídeo que compreende uma cadeia de nucleotídeos que é descrita pela sequência referida que usa a nomenclatura de nucleotídeo padrão.

[00057] Conforme usado no presente documento, e exceto se indicado em contrário, o termo "complementar", quando usado para descrever uma primeira sequência de nucleotídeos em relação a uma segunda sequência de nucleotídeos, se refere à capacidade de um oligonucleotídeo ou polinucleotídeo que compreende a primeira sequência de nucleotídeos de hibridizar e formar uma estrutura de dúplice sob certas condições com um oligonucleotídeo ou polinucleotídeo que compreende a segunda sequência de nucleotídeos, conforme será compreendido pelo versado. Tais condições podem, por exemplo, ser condições rigorosas, onde as condições rigorosas podem incluir: NaCl a 400 mM, PIPES a 40 mM, pH 6,4, EDTA a 1 mM, 50°C ou 70°C por 12 a 16 horas seguido de lavagem. Outras condições, como condições fisiologicamente relevantes conforme as que podem ser encontradas dentro de um organismo, podem ser aplicadas. O versado terá a capacidade de determinar o conjunto de condições mais apropriadas para um teste de complementariedade de duas sequências de acordo com a última aplicação dos nucleotídeos hibridizados.

[00058] As sequências complementares dentro de um iRNA, por

exemplo, dentro de um dsRNA conforme aqui descrito, incluem emparelhamento de base do oligonucleotídeo ou polinucleotídeo que compreende uma primeira sequência de nucleotídeos a um oligonucleotídeo ou polinucleotídeo que compreende uma segunda sequência de nucleotídeos ao longo da totalidade do comprimento de uma ou de ambas as sequências de nucleotídeos. Tais sequências podem ser referidas como "totalmente complementares" em relação entre si no presente documento. No entanto, onde uma primeira sequência é referida como "substancialmente complementar" em relação a uma segunda sequência no presente documento, as duas sequências podem ser totalmente complementares, ou podem formar um ou mais, mas, em geral, não mais que 5, 4, 3 ou 2 pares de base que não combinam mediante a hibridização para um dúplex até 30 pares de base (bp), enquanto retém a capacidade de hibridizar sob as condições mais relevantes para sua aplicação final, por exemplo, a inibição da expressão de gene através de uma rota de RISC. No entanto, onde dois oligonucleotídeos são projetados para formar, mediante hibridização, uma ou mais protrusões (overhangs) de fita única, tais protrusões não devem ser consideradas como uma falta de combinação em relação à determinação de complementariedade. Por exemplo, um dsRNA que compreende um oligonucleotídeo com 21 nucleotídeos de comprimento e outro oligonucleotídeo 23 com nucleotídeos de comprimento, em que o maior oligonucleotídeo compreende uma sequência de 21 nucleotídeos que é totalmente complementar ao menor oligonucleotídeo, pode ainda ser referido como "totalmente complementar" para as finalidades aqui descritas.

[00059] As sequências "complementares", conforme aqui usado, também podem incluir, ou ser formadas integralmente de, pares de base de não Watson-Crick e/ou pares de base formados de nucleotídeos não naturais e modificados, na medida em que são atendidas as

exigências acima em relação a sua capacidade de hibridizar. Tais pares de base de não Watson-Crick incluem, mas não se limitam a, emparelhamento de base de Wobble ou Hoogsteen G:U.

[00060] Os termos "complementar", "totalmente complementar" e "substancialmente complementar" do presente documento podem ser usados em relação à correspondência de base entre a fita senso e a fita antissenso de um dsRNA, ou entre a fita antissenso de um agente de iRNA e uma sequência alvo, conforme será compreendido a partir do contexto de seu uso.

[00061] Conforme usado no presente documento, um polinucleotídeo que é "substancialmente complementar a pelo menos parte de" um RNA mensageiro (um mRNA) se refere a um polinucleotídeo que é substancialmente complementar a uma porção contígua do mRNA de interesse (por exemplo, um mRNA que codifica TMPRSS6). Por exemplo, um polinucleotídeo é complementar a pelo menos uma parte de um mRNA de TMPRSS6 se a sequência for substancialmente complementar a uma porção não interrompida de um mRNA que codifica TMPRSS6.

[00062] O termo "RNA de fita dupla" ou "dsRNA", conforme aqui usado, se refere a um iRNA que inclui uma molécula de RNA ou complexo de moléculas que tem uma região de dúplice hibridizada que compreende duas fitas de ácido nucleico antiparalelos e substancialmente complementares, que será referida como tendo orientações "senso" e "antissenso" em relação a um RNA alvo. A região de dúplice pode ter qualquer comprimento que permite degradação específica de um RNA alvo desejado através de uma rota de RISC, mas se situará tipicamente na faixa de 9 a 36 pares de base de comprimento, por exemplo, 15 a 30 pares de base de comprimento. Considerando um dúplice entre 9 e 36 pares de base, o dúplice pode ter qualquer comprimento nessa faixa, por exemplo, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17,

18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 ou 36 e qualquer subfaixa entre isso, que inclui, mas não se limita a 15 a 30 pares de base, 15 a 26 pares de base, 15 a 23 pares de base, 15 a 22 pares de base, 15 a 21 pares de base, 15 a 20 pares de base, 15 a 19 pares de base, 15 a 18 pares de base, 15 a 17 pares de base, 18 a 30 pares de base, 18 a 26 pares de base, 18 a 23 pares de base, 18 a 22 pares de base, 18 a 21 pares de base, 18 a 20 pares de base, 19 a 30 pares de base, 19 a 26 pares de base, 19 a 23 pares de base, 19 a 22 pares de base, 19 a 21 pares de base, 19 a 20 pares de base, 20 a 30 pares de base, 20 a 26 pares de base, 20 a 25 pares de base, 20 a 24 pares de base, 20 a 23 pares de base, 20 a 22 pares de base, 20 a 21 pares de base, 21 a 30 pares de base, 21 a 26 pares de base, 21 a 25 pares de base, 21 a 24 pares de base, 21 a 23 pares de base ou 21 a 22 pares de base. Os dsRNAs gerados na célula através do processamento com enzima Dicer e similares se situam, em geral, na faixa de 19 a 22 pares de base de comprimento. Uma fitada região de dúplex de um dsDNA compreende uma sequência que é substancialmente complementar a uma região de um RNA alvo. Os duas fitas que formam a estrutura de dúplex podem ser de uma única molécula de RNA que tem pelo menos uma região autocomplementar, ou podem ser formados de duas ou mais moléculas de RNA separadas. Onde a região de dúplex é formada de duas fitas de uma única molécula, a molécula pode ter uma região de dúplex separada por uma cadeia de nucleotídeos de fita única (aqui referida como um "laço de *pino de cabelo*") entre a extremidade 3' de uma fita e a extremidade 5' do outro respectiva fita que forma a estrutura de dúplex. O laço de *pino de cabelo* pode compreender pelo menos um nucleotídeo não emparelhado; em algumas modalidades, o laço de *pino de cabelo* pode compreender pelo menos 3, pelo menos 4, pelo menos 5, pelo menos 6, pelo menos 7, pelo menos 8, pelo menos 9, pelo menos 10, pelo menos 20, pelo

menos 23 ou mais nucleotídeos não emparelhados. Onde os duas fitas substancialmente complementares de um dsRNA são compostos por moléculas de RNA separadas, aquelas moléculas não precisam, mas podem estar conectadas covalentemente. Onde os duas fitas estão conectados covalentemente por meios que não um laço de *pino de cabelo*, a estrutura conectante é referida como um "ligador". O termo "siRNA" também é usado aqui para se referir a um dsRNA conforme descrito acima.

[00063] O versado reconhecerá que o termo "molécula de RNA" ou "molécula de ácido ribonucleico" abrange não apenas moléculas de RNA conforme expresso ou encontrado na natureza, mas também análogos e derivados de RNA que compreende um ou mais análogos ou derivados de ribonucleotídeo/ribonucleosídeo conforme aqui descrito ou conforme é conhecido na técnica. A rigor, um "ribonucleosídeo" inclui uma base de nucleosídeo e um açúcar ribose, e um "ribonucleotídeo" é um ribonucleosídeo com uma, duas ou três porções de fosfato. No entanto, os termos "ribonucleosídeo" e "ribonucleotídeo" podem ser considerados equivalentes conforme aqui usado. O RNA pode ser modificado na estrutura de nucleobase ou na estrutura principal de ribose-fosfato, por exemplo, conforme aqui descrito abaixo. No entanto, as moléculas que compreendem análogos ou derivados de ribonucleosídeo precisam deter a capacidade de formar um dúplex. Como exemplos não limitadores, uma molécula de RNA também pode incluir pelo menos um ribonucleosídeo modificado que inclui, mas não se limite a um nucleosídeo de 2'-O-metila modificado, um nucleosídeo que compreende um grupo 5' fosforotioato, um nucleosídeo terminal ligado a um derivado de colesterila ou grupo bisdecilamida de ácido dodecanoico, um nucleosídeo fechado, um nucleosídeo abásico, um nucleosídeo de 2'-desoxi-2'-fluoro modificado, um nucleosídeo de 2'-amino-modificado, um nucleosídeo de 2'-alquila-modificado, nucleosí-

deo de morfolino, um fosforamidato ou uma base não natural que compreende nucleosídeo, ou qualquer combinação dos mesmos. Alternativamente, uma molécula de RNA pode compreender pelo menos dois ribonucleosídeos modificados, pelo menos 3, pelo menos 4, pelo menos 5, pelo menos 6, pelo menos 7, pelo menos 8, pelo menos 9, pelo menos 10, pelo menos 15, pelo menos 20 ou mais, até a totalidade do comprimento da molécula de dsRNA. As modificações não precisam ser iguais para cada um de tal pluralidade de ribonucleosídeos modificados em uma molécula de RNA. Em uma modalidade, os RNAs modificados contemplados para o uso nos métodos e composições aqui descritos são ácidos nucleicos peptídicos (PNAs) que têm a capacidade de formar a estrutura de dúplice necessária e que permitem ou mediam a degradação específica de um RNA alvo através de uma rota de RISC.

[00064] Em um aspecto, um ribonucleosídeo modificado inclui um desoxirribonucleosídeo. Em tal exemplo, um agente de iRNA pode compreender um ou mais desoxinucleosídeos, incluindo, por exemplo, uma protrusão(ões) de desoxinucleosídeo, ou um ou mais desoxinucleosídeos dentro da porção de fita dupla de um dsRNA. No entanto, é evidente que, sob nenhuma circunstância, é uma molécula de DNA de fita dupla abrangida pelo termo "iRNA".

[00065] Em um aspecto, um agente de interferência de RNA inclui um RNA de fita única que interage com uma sequência de RNA alvo para direcionar a clivagem do RNA alvo. Sem ater-se a nenhuma teoria, o RNA de fita dupla longo introduzido em células vegetais e de invertebrados é quebrado formando siRNA por uma endonuclease Tipo III conhecida como Dicer (Sharp *et al.*, Genes Dev. 2001, 15:485). Dicer, uma enzima similar à ribonuclease-III, processa o dsRNA formando 19 a 23 RNAs de interferência curta de par de bases com protrusões de duas bases 3' características (Bernstein, *et al.*, (2001) Nature 409:363). Os siR-

NAs são, então, incorporados a um complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC) onde uma ou mais helicases desenrolam o dúplex de siRNA, permitindo que a fita antissenso complementar guie o reconhecimento alvo (Nykanen, *et al.*, (2001) Cell 107:309). Mediante ligação ao mRNA alvo apropriado, uma ou mais endonucleases dentro do RISC cliva o alvo para induzir o silenciamento (Elbashir, *et al.*, (2001) Genes Dev. 15:188). Dessa forma, em um aspecto, a invenção se refere a um RNA de fita única que promove a formação de um complexo RISC para efetuar o silenciamento do gene alvo.

[00066] Conforme usado no presente documento, o termo "protrusão de nucleotídeo" se refere a pelo menos um nucleotídeo não emparelhado que se projeta da estrutura de dúplex de um iRNA, por exemplo, um dsRNA. Por exemplo, quando uma extremidade 3' de uma fita de um dsRNA estende-se além da extremidade 5' do outra fita, ou vice versa, há uma protrusão de nucleotídeo. Um dsRNA pode compreender uma protrusão de pelo menos um nucleotídeo; alternativamente, a protrusão pode compreender pelo menos dois nucleotídeos, pelo menos três nucleotídeos, pelo menos quatro nucleotídeos, pelo menos cinco nucleotídeos ou mais. Uma protrusão de nucleotídeo pode compreender ou consistir em um análogo de nucleotídeo/nucleosídeo, incluindo um desoxinucleotídeo/nucleosídeo. A(s) protrusão(ões) pode(m) estar na fita senso, na fita antissenso ou qualquer combinação das mesmos. Ademais, o(s) nucleotídeo(s) de uma protrusão pode estar presente na extremidade 5', na extremidade 3' ou em ambas as extremidades de uma fita antissenso ou senso de um dsRNA.

[00067] Em uma modalidade, a fita antissenso de um dsRNA tem uma protrusão com 1 a 10 nucleotídeos na extremidade 3' e/ou na extremidade 5'. Em uma modalidade, a fita senso de um dsRNA tem uma protrusão com 1 a 10 nucleotídeos na extremidade 3' e/ou na extremidade 5'. Em outra modalidade, um ou mais nucleotídeos na protrusão

são substituídos por um nucleosídeo tiofosfato.

[00068] Os termos "cega (blunt)" ou "extremidade cega (blunt)" conforme aqui usado em referência a um dsRNA significam que não há nucleotídeos não emparelhados ou análogos de nucleotídeo em uma dada extremidade terminal de um dsRNA, isto é, sem protrusão de nucleotídeo. Uma ou ambas as extremidades de um dsRNA podem ser cegas. Onde ambas as extremidades de um dsRNA são cegas, diz-se que o dsRNA tem extremidade cega. Para ser claro, um dsRNA de "extremidade cega" é um dsRNA que é cego em ambas as extremidades, isto é, sem protrusão de nucleotídeo em nenhuma das extremidades da molécula. Com mais frequência, tal molécula terá fita dupla ao longo de todo seu comprimento.

[00069] O termo "fita antissenso" ou "fita guia" se refere a fita de um iRNA, por exemplo, um dsRNA, que inclui uma região que é substancialmente complementar a uma sequência alvo. Conforme usado no presente documento, o termo "região de complementariedade" se refere à região na fita antissenso que é substancialmente complementar a uma sequência, por exemplo, uma sequência alvo, conforme aqui definido. Onde a região de complementariedade não é totalmente complementar à sequência alvo, as faltas de combinação podem estar nas regiões internas ou terminais da molécula. Em geral, as faltas de combinação mais toleradas estão nas regiões terminais, por exemplo, dentro do 5, 4, 3 ou 2 nucleotídeos no terminal 5' e/ou 3'.

[00070] O termo "fita senso" ou "fita passageira" conforme aqui usado, se refere a fita de um iRNA que inclui uma região que é substancialmente complementar a uma região da fita antissenso tal como o termo é aqui definido.

[00071] Conforme usado no presente documento, em uma modalidade, o termo "SNALP" se refere a uma partícula lipídica de ácido nucleico estável. Uma SNALP representa uma vesícula de lipídeos que

cobre uma parte interna aquosa reduzida que compreende um ácido nucleico como um iRNA ou um plasmídeo do qual um iRNA é transcrito. As SNALPs são descritas, por exemplo, nas Publicações de Pedido de Patente nºs U.S. 20060240093, 20070135372, e no Pedido Internacional Nº WO 2009082817. Exemplos de formulações de "SNALP" são descritos aqui em outro lugar.

[00072] "Introduzir em uma célula", referindo-se a um iRNA, significa facilitar ou efetuar a admissão ou absorção na célula, conforme é compreendido pelo versado na técnica. A absorção ou admissão de um iRNA pode ocorrer através de processos celulares difusivos ou ativos sem ajuda, ou por agentes ou dispositivos auxiliares. O significado desse termo não se limita a células *in vitro*; um iRNA também pode ser "introduzido em uma célula", em que a célula faz parte de um organismo vivo. Em tal exemplo, a introdução na célula incluirá a aplicação no organismo. Por exemplo, para aplicação *in vivo*, o iRNA pode ser injetado em um sítio de tecido ou administrado sistemicamente. A aplicação *In vivo* também pode ser por um sistema de aplicação de β -glucano, como aqueles descritos nas Patentes Nºs U.S. 5.032.401 e 5.607.677 e na Publicação Nº U.S. 2005/0281781 que estão aqui incorporadas a título de referência em sua totalidade. A introdução *in vitro* em uma célula inclui métodos conhecidos na técnica como eletroporação e lipofecção. São descritas aqui abaixo ou são conhecidas na técnica as abordagens adicionais.

[00073] Conforme usado no presente documento, o termo "modular a expressão de", se refere a pelo menos uma "inibição" parcial ou "ativação" parcial da expressão de gene TMPRSS6 em uma célula tratada com uma composição de iRNA conforme aqui descrito em comparação à expressão de TMPRSS6 em uma célula não tratada.

[00074] Os termos "ativar", "intensificar", "aumentar os níveis da expressão de", "aumentar a expressão de", e similares, na medida em

que se referem a um gene TMPRSS6, aqui se referem à ativação pelo menos parcial da expressão de um gene TMPRSS6, conforme manifestado por um aumento na quantidade de mRNA de TMPRSS6, que pode ser isolado de ou detectado em uma primeira célula ou grupo de células no qual um gene TMPRSS6 é transcrito e que é ou foi tratado de tal modo que a expressão de um gene TMPRSS6 seja aumentada, em comparação a uma segunda célula ou grupo de células substancialmente idêntico à primeira célula ou grupo de células, mas que foi ou não foi tratado dessa forma (células de controle).

[00075] Em uma modalidade, a expressão de um gene TMPRSS6 é ativada em pelo menos cerca de 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45% ou 50% pela administração de um iRNA conforme aqui descrito. Em algumas modalidades, um gene TMPRSS6 é ativado em pelo menos cerca de 60%, 70% ou 80% pela administração de um iRNA apresentado na invenção. Em algumas modalidades, a expressão de um gene TMPRSS6 é ativada em pelo menos cerca de 85%, 90% ou 95% ou mais pela administração de um iRNA conforme aqui descrito. Em algumas modalidades, a expressão de gene TMPRSS6 é aumentada em pelo menos 1 vez, pelo menos 2 vezes, pelo menos 5 vezes, pelo menos 10 vezes, pelo menos 50 vezes, pelo menos 100 vezes, pelo menos 500 vezes, pelo menos 1.000 vezes ou mais em células tratadas com um iRNA conforme aqui descrito em comparação à expressão em uma célula não tratada. A ativação da expressão por pequenos dsRNAs é descrita, por exemplo, em Li *et al.*, 2006 *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103:17.337 a 42, e em US20070111963 e US2005226848, cada uma aqui incorporada a título de referência.

[00076] Os termos "silenciar", "inibir a expressão de", "diminuir os níveis da expressão de", "suprimir a expressão de", e similares, na medida em que se referem a um gene TMPRSS6, aqui se referem à supressão pelo menos parcial da expressão de um gene TMPRSS6,

conforme manifestado por uma redução da quantidade de mRNA de TMPRSS6 que pode ser isolado de ou detectado em uma primeira célula ou grupo de células no qual um gene TMPRSS6 é transcrito em que é ou foi tratado de tal modo que a expressão de um gene TMPRSS6 seja inibida, em comparação a uma segunda célula ou grupo de células substancialmente idêntico à primeira célula ou grupo de células, mas que foi ou não foi tratado dessa forma (células de controle). O grau de inibição é usualmente expresso em termos de

$$\frac{(\text{mRNA em células de controle}) - (\text{mRNA em células tratadas})}{(\text{mRNA em células de controle})} \bullet 100\%$$

[00077] Alternativamente, o grau de inibição pode ser dado em termos de uma redução de um parâmetro que está ligado funcionalmente à expressão de gene TMPRSS6, por exemplo, a quantidade de proteína codificada por um gene TMPRSS6, ou o número de células que exibem um certo fenótipo, por exemplo, uma diminuição nos níveis de ferro, ou na absorção de ferro. Em princípio, o silenciamento do gene TMPRSS6 pode ser determinado em qualquer célula que expressa TMPRSS6, constitutivamente ou por manipulação genômica, e por qualquer ensaio apropriado.

[00078] Por exemplo, em determinados exemplos, a expressão de um gene TMPRSS6 é suprimida em pelo menos cerca de 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45% ou 50% pela administração de um iRNA apresentado na invenção. Em algumas modalidades, um gene TMPRSS6 é suprimido em pelo menos cerca de 60%, 70% ou 80% pela administração de um iRNA aqui descrito. Em algumas modalidades, um gene TMPRSS6 é suprimido em pelo menos cerca de 85%, 90%, 95%, 98%, 99%, ou mais, pela administração de um iRNA conforme aqui descrito.

[00079] Conforme usado no presente documento no contexto da expressão de TMPRSS6, os termos "tratar", "tratamento", e similares,

se referem à mitigação ou ao alívio de processos patológicos mediados por expressão de TMPRSS6. No contexto da presente invenção na medida em que se refere a qualquer uma das outras afecções aqui citadas abaixo (que não processos patológicos mediados por expressão de TMPRSS6), os termos "tratar", "tratamento", e similares significam mitigar ou aliviar pelo menos um sintoma associado a tal afecção, ou reduzir ou reverter a progressão ou a progressão antecipada de tal afecção, como reduzir a progressão de uma hemocromatose, como uma β -talassemia.

[00080] Entende-se por "reduzir" no contexto de um sintoma ou marcador de doença uma diminuição estatisticamente significativa em tal nível. A diminuição pode ser, por exemplo, pelo menos 10%, pelo menos 20%, pelo menos 30%, pelo menos 40% ou mais, e é, de preferência, diminuída a um nível aceito como dentro da faixa de normalidade para um indivíduo sem tal distúrbio.

[00081] Conforme usado no presente documento, as frases "quantidade terapeuticamente eficaz" e "quantidade profilaticamente eficaz" se referem a uma quantidade que fornece um benefício terapêutico no tratamento, prevenção ou manejo de processos patológicos mediados por expressão de TMPRSS6 ou um sintoma observável de processos patológicos mediados por expressão de TMPRSS6. A quantidade específica que é terapeuticamente eficaz pode ser prontamente determinada por um médico comum, e pode variar dependendo de fatores conhecidos na técnica, como, por exemplo, o tipo de processos patológicos mediados por expressão de TMPRSS6, a idade e o histórico do paciente, o estágio dos processos patológicos mediados por expressão de TMPRSS6, e a administração de outros agentes que inibem processos patológicos mediados por expressão de TMPRSS6.

[00082] Conforme usado no presente documento, uma "composição farmacêutica" compreende uma quantidade farmacologicamente eficaz

de um iRNA e um veículo farmacologicamente aceitável. Conforme usado no presente documento, "quantidade farmacologicamente eficaz", "quantidade terapeuticamente eficaz" ou simplesmente "quantidade eficaz" se referem àquela quantidade de um iRNA eficaz para a produção do resultado farmacológico, terapêutico ou preventivo previsto. Por exemplo, se um dado tratamento clínico for considerado eficaz quando há pelo menos uma redução de 10% em um parâmetro mensurável associado a uma doença ou distúrbio, uma quantidade terapeuticamente eficaz de um fármaco para o tratamento daquela doença ou distúrbio é a quantidade necessária para efetuar pelo menos uma redução de 10% naquele parâmetro. Por exemplo, uma quantidade terapeuticamente eficaz de um TMPRSS6 de direcionamento de iRNA pode reduzir os níveis de proteína de TMPRSS6 em pelo menos 10%.

[00083] Conforme usado no presente documento, o termo "talassemia" se refere a um distúrbio de sangue recessivo herdado. Uma mutação de perda de função resulta na taxa reduzida de síntese ou não síntese de uma das cadeias de globina que constituem a hemoglobina, e ocasiona uma deficiência em proteínas globina normais. Os pacientes que sofrem de talassemia produzem uma deficiência de α globina (denominada α -talassemia), β globina (denominada β -talassemia) ou, em casos raros, δ globina. Em α -talassemia, um excesso de cadeias β forma tetrâmeros instáveis, que têm curvas de dissociação de oxigênio anormais. β -talassemias podem ser leves, intensas ou intermediárias.

[00084] As cadeias de β globina são codificadas por um único gene denominado gene da HBB (hemoglobina, β). A β -talassemia leve em pacientes que portam um alelo de β -talassemia mutante, e um alelo de tipo selvagem. Essa condição não tem efeito sob níveis de ferro no sangue, e os pacientes não precisam de tratamento. A β -talassemia intensa resulta quando um paciente porta dois alelos de β -talassemia

mutantes de expressão reduzida. O excesso de ferro acumula nesses pacientes, e o excesso de ferro é armazenado, em, primeiro lugar, em células de Kupffer hipertróficas. Os pacientes com β -talassemia intensa são tratados, tipicamente, com terapia de transfusão de sangue crônica, quelação de ferro, transplantação hematopoiética de esplenectomia e alogênica. A β -talassemia intermediária resulta quando um paciente porta um alelo de expressão reduzida do gene da β -talassemia e um alelo de perda de função parcial. O excesso de ferro acumula nesses pacientes, e o excesso de ferro é armazenado, em primeiro lugar, em hepatócitos. Os pacientes com talassemia intensa e talassemia intermediária têm anemia (hipóxia), que leva a um aumento em EPO (eritropoietina) e, conseqüentemente, eritropoiese ineficaz e compensatória dramática (a produção de células vermelhas de sangue por células-tronco na medula óssea). Os pacientes com talassemia intermediária desenvolvem, às vezes, hepatosplenomegalia, icterícia, osteopenia, eventos trombóticos, úlceras de membros inferiores, hipertensão pulmonar, falha congestiva do coração, diabetes mellitus, deficiência do hormônio do crescimento, hipotireoidismo, hipoparatiroidismo, hipogonadismo e deformidades faciais.

[00085] Conforme usado no presente documento, o termo "hemocromatose" se refere a um distúrbio, que resulta em muito ferro sendo absorvido do trato gastrointestinal. A hemocromatose ocorre em duas formas: primária e secundária. A hemocromatose primária, o distúrbio genético mais comum nos Estados Unidos (afeta 1 a cada 200 a 300 norte-americanos), é usualmente ocasionada por um problema genético específico que ocasiona muito ferro sendo absorvido. A hemocromatose secundária, ou adquirida, hemocromatose, pode ser ocasionada por doenças como talassemia ou anemia sideroblástica. A hemocromatose secundária se desenvolve, às vezes, em pacientes com anemia hemolítica e alcoolismo crônico. Os sintomas da hemocroma-

tose incluem dor abdominal, dor nas articulações, fadiga, falta de energia, fraqueza, escurecimento da pele (frequentemente referido como "bronzamento") e perda de pelos do corpo.

[00086] O termo "veículo farmacologicamente aceitável" se refere a um veículo para a administração de um agente terapêutico. Tais veículos incluem, mas não se limitam a, solução salina, solução salina tamponada, dextrose, água, glicerol, etanol e combinações dos mesmos. O termo exclui especificamente meio de cultura celular. Para fármacos administrados oralmente, os veículos farmacologicamente aceitáveis incluem, mas não se limitam a excipientes farmacologicamente aceitáveis como diluentes inertes, agentes desintegrantes, agentes de ligação, agentes de lubrificação, agentes de adoçamento, agentes flavorizantes, agentes colorantes e conservantes. Os diluentes inertes adequados incluem carbonato de sódio e cálcio, fosfato de sódio e cálcio e lactose, enquanto o amido de milho e o ácido algínico são agentes desintegrantes adequados. Os agentes de ligação podem incluir amido e gelatina, enquanto o agente lubrificante, se presente, será, em geral, estearato de magnésio, ácido esteárico ou talco. Se desejado, os tablets podem ser revestidos com um material como monostearato de glicerila ou distearato de glicerila, para atrasar a absorção no trato gastrointestinal. Os agentes incluídos em formulações de fármaco são descritos adicionalmente no presente documento abaixo.

[00087] Conforme usado no presente documento, um "indivíduo" é um mamífero, por exemplo, um cachorro, cavalo, gato e outros primatas não humanos. Em uma modalidade preferencial, um indivíduo é um ser humano.

[00088] Conforme usado no presente documento, o termo "LNPXX", em que "XX" são numerais, também é referido como "AFX" no presente documento. Por exemplo, LNP09 também é referido como AF09 e LNP12 também é conhecido ou referido como AF12.

[00089] Conforme usado no presente documento, o termo "que compreende" ou "compreende" é usado em referência a composições, métodos e respectivo(s) componente(s) disso, que são essenciais à invenção, ainda aberta à inclusão de elementos não especificados, essenciais ou não.

[00090] Conforme usado no presente documento, o termo "que consiste essencialmente em" se refere àqueles elementos necessários para uma dada modalidade. O termo permite a presença de elementos que não afetam materialmente as característica(s) básica(s) e inovadora(s) ou funcional(s) daquela modalidade apresentada na invenção.

[00091] O termo "que consiste em" se refere a composições, métodos e respectivos componentes dos mesmos conforme aqui descrito, que são exclusivos de qualquer elemento não citado naquela descrição da modalidade.

II. Ácido ribonucleico de fita dupla (dsRNA)

[00092] São descritos no presente documento agentes de iRNA que modulam a expressão do gene TMPRSS6. Em uma modalidade, o agente de iRNA inclui moléculas de ácido ribonucleico de fita dupla (dsRNA) para a inibição da expressão de um gene TMPRSS6 em uma célula ou mamífero, por exemplo, em um ser humano que tem níveis elevados de ferro, como em um paciente com uma β -talassemia, ou uma hemacromatose. O dsRNA inclui uma fita antissenso que tem uma região de complementariedade que é complementar a pelo menos uma parte de um mRNA formado na expressão de um gene TMPRSS6. A região de complementariedade tem 30 nucleotídeos ou menos de comprimento, em geral, 19 a 24 nucleotídeos de comprimento, e onde o dsRNA, mediante contato com uma célula que expressa o gene TMPRSS6, inibe a expressão do gene TMPRSS6 e pelo menos 10% conforme analisado por, por exemplo, uma PCR ou método à base de DNA ramificado (bDNA), ou por um método à base de

proteína, como Western blot. Em uma modalidade, o agente de iRNA ativa a expressão de um gene TMPRSS6 em uma célula ou mamífero. A expressão de um gene TMPRSS6 em uma cultura celular, como em células de COS, células de HeLa, hepatócitos primários, células de HepG2, células cultivadas primárias ou em uma amostra biológica de um indivíduo, pode ser analisada medindo-se os níveis de mRNA de TMPRSS6, como através de ensaio de bDNA ou TaqMan®, ou medindo-se os níveis de proteína, como por análise de imunofluorescência, com o uso de, por exemplo, técnicas de Western blot ou de citometria de fluxo.

[00093] Um dsRNA inclui duas fitas de RNA que são complementares para hibridizar a fim de formar uma estrutura de dúplex sob condições nas quais o dsRNA será usado. Uma fita de um dsRNA (a fita antissenso) inclui uma região de complementariedade **que é substancialmente complementar, e, em geral, totalmente complementar,** a uma sequência alvo. **A sequência alvo pode ser** derivada da sequência de um mRNA formado durante a expressão de um gene TMPRSS6. O outra fita (a fita senso) inclui uma região que é complementar aa fita antissenso, de tal modo que os duas fitas hibridizam e formem uma estrutura de dúplex quando combinados sob condições adequadas. Em geral, a estrutura de dúplex tem entre 15 e 30 inclusive, mais geralmente, entre 18 e 25 inclusive, ainda mais geralmente, entre 19 e 24 inclusive, e com máxima generalidade, entre 19 e 21 pares de base de comprimento, inclusive. De modo similar, a região de complementariedade **à sequência alvo tem** entre 15 e 30 inclusive, mais geralmente, entre 18 e 25 inclusive, ainda mais geralmente, entre 19 e 24 inclusive, e com máxima generalidade, entre 19 e 21 nucleotídeos de comprimento, inclusive. Em algumas modalidades, o dsRNA tem entre 15 e 20 nucleotídeos de comprimento, inclusive, e, em outras modalidades, o dsRNA tem entre 25 e 30 nucleotídeos de com-

primento, inclusive. Como o versado reconhecerá, a região direcionada de um RNA direcionado para clivagem fará parte, com mais frequência, de uma molécula de RNA maior, com frequência, uma molécula de mRNA. Onde for relevante, uma "parte" de um mRNA alvo é uma sequência contígua de um mRNA alvo de comprimento suficiente para ser um substrato para a clivagem de RNAi direcionado (isto é, clivagem através de uma rota de RISC). Os dsRNAs que têm dúplexes tão curtos quanto 9 pares de base podem, sob algumas circunstâncias, mediar a clivagem de RNA de RNAi direcionado. Com máxima frequência, um alvo terá pelo menos 15 nucleotídeos de comprimento, de preferência, 15 a 30 nucleotídeos de comprimento.

[00094] Um versado na técnica também reconhecerá que a região de dúplex é uma porção funcional primária de um dsRNA, por exemplo, uma região de dúplex de 9 a 36, por exemplo, 15 a 30 pares de base. Dessa forma, em uma modalidade, na medida em que isso é processado em um dúplex funcional de, por exemplo, 15 a 30 pares de base que direciona um RNA desejado para clivagem, uma molécula de RNA ou complexo de moléculas de RNA que tem uma região de dúplex maior do que 30 pares de base é um dsRNA. Dessa forma, um elemento de habilidade comum reconhecerá que, em uma modalidade, um miRNA é um dsRNA. Em outra modalidade, um dsRNA não é um miRNA de ocorrência natural. Em outra modalidade, um agente de iRNA útil para direcionar a expressão de TMPRSS6 não é gerado na célula alvo através da clivagem de um dsRNA maior.

[00095] Um dsRNA conforme aqui descrito pode incluir adicionalmente uma ou mais protrusões de nucleotídeo de fita única. O dsRNA pode ser sintetizado por métodos padrão conhecidos na técnica conforme adicionalmente discutido abaixo, por exemplo, através do uso de um sintetizador de DNA automático, como comercialmente disponível junto à, por exemplo, Biosearch, Applied Biosystems, Inc. Em uma

modalidade, um gene TMPRSS6 é um gene TMPRSS6 humano. Em outra modalidade, o gene TMPRSS6 é um gene TMPRSS6 de camundongo ou de rato. A sequência de mRNA de TMPRSS6 de camundongo pode ser encontrada no N° de Acesso GenBank NM_027902 (GI:125656151, Registro datado de 28 de dezembro de 2010). A sequência de mRNA de TMPRSS6 de rato pode ser encontrada no N° de Acesso GenBank NM_001130556.1 (GI:194474097, Registro datado de 17 de janeiro de 2011). Em modalidades específicas, a primeira sequência é uma fita senso de um dsRNA que inclui uma **sequência senso de uma das Tabelas 2, 3 ou 4 e a segunda sequência** é uma fita antissenso de um dsRNA que inclui uma sequência antissenso de uma das Tabelas 2, 3 ou 4. Os agentes de dsRNA alternativos que direcionam qualquer lugar na sequência alvo fornecida nas Tabelas 2, 3 ou 4 podem ser prontamente determinados com o uso da sequência alvo e da sequência de TMPRSS6 de flanqueamento.

[00096] Em um aspecto, um dsRNA incluirá pelo menos duas sequências de nucleotídeos, uma sequência senso e uma antissenso, através da qual a fita senso é selecionado dos grupos de sequências fornecidas nas Tabelas 2, 3 ou 4. Nesse aspecto, uma das duas sequências é complementar à outra das duas sequências, com uma das sequências sendo **substancialmente** complementar a uma sequência de um mRNA gerado na expressão de um gene TMPRSS6. Como tal, nesse aspecto, um dsRNA incluirá dois oligonucleotídeos, onde um oligonucleotídeo é descrito como a fita senso nas Tabelas 2, 3 ou 4 e o segundo oligonucleotídeo é descrito como a fita antissenso correspondente da fita senso das Tabelas 2, 3 ou 4. **Conforme descrito aqui em outro lugar e conforme conhecido na técnica, as sequências complementares de um dsRNA também podem estar contidas como regiões autocomplementares de uma única molécula de ácido nucleico, ao invés de estar em oligonucleotídeos separados.**

[00097] O versado está ciente que os dsRNAs que têm uma estrutura de dúplex com 20 e 23, mas especificamente 21, pares de base foram aclamados como particularmente eficazes na indução de interferência de RNA (Elbashir *et al.*, EMBO 2001, 20:6.877 a 6.888). No entanto, outros encontraram que as estruturas de dúplex de RNA mais curto ou mais longo também podem ser eficazes. Nas modalidades descritas acima, em virtude da natureza das sequências de oligonucleotídeos fornecidas nas Tabelas 2, 3 ou 4, os dsRNAs aqui descritos podem incluir pelo menos uma fita de um comprimento mínimo de 21 nt. Pode ser razoavelmente esperado que dúplexes mais curtos que têm uma das sequências das Tabelas 2, 3 ou 4 menos apenas alguns nucleotídeos em uma ou em ambas as extremidades possam ser similarmente eficazes em comparação aos dsRNAs descritos acima. Por conseguinte, os dsRNAs que têm uma sequência parcial de pelo menos 15, 16, 17, 18, 19, 20, ou mais nucleotídeos contíguos de uma das sequências das Tabelas 2, 3 ou 4 e que diferem em sua capacidade de inibir a expressão de um gene TMPRSS6 em não mais que 5, 10, 15, 20, 25 ou 30% de inibição de um dsRNA que compreende a sequência completa, são contemplados de acordo com a invenção.

[00098] Além disso, os RNAs fornecidos nas Tabelas 2, 3 ou 4 identificam um sítio em um transcrito de TMPRSS6 que é suscetível à clivagem mediada por RISC. Como tal, a presente invenção apresenta, ainda, iRNAs que direcionam em uma de tais sequências. Conforme usado no presente documento, diz-se que um iRNA se direciona em um sítio particular de um transcrito de RNA se o iRNA promover a clivagem do transcrito em qualquer lugar dentro daquele sítio particular. Tal iRNA incluirá, em geral, pelo menos 15 nucleotídeos contíguos de uma das sequências fornecidas nas Tabelas 2, 3 ou 4 acoplados a sequências de nucleotídeos adicionais tomadas da região contígua à sequência selecionada em um gene TMPRSS6.

[00099] Embora uma sequência alvo tenha, em geral, 15 a 30 nucleotídeos de comprimento, há uma ampla variação na capacidade de adequação de sequências particulares nessa faixa para direcionar a clivagem de qualquer RNA alvo dado. Vários pacotes de software e as diretrizes aqui definidas fornecem orientação para a identificação de sequências alvo ideais para um dado gene alvo, mas uma abordagem empírica também pode ser tomada, na qual uma "janela" ou "máscara" de um dado tamanho (como um exemplo não limitador, 21 nucleotídeos) é literal ou figurativamente (incluindo, por exemplo, *em silico*) colocada na sequência de RNA alvo para identificar sequências na faixa de tamanho que pode servir como sequências alvo. Movendo-se a "janela" de sequência progressivamente um nucleotídeo para cima ou para baixo de um local inicial de sequência alvo, a próxima sequência alvo potencial pode ser identificada, até que o conjunto completo de sequências possíveis seja identificado para um dado tamanho alvo selecionado. Esse processo, acoplado à síntese sistemática e ao teste das sequências identificadas (com o uso de ensaios conforme aqui descrito ou conforme conhecido na técnica) para identificar aquelas sequências que realizam de modo ideal, pode identificar aquelas sequências de RNA que, quando direcionadas com um agente de iRNA, mediam a inibição mais satisfatória de expressão de gene alvo. Dessa forma, embora as sequências identificadas, por exemplo, nas Tabelas 2, 3 ou 4 representem sequências alvo eficazes, contempla-se que a otimização adicional da eficácia de inibição possa ser alcançada ao "andar a janela" progressivamente um nucleotídeo para cima ou para baixo das sequências dadas para identificar sequências com características de inibição iguais ou mais satisfatórias.

[000100] Adicionalmente, contempla-se que, para qualquer sequência identificada, por exemplo, nas Tabelas 2, 3 ou 4, a otimização adicional poderia ser alcançada através da adição ou remoção sistemáti-

ca de nucleotídeos a fim de gerar sequências mais longas ou mais curtas e testar essas sequências geradas ao andar com a janela da tamanho mais longo ou mais curto para cima ou para baixo do RNA alvo a partir daquele ponto. Novamente, o acoplamento dessa abordagem para a geração de novos candidatos alvo com o teste para eficiência de iRNAs baseado naquelas sequências alvo em um ensaio de inibição conforme conhecido na técnica ou conforme aqui descrito pode levar a melhoras adicionais na eficácia da inibição. Ainda mais, tais sequências otimizadas podem ser ajustadas, por exemplo, através da introdução de nucleotídeos modificados conforme aqui descrito ou conforme conhecido na técnica, da adição ou alterações na protrusão, ou outras modificações conforme conhecido na técnica e/ou discutido no presente documento para otimizar adicionalmente a molécula (por exemplo, aumentar a estabilidade sérica ou a meia-vida de circulação, aumentar a estabilidade térmica, intensificar a aplicação de transmembrana, direcionar para um local ou tipo de célula particular, aumentar a interação com enzimas de rota de silenciamento, aumentar a liberação de endossomas, etc.) como um inibidor de expressão.

[000101] **Um iRNA conforme aqui descrito pode conter uma ou mais faltas de combinação em relação à sequência alvo. Em uma modalidade, um iRNA conforme aqui descrito não contém mais do que 3 faltas de combinação. Se a fita antissenso do iRNA contém faltas de combinação em relação a uma sequência alvo, é preferencial que a área da falta de combinação não esteja situada no centro da região de complementariedade. Se a fita antissenso do iRNA contém faltas de combinação em relação à sequência alvo, é preferencial que a falta de combinação seja restrinja aos últimos 5 nucleotídeos da extremidade 5' ou 3' da região de complementariedade. Por exemplo, para uma fita de RNA de agente de iRNA de 23 nucleotídeos que é complementar a uma região de um gene**

TMPRSS6, a fita de RNA, em geral, não contém nenhuma falta de combinação nos 13 nucleotídeos centrais. Os métodos aqui descritos ou os métodos conhecidos na técnica podem ser usados para a determinação se um iRNA contendo um falta de combinação em relação a uma sequência alvo é eficaz na inibição da expressão de um gene TMPRSS6. É importante a consideração da eficácia de iRNAs com faltas de combinação na inibição da expressão de um gene TMPRSS6, especialmente se a região de complementariedade particular em um gene TMPRSS6 for conhecida por ter variação de sequência polimórfica dentro da população.

[000102] Em uma modalidade, pelo menos uma extremidade de um dsRNA tem uma protrusão de nucleotídeo de fita única de 1 a 4, em geral, 1 ou 2 nucleotídeos. Tais dsRNAs que têm pelo menos uma protrusão de nucleotídeo têm propriedades inibitórias inesperadamente superiores em relação a suas contrapartes com extremidades cegas. Em ainda outra modalidade, o RNA de um iRNA, por exemplo, um dsRNA, é quimicamente modificado para intensificar a estabilidade ou outras características benéficas. Os ácidos nucleicos apresentados na invenção podem ser sintetizados e/ou modificados por métodos bem estabelecidos na técnica, como aqueles descritos em "Current protocols in nucleic acid chemistry", Beaucage, S.L. *et al.* (Edrs.), John Wiley & Sons, Inc., Nova York, NY, EUA, que está aqui incorporado a título de referência. As modificações incluem, por exemplo, (a) modificações de extremidade, por exemplo, modificações de extremidade 5' (fosforilação, conjugação, ligações invertidas, *etc.*), modificações de extremidade 3' (conjugação, nucleotídeos de DNA, ligações invertidas, *etc.*), (b) modificações de base, por exemplo, substituições por bases estabilizantes, bases desestabilizantes, ou bases que têm o par de bases emparelhado a um repertório expandido de parceiros, remoção de

bases (nucleotídeos abásicos), ou bases conjugadas, (c) modificações de açúcar (por exemplo, na posição 2' ou posição 4') ou substituição do açúcar, bem como (d) modificações de cadeia principal, incluindo modificação ou substituição das ligações de fosfodiéster. Exemplos específicos dos compostos de RNA úteis nas modalidades aqui descritas incluem, mas não se limitam a, RNAs contendo cadeias principais modificadas ou ligações entre nucleotídeos não naturais. Os RNAs que têm cadeias principais modificadas incluem, entre outros, aqueles que não têm um átomo de fósforo na cadeia principal. Para os propósitos desse relatório descritivo, e, às vezes referido na técnica, os RNAs modificados que não têm um átomo de fósforo em sua cadeia principal entre nucleosídeos também podem ser considerados oligonucleosídeos. Em modalidades particulares, o RNA modificado terá um átomo de fósforo em sua cadeia principal entre nucleosídeos.

[000103] As cadeias principais de RNA modificado incluem, por exemplo, fosforotioatos, fosforotioatos quirais, fosforoditioatos, fosfotriésteres, aminoalquilfosfotriésteres, fosfonatos de metila e outros de alquila incluindo fosfonatos de 3'-alquilenos e fosfonatos quirais, fosfinatos, fosforamidatos incluindo fosforamidato e aminoalquilfosforamidatos 3'-amino, tionofosforamidatos, tionoalquilfosfonatos, tionoalquilfosfotriésteres e boranofosfatos que têm ligações de 3'-5' normais, análogos ligados 2'-5' desses, e aqueles que têm polaridade invertida em que os pares adjacentes de unidades de nucleosídeo são 3'-5' a 5'-3' ou 2'-5' a 5'-2'. Vários sais, sais misturados e formas de ácido livre também estão incluídos.

[000104] As patentes representativas que ensinam a preparação das ligações contendo fósforo acima incluem, mas não se limitam a, Patentes N^{os} U.S. 3.687.808; 4.469.863; 4.476.301; 5.023.243; 5.177.195; 5.188.897; 5.264.423; 5.276.019; 5.278.302; 5.286.717; 5.321.131; 5.399.676; 5.405.939; 5.453.496; 5.455.233; 5.466.677; 5.476.925;

5.519.126; 5.536.821; 5.541.316; 5.550.111; 5.563.253; 5.571.799; 5.587.361; 5.625.050; 6.028.188; 6.124.445; 6.160.109; 6.169.170; 6.172.209; 6.239.265; 6.277.603; 6.326.199; 6.346.614; 6.444.423; 6.531.590; 6.534.639; 6.608.035; 6.683.167; 6.858.715; 6.867.294; 6.878.805; 7.015.315; 7.041.816; 7.273.933; 7.321.029; e Patente U.S. RE39464, cada uma aqui incorporada a título de referência.

[000105] As cadeias principais de RNA modificado que não incluem um átomo de fósforo nisso têm cadeias principais que são formadas por ligações entre nucleotídeos de alquila ou cicloalquila de cadeia curta, heteroátomos misturados e ligações entre nucleotídeos de alquila ou cicloalquila, ou uma ou mais ligações entre nucleotídeos heteroatômicas ou heterocíclicas de cadeia curta. Essas incluem aquelas que têm ligações de morfolino (formadas em parte da porção de açúcar de um nucleosídeo); cadeias principais de siloxano; cadeias principais de sulfeto, sulfóxido e sulfona; cadeias principais de formacetila e tioformacetila; cadeias principais formacetila e tioformacetila de metileno; cadeias principais contendo alqueno; cadeias principais de sulfamato; cadeias principais de metilenoimino e metileno-hidrazino; cadeias principais sulfonato e sulfonamida; cadeias principais de amida; e outras que têm partes de componente N, O, S e CH₂ misturadas.

[000106] As patentes U.S. representativas que ensinam a preparação dos oligonucleosídeos acima incluem, mas não se limitam a, Patentes N^{os} U.S. 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; e 5.677.439, cada uma aqui incorporada a título de referência.

[000107] Em outros miméticos RNA adequados ou contemplados para o uso em iRNAs, as ligações de açúcar e entre nucleosídeos, isto

é, a cadeia principal, das unidades de nucleotídeo são substituídas por grupos inovadores. As unidades base são mantidas para hibridização com um composto alvo de ácido nucleico apropriado. Tal composto oligomérico mostrou-se que um mimético RNA tem excelentes propriedades de hibridização, é referido como um ácido nucleico peptídico (PNA). Em compostos de PNA, a cadeia principal de açúcar de um RNA é substituída por uma cadeia principal contendo amida, em particular, uma cadeia principal de aminoetilglicina. As nucleobases são retidas e são ligadas direta ou indiretamente a átomos de nitrogênio aza da porção de amida da cadeia principal. As patentes U.S. representativas que ensinam a preparação do compostos de PNA incluem, mas não se limitam a, Patentes N^{os} U.S. 5.539.082; 5.714.331; e 5.719.262, cada uma aqui incorporada a título de referência. Ensina-mentos adicionais do compostos de PNA podem ser encontrados, por exemplo, em Nielsen *et al.*, Science, 1991, 254, 1.497 a 1.500.

[000108] Algumas modalidades apresentadas na invenção incluem RNAs com cadeias principais de fosforotioato e oligonucleosídeos com cadeias principais de heteroátomo, e, em particular, --CH₂--NH--CH₂--, --CH₂--N(CH₃)--O--CH₂--[conhecida como uma cadeia principal de metileno (metilimino) ou MMI], --CH₂--O--N(CH₃)--CH₂--, --CH₂--N(CH₃)--N(CH₃)--CH₂-- e --N(CH₃)--CH₂--CH₂--[em que a cadeia principal de fosfodiéster nativa está representada como --O--P--O--CH₂--] da Patente N^o U.S. 5.489.677 referida acima, e as cadeias principais de amida da Patente N^o U.S. 5.602.240 referida acima. Em algumas modalidades, as RNAs aqui apresentadas têm estruturas de cadeia principal de morfolino da Patente N^o U.S. 5.034.506 referida acima.

[000109] Os RNAs modificados também podem conter uma ou mais porções de açúcar substituídas. Os iRNAs, por exemplo, dsRNAs, aqui apresentados podem incluir uma das que seguem na posição 2': OH; F; O-, S-, ou N-alquila; O-, S-, ou N-alquenila; O-, S- ou N-alquinila; ou O-

alquil-O-alquila, em que a alquila, a alquenila e a alquinila podem ser alquila C₁ a C₁₀ ou alquenila e alquinila C₂ a C₁₀ substituída ou não substituída. As modificações adequadas exemplificadoras incluem $O[(CH_2)_nO]_mCH_3$, $O(CH_2)_nOCH_3$, $O(CH_2)_nNH_2$, $O(CH_2)_nCH_3$, $O(CH_2)_nONH_2$, e $O(CH_2)_nON[(CH_2)_nCH_3]_2$, onde n e m são de 1 a cerca de 10. Em outras modalidades, os dsRNAs incluem uma das que seguem na posição 2': alquila inferior C₁ a C₁₀, alquila inferior substituída, alcarila, aralquila, O-alcarila ou O-aralquila, SH, SCH₃, OCN, Cl, Br, CN, CF₃, OCF₃, SOCH₃, SO₂CH₃, ONO₂, NO₂, N₃, NH₂, heterocicloalquila, heterocicloalcarila, aminoalquilamino, polialquilamino, silila substituída, um grupo de clivagem de RNA, um grupo repórter, um intercalador, um grupo para o aprimoramento das propriedades farmacocinéticas de um iRNA, ou um grupo para o aprimoramento das propriedades farmacodinâmicas de um iRNA, e outros substituintes que têm propriedades similares. Em algumas modalidades, a modificação inclui um 2'-metoxietóxi (2'-O--CH₂CH₂OCH₃, também conhecido como 2'-O-(2-metoxietila) ou 2'-MOE) (Martin *et al.*, *Helv. Chim. Acta*, 1995, 78:486 a 504) isto é, um grupo alcóxi-alcóxi. Outra modificação exemplificadora é 2'-dimetilaminooxietóxi, isto é, um grupo O(CH₂)₂ON(CH₃)₂, também conhecido como 2'-DMAOE, conforme descrito nos exemplos abaixo no presente documento, e 2'-dimetilaminoetoxietóxi (também conhecido na técnica como 2'-O-dimetilaminoetoxietila ou 2'-DMAEOE), isto é, 2'-O--CH₂--O--CH₂--N(CH₂)₂, também descrito nos exemplos abaixo no presente documento.

[000110] Outras modificações incluem 2'-metóxi (2'-OCH₃), 2'-aminopropóxi (2'-OCH₂CH₂CH₂NH₂) e 2'-fluoro (2'-F). Modificações similares também podem ser realizadas em outras posições no RNA de um iRNA, particularmente na posição 3' do açúcar no 3' nucleotídeo terminal ou em dsRNAs ligados em 2'-5' e na posição 5' do 5' nucleotídeo terminal. Os iRNAs também podem ter miméticos de açúcar como

porções de ciclobutila no lugar do açúcar de pentofuranosila. As patentes U.S. representativas que ensinam a preparação de tais estruturas de açúcar modificadas incluem, mas não se limitam a, Patentes N^{os} U.S. 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; e 5.700.920, algumas pertencem à mesma cessionária da presente invenção, e cada uma está aqui incorporada a título de referência.

[000111] Um iRNA também pode incluir modificações ou substituições de nucleobase (referido com frequência na técnica simplesmente como "base"). Conforme usado no presente documento, nucleobases "não modificadas" ou "naturais" incluem as adenina (A) e guanina (G) de base purina, e a timina (T), citosina (C) e uracila (U) de base pirimidina. As nucleobases modificadas incluem outras nucleobases sintéticas e naturais como 5-metilcitosina (5-me-C), 5-hidroximetil citosina, xantina, hipoxantina, 2-aminoadenina, 6-metila e outros derivados de alquila de adenina e guanina, 2-propila e outros derivados de alquila de adenina e guanina, 2-tiouracila, 2-tiotimina e 2-tiocitosina, 5-halouracila e citosina, 5-propinil uracila e citosina, 6-azo uracila, citosina e timina, 5-uracila (pseudouracila), 4-tiouracila, 8-halo, 8-amino, 8-tiol, 8-tioalquila, 8-hidroxila e outras adeninas e guaninas com substituição na posição 8, 5-halo, particularmente 5-bromo, 5-trifluorometila e outras uracilas e citosinas com substituição na posição 5, 7-metilguanina e 7-metiladenina, 8-azaguanina e 8-azaadenina, 7-deazaguanina e 7-daazaadenina e 3-deazaguanina e 3-deazaadenina. As nucleobases adicionais incluem aquelas reveladas na Patente N^o U.S. 3.687.808, aquelas reveladas em *Modified Nucleosides in Biochemistry, Biotechnology and Medicine*, Herdewijn, P. ed. Wiley-VCH, 2008; aquelas reveladas em *The Concise Encyclopedia Of Polymer*

Science And Engineering, páginas 858 a 859, Kroschwitz, J. L, ed. John Wiley & Sons, 1990, aquelas reveladas por Englisch *et al.*, Angewandte Chemie, Edição Internacional, 1991, 30, 613, e aquelas reveladas por Sanghvi, Y S., Capítulo 15, dsRNA Research and Applications, páginas 289 a 302, Crooke, S. T e Lebleu, B., Ed., CRC Press, 1993. Algumas dessas nucleobases são particularmente úteis para o aumento da afinidade de ligação dos compostos oligoméricos apresentados na invenção. Os mesmos incluem pirimidinas com substituição na posição 5, 6-azapirimidinas e purinas com substituições nas posições N-2, N-6 e O-6, incluindo 2-aminopropiladenina, 5-propiniluracila e 5-propinilcitosina. Mostrou-se que as substituições de 5-metilcitosina aumentam a estabilidade de dúpex de ácido nucleico em 0,6 a 1,2°C (Sanghvi, Y. S., Crooke, S. T. e Lebleu, B., Eds., dsRNA Research and Applications, CRC Press, Boca Raton, 1993, páginas 276 a 278) e são substituições de base exemplificadoras, ainda mais particularmente quando combinadas com modificações de açúcar de 2'-O-metoxietila.

[000112] As patentes U.S. representativas que ensinam a preparação de algumas das nucleobases modificadas acima bem como outras nucleobases modificadas incluem, mas não se limitam a, a Patente N^o U.S. 3.687.808 relatada acima, bem como as Patentes N^{os} U.S. 4.845.205; 5.130.30; 5.134.066; 5.175.273; 5.367.066; 5.432.272; 5.457.187; 5.459.255; 5.484.908; 5.502.177; 5.525.711; 5.552.540; 5.587.469; 5.594.121. 5.596.091; 5.614.617; 5.681.941; 6.015.886; 6.147.200; 6.166.197; 6.222.025; 6.235.887; 6.380.368; 6.528.640; 6.639.062; 6.617.438; 7.045.610; 7.427.672; e 7.495.088, cada uma aqui incorporada a título de referência, e a Patente N^o U.S. 5.750.692, também aqui incorporado a título de referência.

[000113] O RNA de um iRNA também pode ser modificado para incluir um ou mais ácidos nucleicos fechados (LNA). Um ácido nucleico fechado é um nucleotídeo que tem uma porção de ribose modificada

na qual a porção de ribose compreende uma ponte extra que conecta os carbonos 2' e 4'. Essa estrutura "fecha" de modo eficaz a ribose na conformação estruturas 3'-endo. Mostrou-se que a adição de ácidos nucleicos fechados a siRNAs aumenta a estabilidade de siRNA em soro, e reduz efeitos fora do direcionamento (Elmen, J. *et al.*, (2005) *Nucleic Acids Research* 33(1):439 a 447; Mook, OR. *et al.*, (2007) *Mol Canc Ther* 6(3):833 a 843; Grunweller, A. *et al.*, (2003) *Nucleic Acids Research* 31(12):3.185 a 3.193).

[000114] As Patentes U.S. representativas que ensinam a preparação de nucleotídeos de ácido nucleico fechado incluem, mas não se limitam às que seguem: Patentes N^{os} U.S. 6.268.490; 6.670.461; 6.794.499; 6.998.484; 7.053.207; 7.084.125; e 7.399.845, cada uma aqui incorporada a título de referência em sua totalidade.

[000115] Outra modificação do RNA de um iRNA apresentado na invenção envolve a ligação química ao RNA de um ou mais ligantes, porções ou conjugados que intensificam a atividade, a distribuição celular, as propriedades farmacocinéticas, ou a admissão celular do iRNA. Tais porções incluem, mas não se limitam a porções lipídicas como uma porção de colesterol (Letsinger *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. EUA, 1989, 86: 6.553 a 6.556), ácido cólico (Manoharan *et al.*, Biorg. Med. Chem. Lett., 1994, 4:1.053 a 1.060), um tioéter, por exemplo, beril-S-tritiltiol (Manoharan *et al.*, Ann. N.Y. Acad. Sci., 1992, 660:306 a 309; Manoharan *et al.*, Biorg. Med. Chem. Lett., 1993, 3:2.765 a 2.770), um tiocolesterol (Oberhauser *et al.*, Nucl. Acids Res., 1992, 20:533 a 538), uma cadeia alifática, por exemplo, resíduos de dodecandiol ou undecil (Saison-Behmoaras *et al.*, EMBO J, 1991, 10:1.111 a 1.118; Kabanov *et al.*, FEBS Lett., 1990, 259:327 a 330; Svinarchuk *et al.*, Biochimie, 1993, 75:49 a 54), um fosfolípideo, por exemplo, dihexadecil-rac-glicerol ou 1,2-di-O-hexadecil-rac-glicero-3-fosfonato de trietil-amônio (Manoharan *et al.*, Tetrahedron Lett., 1995, 36:3.651 a

3.654; Shea *et al.*, Nucl. Acids Res., 1990, 18:3.777 a 3.783), uma cadeia de poliamina ou de polietileno glicol (Manoharan *et al.*, Nucleosides & Nucleotides, 1995, 14:969 a 973), ou ácido adamantano acético (Manoharan *et al.*, Tetrahedron Lett., 1995, 36:3.651 a 3.654), um porção de palmitila (Mishra *et al.*, Biochim. Biophys. Acta, 1995, 1264:229 a 237), ou uma porção de octadecilamina ou de hexilamino-carboniloxicolesterol (Crooke *et al.*, J. Pharmacol. Exp. Ther., 1996, 277:923 a 937).

[000116] Em uma modalidade, um ligante altera a distribuição, direcionamento ou tempo de vida de um agente de iRNA no qual o mesmo é incorporado. Em modalidades preferenciais, um ligante fornece uma afinidade intensificada para um alvo selecionado, por exemplo, molécula, célula ou tipo de célula (por exemplo, uma célula do fígado, como um hepatócito), compartimento, por exemplo, um compartimento celular ou de órgão, tecido, órgão ou região do corpo, por exemplo, em comparação a uma espécie ausente como um ligante. Os ligantes preferenciais não participam de emparelhamento de dúplex em um ácido nucleico duplexado.

[000117] Os ligantes podem incluir uma substância de ocorrência natural, como uma proteína (por exemplo, albumina sérica humana (HSA), lipoproteína de baixa densidade (LDL), ou globulina); carboidrato (por exemplo, um dextrano, pululano, quitina, quitosano, inulina, ciclodextrina ou ácido hialurônico); ou um lipídeo. O ligante também pode ser uma molécula recombinante ou sintética, como um polímero sintético, por exemplo, um ácido poliamino sintético. Exemplos de poliaminoácidos incluem ácido poliamino é uma polilisina (PLL), ácido poli L-aspártico, ácido poli L-glutâmico, copolímero de anidrido de ácido estireno-maleico, copolímero de poli(L-lactida-co-glicolida), copolímero de anidrido de divinil éter-maleico, copolímero de N-(2-hidroxipropil)metacrilamida (HMPA), polietileno glicol (PEG), álcool poli-

vinílico (PVA), poliuretano, poli(ácido 2-etilacrílico), polímeros de N-isopropilacrilamida, ou polifosfazina. Exemplos de poliaminas incluem: polietilenimina, polilisina (PLL), espermina, espermidina, poliamina, poliamina pseudopeptídica, poliamina peptidomimética, poliamina dendrímero, arginina, amidina, protamina, lipídeo catiônico, porfirina catiônica, sal quaternário de uma poliamina, ou um peptídeo α helicoidal.

[000118] Os ligantes também podem incluir grupos de direcionamento, por exemplo, um agente de direcionamento de célula ou tecido, por exemplo, uma lectina, glicoproteína, lipídeo ou proteína, por exemplo, um anticorpo, que se liga a um tipo de célula específico como uma célula renal. Um grupo de direcionamento pode ser uma tiotropina, melanotropina, lectina, glicoproteína, proteínas tensoativas A, carboidrato de Mucina, lactose multivalente, galactose multivalente, N-acetilgalactosamina, manose multivalente de N-acetil-gulucosamina, fucose multivalente, poliaminoácidos glicosilados, galactose multivalente, transferrina, bisfosfonato, poliglutamato, poliaspartato, um lipídeo, colesterol, um esteroide, ácido biliar, folato, vitamina B12, vitamina A, biotina, ou um peptídeo de RGD ou mimético de peptídeo RGD.

[000119] Outros exemplos de ligantes incluem corantes, agentes de intercalação (por exemplo, acridinas), reticuladores (por exemplo, psoraleno, mitomicina C), porfirinas (TPPC4, texafirina, Sapfirina), hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (por exemplo, fenazina, diidrofenazina), endonucleases artificiais (por exemplo, EDTA), moléculas lipofílicas, por exemplo, colesterol, ácido cólico, ácido adamantano acético, ácido 1-pireno butírico, diidrotestosterona, 1,3-Bis-O(hexadecil)glicerol, grupo geraniloxihexila, hexadecilglicerol, borneol, mentol, 1,3-propanodiol, grupo heptadecila, ácido palmítico, ácido mirístico, ácido O3-(oleoil)lito cólico, ácido O3-(oleoil)colênico, dimetoxitritila, ou fenoxazina) e conjugados peptídicos (por exemplo, peptídeo antenapedia, peptídeo Tat), agentes alquilantes, fosfato, amino, mer-

capto, PEG (por exemplo, PEG-40K), MPEG, [MPEG]₂, poliamino, alquila, alquila substituída, marcadores radiomarcados, enzimas, haptenos (por exemplo, biotina), facilitadores de transporte/absorção (por exemplo, aspirina, vitamina E, ácido fólico), ribonucleases sintéticas (por exemplo, imidazol, bisimidazol, histamina, agrupamentos de imidazol, conjugados de acridina-imidazol, complexos Eu³⁺ de tetraaza-macrociclos), dinitrofenila, HRP, ou AP.

[000120] Os ligantes podem ser proteínas, por exemplo, glicoproteínas, ou peptídeos, por exemplo, moléculas que têm uma afinidade específica para um co-ligante, ou anticorpos, por exemplo, um anticorpo que se liga a um tipo de célula específica como uma célula de câncer, célula endotelial, ou célula óssea. Os ligantes podem incluir também hormônios e receptores de hormônio. Os mesmos também podem incluir espécies não peptídicas, como lipídeos, lectinas, carboidratos, vitaminas, cofatores, lactose multivalente, galactose multivalente, N-acetil-galactosamina, manose multivalente de N-acetil-gulucosamina, ou fucose multivalente. O ligante pode ser, por exemplo, um lipopolissacarídeo, um ativador de p38 MAP quinase, ou um ativador de NF-κB.

[000121] O ligante pode ser uma substância, por exemplo, um fármaco, que pode aumentar a admissão do agente de iRNA na célula, por exemplo, rompendo o citoesqueleto da célula, por exemplo, rompendo os microtúbulos, microfibrilas e/ou fibras intermediários da célula. O fármaco pode ser, por exemplo, táxon, vincristina, vinblastina, citocalasina, nocodazol, japlakinolido, latrunculina A, faloidina, swinholida A, indanocina ou mioservina.

[000122] Em algumas modalidades, um ligante fixado a um iRNA conforme aqui descrito atua como um modulador PK. Conforme usado no presente documento, um "modulador PK" se refere a um modulador farmacocinético. Os moduladores PK incluem lipofílicos, ácidos biliares, esteroides, análogos de fosfolípida, peptídeos, agentes de ligação de

proteína, PEG, vitaminas, *etc.* Os moduladores PK exemplificadores incluem, mas não se limitam a, colesterol, ácidos graxos, ácido cólico, ácido litocólico, dialquilglicerídeos, diacilglicerídeo, fosfolipídeos, esfingolipídeos, naproxen, ibuprofen, vitamina E, biotina, *etc.* Os ligonucleotídeos que compreende inúmeras ligações de fosforotioato também são conhecidos por se ligarem à proteína sérica, dessa forma, os oligonucleotídeos curtos, por exemplo, oligonucleotídeos com cerca de 5 bases, 10 bases, 15 bases ou 20 bases, que compreende múltiplas ligações de fosforotioato na cadeia principal também são receptivos à presente invenção como ligantes (por exemplo, como ligantes de modulação PK). Além disso, os aptâmeros que se ligam a componentes séricos (por exemplo, proteínas séricas) também são adequados para o uso como ligantes de modulação PK nas modalidades aqui descritas.

[000123] Para fármacos macromoleculares e moléculas de fármaco hidrofílico, que não podem cruzar facilmente membranas de camada dupla, pensa-se que o confinamento em compartimentos endossomais/lisossomais da célula é a maior dificuldade para a aplicação eficaz em seu sítio de ação. Nos últimos anos, foram desenvolvidas inúmeras abordagens e estratégias para abordar esse problema. Para formulações lipossomais, o uso de lipídeos fusogênicos na formulação é a abordagem mais comum (Singh, R. S., Goncalves, C. *et al.* (2004). On the Gene Delivery Efficacies of pH-Sensitive Cationic Lipids via Endosomal Protonation. A Chemical Biology Investigation. Chem. Biol. 11, 713 a 723.). Outros componentes, que exibem atividade endossomolítica sensível ao pH através da protonação e/ou alterações conformacionais induzidas por pH, incluem polímeros e peptídeos carregados. Exemplos podem ser encontrados em Hoffman, A. S., Stayton, P. S. *et al.* (2002). O modelo de polímeros "inteligentes" que podem direcionar aplicação de fármaco intracelular. Polymers Adv. Technol. 13, 992 a 999; Kakudo, Chaki, T., S. *et al.* (2004). Transferrin-Modified

Liposomes Equipped with a pH-Sensitive Fusogenic Peptide: An Artificial Viral-like Delivery System. *Biochemistry* 436, 5.618 a 5.628; Yessine, M. A. and Leroux, J. C. (2004). Membrane-destabilizing polyanions: interaction with lipid bilayers and escape endossomal of biomacromolecules. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 56, 999 a 1.021; Oliveira, S., van Rooy, I. *et al.* (2007). Os peptídeos fusogênicos intensificam o escape endossomal que aprimora o silenciamento induzido por iRNA de oncogenes. *Int. J. Pharm.* 331, 211 a 4. Os mesmos foram usados, em geral, no contexto de sistemas de aplicação de fármaco, como lipossomas ou lipoplexos. Para a aplicação mediada por receptor de folato com o uso de formulações lipossomais, por exemplo, um peptídeo fusogênico sensível ao pH foi incorporado ao lipossomo e mostrou intensificação da atividade através da melhora do descarregamento de fármaco durante o processo de admissão (Turk, M. J., Reddy, J. A. *et al.* (2002). A caracterização de um peptídeo sensível ao pH inovador que intensifica a liberação de fármaco de lipossomos direcionados a folato em pH endossômicos é descrita em *Biochim. Biophys. Acta* 1559, 56 a 68).

[000124] Em determinadas modalidades, os componentes endossomolíticos da presente invenção podem ser peptídeos polianiónicos ou peptidomiméticos que mostram fusogenicidade e/ou atividade de membrana dependente de pH. Um peptidomimético pode ser uma cadeia similar à proteína pequena projetada para mimetizar um peptídeo. Um peptidomimético pode surgir da modificação de um peptídeo existente a fim de alterar as propriedades da molécula, ou a síntese de uma molécula similar a peptídeo com o uso de aminoácidos não naturais ou seus análogos. Em determinadas modalidades, os mesmos têm estabilidade e/ou atividade biológica aprimorada em comparação a um peptídeo. Em determinadas modalidades, o componente endossomolítico assume sua conformação ativa no pH endossômico (por

exemplo, pH 5 a 6). A conformação "ativa" é aquela conformação na qual o componente endossomolítico promove a lise do endossoma e/ou transporte da composição modular apresentada na invenção, ou qualquer um de seus componentes (por exemplo, um ácido nucleico), do endossoma para o citoplasma da célula.

[000125] As bibliotecas dos compostos podem ser submetidas à varredura para sua atividade de membrana diferencial em pH endossômico versus pH neutro com o uso de um ensaio de hemólise. Os candidatos potenciais isolados através desse método podem ser usados como componentes das composições modulares apresentadas na invenção. Um método para a identificação de um componente endossomolítico para uso nas composições e métodos da presente invenção pode compreender: fornecer uma biblioteca do compostos; colocar as células sanguíneas em contato com os membros da biblioteca, em que o pH do meio no qual o contato ocorre é controlado; determinar se os compostos induzem a lise diferencial de células sanguíneas em um baixo pH (por exemplo, cerca de pH 5 a 6) versus pH neutro (por exemplo, cerca de pH 7 a 8).

[000126] Os componentes endossomolíticos exemplificadores incluem o peptídeo GALA (Subbarao *et al.*, Biochemistry, 1987, 26: 2.964 a 2.972), o peptídeo EALA (Vogel *et al.*, J. Am. Chem. Soc., 1996, 118: 1.581 a 1.586), e seus derivados (Turk *et al.*, Biochem. Biophys. Acta, 2002, 1559: 56 a 68). Em determinadas modalidades, o componente endossomolítico pode conter um grupo químico (por exemplo, um aminoácido) que será submetido a uma alteração na carga ou protonação em resposta a uma alteração no pH. O componente endossomolítico pode ser linear ou ramificado. As sequências primárias exemplificadoras de componentes endossomolíticos incluem H₂N-(AALEALAEALAEALAEALAEAAAAGGC)-CO₂H (SEQ ID NO:2); H₂N-(AALAEALAEALAEALAEALAEALAAAAGGC)-CO₂H (SEQ ID

NO:3); e H₂N-(ALEALAEALEALAEA)-CONH₂ (SEQ ID NO:4).

[000127] Em determinadas modalidades, mais de um componente endossomolítico podem ser incorporados ao agente de iRNA apresentado na invenção. Em algumas modalidades, isso implicará na incorporação de mais de um do mesmo componente endossomolítico ao agente de iRNA. Em outras modalidades, isso implicará na incorporação de dois ou mais componentes endossomolíticos diferentes ao agente de iRNA.

[000128] Esses componentes endossomolíticos podem mediar escape endossômico, por exemplo, alterando-se a conformação no pH endossômico. Em determinadas modalidades, os componentes endossomolíticos podem existir em uma conformação espiralada aleatória no pH neutro e se rearranjar em uma hélice anfifática no pH endossômico. Como uma consequência dessa transição conformacional, esses peptídeos podem ser inseridos na membrana lipídica do endossoma, ocasionando vazamento dos conteúdos endossômicos no citoplasma. Devido ao fato de que a transição conformacional depende do pH, os componentes endossomolíticos pode exibir pouca ou nenhuma atividade fusogênica enquanto circulam no sangue (pH ~7,4). "Atividade fusogênica", conforme aqui usado, é definida como aquela atividade que resulta na quebra de uma membrana lipídica pelo componente endossomolítico. Um exemplo de atividade fusogênica é a quebra da membrana endossômica pelo componente endossomolítico, levando à lise ou vazamento e transporte de um ou mais componentes da composição modular apresentada na invenção (por exemplo, o ácido nucleico) do endossoma no citoplasma.

[000129] Além de ensaios de hemólise, conforme aqui descrito, os componentes endossomolíticos adequados podem ser testados e identificados por um versado com o uso de outros métodos. Por exemplo, a capacidade de um composto de responder, por exemplo, à

alteração de carga dependente, o ambiente de pH pode ser testados por métodos rotineiros, por exemplo, em um ensaio celular. Em determinadas modalidades, um composto de teste é combinado a ou colocado em contato com uma célula, e é permitido que a célula internalize o composto de teste, por exemplo, por endocitose. Uma preparação de endossoma pode ser, então, feita a partir das células em contato e a preparação de endossoma em comparação a uma preparação de endossoma de células de controle. Uma alteração, por exemplo, uma diminuição, na fração de endossoma da célula em contato vs. a célula de controle indica que o composto de teste pode funcionar como um agente fusogênico. Alternativamente, a célula em contato e a célula de controle podem ser avaliadas, por exemplo, por microscopia, por exemplo, por microscopia de luz ou eletrônica, para determinar uma diferença na população de endossoma nas células. O composto de teste e/ou os endossomas pode ser marcados, por exemplo, para quantificar o vazamento endossômico.

[000130] Em outro tipo de ensaio, um agente de iRNA descrito no presente documento é construído através do uso de um ou mais agentes fusogênicos de teste ou putativos. O agente de iRNA pode ser etiquetado para visualização fácil. A capacidade do componente endossomolítico de promover escape endossomal, assim que o agente de iRNA é absorvido pela célula, pode ser avaliada, por exemplo, mediante a preparação de uma preparação de endossoma, ou mediante técnicas de microscopia, que permitem a visualização do agente de iRNA etiquetado no citoplasma da célula. Em determinadas outras modalidades, a inibição da expressão de gene, ou qualquer outro parâmetro fisiológico, pode ser usada como um marcador substituto para o escape endossomal.

[000131] Em outras modalidades, a espectroscopia por dicroísmo circular pode ser usada para identificar os componentes que exibem

uma transição estrutural dependente de pH.

[000132] Um ensaio em duas etapas também pode ser executado, em que um primeiro ensaio avalia a capacidade de um composto de teste de responder por si só às mudanças no pH e um segundo ensaio avalia a capacidade de uma composição modular que inclui a resposta do composto de teste às mudanças no pH.

Conjugados de Lipídeo

[000133] Em um ligante, o ligante ou conjugado é um lipídeo ou molécula à base de lipídeo. Tal lipídeo ou molécula à base de lipídeo de preferência se liga a uma proteína sérica, por exemplo, albumina sérica humana (HSA). Um ligante de ligação a HSA permite a distribuição do conjugado para um tecido alvo, por exemplo, um tecido alvo diferente do rim do corpo. Por exemplo, o tecido alvo pode ser o fígado, incluindo células parenquimais do fígado. Outras moléculas que podem se ligar a HSA também podem ser usadas como ligantes. Por exemplo, neproxina ou aspirina pode ser usada. Um lipídeo ou ligante à base de lipídeo pode (a) aumentar a resistência à degradação do conjugado, (b) aumentar o alvejamento ou o transporte para uma célula alvo ou membrana celular, e/ou (c) pode ser usado para ajustar a ligação a uma proteína sérica, por exemplo, HSA.

[000134] Um ligante à base de lipídeo pode ser usado para modular, por exemplo, controlar a ligação de o conjugado a um tecido alvo. Por exemplo, um lipídeo ou ligante à base de lipídeo que se liga a HSA mais fortemente será menos propenso a ser direcionado para o rim e, portanto, menos propenso a ser limpado do corpo. Um lipídeo ou ligante à base de lipídeo que se liga a HSA menos fortemente pode ser usado para alvejar o conjugado para o rim.

[000135] Em uma modalidade preferencial, o ligante à base de lipídeo se liga a HSA. De preferência, se liga a HSA com uma afinidade suficiente de tal modo que o conjugado será de preferência distribuído

para um tecido diferente de rim. No entanto, é preferido que a afinidade não tão forte que a ligação HSA-ligante não possa ser revertida.

[000136] Em uma outra modalidade preferencial, o ligante à base de lipídeo se liga a HSA deficientemente ou não tão deficiente, de tal modo que o conjugado será de preferência distribuído para o rim. Outras porções que alvejam células de rim também podem ser usados no lugar de ou além do ligante à base de lipídeo.

[000137] Em outro aspecto, o ligante é uma porção química, por exemplo, uma vitamina, que é absorvida por uma célula alvo, por exemplo, uma célula de proliferação. Esses são particularmente úteis para o tratamento de distúrbios caracterizados por proliferação celular indesejada, por exemplo, do tipo maligno ou não maligno, por exemplo, células de câncer. As vitaminas exemplificativas incluem vitamina A, E e K. Outras vitaminas exemplificativas incluem vitamina B, por exemplo, ácido fólico, B12, riboflavina, biotina, piridoxal ou outras vitaminas ou nutrientes absorvidas pelas células de câncer. Também são incluídos HSA e lipoproteína de baixa densidade (LDL).

[000138] Em outro aspecto, o ligante é um agente de permeação celular, de preferência, um agente de permeação celular helicoidal. De preferência, o agente é anfifático. Um agente exemplificativo é um peptídeo tal como tat ou antenopedia. Se o agente for um peptídeo, isso pode ser modificado, incluindo ligações peptidilmiméticas, invertômeras, sem peptídeo ou pseudopeptídeo e uso de D-aminoácidos. O agente helicoidal é de preferência um agente α -helicoidal, que de preferência tem uma fase lipofílica e uma fase lipofóbica.

Peptídeos de Permeação Celular

[000139] Os peptídeos adequados para uso com a presente invenção podem ser um peptídeo natural, por exemplo, peptídeo tat ou antenapedia, um peptídeo sintético ou um peptidomimético. Ademais, o peptídeo pode ser um peptídeo modificado, por exemplo, peptídeo po-

de compreender ligações sem peptídeo ou pseudopeptídeo e D-aminoácidos. Um peptidomimético (também chamado no presente documento de oligopeptidomimético) é uma molécula capaz de se dobrar em uma estrutura tridimensional definida similar a um peptídeo natural. A fixação de peptídeo e peptidomiméticos a agentes de iRNA pode afetar a distribuição farmacocinética do iRNA, tal como através da intensificação do reconhecimento e da absorção celular. A porção química de peptídeo ou peptidomimético pode ter cerca de 5 a 50 aminoácidos de comprimento, por exemplo, cerca de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 ou 50 aminoácidos de comprimento.

[000140] Um peptídeo ou peptidomimético pode ser, por exemplo, um peptídeo de permeação celular, peptídeo catiônico, peptídeo anfático ou peptídeo hidrofóbico (por exemplo, que consiste principalmente em Tyr, Trp ou Phe). A porção química de peptídeo pode ser um peptídeo dendrímero, peptídeo restrito ou peptídeo reticulado. Em uma outra alternativa, a porção química de peptídeo pode incluir um sequência de translocação membrana hidrofóbica (MTS). Um peptídeo que contém MTS hidrofóbica exemplificador é RFGF que tem a sequência de aminoácido AAVALLPAVLLALLAP (SEQ ID NO:5). Um análogo de RFGF (por exemplo, sequência de aminoácido AALLPVL-LAAP (SEQ ID NO:6)) que contem uma MTS hidrofóbica também pode ser uma porção química de alvejamento. A porção química de peptídeo pode ser um peptídeo de "entrega", que pode portar moléculas polares grandes incluindo peptídeos, oligonucleotídeos e proteína ao longo das membranas celulares. Por exemplo, as sequências da proteína Tat do HIV (GRKKRRQRRRPPQ (SEQ ID NO:7)) e a proteína de Drosophila Antennapedia (RQIKIWFQNRRMKWKK (SEQ ID NO:8)) foram concluídas como capazes de funcionar como peptídeos de entrega. Um peptídeo ou peptidomimético pode ser codificado por uma sequência de DNA aleatória, tal como um peptídeo identificado a partir

de uma biblioteca de exibição de fago ou biblioteca combinatória de uma microesfera e um composto (OBOC) (Lam *et al.*, Nature, 354:82-84, 1991). De preferência, o peptídeo ou peptidomimético preso ao lipídeo é um peptídeo de alveijamento celular tal como um peptídeo de arginina-glicina-ácido aspártico (RGD) ou uma imitação de RGD. Uma porção química de peptídeo pode estar na faixa de comprimento de cerca de 5 aminoácidos a cerca de 40 aminoácidos. As porções de peptídeo podem ter uma modificação estrutural, tal como para aumentar uma estabilidade ou propriedades conformacionais diretas. Qualquer uma das modificações estruturais descritas abaixo pode ser utilizada.

[000141] Uma porção química de peptídeo RGD pode ser usada para alvejar uma célula de tumor, tal como uma célula de tumor endotelial ou uma célula de tumor de câncer de mama (Zitzmann *et al.*, Cancer Res., 62:5139 a 43, 2002). Um peptídeo de RGD pode facilitar o alveijamento de um agente de dsRNA para tumores de uma variedade de outros tecidos, incluindo o pulmão, rim, baço ou fígado (Aoki *et al.*, Cancer Gene Therapy 8:783 a 787, 2001). De preferência, o peptídeo RGD irá facilitar o alveijamento de um agente de iRNA para o rim. O peptídeo RGD pode ser linear ou cíclico e pode ser modificado, por exemplo, glicosilado ou metilado para facilitar o alveijamento para tecidos específicos. Por exemplo, um peptídeo RGD glicosilado pode aplicar um agente de iRNA a uma célula de tumor que expressa $\alpha_v\beta_3$ (Haubner *et al.*, Jour. Nucl. Med., 42:326 a 336, 2001).

[000142] Os peptídeos que alvejam marcadores enriquecidos em células de proliferação podem ser usados. Por exemplo, os peptídeos que contêm RGD e os peptidomiméticos podem direcionar as células de câncer, em particular, células que exibem uma integrina $\alpha_v\beta_3$. Dessa forma, seria possível usar peptídeos RGD, peptídeos cíclicos contendo RGD, peptídeos RGD que incluem D-aminoácidos, bem como imitações de

RGD sintéticas. Além do RGD, é possível usar outras porções que alvejam o ligante de integrina $\alpha\beta 3$. Em geral, tais ligantes podem ser usados para controlar as células de proliferação e a angiogênese.

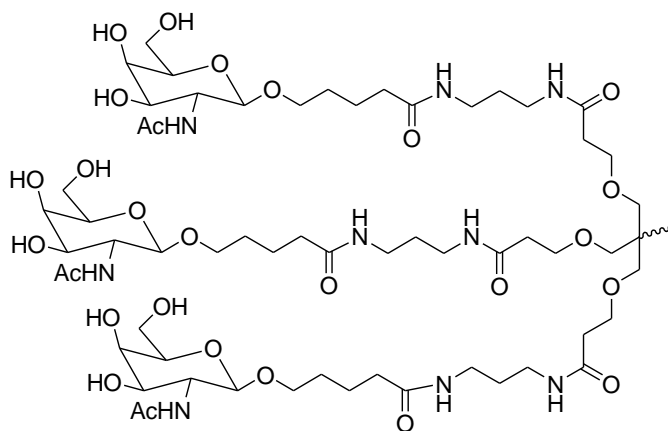
[000143] Um "peptídeo de permeação celular" é capaz de permear uma célula, por exemplo, uma célula microbial, tal como uma célula bacteriana ou fúngica, ou uma célula de mamífero, tal como uma célula humana. Um peptídeo que permeia célula microbial pode ser, por exemplo, um peptídeo linear α -helicoidal (por exemplo, LL-37 ou Cero-pina P1), um peptídeo que contém ligação de dissulfeto (por exemplo, α -defensina, β -defensina ou bactenecina) ou um peptídeo contendo apenas um ou dois aminoácidos dominantes (por exemplo, PR-39 ou indolicidina). Um peptídeo de permeação celular também pode incluir um sinal de localização nuclear (NLS). Por exemplo, um peptídeo de permeação celular pode ser um peptídeo anfifático bipartido, tal como MPG, que é derivado do domínio de peptídeo de fusão de HIV-1 gp41 e o NLS de antígeno T SV40 grande (Simeoni *et al.*, Nucl. Acids Res. 31:2717 a 2724, 2003).

Conjugados de Carboidrato

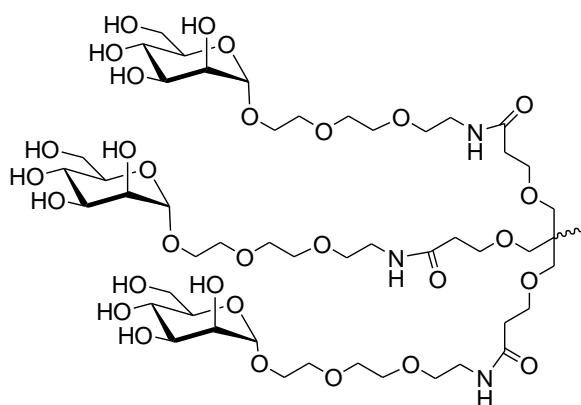
[000144] Em algumas modalidades, os oligonucleotídeos de iRNA aqui descritos compreendem adicionalmente conjugados de carboidrato. Os conjugados de carboidrato são vantajosos para a aplicação *in vivo* de ácidos nucleicos, bem como composições adequadas para uso terapêutico *in vivo*, conforme aqui descrito. Conforme usado no presente documento, "carboidrato" se refere a um composto que é um carboidrato *per se* constituído de uma ou mais unidades de monossacarídeo com pelo menos 6 átomos de carbono (que pode ser linear, ramificado ou cíclico) com um átomo de oxigênio, nitrogênio ou enxofre ligado a cada átomo de carbono; ou um composto que tem como uma parte do mesmo uma porção química de carboidrato constituída de uma ou mais unidades de monossacarídeo com pelo menos seis

átomos de carbono (que pode ser linear, ramificada ou cíclica), com um átomo de oxigênio, nitrogênio ou enxofre ligado a cada átomo de carbono. Os carboidratos representativos incluem os açúcares (mono, di, tri e oligossacarídeos contendo de cerca de 4 a 9 unidades de monossacarídeo) e polissacarídeos tais como amidos, glicogênio, celulose e gomas de polissacarídeo. Os monossacarídeos específicos incluem açúcares C₅ e acima (de preferência C₅ a C₈); di e trissacarídeos incluem açúcares que tem duas ou três unidades de monossacarídeo (de preferência C₅ a C₈).

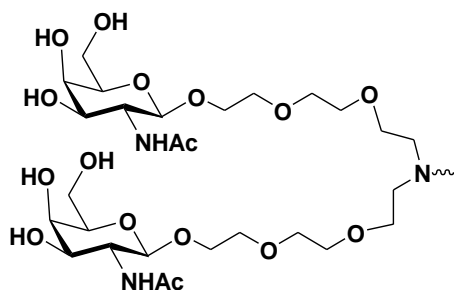
[000145] Em uma modalidade, o conjugado de carboidrato é selecionado a partir do grupo que consiste em:



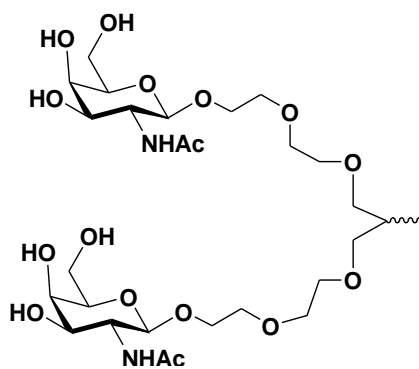
Fórmula II,



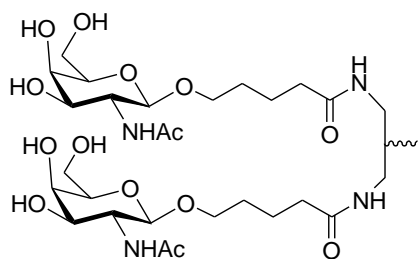
Fórmula III,



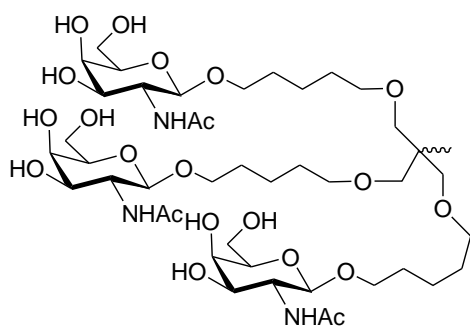
Fórmula IV,



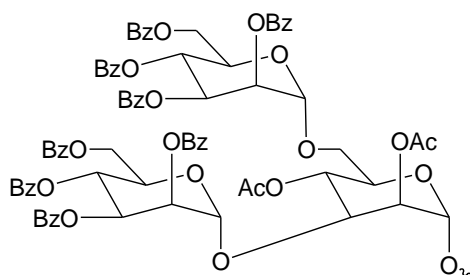
Fórmula V,



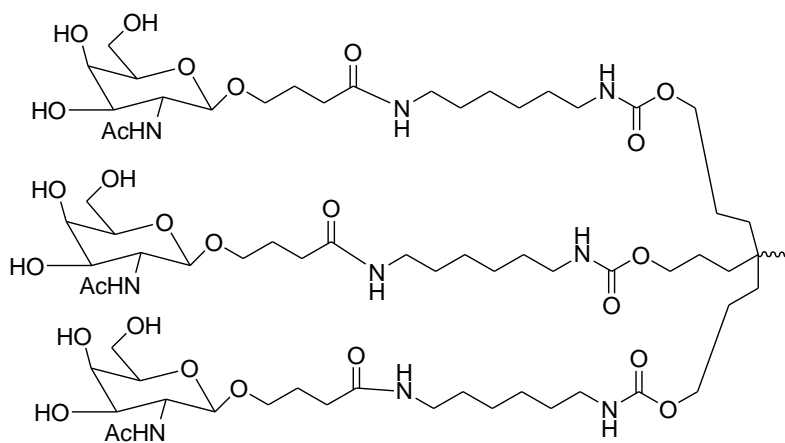
Fórmula VI,



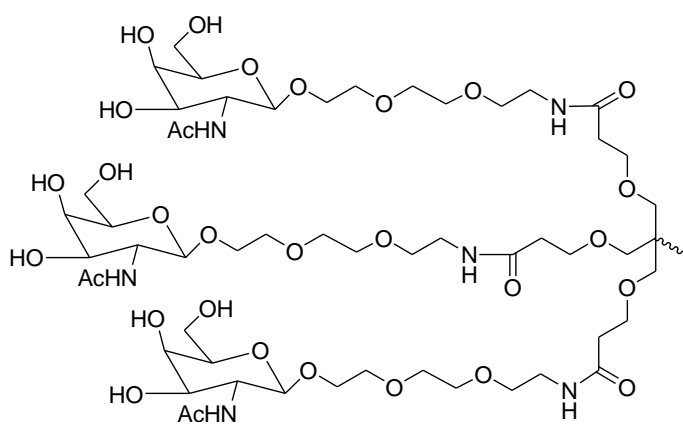
Fórmula VII,



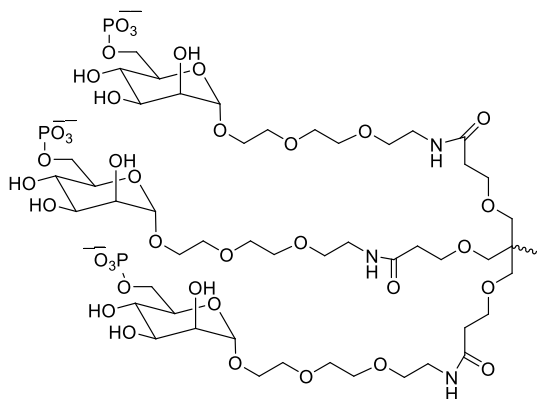
Fórmula VIII,



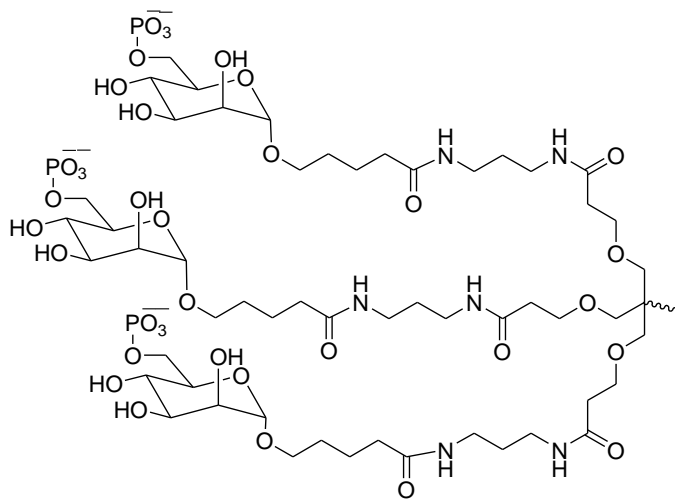
Fórmula IX,



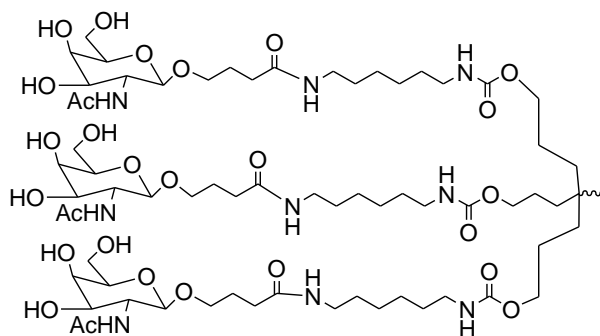
Fórmula X,



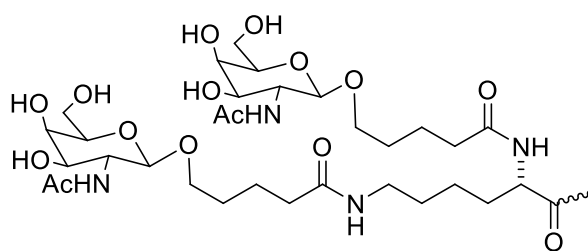
Fórmula XI,



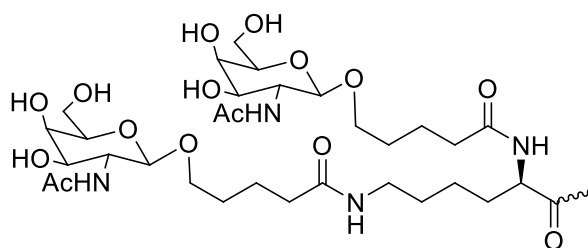
Fórmula XII,



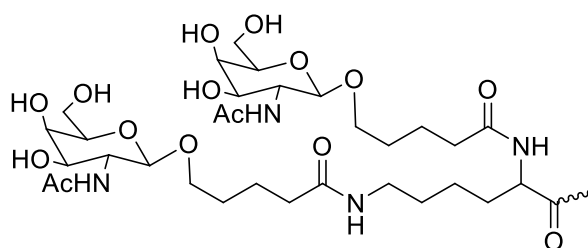
Fórmula XIII,



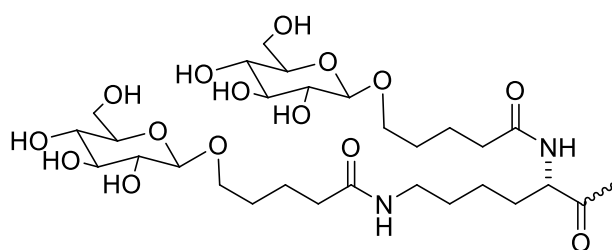
Fórmula XIV,



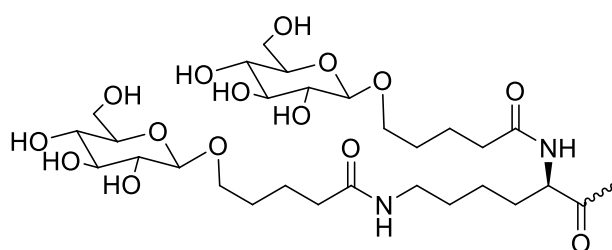
Fórmula XV,



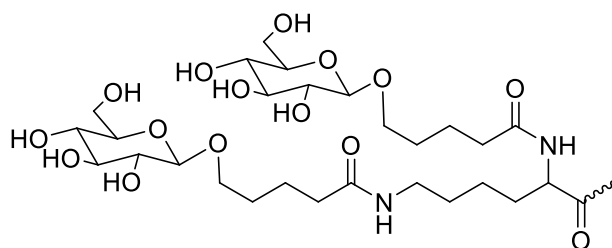
Fórmula XVI,



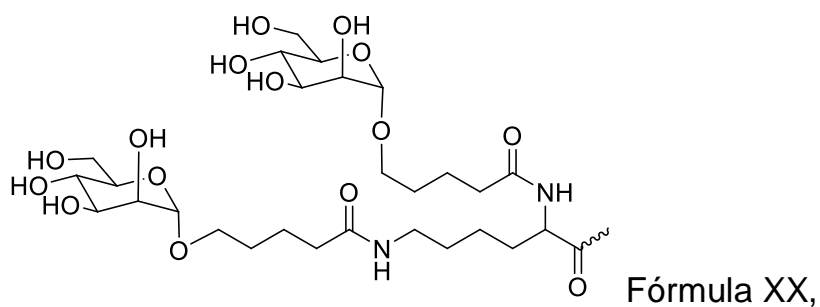
Fórmula XVII,



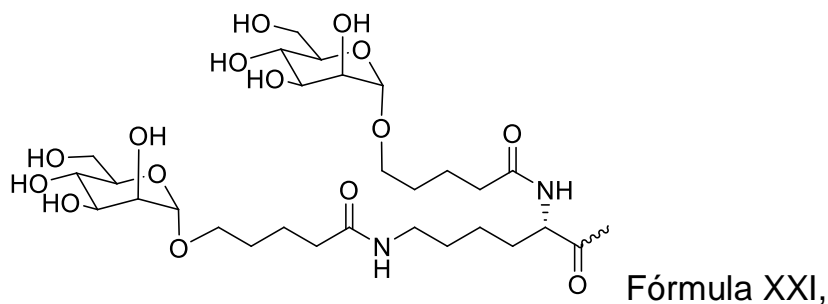
Fórmula XVIII,



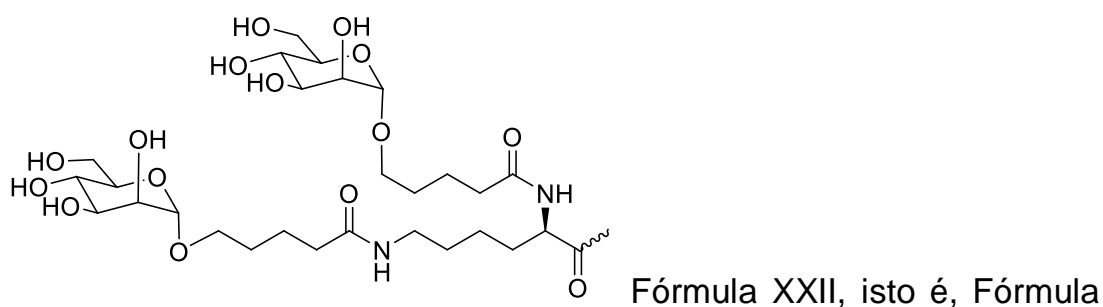
Fórmula XIX,



Fórmula XX,



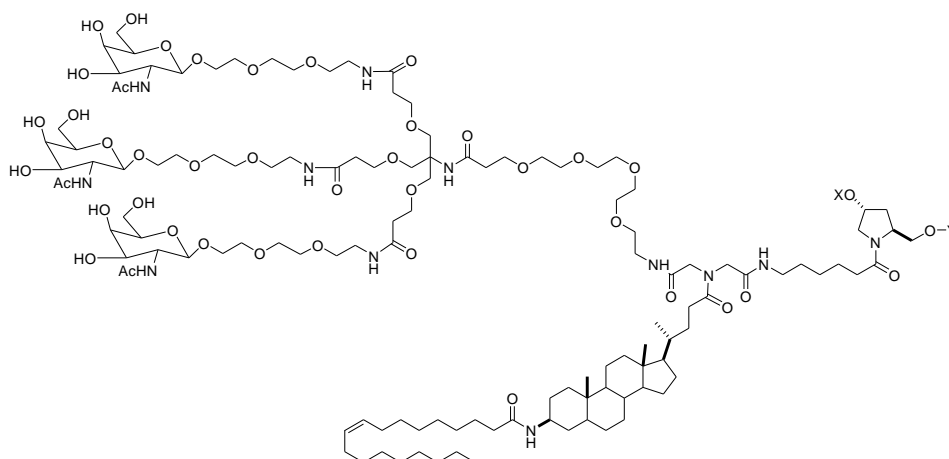
Fórmula XXI,



Fórmula XXII, isto é, Fórmula

II – Fórmula XXII.

[000146] Um outro conjugado de carboidrato representativo para uso nas modalidades aqui descritas inclui, mas não é limitado a,



(Fórmula XXIII),

quando um de X ou Y é um oligonucleotídeo, o outro é um hidrogênio.

[000147] Em algumas modalidades, o conjugado de carboidrato

compreende adicionalmente outro ligante tal como, mas não limitado a, modulador de PK, ligante endossomolítico e peptídeo de permeação celular.

Ligadores

[000148] Em algumas modalidades, os conjugados aqui descritos podem ser fixados ao oligonucleotídeo de iRNA com vários ligadores que podem ser cliváveis ou não cliváveis.

[000149] O termo "ligador" ou "grupo de ligação" significa uma porção química orgânica que conecta duas partes de um composto. Os ligadores tipicamente compreendem uma ligação direta ou um átomo tal como oxigênio ou enxofre, uma unidade tal como NR^8 , C(O) , C(O)NH , SO , SO_2 , SO_2NH ou uma cadeia de átomos, tal como, mas não limitado a, alquila substituída ou não substituída, alquenila substituída ou não substituída, alquinila substituída ou não substituída, arilalquila, arilalquenila, arilalquinila, heteroarilalquila, heteroarilalquenila, heteroarilalquinila, heterociclilalquila, heterociclilalquenila, heterociclilalquinila, arila, heteroarila, heterociclila, cicloalquila, cicloalquenila, alquilarilalquila, alquilarilalquenila, alquilarilalquinila, alquenilarilalquila, alquenilarilalquenila, alquenilarilalquinila, alquinilarilalquila, alquinilarilalquenila, alquinilarilalquinila, alquil-heteroarilalquila, alquil-heteroarilalquenila, alquil-heteroarilalquinila, alquenil-heteroarilalquila, alquenil-heteroarilalquenila, alquenil-heteroarilalquinila, alquinil-heteroarilalquila, alquinil-heteroarilalquenila, alquinil-heteroarilalquinila, alquil-heterociclilalquila, alquil-heterociclilalquenila, alquil-heterociclilalquinila, alquenil-heterociclilalquila, alquenil-heterociclilalquenila, alquenil-heterociclilalquinila, alquinil-heterociclilalquila, alquinil-heterociclilalquenila, alquinil-heterociclilalquinila, alquilarila, alquenilarila, alquinilarila, alquil-heteroarila, alquenil-heteroarila, alquinil-heteroarila, que um ou mais metilenos podem ser interrompidos ou terminados por O, S, S(O) , SO_2 ,

$N(R^8)$, $C(O)$, arila substituída ou não substituída, heteroarila substituída ou não substituída, heterociclila substituída ou não substituída; em que R^8 é hidrogênio, acila, alifático ou alifático substituído. Em uma modalidade, o ligador é entre 1 a 24 átomos, de preferência 4 a 24 átomos, de preferência 6 a 18 átomos, mais de preferência 8 a 18 átomos e com máxima preferência 8 a 16 átomos.

[000150] Um grupo de ligação clivável é um que é suficientemente estável fora da célula, mas que mediante a entrada em uma célula alvo é clivado para liberar as duas partes que o ligador está retendo. Em uma modalidade preferencial, o grupo de ligação clivável é clivado pelo menos 10 vezes ou mais, de preferência pelo menos 100 vezes mais rápido na célula alvo ou sob uma primeira condição de referência (que pode, por exemplo, ser selecionada para imitar ou representar condições intracelulares) que no sangue de um indivíduo ou sob uma segunda condição de referência (que pode, por exemplo, ser selecionada para imitar ou representar condições encontradas no sangue ou soro).

[000151] Os grupos de ligação cliváveis são suscetíveis a agentes de clivagem, por exemplo, pH, potencial redox ou presença de moléculas degradantes. Em geral, os agentes de clivagem são mais prevalentes ou encontrados em níveis ou atividades superiores dentro das células que no soro ou sangue. Os exemplos de tais agentes degradantes incluem: agentes redox que são selecionados para substratos particulares ou que não possuem especificidade do substrato, incluindo, por exemplo, enzimas oxidativas ou redutoras ou agentes redutores tais como mercaptanos, presentes em células, que podem degradar um grupo de ligação redox clivável por redução; esterases; endossomas ou agentes que podem criar um ambiente ácido, por exemplo, aqueles que resultam em um pH de cinco ou menos; enzimas que podem hidrolisar ou degradar um grupo de ligação clivável ácido através da atuação como um ácido geral, peptidases (que podem ser específicas

de substrato) e fosfatases.

[000152] Um grupo de ligação clivável, tal como uma ligação de dissulfeto pode ser suscetível ao pH. O pH de soro humano é 7,4, enquanto o pH intracelular médio é levemente menor, na faixa de cerca de 7,1 a 7,3. Os endossomas têm um pH mais ácido, na faixa de 5,5 a 6,0 e os lisossomas têm um pH ainda mais ácido em torno de 5,0. Alguns ligadores terão um grupo de ligação clivável que é clivado em um pH preferido, liberando assim o lipídeo catiônico do ligante dentro da célula ou no compartimento da célula desejado.

[000153] Um ligador pode incluir um grupo de ligação clivável que é clivável por uma enzima particular. O tipo de grupo de ligação clivável incorporado em um ligador pode depender da célula a ser direcionada. Por exemplo, os ligantes de alveamento de fígado podem ser ligados aos lipídeos catiônicos através de um ligador que inclui um grupo éster. As células de fígado são ricas em esterases, e, portanto, o ligador será clivado mais eficientemente em células do fígado que em tipos de célula que não são ricos em esterase. Outros tipos de célula ricos em esterases incluem células do pulmão, córtex renal e testículo.

[000154] Os ligadores que contêm as ligações de peptídeo podem ser usados mediante o alveamento de tipos de célula ricos em peptidases, tais como células do fígado e sinoviócitos.

[000155] Em geral, a adequabilidade de um grupo de ligação clivável candidato pode ser avaliada através do teste da capacidade de um agente degradante (ou condição) clivar o grupo de ligação candidato. Também será desejável testar também o grupo de ligação clivável candidato em relação à capacidade de resistir à clivagem no sangue ou quando em contato com outro tecido não alvo. Dessa forma, é possível determinar a suscetibilidade relativa para clivagem entre uma primeira e uma segunda condição, em que a primeira é selecionada para ser indicativa de clivagem em uma célula alvo e a segunda é se-

leccionada para ser indicativa de clivagem em outros tecidos ou fluidos biológicos, por exemplo, sangue ou soro. As avaliações podem ser executadas em sistemas livres de célula, em células, em cultura celular, em órgão ou cultura de tecido, ou em animais integrais. Isso pode ser útil para realizar avaliações iniciais em condições de cultura ou livres de célula e para confirmar por avaliações adicionais em animais integrais. Em modalidades preferenciais, os compostos candidatos úteis são clivados pelo menos 2, 4, 10 ou 100 vezes mais rápido na célula (ou sob condições *in vitro* selecionadas para imitar condições intracelulares) em comparação com sangue ou soro (ou sob condições *in vitro* selecionadas para imitar condições extracelulares).

Grupos de ligação Cliváveis Redox

[000156] Uma classe de grupos de ligação cliváveis são grupos de ligação cliváveis redox que são clivados mediante a redução ou a oxidação. Um exemplo de grupo de ligação redutivamente clivável é um grupo de ligação de dissulfeto (-S-S-). Para determinar se um grupo de ligação clivável candidato é um "grupo de ligação redutivamente clivável" adequado, ou, por exemplo, é adequado para uso com uma porção química de iRNA particular e agente de alvejamento, pode-se observar os métodos aqui descritos. Por exemplo, um candidato pode ser avaliado por incubação com ditioneitol (DTT) ou outro agente de redução que usa os reagentes conhecidos na técnica, que imitam a taxa de clivagem que seria observada em uma célula, por exemplo, uma célula alvo. Os candidatos também podem ser avaliados sob condições que são selecionadas para imitar as condições de sangue ou soro. Em uma modalidade preferencial, os compostos candidatos são clivados por no máximo 10% no sangue. Em modalidades preferenciais, os compostos candidatos úteis são degradados pelo menos 2, 4, 10 ou 100 vezes mais rápido na célula (ou sob condições *in vitro* selecionadas para imitar as condições intracelulares) em comparação ao san-

que (ou sob condições *in vitro* selecionadas para imitar as condições extracelulares). A taxa de clivagem de compostos candidatos pode ser determinada com o uso de ensaios cinéticos de enzima padrão sob condições escolhidas para imitar os meios intracelulares e comparada com as condições escolhidas para imitar os meios extracelulares.

Grupos de Ligação Cliváveis à Base de Fosfato

[000157] Os grupos de ligação cliváveis à base de fosfato são clivados por agentes que degradam ou hidrolisam o grupo de fosfato. Um exemplo de um agente que cliva os grupos de fosfato em células são enzimas tais como fosfatases em células. Os exemplos de grupos de ligação à base de fosfato são -O-P(O)(ORk)-O-, -O-P(S)(ORk)-O-, -O-P(S)(SRk)-O-, -S-P(O)(ORk)-O-, -O-P(O)(ORk)-S-, -S-P(O)(ORk)-S-, -O-P(S)(ORk)-S-, -S-P(S)(ORk)-O-, -O-P(O)(Rk)-O-, -O-P(S)(Rk)-O-, -S-P(O)(Rk)-O-, -S-P(S)(Rk)-O-, -S-P(O)(Rk)-S-, -O-P(S)(Rk)-S-. As modalidades preferidas são -O-P(O)(OH)-O-, -O-P(S)(OH)-O-, -O-P(S)(SH)-O-, -S-P(O)(OH)-O-, -O-P(O)(OH)-S-, -S-P(O)(OH)-S-, -O-P(S)(OH)-S-, -S-P(S)(OH)-O-, -O-P(O)(H)-O-, -O-P(S)(H)-O-, -S-P(O)(H)-O-, -S-P(S)(H)-O-, -S-P(O)(H)-S-, -O-P(S)(H)-S-. Uma modalidade preferencial é -O-P(O)(OH)-O-. Esses candidatos podem ser avaliados com o uso de métodos análogos aos descritos acima.

Grupos de Ligação Cliváveis Ácidos

[000158] Os grupos de ligação cliváveis são grupos de ligação que são clivados sob condições ácidas. Em modalidades preferenciais, os grupos de ligação cliváveis ácidos são clivados em um ambiente ácido com um pH de cerca de 6,5 ou menos (por exemplo, cerca de 6,0, 5,5, 5,0 ou menos), ou por agentes tais como enzimas que podem atuar como um ácido geral. Em uma célula, as organelas com pH baixo específico, tais como endossomas e lisossomas podem fornecer um ambiente de clivagem para grupos de ligação cliváveis ácidos. Os exemplos de grupos de ligação cliváveis ácidos incluem, mas não se limitam a, hidrazonas, éste-

res e ésteres de aminoácidos. Os grupos cliváveis ácidos podem ter a fórmula geral $-C(=O)O-$, $C(O)O$, ou $-OC(O)-$. Uma modalidade preferencial é quando o carbono fixado ao oxigênio do éster (o grupo alcóxi) é um grupo arila, grupo alquila substituído ou grupo alquila terciário tal como dimetil pentila ou t-butila. Esses candidatos podem ser avaliados com o uso de métodos análogos aos descritos acima.

Grupos de ligação à Base de Éster

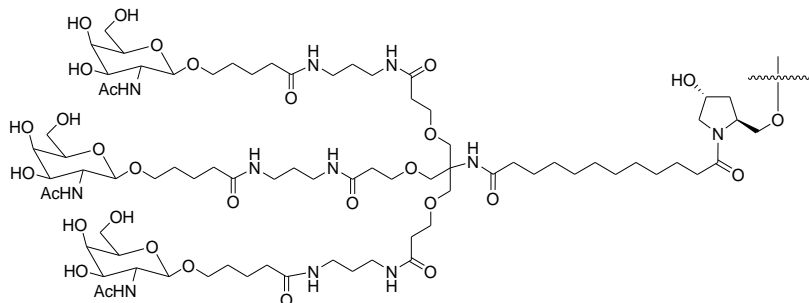
[000159] Os grupos de ligação cliváveis à base de éster são clivados por enzimas tais como esterases e amidases em células. Os exemplos de grupos de ligação cliváveis à base de éster incluem, mas não se limitam a, grupos de ésteres de alquilenos, alquenileno e alquinileno. Os grupos de ligação cliváveis de éster têm a fórmula geral $-C(O)O-$, ou $-OC(O)-$. Esses candidatos podem ser avaliados com o uso de métodos análogos aos descritos acima.

Grupos de Clivagem à Base de Peptídeo

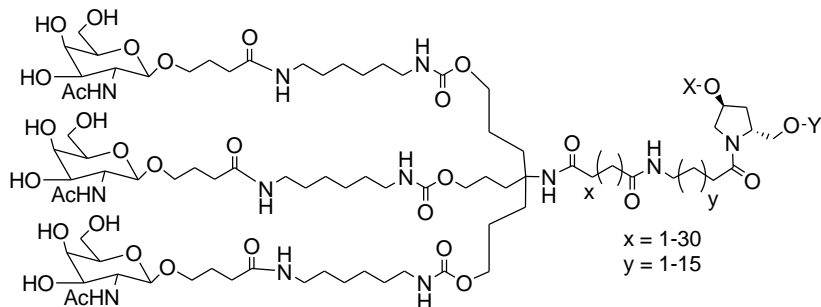
[000160] Os grupos de ligação cliváveis à base de peptídeo são clivados por enzimas tais como peptidases e proteases em células. Os grupos de ligação cliváveis à base de peptídeo são ligações de peptídeo formadas entre os aminoácidos para produzir oligopeptídeos (por exemplo, dipeptídeos, tripeptídeos, etc.) e polipeptídeos. Os grupos cliváveis à base de peptídeo não incluem o grupo amida ($-C(O)NH-$). O grupo amida pode ser formado entre qualquer alquilenos, alquenileno ou alquineleno. Uma ligação de peptídeo é um tipo especial de ligação de amida formado entre os aminoácidos para produzir peptídeos e proteínas. O grupo de clivagem à base de peptídeo é em geral limitado à ligação de peptídeo (isto é, a ligação de amida) formada entre os aminoácidos que produzem peptídeos e proteínas e não inclui todo o grupo funcional de amida. Os grupos de ligação cliváveis à base de peptídeo têm a fórmula geral $-NHCH(R^A)C(O)NHCH(R^B)C(O)-$, em que R^A e R^B são os grupos R dos dois aminoácidos adjacentes. Esses candida-

tos podem ser avaliados com o uso dos métodos análogos aos descritos acima.

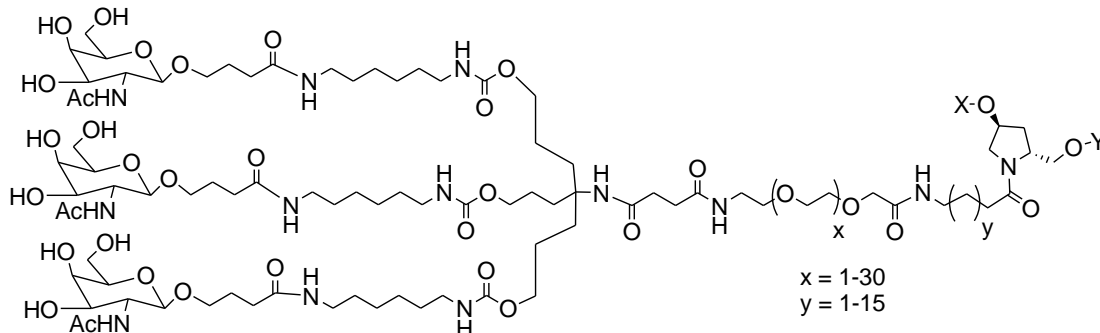
[000161] Os conjugados de carboidrato representativos com ligadores incluem, mas não se limitam a,



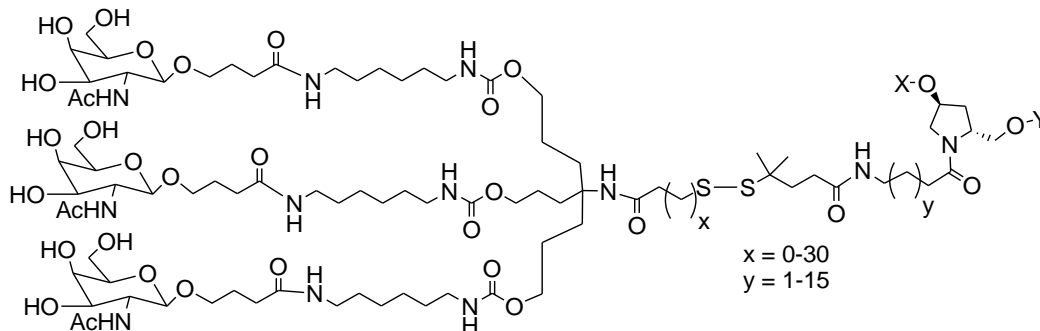
(Fórmula XXIV),



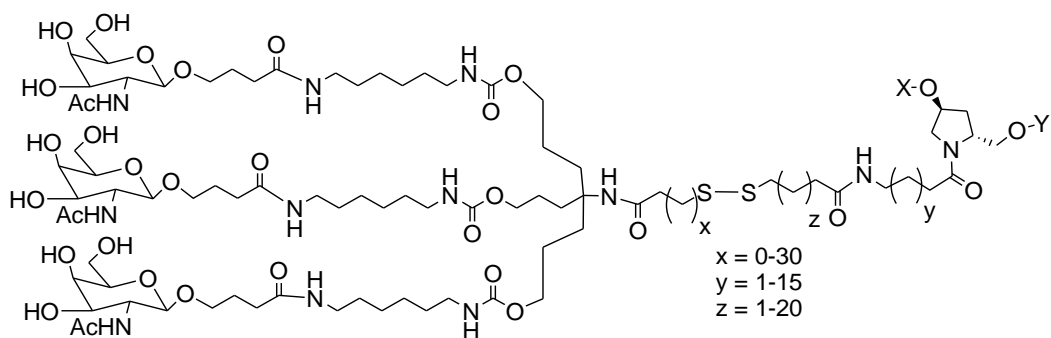
(Fórmula XXV),



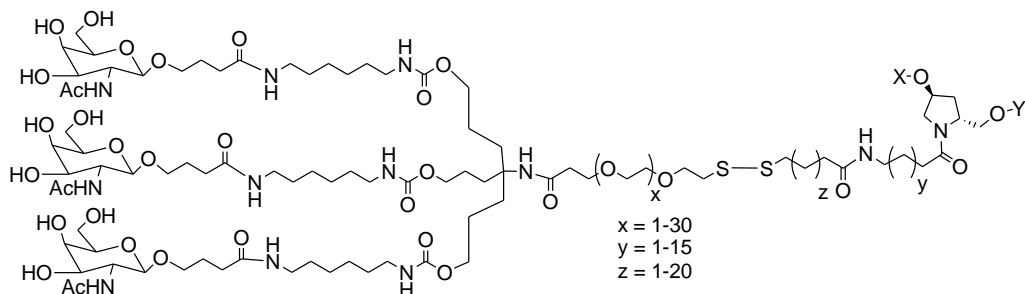
(Fórmula XXVI),



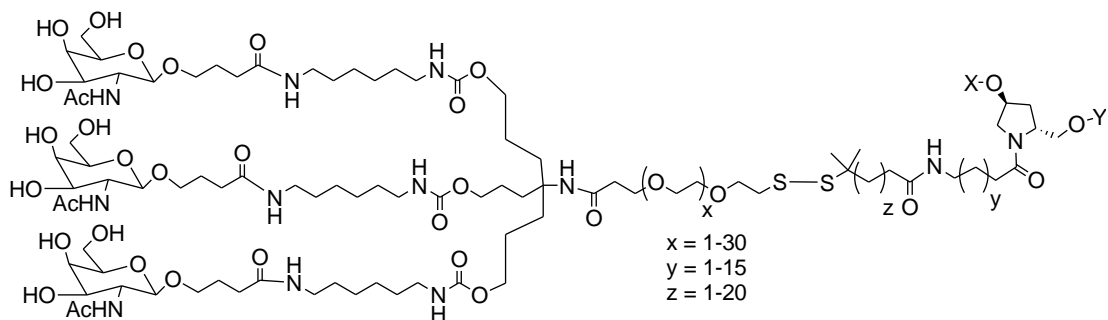
(Fórmula XXVII),



(Fórmula XXVIII),



(Fórmula XXIX), e



(Fórmula XXX),

quando um de X ou Y é um oligonucleotídeo, o outro é um hidrogênio.

[000162] As patentes U.S. representativas que ensinam a preparação de conjugados de RNA incluem, mas não se limitam a, Patentes N^{os} U.S. 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 e 5.688.941; 6.294.664; 6.320.017; 6.576.752; 6.783.931; 6.900.297; 7.037.646; cada uma aqui incorporada a título de referência.

[000163] Não é necessário que todas as posições em um determinado composto sejam uniformemente modificadas e, de fato, mais de uma das modificações supracitadas pode ser incorporada em um único composto ou até mesmo em um único nucleosídeo dentro de um iRNA. A presente invenção também inclui compostos de iRNA que são compostos quiméricos. Os compostos de iRNA "quiméricos" ou "quimeras", no contexto desta invenção, são compostos de iRNA, de preferência dsRNAs, que contêm duas ou mais regiões quimicamente distintas, em que cada uma constitui de pelo menos uma unidade de monômero, isto é, um nucleotídeo no caso de um composto de dsRNA. Esses iRNAs contêm tipicamente pelo menos uma região em que o RNA é modificado com a finalidade de conferir mediante o iRNA resistência aumentada à degradação de nuclease, admissão celular aumentada e/ou afinidade de ligação aumentada para o ácido nucleico alvo. Uma região adicional do iRNA pode servir como um substrato para enzimas capazes de clivar híbridos de RNA:DNA ou RNA:RNA. Por meio de exemplo, RNase H é uma endonuclease celular que cliva a fita de RNA de um duplex RNA:DNA. A ativação de RNase H, portanto, resulta na clivagem do alvo de RNA, intensificando consideravelmente assim a eficiência de inibição de expressão de gene de iRNA. Consequentemente, os resultados comparáveis podem frequentemente ser obtidos com iRNAs mais curtos quando os dsRNAs quiméricos são usados, em comparação a dsRNAs de fosforotioato desoxi que hibridizam para a mesma região alvo. A clivagem do alvo de RNA pode ser rotineiramente detectada por eletroforese de gel e, se

necessário, técnicas de hibridização de ácido nucleico associadas conhecidas na técnica.

[000164] Em certos casos, o RNA de um iRNA pode ser modificado por um grupo sem ligante. Inúmeras moléculas sem ligante foram conjugadas para iRNAs a fim de intensificar a atividade, a distribuição celular ou a admissão celular do iRNA e os procedimentos para executar tais conjugações estão disponíveis na literatura científica. Tais porções sem ligante incluíram porções lipídicas, tal como colesterol (Kubo, T. *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 2007, 365(1):54 a 61; Letsinger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, 86:6553), ácido cólico (Manoharan *et al.*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1994, 4:1053), um tioéter, por exemplo, hexil-S-tritiltiol (Manoharan *et al.*, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1992, 660:306; Manoharan *et al.*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1993, 3:2765), um tiocolesterol (Oberhauser *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 1992, 20:533), um cadeia alifática, por exemplo, resíduos de dodecandiol ou undecila (Saison-Behmoaras *et al.*, *EMBO J.*, 1991, 10:111; Kabanov *et al.*, *FEBS Lett.*, 1990, 259:327; Svinarchuk *et al.*, *Biochimie*, 1993, 75:49), um fosfolípideo, por exemplo, di-hexadecil-rac-glicerol ou trietilamônio 1,2-di-O-hexadecil-rac-glicero-3-H-fosfonato (Manoharan *et al.*, *Tetrahedron Lett.*, 1995, 36:3651; Shea *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 1990, 18:3777), uma cadeia de glicol de poliamina ou polietileno (Manoharan *et al.*, *Nucleosides & Nucleotides*, 1995, 14:969), ou ácido acético de adamantano (Manoharan *et al.*, *Tetrahedron Lett.*, 1995, 36:3651), uma porção de palmitila (Mishra *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta*, 1995, 1264:229), ou uma porção de octadecilamina ou hexilamino-carbonil-oxicolesterol (Crooke *et al.*, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1996, 277:923). As patentes dos Estados Unidos representativas que ensinam a preparação de tais conjugados de RNA foram mencionadas acima. Os protocolos de conjugação típicos envolvem a síntese de um RNA que porta um ligador de amino em uma ou mais posições da sequência. O

grupo amino é, então, reagido com a molécula que está sendo conjugada com o uso de reagentes de acoplamento ou ativação apropriados. A reação de conjugação pode ser executada com o RNA ainda ligado ao suporte sólido ou após a clivagem do RNA, em fase de solução. A purificação do conjugado de RNA por HPLC tipicamente torna o conjugado puro.

Aplicação de iRNA

[000165] A aplicação de um iRNA em um indivíduo em necessidade do mesmo pode ser alcançada por inúmeras maneiras diferentes. A aplicação *in vivo* pode ser executada diretamente através da administração de uma composição que compreende um iRNA, por exemplo, um dsRNA, em um indivíduo. Alternativamente, a aplicação pode ser executada indiretamente através da administração de um ou mais vetores que codificam e direcionam a expressão do iRNA.

Aplicação Direta de uma Composição de iRNA

[000166] Em geral, qualquer método de aplicação de uma molécula de ácido nucleico pode ser adaptado para uso com um iRNA (consulte, por exemplo, Akhtar S. e Julian RL. (1992) Trends Cell. Biol. 2(5):139 a 144 e WO94/02595, que são incorporadas no presente documento a título de referência em suas totalidades). No entanto, existem três fatores que são importantes para considerar a fim de aplicar com sucesso uma molécula de iRNA *in vivo*: (a) estabilidade biológica da molécula aplicada, (2) prevenção de efeitos não específicos e (3) acúmulo da molécula aplicada no tecido alvo. Os efeitos não específicos de um iRNA podem ser minimizados por administração local, por exemplo, por injeção direta ou implantação em um tecido (como um exemplo não limitador, um tumor) ou administração tópica da preparação. A administração local a um sítio de tratamento maximiza a concentração local do agente, limita a exposição do agente aos tecidos sistêmicos que pode, de outro modo, ser prejudicada pelo agente ou que pode

degradar o agente, e permite que uma dose total menor da molécula de iRNA seja administrada. Os vários estudos demonstraram redução de expressão bem sucedida de produtos gênicos quando um iRNA é administrado localmente. Por exemplo, a aplicação intraocular de um dsRNA VEGF por injeção intravítrea em macacos cinomolgos (Tolentino, MJ., *et al* (2004) *Retina* 24:132 a 138) e as injeções subretinais em camundongos (Reich, SJ., *et al* (2003) *Mol. Vis.* 9:210 a 216) mostraram o impedimento de neovascularização em um modelo experimental de degeneração macular relacionada à idade. Além disso, a injeção intratumoral direta de um dsRNA em camundongos reduz o volume tumoral (Pille, J., *et al* (2005) *Mol. Ther.* 11:267 a 274) e pode prolongar a sobrevivência de camundongos que portam tumor (Kim, WJ., *et al* (2006) *Mol. Ther.* 14:343 a 350; Li, S., *et al* (2007) *Mol. Ther.* 15:515-523). A interferência de RNA também demonstrou sucesso com a aplicação local ao CNS por injeção direta (Dorn, G., *et al.* (2004) *Nucleic Acids* 32:e49; Tan, PH., *et al* (2005) *Gene Ther.* 12:59 a 66; Makimura, H., *et al* (2002) *BMC Neurosci.* 3:18; Shishkina, GT., *et al* (2004) *Neuroscience* 129:521 a 528; Thakker, ER., *et al* (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101:17270 a 17275; Akaneya, Y., *et al* (2005) *J. Neurophysiol.* 93:594 a 602) e aos pulmões por administração intranasal (Howard, KA., *et al* (2006) *Mol. Ther.* 14:476 a 484; Zhang, X., *et al* (2004) *J. Biol. Chem.* 279:10677 a 10684; Bitko, V., *et al* (2005) *Nat. Med.* 11:50 a 55). Para administrar um iRNA sistemicamente para o tratamento de uma doença, o RNA pode ser modificado ou alternativamente aplicado com o uso de um sistema de aplicação de fármaco; ambos os métodos atuam na prevenção da degradação rápida do dsRNA por endo e exonucleases *in vivo*. A modificação do RNA ou do veículo farmacêutico também pode permitir o alvejamento da composição de iRNA para o tecido alvo e evitar efeitos fora de alvo indesejáveis. As moléculas de iRNA podem ser modificadas através da conju-

gação química para grupos lipofílicos tal como colesterol para intensificar a admissão celular e impedir a degradação. Por exemplo, um iRNA direcionado contra ApoB conjugado para uma porção de colesterol lipofílica foi injetado sistemicamente nos camundongos e resultou na redução de expressão de mRNA de apoB tanto no fígado quanto no jejuno (Soutschek, J., *et al* (2004) *Nature* 432:173 a 178). A conjugação de um iRNA para um aptâmero demonstrou a crescimento de inibição de tumor e media a regressão tumoral em um modelo de camundongo de câncer de próstata (McNamara, JO., *et al* (2006) *Nat. Biotechnol.* 24:1005 a 1015). Em uma modalidade alternativa, o iRNA pode ser aplicado com o uso dos sistemas de aplicação de fármaco tal como uma nanopartícula, um dendrímero, um polímero, um lipossoma ou um sistema de aplicação catiônica. Os sistemas de aplicação catiônica positivamente carregados facilitam a ligação de uma molécula de iRNA (negativamente carregada) e também intensificam as interações na membrana celular negativamente carregada para permitir a admissão eficiente de um iRNA pela célula. Os lipídeos, dendrímeros ou polímeros catiônicos podem ser ligados a um iRNA ou induzidos para formar uma vesícula ou micela (consulte, por exemplo, Kim SH., *et al* (2008) *Journal of Controlled Release* 129(2):107 a 116) que envolve um iRNA. A formação de vesículas ou micelas impede ainda a degradação do iRNA quando administrado sistemicamente. Os métodos para produção e administração de complexos catiônicos-iRNA são bem conhecidos pelos versados na técnica (consulte, por exemplo, Sorensen, DR., *et al* (2003) *J. Mol. Biol* 327:761 a 766; Verma, UN., *et al* (2003) *Clin. Cancer Res.* 9:1291 a 1300; Arnold, AS *et al* (2007) *J. Hypertens.* 25:197 a 205, que são incorporados no presente documento a título de referência em sua totalidade). Alguns exemplos não limitantes de sistemas de aplicação de fármaco úteis para a aplicação sistêmica de iRNAs incluem DOTAP (Sorensen, DR., *et al* (2003), *supra*; Verma,

UN., *et al* (2003), *supra*), Oligofectamina, "partículas sólidas de lipídeo de ácido nucleico" (Zimmermann, TS., *et al* (2006) *Nature* 441:111 a 114), cardiolipina (Chien, PY., *et al* (2005) *Cancer Gene Ther.* 12:321 a 328; Pal, A., *et al* (2005) *Int J. Oncol.* 26:1087 a 1091), polietilenoimina (Bonnet ME., *et al* (2008) *Pharm. Res.* Aug 16 Epub ahead of print; Aigner, A. (2006) *J. Biomed. Biotechnol.* 71659), Arg-Gli-Asp (RGD) peptídeos (Liu, S. (2006) *Mol. Pharm.* 3:472 a 487), e poliamidoaminas (Tomalia, DA., *et al* (2007) *Biochem. Soc. Trans.* 35:61 a 67; Yoo, H., *et al* (1999) *Pharm. Res.* 16:1799 a 1804). Em algumas modalidades, um iRNA forma um complexo com ciclodextrina para administração sistêmica. Os métodos para uma administração e composições farmacêuticas de iRNAs e ciclodextrinas podem ser encontrados na patente nº US7.427.605, que é na presente invenção incorporada a título de referência em sua totalidade.

iRNAs Codificados por Vetor

[000167] Em outro aspecto, o iRNA que direciona o gene TMPRSS6 pode ser expressado a partir das unidades de transcritos inseridas nos vetores de DNA ou RNA (consulte, por exemplo, Couture, A, *et al.*, *TIG.* (1996), 12:5 a 10; Skillern, A., *et al.*, publicação internacional PCT nº WO 00/22113, Conrad, publicação PCT nº WO 00/22114 e Conrad, patente nº US6.054.299). A expressão pode ser transiente (na ordem de horas a semanas) ou sustentada (semanas a meses ou mais), dependendo do construto específico usado e do tipo de tecido alvo ou célula. Esses transgenes podem ser introduzidos como um construto linear, um plasmídeo circular ou um vetor viral, que pode ser um vetor integrante ou não integrante. O transgene também pode ser construído para permitir que seja herdado como um plasmídeo extracromossômico (Gassmann, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1995) 92:1292).

[000168] A fita individual ou fitas de um iRNA pode ser transcrita a partir de um promotor em um vetor de expressão. Em que duas fitas

separadas devem ser expressas para gerar, por exemplo, um dsRNA, dois vetores de expressão separados podem ser cointroduzidos (por exemplo, por transfecção ou infecção) em uma célula alvo. Alternativamente, cada fita individual de um dsRNA pode ser transcrita por promotores que são localizados no mesmo plasmídeo de expressão. Em uma modalidade, as fitas de um dsRNA são expressados como polinucleotídeos de repetição invertidos unidos por uma sequência de polinucleotídeo de ligador de tal modo que o dsRNA tenham uma estrutura de laço e tronco.

[000169] Os vetores de expressão de iRNA são em geral, plasmídeos de DNA ou vetores virais. Os vetores de expressão compatíveis com as células eucariotas, de preferência, aqueles compatíveis com as células vertebradas, podem ser usados para produzir construtos recombinantes para a expressão de um iRNA conforme aqui descrito. Os vetores de expressão de célula eucariota são bem conhecidos na técnica e estão disponíveis a partir de inúmeras fontes comerciais. Tipicamente, tais vetores são fornecidos contendo sítios de restrição convenientes para inserção do segmento de ácido nucleico desejado. A aplicação de vetores que expressam iRNA pode ser sistêmica, tal como, por administração intravenosa ou intramuscular, através da administração a células alvos explantadas do paciente seguida pela reintrodução no paciente ou por qualquer outro meio que permita a introdução em uma célula alvo desejada.

[000170] Os plasmídeos de expressão de iRNA podem ser transfectados em células alvos como um complexo com veículos catiônicos de lipídeo (por exemplo, Oligofectamina) ou veículos de base catiônica sem lipídeo (por exemplo, Transit-TKO™). Múltiplas transfecções de lipídeo para reduções de expressão mediadas por iRNA que alvejam diferentes regiões de um RNA alvo por um período de uma semana ou mais são também contempladas pela invenção. A introdução bem su-

cedida de vetores nas células hospedeiras pode ser monitorada com o uso de vários métodos conhecidos. Por exemplo, a transfecção transitente pode ser sinalizada com um repórter, tal como um marcador fluorescente, tal como Proteína Fluorescente Verde (GFP). A transfecção estável de células *ex vivo* pode ser assegurada com o uso de marcadores que fornecem à célula transfectada resistência a fatores ambientais específicos (por exemplo, antibióticos e fármacos), tal como resistência à higromicina B.

[000171] Os sistemas de vetor viral que podem ser utilizados com os métodos e as composições aqui descritas incluem, mas não se limitam a, (a) vetores de adenovírus; (b) vetores de retrovírus, que inclui, mas não se limita a vetores lentivirais, vírus de leucemia de murino Monoclonal, *etc.*; (c) vetores de vírus adenoassociados; (d) vetores de vírus de herpes simplex; (e) vetores SV40; (f) vetores de vírus poliomax; (g) vetores de vírus papiloma; (h) vetores picornavírus; (i) vetores de vírus de sífilis tal como um ortopox, por exemplo, vetores de vírus de varíola ou avipox, por exemplo, pox de canário ou pox de aves; e (j) um adenovírus dependente de ajudante ou não encorajado. Os vírus com defeito de replicação também podem ser vantajosos. Diferentes vetores se tornarão ou não incorporados no genoma celular. Os construtos podem incluir sequências virais para transfecção, se desejado. Alternativamente, o construto pode ser incorporado nos vetores com capacidade de replicação epissômica, por exemplo, vetores EPV e EBV. Os construtos para a expressão recombinante de um iRNA, em geral, requererão elementos regulatórios, por exemplo, promotores, intensificadores, *etc.*, para assegurar a expressão do iRNA em células alvos. Outros aspectos para considerar vetores e construtos são adicionalmente descritos abaixo.

[000172] Os vetores úteis para a aplicação de um iRNA irão incluir elementos regulatórios (promotor, intensificador, *etc.*) suficientes para

a expressão do iRNA na célula ou tecido alvo desejado. Os elementos regulatórios podem ser escolhidos para fornecer expressão constitutiva ou regulada/induzível.

[000173] A expressão do iRNA pode ser precisamente regulada, por exemplo, através do uso de uma sequência regulatória induzível que é sensível a certos reguladores fisiológicos, por exemplo, circulação de níveis de glicose ou hormônios (Docherty *et al.*, 1994, FASEB J. 8:20 a 24). Tais sistemas de expressão induzível, adequados para o controle de expressão de dsRNA em células ou em mamíferos, incluem, por exemplo, regulação por ecdisona, por estrogênio, progesterona, tetraciclina, indutores químicos de dimerização e isopropil- β -D1 - tiogalactopiranosídeo (IPTG). Um elemento versado na técnica seria capaz de escolher a sequência regulatória/promotora adequada com base no uso pretendido do transgene de iRNA.

[000174] Em uma modalidade específica, os vetores virais que contêm sequências de ácido nucleico que codificam um iRNA podem ser usados. Por exemplo, um vetor retroviral pode ser usado (consulte Miller *et al.*, Meth. Enzymol. 217:581 a 599 (1993)). Esses vetores retrovirais contêm os componentes necessários para o empacotamento correto do genoma viral e integração no DNA da célula hospedeira. As sequências de ácido nucleico que codificam um iRNA são clonadas em um ou mais vetores, o que facilita aplicação do ácido nucleico em um paciente. Mais detalhes sobre os vetores retrovirais podem ser encontrados, por exemplo, em Boesen *et al.*, Biotherapy 6:291 a 302 (1994), que descreve o uso de um vetor retroviral para aplicar o gene *mdr1* a células-tronco hematopoiéticas a fim de tornar as células-tronco mais resistentes à quimioterapia. Outras referências que ilustram o uso de vetores retrovirais em terapia de gene são: Clowes *et al.*, J. Clin. Invest. 93:644 a 651 (1994); Kiem *et al.*, Blood 83:1467 a 1473 (1994); Salmons e Gunzberg, Human Gene Therapy 4:129 a 141

(1993); e Grossman e Wilson, Curr. Opin. in Genetics and Devel. 3:110 a 114 (1993). Os vetores lentivirais contemplados para uso incluem, por exemplo, os vetores à base de HIV descritos nas patentes nºs US6.143.520; US5.665.557; e US5.981.276, que são incorporados na presente invenção a título de referência.

[000175] Os adenovírus são também contemplados para uso na aplicação de iRNAs. Os adenovírus são veículos especialmente atraentes, por exemplo, para aplicação de genes a epitélio respiratório. Os adenovírus infectam naturalmente o epitélio respiratório pois ocasionam uma doença moderada. Outros alvos para sistemas de aplicação à base de adenovírus são fígado, sistema nervoso central, células endoteliais e músculo. Os adenovírus têm a vantagem de terem a capacidade de infectar células sem divisão. Kozarsky e Wilson, Current Opinion in Genetics and Development 3:499 a 503 (1993) apresentam uma análise de terapia de gene à base de adenovírus. Bout *et al.*, Human Gene Therapy 5:3 a 10 (1994) demonstraram o uso de vetores de adenovírus para transferir genes para o epitélio respiratório de macacos resos. Outros casos do uso de adenovírus em terapia de gene podem ser encontrados em Rosenfeld *et al.*, Science 252:431 a 434 (1991); Rosenfeld *et al.*, Cell 68:143 a 155 (1992); Mastrangeli *et al.*, J. Clin. Invest. 91:225 a 234 (1993); publicação PCT WO94/12649; e Wang, *et al.*, Gene Therapy 2:775 a 783 (1995). Um vetor AV adequado para expressar um iRNA apresentado na invenção, um método para construir o vetor AV recombinante e um método para aplicação do vetor em células alvos, são descritos em Xia H *et al.* (2002), *Nat. Biotech.* 20: 1006 a 1010.

[000176] O uso de vetores de vírus adenoassociados (AAV) é também contemplado (Walsh *et al.*, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 204:289 a 300 (1993); patente nº US5.436.146). Em uma modalidade, o iRNA pode ser expressado como duas moléculas de RNA de fita única com-

plementares separadas a partir de um vetor AAV recombinante que tem, por exemplo, os promotores de RNA U6 ou H1, ou o promotor de citomegalovírus (CMV). Os vetores AAV adequados para expressar o dsRNA apresentado na invenção, os métodos para construir o vetor AV recombinante e os métodos para aplicação dos vetores em células alvos são descritos em Samulski R *et al.* (1987), J. Virol. 61: 3096 a 3101; Fisher K J *et al.* (1996), J. Virol, 70: 520 a 532; Samulski R *et al.* (1989), J. Virol. 63: 3822 a 3826; patente nº US5.252.479; patente nº US5.139.941; pedido de patente internacional nº WO 94/13788; e pedido de patente internacional nº WO 93/24641, cujas revelações são incorporadas na presente invenção a título de referência.

[000177] Um outro vetor viral preferido é um vírus de sifilis tal como um vírus de varíola, por exemplo, uma varíola atenuada tal como Vírus Modificado Ankara (MVA) ou NYVAC, um avipox tal como pox de ave ou pox de canário.

[000178] O tropismo de vetores virais pode ser modificado através da pseudotipagem dos vetores com proteínas de envelope ou outros antígenos de superfície de outros vírus ou através da substituição de diferentes proteínas de capsídeo viral, conforme apropriado. Por exemplo, os vetores lentivirais podem ser pseudotipados com proteínas de superfície de vírus da estomatite vesicular (VSV), raiva, Ebola, Mokola e similares. Os vetores AAV podem ser produzidos para alvejar diferentes células através da manipulação dos vetores para expressar diferentes serótipos de proteína de capsídeo; consulte, por exemplo, Rabinowitz J E *et al.* (2002), J Virol 76:791 a 801, cuja revelação é incorporada na presente invenção a título de referência.

[000179] A preparação farmacêutica de um vetor pode incluir o vetor em um diluente aceitável ou pode incluir uma matriz de liberação lenta em que o veículo de aplicação de gene é embebido. Alternativamente, onde o vetor de aplicação de gene completo pode ser tornado intacto a

partir de células recombinantes, por exemplo, vetores retrovirais, a preparação farmacêutica pode incluir uma ou mais células que produzem o sistema de aplicação de gene.

III. Composições Farmacêuticas Contendo iRNA

[000180] Em uma modalidade, são fornecidas na presente invenção composições farmacêuticas contendo um iRNA e um veículo farmacêuticamente aceitável. A composição farmacêutica que contém o iRNA é útil para o tratamento de uma doença ou distúrbio associado à expressão ou atividade de um gene TMPRSS6, tais como processos patológicos mediados por expressão de TMPRSS6. Tais composições farmacêuticas são formuladas com base no modo de aplicação. Um exemplo é as composições que são formuladas para administração sistêmica através de aplicação parenteral, por exemplo, por aplicação intravenosa (IV).

[000181] As composições farmacêuticas aqui apresentadas são administradas em dosagens suficientes para uma inibição da expressão de gene TMPRSS6s. Em geral, uma dose adequada de iRNA estará na faixa de 0,01 a 200,0 miligramas por quilograma de peso corporal do recipiente por dia, em geral, na faixa de 1 a 50 mg por quilograma de peso corporal por dia. Por exemplo, o dsRNA pode ser administrado a 0,05 mg/kg, 0,5 mg/kg, 1 mg/kg, 1,5 mg/kg, 2 mg/kg, 3 mg/kg, 10 mg/kg, 20 mg/kg, 30 mg/kg, 40 mg/kg ou 50 mg/kg por dose única. A composição farmacêutica pode ser administrada uma vez diariamente ou uma vez por semana ou uma vez por mês ou de dois em dois meses. A composição pode ser alternativamente administrada duas vezes por semana ou duas vezes por mês ou uma vez a cada duas, três ou quatro semanas. Em algumas modalidades, o iRNA é administrado como duas, três ou mais subdoses em intervalos apropriados por todo o dia ou ainda com o uso de infusão ou aplicação contínua através de uma formulação de liberação controlada. Nesse caso, o iRNA contido

em cada subdose precisa ser correspondentemente menor a fim de alcançar a dose diária total. A unidade de dosagem também pode ser composta para a aplicação por vários dias, por exemplo, com o uso de uma formulação de liberação sustentada convencional que fornecer liberação sustentada do iRNA por um período de vários dias. As formulações de liberação sustentada são bem conhecidas na técnica e são particularmente úteis para a aplicação de agentes em um sítio particular, tal como poderia ser usado com os agentes da presente invenção. Nessa modalidade, a unidade de dosagem contém um múltiplo correspondente da dose diária.

[000182] O efeito de uma única dose em níveis de TMPRSS6 pode ser de longa duração, de tal modo que doses subsequentes sejam administradas em não mais que 3, 4 ou 5 dias de intervalo ou não mais que 1, 2, 3 ou 4 semanas de intervalo.

[000183] O versado na técnica irá observar que certos fatores podem influenciar na dosagem e no cronograma requeridos para tratar efetivamente um indivíduo, que inclui, mas não se limita à severidade da doença ou distúrbio, tratamentos anteriores, a saúde geral e/ou idade do indivíduo e outras doenças presentes. Além disso, o tratamento de um indivíduo com uma quantidade terapeuticamente eficaz de uma composição pode incluir um único tratamento ou uma série de tratamentos. As estimativas de dosagens eficazes e meias-vidas *in vivo* para os iRNAs individuais abrangidos pela invenção podem ser feitas com o uso de metodologias convencionais ou com base na testagem *in vivo* com o uso de um modelo animal apropriado, conforme descrito em qualquer parte da presente invenção.

[000184] Os avanços em genética de camundongo geraram inúmeros modelos de camundongo para o estudo de várias doenças humanas, tais como processos patológicos mediados por expressão de TMPRSS6. Tais modelos podem ser usados para testagem *in vivo* de

iRNA, bem como para determinar uma dose terapeuticamente eficaz. Um modelo de camundongo adequado é, por exemplo, um camundongo que contém um transgene que expressa TMPRSS6 humana.

[000185] A presente invenção também inclui composições farmacêuticas e formulações que incluem os compostos de iRNA apresentados na invenção. As composições farmacêuticas da presente invenção podem ser administradas de inúmeras formas dependendo se o tratamento local ou sistêmico for desejado e sobre a área a ser tratada. A administração pode ser tópica (por exemplo, por um emplastro transdérmico), pulmonar, por exemplo, por inalação ou insuflação de pós ou aerossóis, incluindo por nebulizador; intratraqueal, intranasal, epidérmico e transdérmico, oral ou parenteral. A administração parenteral inclui injeção ou infusão intravenosa, intra-arterial, subcutânea, intra-peritoneal ou intramuscular; subdérmica, por exemplo, através de um dispositivo implantado; ou intracraniana, por exemplo, por administração intraparenquimal, intratecal ou intraventricular.

[000186] O iRNA pode ser aplicado de uma maneira a alvejar um tecido particular, tal como o fígado (por exemplo, os hepatócitos do fígado).

[000187] As composições e formulações farmacêuticas para administração tópica podem incluir emplastos transdérmicos, pomadas, loções, cremes, géis, gotas, supositórios, aspersões, líquidos e pós. Os veículos farmacêuticos, bases aquosas, em pó ou oleosas, espessantes e similares convencionais podem ser necessários ou desejáveis. Camisinhas, luvas e similares revestidas também podem ser úteis. As formulações tópicas adequadas incluem aquelas em que os iRNAs apresentados na invenção estão em mistura por adição com um agente de aplicação tópica tais como lipídeos, lipossomas, ácidos graxos, ésteres de ácido graxo, esteroides, agentes quelantes e tensoativos. Os lipídeos e lipossomas adequados incluem neutros (por exemplo,

dioleoilfosfatidil DOPE etanolamina, dimiristoilfosfatidil colina DMPC, distearoilfosfatidil colina), negativo (por exemplo, dimiristoilfosfatidil glicerol DMPG) e catiônico (por exemplo, dioleoiltetrametilaminopropil DOTAP e dioleoilfosfatidil etanolamina DOTMA). Os iRNAs apresentados na invenção podem ser encapsulados dentro de lipossomas ou podem formar complexos a isso, em particular, a lipossomas catiônicos. Alternativamente, os iRNAs podem ser formados em complexo com lipídeos, em particular a lipídeos catiônicos. Os ácidos graxos e ésteres adequados incluem, mas não se limitam a, ácido araquidônico, ácido oleico, ácido eicosanoico, ácido láurico, ácido caprílico, ácido cáprico, ácido mirístico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido linoleico, ácido linolênico, dicaprato, tricaprato, mono-oleína, dilaurina, gliceril 1-monocaprato, 1-dodecilazacido-heptan-2-a, um acilcarnitina, um acilcolina, ou um éster de alquila C₁₋₂₀ (por exemplo, isopropilmiristato IPM), monoglicerídeo, diglicerídeo ou sal farmaceuticamente aceitável dos mesmos. As formulações tópicas são descritas em detalhes na patente nº US6.747.014, que é incorporada na presente invenção a título de referência.

Formulações Lipossômicas

[000188] Existem muitas estruturas de tensoativo organizadas além das microemulsões que foram estudadas e usadas para a formulação de fármacos. Essas incluem monocamadas, micelas, bicamadas e vesículas. As vesículas, tais como lipossomas, têm atraído grande interesse por suas especificidade e duração de ação que oferecem a partir do ponto de vista de aplicação de fármaco. Conforme usado na presente invenção, o termo "lipossoma" significa uma vesícula composta de lipídeos anfifílicos dispostos em uma bicamada ou bicamadas esféricas.

[000189] Os lipossomas são vesículas unilamelares ou multilamelares que têm uma membrana formada a partir de um material lipofílico e

um interior aquoso. A porção aquosa contém a composição a ser aplicada. Os lipossomas catiônicos possuem a vantagem de serem capazes de fundir à parede da célula. Os lipossomas não catiônicos, embora não capazes de fundir tão eficientemente com a parede da célula, são absorvidos por macrófagos *in vivo*.

[000190] A fim de atravessar o tecido do mamífero adequado, as vesículas de lipídeo precisam passar através de uma série de poros finos, cada um com um diâmetro menor que 50 nm, sob a influência de um gradiente transdérmico adequado, portanto, é desejável usar um lipossoma que é altamente deformável e capaz de passar através de tais poros finos.

[000191] As vantagens adicionais de lipossomas incluem; os lipossomas obtidos a partir de fosfolipídeos naturais são biocompatíveis e biodegradáveis; os lipossomas podem incorporar uma ampla faixa de água e fármacos solúveis em lipídeo; os lipossomas podem proteger fármacos encapsulados em seus compartimentos internos do metabolismo e degradação (Rosoff, in *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger e Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., EUA, volume 1, página 245). As considerações importantes na preparação de formulações de lipossoma são a carga de superfície de lipídeo, o tamanho da vesícula e o volume aquoso dos lipossomas.

[000192] Os lipossomas são úteis para a transferência e a aplicação de ingredientes ativos para o sítio de ação. Devido ao fato de que a membrana lipossômica é estruturalmente similar às membranas biológicas, quando os lipossomas são aplicados a um tecido, os lipossomas começar a se consolidar com as membranas celulares e conforme a consolidação do lipossoma e da célula progride, os teores lipossômicos são esvaziados na célula em que o agente ativo pode atuar.

[000193] As formulações lipossômicas foram o foco de investigação aprofundada como o modo de aplicação para muitos fármacos. Há

uma evidência crescente de que para a administração tópica, os lipossomas apresentam várias vantagens em comparação com outras formulações. Tais vantagens incluem efeitos colaterais reduzidos relacionados à alta absorção sistêmica do fármaco administrado, acúmulo aumentado do fármaco administrado no alvo desejado e a capacidade de administrar uma ampla variedade de fármacos, tanto hidrofílicos quanto hidrofóbicos, na pele.

[000194] Vários relatórios detalharam a capacidade de os lipossomas aplicarem agentes incluindo DNA de peso molecular alto na pele. Os compostos que incluem analgésicos, anticorpos, hormônios e DNAs com peso molecular alto foram administrados à pele. A maior parte das aplicações resultou no alveijamento da epiderme superior.

[000195] Os lipossomas se enquadram em duas classes amplas. Os lipossomas catiônicos são lipossomas positivamente carregados que interagem com as moléculas de DNA negativamente carregadas para formar um complexo estável. O complexo de DNA/lipossoma positivamente carregado se liga a uma superfície da célula negativamente carregada e é internalizado em um endossoma. Devido ao pH ácido dentro do endossoma, os lipossomas são rompidos, liberando seus conteúdos no citoplasma da célula (Wang *et al.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., 1987, 147, 980 a 985).

[000196] Os lipossomas que são sensíveis ao pH ou negativamente carregados, aprisionam ácidos nucleicos em vez de formarem complexo com isso. Posto que tanto o DNA quanto o lipídeo são carregados de modo similar, a repulsão em vez da formação de complexo ocorre. Todavia, alguma parte do DNA é aprisionada dentro do interior aquoso desses lipossomas. Os lipossomas sensíveis ao pH foram usados para aplicar ácidos nucleicos que codificam o gene timidina quinase às monocamadas da célula em cultura. A expressão do gene exógeno foi detectada nas células alvos (Zhou *et al.*, Journal of Controlled Rele-

ase, 1992, 19, 269 a 274).

[000197] Um tipo principal de composição lipossômica inclui fosfolídeos além de fosfatidilcolina naturalmente derivada. As composições de lipossoma neutras, por exemplo, podem ser formadas a partir de dimiristoil fosfatidilcolina (DMPC) ou dipalmitoil fosfatidilcolina (DPPC). As composições de lipossoma aniônicas em geral, são formadas a partir de dimiristoil fosfatidilglicerol, enquanto os lipossomas fusogênicos aniônicos são formados principalmente a partir de dioleoil fosfatidiletanolamina (DOPE). Um outro tipo de composição lipossômica é formado a partir de fosfatidilcolina (PC) tal como, por exemplo, PC de feijão-soja e PC de ovo. Um outro tipo é formado a partir de misturas de fosfolípídeo e/ou fosfatidilcolina e/ou colesterol.

[000198] Vários estudos avaliaram a aplicação tópica de formulações lipossomais de fármaco à pele. A aplicação de lipossomas contendo interferón à pele de porquinho-da-índia resultou em uma redução de feridas de herpes na pele enquanto a aplicação de interferón por outros meios (por exemplo, como uma solução ou como uma emulsão) foi ineficaz (Weiner *et al.*, Journal of Drug Targeting, 1992, 2, 405 a 410). Adicionalmente, um estudo adicional testou a eficácia de interferón administrado como parte de uma formulação lipossômica para a administração de interferón com o uso de um sistema aquoso e concluiu que a formulação lipossômica foi superior para a administração aquosa (du Plessis *et al.*, Antiviral Research, 1992, 18, 259 a 265).

[000199] Os sistemas lipossômicos não iônicos também foram examinados para determinar sua utilidade na aplicação de fármacos à pele, em sistemas particulares que compreendem tensoativo não iônico e colesterol. As formulações lipossomais não iônicas que compreendem Novasome™ I (gliceril dilaurato/colesterol/éter de polioxietileno-10-estearila) e Novasome™ II (distearato de glicerila/colesterol/éter de polioxietileno-10-estearila) foram usadas para aplicar ciclosporin-A na

derme da pele do camundongo. Os resultados indicaram que tais sistemas lipossômicos não iônicos foram eficazes na facilitação da deposição de ciclosporina A em diferentes camadas da pele (Hu *et al.* S.T.P. Pharma. Sci., 1994, 4, 6, 466).

[000200] Os lipossomas também incluem lipossomas "estericamente estabilizados", um termo que, conforme aqui usado, se refere a lipossomas que compreendem um ou mais lipídeos especializados que, quando incorporados nos lipossomas, resultam em tempos de vida de circulação intensificados em relação a lipossomas que carecem de tais lipídeos especializados. Os exemplos de lipossomas estericamente estabilizados são aqueles em que parte da porção de lipídeo de formação de vesícula do lipossoma (A) compreende um ou mais glicolipídeos, tal como monosialogangliosídeo G_{M1} , ou (B) é derivatizada com um ou mais polímeros hidrofílicos, tal como uma porção química de polietileno glicol (PEG). Sem se ater a qualquer teoria particular, é ensinado na técnica que, pelo menos para lipossomas estericamente estabilizados contendo gangliosídeos, esfingomielina ou lipídeos derivatizados de PEG, a meia-vida de circulação intensificada desses lipossomas estericamente estabilizados deriva de uma admissão reduzida nas células do sistema reticuloendotelial (RES) (Allen *et al.*, FEBS Letters, 1987, 223, 42; Wu *et al.*, Cancer Research, 1993, 53, 3765).

[000201] Vários lipossomas que compreendem um ou mais glicolipídeos são conhecidos na técnica. Papahadjopoulos *et al.* (Ann. N.Y. Acad. Sci., 1987, 507, 64) relatou a capacidade de os monosialogangliosídeo G_{M1} , sulfato de galactocerebrosídeo e fosfatidilinositol aprimoraram as meias-vidas de sangue de lipossomas. Essas conclusões foram expounded por Gabizon *et al.* (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1988, 85, 6949). A patente nº US4.837.028 e o documento WO 88/04924, ambos de Allen *et al.*, revelam lipossomas que compreendem (1) esfingomielina e (2) o gangliosídeo G_{M1} ou um éster de sulfato

de galactocerebroside. A patente nº US5.543.152 (Webb *et al.*) revela lipossomas que compreendem esfingomielina. Os lipossomas que compreendem 1,2-sn-dimiristoilfosfatidilcolina são revelados em WO 97/13499 (Lim *et al.*).

[000202] Muitos lipossomas que compreendem lipídeos derivados com um ou mais polímeros hidrofílicos, e métodos de preparação dos mesmos, são conhecidos na técnica. Sunamoto *et al.* (Bull. Chem. Soc. Jpn., 1980, 53, 2778) descreveu lipossomas que compreendem um detergente não iônico, 2C_{1215G}, que contém uma porção química de PEG. Illum *et al.* (FEBS Lett., 1984, 167, 79) relatou que o revestimento hidrofílico de partículas de poliestireno com glicóis poliméricos resulta em meias-vidas de sangue significativamente intensificadas. Os fosfolipídeos sintéticos modificados pelos grupos carboxílicos de fixação de polialquilenoglicóis (por exemplo, PEG) são descritos por Sears (Patentes U.S. N^{os} 4.426.330 e 4.534.899). Klibanov *et al.* (FEBS Lett., 1990, 268, 235) descreveu experimentos que demonstram que lipossomas que compreendem fosfatidiletanolamina (PE) derivada com PEG ou estereato de PEG têm aumentos significativos em meias-vidas de circulação de sangue. Blume *et al.* (Biochimica et Biophysica Acta, 1990, 1029, 91) estendeu tais observações a outros fosfolipídeos derivados de PEG, por exemplo, DSPE-PEG, formado da combinação de distearoilfosfatidiletanolamina (DSPE) e PEG. Os lipossomas que têm porções de PEG covalentemente ligadas em sua superfície externa são descritos na Patente N^o EP 0.445.131 B1 e WO 90/04384 para Fisher. As composições de lipossoma contendo 1-20 por cento em mol de PE derivado com PEG, e métodos de uso das mesmas, são descritas por Woodle *et al.* (Patentes U.S. N^{os} 5.013.556 e 5.356.633) e Martin *et al.* (Patente U.S. N^o 5.213.804 e Patente N^o EP 0.496.813 B1). Os lipossomas que compreendem inúmeros outros conjugados de lipídeo-polímero são revelados no documento WO 91/05545 e na Patente

U.S. Nº 5.225.212 (ambos de Martin *et al.*) e no documento WO 94/20073 (Zalipsky *et al.*). Os lipossomas que compreendem lipídeos de ceramida modificada por PEG são descritos no documento WO 96/10391 (Choi *et al.*). A Patente U.S. Nº 5.540.935 (Miyazaki *et al.*) e a Patente U.S. Nº 5.556.948 (Tagawa *et al.*) descrevem lipossomas contendo PEG que podem ser adicionalmente derivados com porções funcionais em suas superfícies.

[000203] Inúmeros lipossomas que compreendem ácidos nucleicos são conhecidos na técnica. O documento WO 96/40062 de Thierry *et al.* revela métodos para o encapsulamento de ácidos nucleicos de alto peso molecular em lipossomas. A Patente U.S. Nº 5.264.221 de Tagawa *et al.* revela lipossomas ligados à proteína e afirma que o teor de tais lipossomas pode incluir um dsRNA. A Patente nº U.S. Nº 5.665.710 de Rahman *et al.* descreve certos métodos de encapsulamento de oligodesoxinucleotídeos em lipossomas. O documento nº WO 97/04787 de Love *et al.* revela lipossomas que compreendem dsRNAs direcionados ao gene raf.

[000204] Os transfersomas são ainda outro tipo de lipossomas, e são agregados de lipídeo altamente deformáveis que são candidatos atraentes para veículos de aplicação de fármacos. Os transfersomas podem ser descritos como gotículas de lipídeo que são tão altamente deformáveis que são facilmente penetráveis através de poros que são menores que a gotícula. Os transfersomas são adaptáveis ao ambiente no qual são usados, por exemplo, são auto-otimizantes (adaptáveis ao formato de poros na pele), autorreparantes, com frequência alcançam seu alvo sem fragmentação, e, com frequência, de autocarregamento. Para produzir transfersomas, é possível adicionar ativadores de borda de superfície, usualmente tensoativos, a uma composição lipossômica padrão. Os transfersomas foram usados para aplicar albumina sérica à pele. Mostrou-se que a aplicação mediada por trans-

persoma de albumina sérica era eficaz como injeção subcutânea de uma solução contendo albumina sérica.

[000205] Os tensoativos encontram ampla aplicação em formulações tal como emulsões (incluindo microemulsões) e lipossomas. A forma mais comum de classificação e de categorização das propriedades dos muitos tipos diferentes de tensoativos, natural e sintético, se dá através do uso do equilíbrio entre hidrófilo/lipófilo (HLB). A natureza do grupo hidrofílico (também conhecido como o "principal") fornece o meio mais útil para a categorização de diferentes tensoativos usados em formulações (Rieger, em *Pharmaceutical Dosage Forms*, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 1988, página 285).

[000206] Se a molécula tensoativa não for ionizada, a mesma é classificada como um tensoativo não iônico. Os tensoativos não iônicos encontram ampla aplicação em produtos farmacêuticos e cosméticos e são úteis em uma ampla faixa de valores de pH. Em geral, seus valores de HLB se situam na faixa de 2 a cerca de 18 dependendo de sua estrutura. Os tensoativos não iônicos incluem ésteres não iônicos tal como ésteres de etileno glicol, ésteres de propileno glicol, ésteres de glicerila, ésteres de poliglicerila, ésteres de sorbitano, ésteres de sacarose, e ésteres etoxilados. O alcanolamidas não iônicas e os éteres tal como etoxilados de álcool graxo, álcoois propoxilados e polímeros de bloco etoxilados/propoxilados estão também incluídos nessa classe. Os tensoativos de polioxietileno são os membros mais populares da classe de tensoativo não iônico.

[000207] Se a molécula tensoativa transporta uma carga negativa quando é dissolvida ou dispersada na água, o tensoativo é classificado como aniônico. Os tensoativos aniônicos incluem carboxilatos tal como sabões, lactilatos de acila, amidas de aminoácidos de acila, ésteres de ácido enxófrico tal como sulfatos de alquila e sulfatos de alquila etoxilada, sulfonatos tal como sulfonatos de alquil benzeno, isetionatos de

acila, tauratos e sulfossuccinatos de acila, e fosfatos. Os membros mais importantes da classe de tensoativo aniônico são os sulfatos de alquila e os sabões.

[000208] Se a molécula tensoativa transporta uma carga positiva quando é dissolvida ou dispersada em água, o tensoativo é classificado como catiônico. Os tensoativos catiônicos incluem sais de amônio quaternário e aminas etoxiladas. Os sais de amônio quaternário são os membros mais usados dessa classe.

[000209] Se a molécula tensoativa tem a capacidade de transportar uma carga positiva ou negativa, o tensoativo é classificado como anfotérico. Os tensoativos anfotéricos incluem derivados de ácido acrílico, alquilamidas substituídas, N-alquilbetainas e fosfatidas.

[000210] O uso de tensoativos em produtos, formulações e em emulsões de fármaco foi analisados (Rieger, em *Pharmaceutical Dosage Forms*, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 1988, página 285).

Partículas de lipídeo de ácido nucleico

[000211] Em uma modalidade, um dsRNA de TMPRSS6 apresentado na invenção é completamente encapsulado na formulação de lipídeo, por exemplo, para formar uma SPLP, pSPLP, SNALP, ou outra partícula de ácido nucleico-lipídeo. Conforme usado no presente documento, o termo "SNALP" se refere a uma partícula de ácido nucleico estável-lipídeo, incluindo SPLP. Conforme usado no presente documento, o termo "SPLP" se refere a uma partícula de ácido nucleico-lipídeo que compreende DNA plasmídico encapsulado em uma vesícula de lipídeo. As SNALPs e SPLPs contêm tipicamente um lipídeo catiônico, um lipídeo não catiônico e um lipídeo que evita agregação da partícula (por exemplo, um conjugado de PEG-lipídeo). As SNALPs e SPLPs são extremamente úteis aplicações sistêmicas, visto que as mesmas exibem tempos de vida de circulação após injeção intravenosa (i.v.) e acumulam em sítios distais (por exemplo, sítios fisicamente

separados do sítio de administração). As SPLPs incluem "pSPLP", que incluem um complexo de agente de condensação-ácido nucleico encapsulado conforme apresentado na Publicação PCT Nº WO 00/03683. As partículas da presente invenção têm tipicamente um diâmetro médio de cerca de 50 nm a cerca de 150 nm, mais tipicamente, cerca de 60 nm a cerca de 130 nm, mais tipicamente, cerca de 70 nm a cerca de 110 nm, ainda mais tipicamente cerca de 70 nm a cerca de 90 nm, e são substancialmente não tóxicas. Além disso, os ácidos nucleicos quando presentes nas partículas de ácido nucleico-lipídeo da presente invenção são resistentes em solução aquosa à degradação com uma nuclease. As partículas de ácido nucleico-lipídeo e seu método de preparação são revelados, por exemplo, nas Patentes Nºs U.S. 5.976.567; 5.981.501; 6.534.484; 6.586.410; 6.815.432; e Publicação PCT Nº WO 96/40964.

[000212] Em uma modalidade, a razão entre lipídeo e fármaco (razão entre massa/massa) (por exemplo, razão entre lipídeo e dsRNA) se situará na faixa de cerca de 1:1 a cerca de 50:1, de cerca de 1:1 a cerca de 25:1, de cerca de 3:1 a cerca de 15:1, de cerca de 4:1 a cerca de 10:1, de cerca de 5:1 a cerca de 9:1, ou cerca de 6:1 a cerca de 9:1.

[000213] O lipídeo catiônico pode ser, por exemplo, cloreto de N,N-dioleil-N,N-dimetilamônio (DODAC), brometo de N,N-distearil-N,N-dimetilamônio (DDAB), cloreto de N-(1-(2,3-dioleiloxi)propil)-N,N,N-trimetilamônio (DOTAP), cloreto de N-(1-(2,3-dioleiloxi)propil)-N,N,N-trimetilamônio (DOTMA), N,N-dimetil-2,3-dioleiloxi)propilamina (DODMA), 1,2-DiLinoleiloxi-N,N-dimetilaminopropano (DLinDMA), 1,2-Dilinoleniloxi-N,N-dimetilaminopropano (DLenDMA), 1,2-Dilinoleilcarbamoiloxi-3-dimetilaminopropano (DLin-C-DAP), 1,2-Dilinoleioxi-3-(dimetilamino)acetoxipropano (DLin-DAC), 1,2-Dilinoleioxi-3-morfolinopropano (DLin-MA), 1,2-Dilinoleoil-3-dimetilaminopropano

(DLinDAP), 1,2-Dilinoleil-3-dimetilaminopropano (DLin-S-DMA), 1-Linoleoil-2-linoleiloxi-3-dimetilaminopropano (DLin-2-DMA), sal de cloreto de 1,2-Dilinoleiloxi-3-trimetilaminopropano (DLin-TMA.Cl), sal de cloreto de 1,2-Dilinoleoil-3-trimetilaminopropano (DLin-TAP.Cl), 1,2-Dilinoleiloxi-3-(N-metilpiperazino)propano (DLin-MPZ), ou 3-(N,N-Dilinoleilamino)-1,2-propanodiol (DLinAP), 3-(N,N-Dioleilamino)-1,2-propanodio (DOAP), 1,2-Dilinoleiloxo-3-(2-N,N-dimetilamino)etoxipropano (DLin-EG-DMA), 1,2-Dilinoleniloxi-N,N-dimetilaminopropano (DLinDMA), 2,2-Dilinoleil-4-dimetilaminometil-[1,3]-dioxolano (DLin-K-DMA) ou análogos dos mesmos, (3aR,5s,6aS)-N,N-dimetil-2,2-di((9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienil)tetra-hidro-3aH-ciclopenta[d][1,3]dioxol-5-amina (ALN100), 4-(dimetilamino)butanoato de (6Z,9Z,28Z,31Z)-heptatriaconta-6,9,28,31-tetraen-19-ila (MC3), 1,1'-(2-(4-(2-((2-(bis(2-hidroxidodecil)amino)etil)(2-hidroxidodecil)amino)etil)piperazin-1-il)etilazanedil)didodecan-2-ol (Tech G1), ou uma mistura dos mesmos. O lipídeo catiônico pode compreender de cerca de 20 % em mol a cerca de 50 % em mol ou cerca de 40 % em mol do lipídeo total presente na partícula.

[000214] Em outra modalidade, o composto 2,2-Dilinoleil-4-dimetilaminoetil-[1,3]-dioxolano pode ser usado para preparar nanopartículas de lipídeo-siRNA. A síntese de 2,2-Dilinoleil-4-dimetilaminoetil-[1,3]-dioxolano é descrita no Pedido de Patente Provisória U.S. Nº 61/107.998 depositado em 23 de outubro de 2008, que está aqui incorporado a título de referência.

[000215] Em uma modalidade, a partícula de lipídeo-siRNA inclui 40% de 2,2-Dilinoleil-4-dimetilaminoetil-[1,3]-dioxolano: 10% de DSPC: 40% de Colesterol: 10% de PEG-C-DOMG (mol por cento) com um tamanho de partícula de $63,0 \pm 20$ nm e uma razão entre siRNA/Lipídeo de 0,027.

[000216] O lipídeo não catiônico pode ser um lipídeo aniônico ou um lipídeo neutro que inclui, mas não se limita a, distearoilfosfatidilcolina

(DSPC), dioleoilfosfatidilcolina (DOPC), dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), dioleoilfosfatidilglicerol (DOPG), dipalmitoilfosfatidilglicerol (DPPG), dioleoil-fosfatidiletanolamina (DOPE), palmitoiloleoilfosfatidilcolina (POPC), palmitoiloleoilfosfatidiletanolamina (POPE), 4-(N-maleimidometil)-ciclo-hexano-l-carboxilato de dioleoil-fosfatidiletanolamina (DOPE-mal), dipalmitoil fosfatidil etanolamina (DPPE), dimiristoilfosfoetanolamina (DMPE), distearoil-fosfatidiletanolamina (DSPE), 16-O-monometila PE, 16-O-dimetila PE, 18-1-trans PE, 1-estearoil-2-oleoil-fosfatidietanolamina (SOPE), colesterol, ou uma mistura dos mesmos. O lipídeo não catiônico pode ser de cerca de 5 % em mol a cerca de 90 % em mol, cerca de 10 % em mol, ou cerca de 58 % em mol se o colesterol estiver incluído, do lipídeo total presente na partícula.

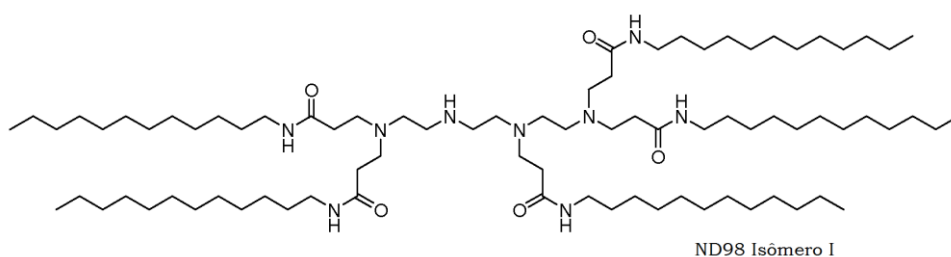
[000217] O lipídeo conjugado que inibe a agregação de partículas pode ser, por exemplo, um lipídeo de polietilenoglicol (PEG) incluindo, sem limitação, um PEG-diacilglicerol (DAG), um PEG-dialquioxipropila (DAA), um PEG-fosfolipídeo, uma PEG-ceramida (Cer), ou uma mistura dos mesmos. O conjugado de PEG-DAA pode ser, por exemplo, um PEG-dilauriloxipropila (Ci₂), a PEG-dimiristiloxipropila (Ci₄), um PEG-dipalmitiloxipropila (Ci₆), ou um PEG-disteariloxipropila (Ci₈). O lipídeo conjugado que evita a agregação de partículas pode ser de 0 % em mol a cerca de 20 % em mol ou cerca de 2 % em mol do lipídeo total presente na partícula.

[000218] Em algumas modalidades, a partícula de ácido nucleico-lipídeo inclui adicionalmente colesterol, por exemplo, a cerca de 10 % em mol a cerca de 60 % em mol ou cerca de 48 % em mol do lipídeo total presente na partícula.

LNP01

[000219] Em uma modalidade, o lipidoide ND98-4HCl (MW 1487) (consulte Pedido de Patente Nº U.S. 12/056.230, depositado em

26/3/2008, que está aqui incorporado a título de referência em sua totalidade), Colesterol (Sigma-Aldrich), e PEG-Ceramida C16 (Avanti Polar Lipids) pode ser usado para preparar nanopartículas de lipídeo-dsRNA (isto é, partículas LNP01). As soluções estoque de cada um em etanol pode ser preparada da seguinte maneira: ND98, 133 mg/ml; Colesterol, 25 mg/ml, PEG-Ceramida C16, 100 mg/ml. O ND98, Colesterol, e soluções estoque C16 de PEG-Ceramida podem ser, então, combinadas em uma razão molar, por exemplo, de 42:48:10. A solução de lipídeo combinado pode ser misturada a dsRNA aquoso (por exemplo, em acetato de sódio, pH 5) de tal modo que a concentração final de etanol seja cerca de 35 a 45% e a concentração final de acetato de sódio seja cerca de 100 a 300 mM. As nanopartículas de lipídeo-dsRNA formam tipicamente espontaneamente mediante mistura. Dependendo da distribuição de tamanho de partícula desejada, a mistura de nanopartícula resultante pode ser extrudada através de uma membrana de policarbonato (por exemplo, corte de 100 nm) com o uso, por exemplo, de uma extrusora de termobarril, tal como Lipex Extruder (Northern Lipids, Inc). Em alguns casos, a etapa de extrusão pode ser omitida. A remoção do etanol e a troca de tampão simultânea podem ser concretizadas, por exemplo, por diálise ou filtração de fluxo tangencial. O tampão pode ser trocado com, por exemplo, solução salina tamponada por fosfato (PBS) a cerca de pH 7, por exemplo, cerca de pH 6,9, cerca de pH 7,0, cerca de pH 7,1, cerca de pH 7,2, cerca de pH 7,3, ou cerca de pH 7,4.



Fórmula I

[000220] As formulações de LNP01 são descritas, por exemplo, na Publicação de Pedido Internacional Nº WO 2008/042973, que está aqui incorporada a título de referência.

[000221] As formulações de lipídeo-dsRNA exemplificadoras adicionais são como segue:

	Lipídeo Catiônico	lipídeo catiônico/lipídeo não catiônico/colesterol/conjugado de PEG-lipídeo razão entre lipídeo:siRNA
SNALP-1	1,2-Dilinoleniloxi-N,N-dimetilaminopropano (DLinDMA)	DLinDMA/DPPC/Colesterol/PEG-cDMA (57,1/7,1/34,4/1,4) lipídeo:siRNA ~ 7:1
S-XTC	2,2-Dilinoleil-4-dimetilaminoetil-[1,3]-dioxolano (XTC)	XTC/DPPC/Colesterol/PEG-cDMA 57,1/7,1/34,4/1,4 lipídeo:siRNA ~ 7:1
LNP05	2,2-Dilinoleil-4-dimetilaminoetil-[1,3]-dioxolano (XTC)	XTC/DSPC/Colesterol/PEG-DMG 57,5/7,5/31,5/3,5 lipídeo:siRNA ~ 6:1
LNP06	2,2-Dilinoleil-4-dimetilaminoetil-[1,3]-dioxolano (XTC)	XTC/DSPC/Colesterol/PEG-DMG 57,5/7,5/31,5/3,5 lipídeo:siRNA ~ 11:1
LNP07	2,2-Dilinoleil-4-dimetilaminoetil-[1,3]-dioxolano (XTC)	XTC/DSPC/Colesterol/PEG-DMG 60/7,5/31/1,5, lipídeo:siRNA ~ 6:1
LNP08	2,2-Dilinoleil-4-dimetilaminoetil-[1,3]-dioxolano (XTC)	XTC/DSPC/Colesterol/PEG-DMG 60/7,5/31/1,5, lipídeo:siRNA ~ 11:1
LNP09	2,2-Dilinoleil-4-dimetilaminoetil-[1,3]-dioxolano (XTC)	XTC/DSPC/Colesterol/PEG-DMG 50/10/38,5/1,5 Lipídeo:siRNA 10:1

	Lipídeo Catiônico	lipídeo catiônico/lipídeo não catiônico/colesterol/conjugado de PEG-lipídeo razão entre lipídeo:siRNA
LNP10	(3aR,5s,6aS)-N,N-dimetil-2,2-di((9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienil)tetra-hidro-3aH-ciclopenta[d][1,3]dioxol-5-amina (ALN100)	ALN100/DSPC/Colesterol/PEG-DMG 50/10/38,5/1,5 Lipídeo:siRNA 10:1
LNP11	4-(dimetilamino)butanoato de (6Z,9Z,28Z,31Z)-heptatriaconta-6,9,28,31-tetraen-19-ila (MC3)	MC-3/DSPC/Colesterol/PEG-DMG 50/10/38,5/1,5 Lipídeo:siRNA 10:1
LNP12	1,1'-(2-(4-(2-((2-(bis(2-hidroxidodecil)amino)etil)(2-hidroxidodecil)amino)etil)piperazin-1-il)etilazanedil)didodecan-2-ol (C12-200)	C12-200/DSPC/Colesterol/PEG-DMG 50/10/38,5/1,5 Lipídeo:siRNA 10:1
LNP13	XTC	XTC/DSPC/Col/PEG-DMG 50/10/38,5/1,5 Lipídeo:siRNA: 33:1
LNP14	MC3	MC3/DSPC/Col/PEG-DMG 40/15/40/5 Lipídeo:siRNA: 11:1
LNP15	MC3	MC3/DSPC/Col/PEG-DSG/GaINAc-PEG-DSG 50/10/35/4,5/0,5 Lipídeo:siRNA: 11:1

	Lipídeo Catiônico	lipídeo catiônico/lipídeo não catiônico/colesterol/conjugado de PEG-lipídeo razão entre lipídeo:siRNA
LNP16	MC3	MC3/DSPC/Col/PEG-DMG 50/10/38,5/1,5 Lipídeo:siRNA: 7:1
LNP17	MC3	MC3/DSPC/Col/PEG-DSG 50/10/38,5/1,5 Lipídeo:siRNA: 10:1
LNP18	MC3	MC3/DSPC/Col/PEG-DMG 50/10/38,5/1,5 Lipídeo:siRNA: 12:1
LNP19	MC3	MC3/DSPC/Col/PEG-DMG 50/10/35/5 Lipídeo:siRNA: 8:1
LNP20	MC3	MC3/DSPC/Col/PEG-DPG 50/10/38,5/1,5 Lipídeo:siRNA: 10:1
LNP21	C12-200	C12-200/DSPC/Col/PEG-DSG 50/10/38,5/1,5 Lipídeo:siRNA: 7:1
LNP22	XTC	XTC/DSPC/Col/PEG-DSG 50/10/38,5/1,5 Lipídeo:siRNA: 10:1

DSPC: distearoilfosfatidilcolina

DPPC: dipalmitoilfosfatidilcolina

PEG-DMG: PEG-didimiristoil glicerol (C14-PEG, ou PEG-C14) (PEG com peso molecular médio de 2.000)

PEG-DSG: PEG-distiril glicerol (C18-PEG, ou PEG-C18) (PEG com peso molecular médio de 2.000)

PEG-cDMA: PEG-carbamoil-1,2-dimiristiloxipropilamina

(PEG com peso molecular médio de 2.000)

[000222] As formulações que compreendem SNALP (1,2-Dilinoleniloxi-N,N-dimetilaminopropano (DLinDMA)) são descritas na Publicação Internacional Nº WO2009/127060, depositada em 15 de abril de 2009, que está aqui incorporada a título de referência.

[000223] As formulações que compreendem XTC são descritas, por exemplo, na Patente Provisório Nº de Série U.S. 61/148.366, depositada em 29 de janeiro de 2009; Patente Provisória Nº de Série U.S. 61/156.851, depositada em 2 de março de 2009; Patente Provisória Nº de Série U.S. depositada em 10 de junho de 2009; Patente Provisória Nº de Série U.S. 61/228.373, depositada em 24 de julho de 2009; Patente Provisória Nº de Série U.S. 61/239.686, depositada em 3 de setembro de 2009, e Pedido Internacional Nº PCT/US2010/022614, depositado em 29 de janeiro de 2010, que estão aqui incorporados a título de referência.

[000224] São descritas as formulações compreendendo MC3, por exemplo, na Patente Provisória Nº de Série U.S. 61/244.834, depositada em 22 de setembro de 2009, Patente Provisória Nº de Série U.S. 61/185.800, depositada em 10 de junho de 2009 e Pedido Internacional Nº PCT/US10/28224, depositado em 10 de junho de 2010, que estão aqui incorporados a título de referência.

[000225] São descritas as formulações compreendendo ALNY-100, por exemplo, Pedido de Patente Internacional Nº PCT/US09/63933, depositado em 10 de novembro de 2009, que está aqui incorporado a título de referência.

[000226] São descritas as formulações compreendendo C12-200 na Patente Provisória Nº de Série U.S. 61/175.770, depositada em 5 de maio de 2009 e no Pedido Internacional Nº PCT/US10/33777, depositado em 5 de maio de 2010, que estão aqui incorporados a título de referência.

[000227] Conforme usado no presente documento, o termo "LNPXX", em que "XX" são numerais, também é referido como aqui "AFXX". Por exemplo, LNP09 também é referido com AF09 e LNP12 também é conhecido ou referido como AF12.

Sínteses de lipídeos catiônicos

[000228] Qualquer um dos compostos, por exemplo, lipídeos catiônicos e similares, usados nas partículas de ácido nucleico-lipídeo apresentadas na invenção pode ser preparados por técnicas conhecidas de síntese orgânica, incluindo os métodos descritos mais detalhadamente nos Exemplos. Todos os substituintes são conforme definido abaixo exceto onde especificado em contrário.

[000229] "Alquila" significa um hidrocarboneto alifático saturado, cíclico ou não cíclico, de cadeia linear ou ramificada contendo de 1 a 24 átomos de carbono. As alquilas de cadeia linear saturada representativas incluem metila, etila, n-propila, n-butila, n-pentila, n-hexila, e similares; enquanto alquilas ramificadas saturadas incluem isopropila, sec-butila, isobutila, terc-butila, isopentila, e similares. As alquilas cíclicas saturadas representativas incluem ciclopropila, ciclobutila, ciclopentila, ciclo-hexila, e similares; enquanto alquilas cíclicas insaturadas incluem ciclopentenila e ciclo-hexenila, e similares.

[000230] "Alquenila" significa uma alquila, conforme definido acima, contendo pelo menos uma ligação dupla entre átomos de carbono adjacentes. As alquenilas incluem isômeros cis e trans. As alquenilas de cadeia linear e ramificada representativas incluem etilenila, propilenila, 1-butenila, 2-butenila, isobutilenila, 1-pentenila, 2-pentenila, 3-metil-1-butenila, 2-metil-2-butenila, 2,3-dimetil-2-butenila, e similares.

[000231] "Alquinila" significa qualquer alquila ou alquenila, conforme definido acima, que contém adicionalmente pelo menos uma ligação tripla entre carbonos adjacentes. As alquinilas cadeia linear e ramificada representativas incluem acetilenila, propinila, 1-butinila, 2-butinila,

1-pentinila, 2-pentinila, 3-metil-1 butinila, e similares.

[000232] "Acila" significa qualquer alquila, alquenila ou alquinila em que o carbono no ponto de fixação é substituído por um grupo oxo, conforme definido abaixo. Por exemplo, $-C(=O)$ alquila, $-C(=O)$ alquenila e $-C(=O)$ alquinila são grupos acila.

[000233] "Heterociclo" significa um anel heterocíclico, com 7 a 10 membros bicíclicos ou com 5 a 7 membros monocíclicos que é saturado, insaturado ou aromático, e que contém de 1 ou 2 heteroátomos independentemente selecionados de nitrogênio, oxigênio e enxofre, e em que os heteroátomos de nitrogênio e enxofre podem ser opcionalmente oxidados, e o heteroátomo de nitrogênio pode ser opcionalmente quaternizado, incluindo os anéis bicíclicos nos quais qualquer um dos heterociclos acima são fundidos em um anel de benzeno. O heterociclo pode ser fixado através de qualquer heteroátomo ou átomo de carbono. Os heterociclos incluem heteroarilas conforme definido abaixo. Os heterociclos incluem morfolinila, pirrolidinonila, pirrolidinila, piperidinila, piperizinila, hidantoinila, valerolactamila, oxiranila, oxetanila, tetra-hidrofuranila, tetra-hidropiranila, tetra-hidropiridinila, tetra-hidroprimidinila, tetra-hidrotiofenila, tetra-hidrotiopiranila, tetra-hidropirimidinila, tetra-hidrotiofenila, tetra-hidrotiopiranila, e similares.

[000234] Os termos "alquila opcionalmente substituída", "alquenila opcionalmente substituída", "alquinila opcionalmente substituída", "acila opcionalmente substituída" e "heterociclo opcionalmente substituído" significam que, quando substituídos, pelo menos um átomo de hidrogênio é substituído por um substituinte. No caso de um substituinte oxo ($=O$) dois átomos de hidrogênio são substituídos. Nesse aspecto, os substituintes incluem oxo, halogênio, heterociclo, $-CN$, $-OR^x$, $-NR^xR^y$, $-NR^xC(=O)R^y$, $-NR^xSO_2R^y$, $-C(=O)R^x$, $-C(=O)OR^x$, $-C(=O)NR^xR^y$, $-SO_nR^x$ e $-SO_nNR^xR^y$, em que n é 0, 1 ou 2, R^x e R^y são iguais ou diferentes e independentemente hidrogênio, alquila ou hete-

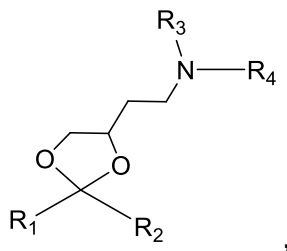
rociclo, e cada um dos ditos substituintes de alquila e heterociclo pode ser adicionalmente substituído por um ou mais dentro oxo, halogênio, -OH, -CN, alquila, -OR^x, heterociclo, -NR^xR^y, -NR^xC(=O)R^y, -NR^xSO₂R^y, -C(=O)R^x, -C(=O)OR^x, -C(=O)NR^xR^y, -SO_nR^x e -SO_nNR^xR^y.

"Halogênio" significa fluoro, cloro, bromo e iodo.

[000235] Em algumas modalidades, os métodos apresentados na invenção podem exigir o uso de grupos de proteção. A metodologia do grupo de proteção é bem conhecida pelo versado na técnica (consulte, por exemplo, *Protective Groups in Organic Synthesis*, Green, T.W. *et al.*, Wiley-Interscience, cidade de Nova York, 1999). Em suma, os grupos de proteção no contexto dessa invenção são qualquer grupo que reduz ou elimina reatividade indesejada de um grupo funcional. Um grupo de proteção pode ser adicionado a um grupo funcional para mascarar sua reatividade durante determinadas reações e, então, removido a fim de revelar o grupo funcional original. Em algumas modalidades, é usado um "grupo de proteção de álcool". Um "grupo de proteção de álcool" é qualquer grupo que diminui ou elimina reatividade indesejada de um grupo funcional de álcool. Os grupos de proteção podem ser adicionados e removidos com o uso de técnicas bem conhecidas na técnica.

Síntese de Fórmula A

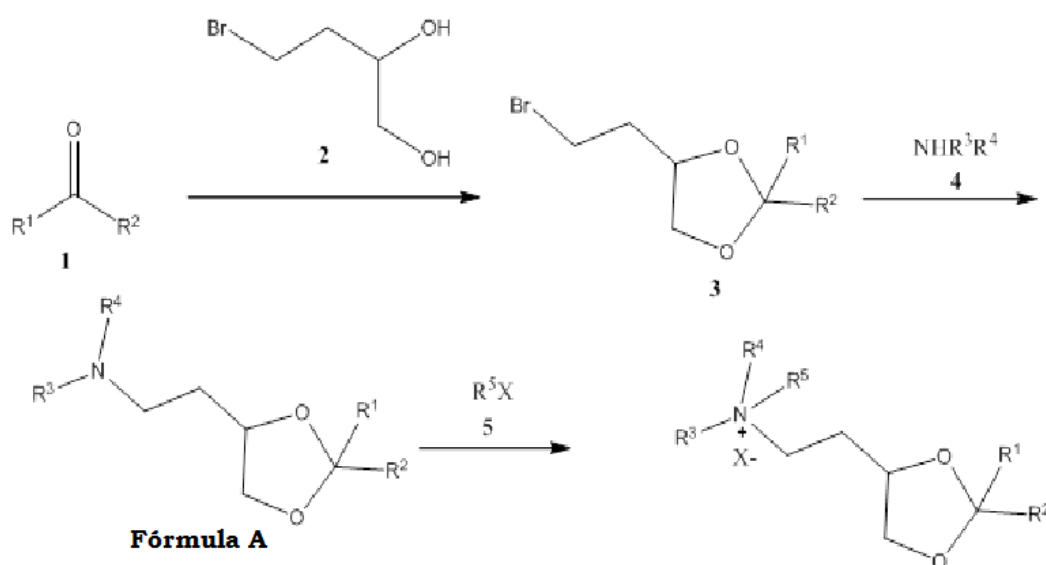
[000236] Em algumas modalidades, as partículas de ácido nucleico-lipídeo apresentadas na invenção são formuladas com o uso de um lipídeo catiônico de fórmula A:



onde R₁ e R₂ são independentemente alquila, alquenila ou alquinila, cada uma pode ser opcionalmente substituída, e R₃ e R₄

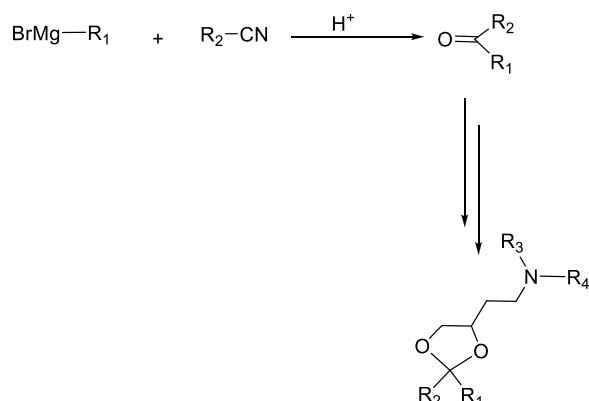
são independentemente alquila inferior ou R₃ e R₄ podem ser tomados em conjunto para formar um anel heterocíclico opcionalmente substituído. Em algumas modalidades, o lipídeo catiônico é XTC (2,2-Dilinoil-4-dimetilaminoetil-[1,3]-dioxolano). Em geral, o lipídeo de fórmula A acima pode ser produzido pelos Esquemas de Reação a seguir 1 ou 2, em que todos os substituintes são conforme definido acima exceto onde especificado em contrário.

Esquema 1



[000237] O lipídeo A, onde R₁ e R₂ são independentemente alquila, alquenila ou alquinila, podem ser, cada um, opcionalmente substituídas, e R₃ e R₄ são independentemente alquila inferior ou R₃ e R₄ podem ser tomados em conjunto para formar um anel opcionalmente substituído heterocíclico, pode ser preparado de acordo com o Esquema 1. A cetona 1 e o brometo 2 podem ser adquiridos ou preparados de acordo com métodos conhecidos pelo indivíduo de habilidade comum na técnica. A Reação de 1 e 2 rende acetal 3. O tratamento de acetal 3 com amina 4 rende lipídeos de fórmula A. Os lipídeos de fórmula A podem ser convertidos no sal de amônio correspondente com um sal orgânico de fórmula 5, onde X é um contraíon de ânion selecionado de halogênio, hidróxido, fosfato, sulfato ou similares.

Esquema 2



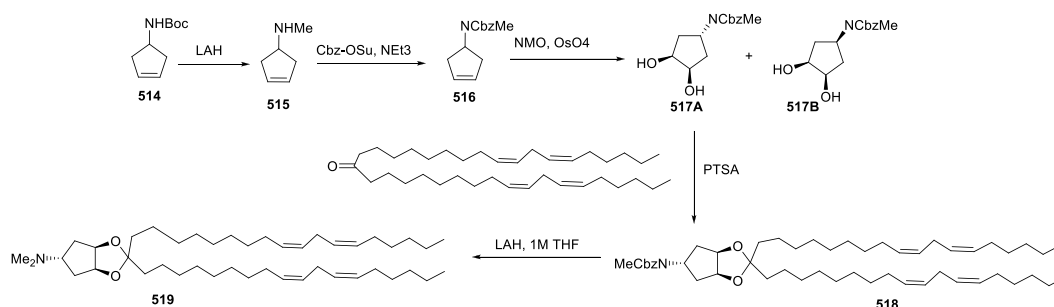
[000238] Alternativamente, o material de partida de cetona 1 pode ser preparado de acordo com o Esquema 2. O reagente de Grignard 6 e o cianeto 7 podem ser adquiridos ou preparados de acordo com métodos conhecidos pelo indivíduo de habilidade comum na técnica. A Reação de 6 e 7 rende a cetona 1. A conversão de cetona 1 nos lipídeos correspondentes de fórmula A é conforme descrito no Esquema 1.

Síntese de MC3

[000239] A preparação de DLin-M-C3-DMA (isto é, 4-(dimetilamino)butanoato de (6Z,9Z,28Z,31Z)-heptatriaconta-6,9,28,31-tetraen-19-ila) se deu da seguinte maneira. Uma solução de (6Z,9Z,28Z,31Z)-heptatriaconta-6,9,28,31-tetraen-19-ol (0,53 g), cloridrato de ácido 4-N,N-dimetilaminobutírico (0,51 g), 4-N,N-dimetilaminopiridina (0,61g) e cloridrato 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (0,53 g) em diclorometano (5 ml) foi agitada à temperatura ambiente de um dia para o outro. A solução foi lavada com ácido hidrocloreídrico diluído seguido de bicarbonato de sódio aquoso diluído. As frações orgânicas foram secas em sulfato de magnésio anidro, filtradas e o solvente removido em um evaporador giratório. O resíduo foi disseminado em uma coluna de sílica-gel(20 g) com o uso de um 1- gradiente de eluição de metanol/diclorometano a 5%. As frações contendo o produto purificado foram combinadas e o solvente removido, rendendo um óleo incolor (0,54 g).

Síntese de ALNY-100

[000240] A síntese de acetal 519 [ALNY-100] foi realizada com o uso do esquema a seguir 3:



Síntese de 515

[000241] A uma suspensão agitada de LiAlH_4 (3,74 g, 0,09852 mol) em 200 ml de THF anidro em um RBF de dois gargalos (1 l), foi adicionada uma solução de 514 (10 g, 0,04926 mol) em 70 ml de THF lentamente a 0°C sob atmosfera de nitrogênio. Após adição completa, a mistura de reação foi amornada à temperatura ambiente e, então, aquecida até refluxo por 4 horas. O progresso da reação foi monitorado por TLC. Após a conclusão da reação (por TLC), a mistura foi resfriada a 0°C e extinta com adição cuidadosa de solução de Na_2SO_4 saturado. A mistura de reação foi agitada por 4 horas à temperatura ambiente e filtrada. O resíduo foi bem lavado com THF. O filtrado e as lavagens foram misturadas e diluídas em 400 ml de dioxano e 26 ml de HCl conc. e agitadas por 20 minutos à temperatura ambiente. As volatilidades foram retiradas sob vácuo para fornecer o sal de cloridrato de 515 como um sólido branco. Rendimento: 7,12 g 1H-RMN(DMSO, 400 MHz): $\delta = 9,34$ (amplo, 2H), 5,68 (s, 2H), 3,74 (m, 1H), 2,66 a 2,60 (m, 2H), 2,50 a 2,45 (m, 5H).

Síntese de 516

[000242] A uma solução agitada do composto 515 em 100 ml de DCM seco em um RBF de 250 ml de dois gargalos, foi adicionado NEt_3 (37,2 ml, 0,2669 mol) e resfriado a 0°C sob atmosfera de nitrogênio. Após uma lenta adição de N-(benziloxi-carboniloxi)-succinimida

(20 g, 0,08007 mol) em 50 ml de DCM seco, permitiu-se que a mistura de reação amornasse à temperatura ambiente. Após a conclusão da reação (2 a 3 horas por TLC), a mistura foi lavada sucessivamente com solução de HCl a 1N (1 x 100 ml) e solução de NaHCO₃ saturado (1 x 50 ml). A camada orgânica foi, então, seca em Na₂SO₄ anidro e o solvente foi evaporado para proporcionar material em bruto que foi purificado por cromatografia por coluna de sílica-gel para obter 516 como uma massa pegajosa. Rendimento: 11g (89%). ¹H-RMN(CDCl₃, 400 MHz): δ = 7,36 a 7,27(m, 5H), 5,69 (s, 2H), 5,12 (s, 2H), 4,96 (br., 1H) 2,74 (s, 3H), 2,60(m, 2H), 2,30 a 2,25(m, 2H). LC-MS [M+H] ⁻232,3 (96,94%).

Síntese de 517A e 517B

[000243] O ciclopenteno 516 (5 g, 0,02164 mol) foi dissolvido em uma solução de 220 ml de acetona e água (10:1) em um RBF de 500 ml de único gargalo e, ao mesmo, foi adicionado morfolina-N-óxido de N-metila (7,6 g, 0,06492 mol) seguido de 4,2 ml de solução a 7,6% de OsO₄ (0,275 g, 0,00108 mol) em terc-butanol à temperatura ambiente. Após a conclusão da reação (~ 3 horas), a mistura foi extinta com a adição de Na₂SO₃ sólido e a mistura resultante foi agitada por 1,5 hora à temperatura ambiente. A mistura de reação foi diluída em DCM (300 ml) e lavada com água (2 x 100 ml) seguido de solução de NaHCO₃ saturado (1 x 50 ml), água (1 x 30 ml) e, por fim, com salmoura (1x 50 ml). A fase orgânica foi seca em Na₂SO₄ anidro e o solvente foi removido em vácuo. A purificação cromatográfica por coluna em sílica-gel do material em bruto proporcionou uma mistura de diastereômeros, que foram separados por HPLC preparatória. Rendimento: - 6 g em bruto

[000244] 517A - Pico-1 (sólido branco), 5,13 g (96%). ¹H-RMN(DMSO, 400 MHz): δ= 7,39 a 7,31(m, 5H), 5,04(s, 2H), 4,78 a 4,73 (m, 1H), 4,48 a 4,47(d, 2H), 3,94 a 3,93(m, 2H), 2,71(s, 3H), 1,72

a 1,67(m, 4H). LC-MS - [M+H]-266,3, [M+NH₄⁺]-283,5 presente, HPLC-97,86%. A estereoquímica confirmou por raios X.

Síntese de 518

[000245] Com o uso de um procedimento análogo àquele descrito para a síntese do composto 505, o composto 518 (1,2 g, 41%) foi obtido como um óleo incolor. ¹H-RMN(CDCl₃, 400 MHz): δ= 7,35 a 7,33(m, 4H), 7,30 a 7,27(m, 1H), 5,37 a 5,27(m, 8H), 5,12(s, 2H), 4,75(m,1H), 4,58 a 4,57(m,2H), 2,78 a 2,74(m,7H), 2,06 a 2,00(m,8H), 1,96 a 1,91(m, 2H), 1,62(m, 4H), 1,48(m, 2H), 1,37 a 1,25(br m, 36H), 0,87(m, 6H), HPLC a 98,65%.

Procedimento Geral para a Síntese do Composto 519

[000246] Uma solução do composto 518 (1 eq) em hexano (15 ml) foi adicionada por gotejamento a uma solução fria como gelo e LAH em THF (1 M, 2 eq). Após a adição completa, a mistura foi aquecida a 40°C ao longo de 0,5 hora, então, novamente resfriada em um banho de gelo. A mistura foi cuidadosamente hidrolisada com Na₂SO₄ aquoso saturado, então, filtrada através de celite e reduzida a um óleo. A cromatografia por coluna forneceu o 519 puro (1,3 g, 68%) que foi obtido como um óleo incolor. ¹³C **RMN** = 130,2, 130,1 (x2), 127,9 (x3), 112,3, 79,3, 64,4, 44,7, 38,3, 35,4, 31,5, 29,9 (x2), 29,7, 29,6 (x2), 29,5 (x3), 29,3 (x2), 27,2 (x3), 25,6, 24,5, 23,3, 226, 14,1; Eletroaspersão MS (+ve): Peso molecular para C₄₄H₈₀NO₂ (M + H)⁺ Calc. 654.6, Encontrado 654.6.

[000247] As formulações preparadas pelo método padrão ou livre de extrusão podem ser caracterizadas de maneiras similares. Por exemplo, as formulações são tipicamente caracterizadas por inspeção visual. As mesmas deveriam ser soluções translúcidas esbranquiçadas livres de agregados ou sedimento. O tamanho de partícula e a distribuição de tamanho de partícula de nanopartículas de lipídeo podem ser medidos por difusão de luz com o uso de, por exemplo, um Mal-

vern Zetasizer Nano ZS (Malvern, EUA). As partículas deveriam ter cerca de 20 a 300 nm, como 40 a 100 nm de tamanho. A distribuição de tamanho de partícula deveria ser unimodal. A concentração de dsRNA total na formulação, bem como a fração aprisionada, é estimada com o uso de um ensaio de exclusão de matriz. Uma amostra do dsRNA formulado pode ser incubada com um matriz de ligação de RNA, como Ribogreen (Molecular Probes) na presença ou ausência de um tensoativo de rompimento de formulação, por exemplo, Triton-X100 a 0,5%. O dsRNA total na formulação pode ser determinado pelo sinal da amostra contendo o tensoativo, em relação a uma curva padrão. A fração aprisionada é determinada subtraindo-se o teor de dsRNA "livre" (conforme medido pelo sinal na ausência de tensoativo) do teor de dsRNA total. O percentual de dsRNA aprisionado é tipicamente >85%. Para formulação SNALP, o tamanho de partícula é pelo menos 30 nm, pelo menos 40 nm, pelo menos 50 nm, pelo menos 60 nm, pelo menos 70 nm, pelo menos 80 nm, pelo menos 90 nm, pelo menos 100 nm, pelo menos 110 nm, e pelo menos 120 nm. A faixa adequada é tipicamente cerca de pelo menos 50 nm a cerca de pelo menos 110 nm, cerca de pelo menos 60 nm a cerca de pelo menos 100 nm, ou cerca de pelo menos 80 nm a cerca de pelo menos 90 nm.

[000248] As composições e formulações para administração oral incluem pós ou grânulos, microparticulados, nanoparticulados, suspensões ou soluções em água ou meio não aquoso, cápsulas, cápsulas em gel, sachês, tabletes ou minitables. Espessantes, agentes flavorizantes, diluentes, emulsificantes, auxiliares de dispersão ou aglutinantes podem ser desejáveis. Em algumas modalidades, as formulações orais são aquelas nas quais dsRNAs apresentados na invenção são administrados em conjunto com um ou mais tensoativos intensificadores de penetração e agentes quelantes. Os tensoativos adequados incluem ácidos graxos e/ou ésteres ou sais dos mesmos, ácidos

biliares e/ou sais dos mesmos. Os ácidos biliares/sais adequados incluem ácido quenodesoxicólico (CDCA) e ácido ursodexiquenodesoxicólico (UDCA), ácido cólico, ácido desidrocólico, ácido desoxicólico, ácido glucólico, ácido glicólico, ácido glicodesoxicólico, ácido taurocólico, ácido taurodesoxicólico, tauro-24,25-di-hidro-fusidato de sódio e glicodi-hidrofusidato de sódio. Os ácidos graxos adequados incluem ácido araquidônico, ácido undecanoico, ácido oleico, ácido láurico, ácido caprílico, ácido cáprico, ácido mirístico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido linoleico, ácido linolênico, dicaprato, tricaprato, mono-oleína, dilaurina, 1-monocaprato de glicerila, 1-dodecilazacicloheptan-2-ona, uma acilcarnitina, uma acilcolina, ou um monoglicerídeo, um diglicerídeo ou um sal farmaceuticamente aceitável disso (por exemplo, sódio). Em algumas modalidades, são usadas as combinações de intensificadores de penetração, por exemplo, ácidos graxos/sais em combinação a ácidos biliares/sais. Uma combinação exemplificadora é o sal de sódio de ácido láurico, ácido cáprico e UDCA. Os intensificadores de penetração adicionais incluem éter polioxietileno-9-laurílico, éter polioxietileno-20-cetílico. Os DsRNAs apresentados na invenção podem ser aplicados oralmente, sob a forma granular incluindo partículas secas aspergidas, ou complexadas para formar micro ou nanopartículas. Os agentes de formação de complexo de DsRNA incluem poliaminoácidos; poli-iminas; poliacrilatos; polialquilacrilatos, polioxetanos, polialquilcianoacrilatos; gelatinas cationizadas, albuminas, amidos, acrilatos, polietilenoglicóis (PEG) e amidos; polialquilcianoacrilatos; poliiminas derivadas de DEAE, polulanos, celulosas e amidos. Os agentes de formação de complexos adequados incluem quitosana, N-trimetilquitosana, poli-L-lisina, poli-histidina, poliornitina, poliesperminas, protamina, polivinilpiridina, politiodietilaminometil-etileno P(TDAE), poliaminoestireno (por exemplo, p-amino), poli(metilcianoacrilato), poli(etilcianoacrilato), poli(butilcianoacrilato), po-

li(isobutilcianoacrilato), poli(isohexilcianoacrilato), DEAE-metacrilato, DEAE-hexilacrilato, DEAE-acrilamida, DEAE-albumina e DEAE-dextrano, polimetilacrilato, poli-hexilacrilato, poli(ácido D,L-lático), poli(ácido DL-lático-co-glicólico (PLGA), alginato, e polietilenoglicol (PEG). As formulações orais para dsRNAs e sua preparação são descritas detalhadamente na Patente Nº U.S. 6.887.906, na Publicação Nº U.S. 20030027780 e na Patente Nº U.S. 6.747.014, cada uma aqui incorporada a título de referência.

[000249] As composições e as formulações para administração parenteral, intraparenquimal (no cérebro), intratecal, intraventricular ou intra-hepática podem incluir soluções aquosas estéreis que também podem conter tampões, diluentes e outros aditivos adequados como, mas não se limitando a, intensificadores de penetração, compostos veículos e outros excipientes ou veículos farmacêuticamente aceitáveis.

[000250] As composições farmacêuticas da presente invenção incluem, mas não se limitam a, soluções, emulsões e formulações contendo lipossoma. Essas composições podem ser geradas a partir de uma variedade de componentes que incluem, mas não se limitam a, líquidos pré-formados, sólidos autoemulsificantes e semissólidos autoemulsificantes. São particularmente preferenciais as formulações que direcionam o fígado durante o tratamento de distúrbios hepáticos como carcinoma hepático.

[000251] As formulações farmacêuticas da presente invenção, que podem ser apresentadas de modo conveniente sob forma de dosagem unitária, podem ser preparadas de acordo com técnicas convencionais bem conhecidas na indústria farmacêutica. Tais técnicas incluem a etapa de colocar em associação os ingredientes ativos com o(s) veículo(s) ou excipiente(s) farmacêutico(s). Em geral, as formulações são preparadas ao colocar uniforme e intimamente em associação os ingredientes ativos com veículos líquidos ou veículos sólidos finamente

divididos, ou ambos, e, então, se for necessário, conformar o produto.

[000252] As composições da presente invenção podem ser formuladas sob qualquer uma de muitas formas possíveis de dosagem como, mas não se limitando a, tabletes, cápsulas, cápsulas em gel, xaropes líquidos, géis macios, supositórios e enemas. As composições da presente invenção também podem ser formuladas como suspensões em meio aquoso, não aquoso ou misturados. As suspensões aquosas podem conter adicionalmente substâncias que aumentam a viscosidade da suspensão incluindo, por exemplo, carboximetilcelulose sódica, sorbitol e/ou dextrano. A suspensão também pode conter estabilizantes.

Formulações Adicionais

Emulsões

[000253] As composições da presente invenção podem ser preparadas e formuladas como emulsões. As emulsões são tipicamente sistemas heterogêneos de um líquido dispersado em outro sob a forma de gotículas que excedem usualmente 0,1 μm de diâmetro (consulte, por exemplo, Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., e Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8ª ed.), Nova York, NY; Idson, em Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger e Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nova York, N.Y., volume 1, página 199; Rosoff, em Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger e Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nova York, N.Y., Volume 1, página 245; Block em Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger e Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nova York, N.Y., volume 2, página 335; Higuchi *et al.*, em Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1985, página 301). Com frequência, as emulsões são sistemas bifásicos que compreendem duas fases líquidas imiscíveis intimamente misturadas e dispersadas entre si. Em geral, as emulsões

podem ser de variedade de água em óleo (w/o) ou de óleo em água (o/w). Quando uma fase aquosa é finamente dividida em e dispersada como pequenas gotículas em uma fase oleosa volumosa, a composição resultante é denominada uma emulsão a água em óleo (w/o). Alternativamente, quando uma fase oleosa é finamente dividida em e dispersada como pequenas gotículas em uma fase aquosa volumosa, a composição resultante é denominada uma emulsão de óleo em água (o/w). As emulsões podem conter componentes adicionais além das fases dispersadas, e o fármaco ativo que pode estar presente como uma solução na fase aquosa, na fase oleosa ou como uma fase separada. Os excipientes farmacêuticos como emulsificantes, estabilizantes, corantes e antioxidantes também pode estar presentes em emulsões conforme for necessário. As emulsões farmacêuticas também podem ser múltiplas emulsões que são compostas de mais de duas fases como, por exemplo, no caso de emulsões de óleo em água em óleo (o/w/o) e água em óleo em água (w/o/w). Tais formulações complexas fornecem, com frequência, certas vantagens que simples emulsões binárias não fornecem. Múltiplas emulsões nas quais gotículas de óleo individuais de uma emulsão de o/w confinam pequenas gotículas de água constituem uma emulsão de w/o/w. Da mesma forma, um sistema de gotículas de óleo confinadas em glóbulos de água estabilizados em uma fase contínua oleosa fornece uma emulsão de o/w/o.

[000254] As emulsões são caracterizadas por pouca ou nenhuma estabilidade termodinâmica. Com frequência, a fase dispersada ou descontínua da emulsão é bem dispersada na fase externa ou contínua e mantida sob essa forma através dos meios de emulsificantes ou da viscosidade da formulação. Qualquer uma das fases da emulsão pode ser um semissólido ou um sólido, como é o caso de cremes ou bases de pomada similar à emulsão. Outros meios de estabilização de emulsões implicam no uso de emulsificantes que podem ser incorpo-

rados a qualquer uma das fases da emulsão. Os emulsificantes podem ser amplamente classificados em quatro categorias: tensoativos sintéticos, emulsificantes de ocorrência natural, bases de absorção e sólidos finamente dispersados (consulte, por exemplo, Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., e Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), Nova York, NY; Idson, em Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger e Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nova York, N.Y., volume 1, página 199).

[000255] Os tensoativos sintéticos, também conhecidos como agentes ativos de superfície, encontram ampla aplicabilidade na formulação de emulsões e foram examinados na literatura (consulte, por exemplo, Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., e Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), Nova York, NY; Rieger, em Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger e Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nova York, N.Y., volume 1, página 285; Idson, em Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger e Banker (Eds.), Marcel Dekker, Inc., Nova York, N.Y., 1988, volume 1, página 199). Os tensoativos são tipicamente anfifílicos e compreendem uma porção hidrofílica e uma hidrofóbica. A razão entre a natureza hidrofílica e a hidrofóbica do tensoativo foi denominada equilíbrio entre equilíbrio hidrófilo/lipófilo (HLB) e é uma valiosa ferramenta na categorização e na seleção de tensoativos na preparação de formulações. Os tensoativos podem ser classificados em diferentes classes com base na natureza do grupo hidrofílico: não iônico, aniônico, catiônico e anfotérico (consulte, por exemplo, Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., e Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), Nova York, NY; Rieger, em Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger e Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc.,

Nova York, N.Y., volume 1, página 285).

[000256] Os emulsificantes de ocorrência natural usados em formulações de emulsão incluem lanolina, cera de abelha, fosfatidas, lecitina e acácia. As bases de absorção possuem propriedades hidrofílicas de tal modo que as mesmas possam absorver água a fim de formar emulsões de w/o restando ainda suas consistências semissólidas, como lanolina anidro e vaselina hidrofílica. Os sólidos finamente divididos também foram usados como emulsificantes satisfatórios especialmente em combinação a tensoativos e em várias preparações. Os mesmos incluem sólidos inorgânicos polares, como hidróxidos de metal pesado, argilas que não intumescem como bentonita, atapulgita, hectorita, caulina, montmorilonita, silicato de alumínio coloidal e silicato de alumínio e magnésio coloidal, pigmentos e sólidos não polares como triestearato de glicerila ou carbono.

[000257] Uma grande variedade de materiais não emulsificantes também está incluída em formulações de emulsão e contribui para as propriedades de emulsões. Essas incluem gorduras, óleos, ceras, ácidos graxos, álcoois graxos, ésteres graxos, umectantes, coloides hidrofílicos, conservantes e antioxidantes (Block, em *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger e Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nova York, N.Y., volume 1, página 335; Idson, em *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger e Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nova York, N.Y., volume 1, página 199).

[000258] Os hidrocoloides ou coloides hidrofílicos incluem gomas de ocorrência natural e polímeros sintéticos como polissacarídeos (por exemplo, acácia, ágar, ácido alginico, carragena, goma guar, goma caraia e tragacanto), derivados de celulose (por exemplo, carboximetilcelulose e carboxipropilcelulose), e polímeros sintéticos (por exemplo, carbômeros, éteres de celulose e polímeros de carboxivinila). Esses dispersam ou intumescem em água a fim de formar soluções co-

loidais que estabilizam emulsões através da formação de fortes filmes interfaciais ao redor das gotículas de fase dispersa e através do aumento da viscosidade da fase externa.

[000259] Visto que as emulsões contêm, com frequência, inúmeros ingredientes como carboidratos, proteínas, esteróis e fosfatidas que podem suportar prontamente o crescimento de micróbios, essas formulações incorporam, com frequência, conservantes. Os conservantes comumente usados incluídos em formulações de emulsão incluem parabeno de metila, parabeno de propila, sais de amônio quaternário, cloreto de benzalcônio, ésteres de ácido p-hidroxibenzoico, e ácido bórico. Os antioxidantes também são comumente adicionados a formulações de emulsão a fim de evitar a deterioração da formulação. Os antioxidantes usados podem ser sequestrantes de radical livre como tocoferóis, galatos de alquila, hidroxianisol butilado, hidroxitolueno butilado ou agentes de redução como ácido ascórbico e metabissulfito de sódio, e sinergistas antioxidantes como ácido cítrico, ácido tartárico e lecitina.

[000260] A aplicação de formulações de emulsão através de rotas dermatológicas, orais e parenterais e os métodos para a sua fabricação foram analisados na literatura (consulte, por exemplo, Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., e Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8^a ed.), Nova York, NY; Idson, em Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger e Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nova York, N.Y., volume 1, página 199). As formulações de emulsão para aplicação oral foram amplamente usadas devido à facilidade de formulação, bem como a eficácia de um ponto de vista de absorção e biodisponibilidade (consulte, por exemplo, Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., e Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8^a ed.), Nova York, NY; Rosoff, em

Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger e Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nova York, N.Y., volume 1, página 245; Idson, em Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger e Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nova York, N.Y., volume 1, página 199). Os laxantes à base de óleo mineral, as vitaminas solúveis em óleo e as preparações nutritivas altamente gordurosas estão entre os materiais que foram comumente administrados oralmente como emulsões de o/w.

[000261] Em uma modalidade da presente invenção, as composições de iRNAs e os ácidos nucleicos são formulados como microemulsões. Uma microemulsão pode ser definida como um sistema de água, óleo e anfifila que é uma única solução termodinamicamente estável e opticamente isotrópica (consulte, por exemplo, Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., e Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8^a ed.), Nova York, NY; Rosoff, em Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger e Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nova York, N.Y., volume 1, página 245). Tipicamente, as microemulsões são sistemas que são preparados ao dispersar, em primeiro lugar, em óleo em uma solução de tensoativo aquosa e, então, mediante adição de uma quantidade suficiente de um quarto componente, em geral, um álcool de comprimento de cadeia intermediário para formar um sistema transparente. Portanto, as microemulsões também foram descritas como dispersões termodinamicamente estáveis, isotropicamente límpidas de dois líquidos imiscíveis que são estabilizados por filmes interfaciais de moléculas de superfície ativa (Leung e Shah, em: Controlled Release of Drugs: Polymers and Aggregate Systems, Rosoff, M., Ed., 1989, VCH Publishers, Nova York, páginas 185 a 215). As microemulsões são comumente preparadas através de uma combinação de três a cinco componentes que incluem óleo, água, tensoativo, cotensoativo e eletrólito.

Seja a microemulsão do tipo água em óleo (w/o) ou de óleo em água (o/w) depende das propriedades do óleo e do tensoativo usados e da estrutura e do empacotamento geométrico das cabeças polares e das caudas de hidrocarboneto das moléculas de tensoativo (Schott, em Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1985, página 271).

[000262] A abordagem fenomenológica que utiliza diagramas de fase foi extensivamente estudadas e rendeu um conhecimento compreensivo, para um versado na técnica, de como formular microemulsões (consulte, por exemplo, Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., e Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8ª ed.), Nova York, NY; Rosoff, em Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger e Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nova York, N.Y., volume 1, página 245; Block, em Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger e Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nova York, N.Y., volume 1, página 335). Em comparação a emulsões convencionais, as microemulsões oferecem a vantagem de solubilização de fármacos insolúveis em água em uma formulação de gotículas termodinamicamente estáveis que são formadas espontaneamente.

[000263] Os tensoativos usados na preparação de microemulsões incluem, mas não se limitam a, tensoativos iônicos, tensoativos não iônicos, Brij 96, polioxietileno oleil éteres, ésteres de poliglicerol de ácido graxo, tetraglicerol monolaurato (ML310), tetraglicerol mono-oleato (MO310), hexaglicerol mono-oleato (PO310), hexaglicerol pentaoleato (PO500), decaglicerol monocaprato (MCA750), decaglicerol mono-oleato (MO750), decaglicerol sequioleato (SO750), decaglicerol decaoleato (DAO750), sozinho ou em combinação a cotensoativos. O cotensoativo, usualmente um álcool de cadeia curta como etanol, 1-propanol e 1-butanol, serve para aumentar a fluidez interfacial median-

te a penetração no filme tensoativo e, conseqüentemente, mediante a criação de um filme desordenado devido ao espaço vazio entre as moléculas de tensoativo. No entanto, as microemulsões podem ser preparadas sem o uso de cotensoativos e os sistemas de microemulsão autostimulantes livres de álcool são conhecidos na técnica. A fase aquosa pode ser, tipicamente, mas não se limita a, água, uma solução aquosa do fármaco, glicerol, PEG300, PEG400, poligliceróis, propileno glicóis, e derivados de etileno glicol. A fase oleosa pode incluir, mas não se limita a, materiais como Captex 300, Captex 355, Capmul MCM, ésteres de ácido graxo, mono, di, e triglicerídeos de cadeia média (C8-C12), ésteres de ácido graxo de glicerila polioxietilada, álcoois graxos, glicerídeos poliglicolizados, glicerídeos C8 a C10 poliglicolizados saturados, óleos vegetais e óleo de silicone.

[000264] As microemulsões são particularmente de interesse do ponto de vista de solubilização de fármaco e da absorção intensificada de fármacos. Foi proposto que as microemulsões à base de lipídeos (o/w e w/o) intensificam a biodisponibilidade oral de fármacos, incluindo peptídeos (consulte, por exemplo, Patentes N^{os} U.S. 6.191.105; 7.063.860; 7.070.802; 7.157.099; Constantinides *et al.*, Pharmaceutical Research, 1994, 11, 1.385 a 1.390; Ritschel, Meth. Find. Exp. Clin. Pharmacol., 1993, 13, 205). As microemulsões proporcionam vantagens de solubilização aprimorada de fármaco, proteção de fármaco contra hidrólise enzimática, intensificação possível de absorção de fármaco devido a alterações induzidas por tensoativo em permeabilidade e fluidez de membrana, facilidade de preparação, facilidade de administração oral sobre formas de dosagem sólidas, potência clínica aprimorada e toxicidade diminuída (consulte, por exemplo, as Patentes N^{os} U.S. 6.191.105; 7.063.860; 7.070.802; 7.157.099; Constantinides *et al.*, Pharmaceutical Research, 1994, 11, 1385; Ho *et al.*, J. Pharm. Sci., 1996, 85, 138 a 143). Com frequência, as microemulsões podem

formar espontaneamente quando seus componentes são colocados juntamente à temperatura ambiente. Isso pode ser particularmente vantajoso durante a formulação de fármacos termolábeis, peptídeos ou iRNAs. As microemulsões também foram eficazes na aplicação transdérmica de componentes ativos em aplicações cosméticas e farmacêuticas. Espera-se que as composições de microemulsão e formulações da presente invenção facilitem a absorção sistêmica aumentada de iRNAs e de ácidos nucleicos do trato gastrointestinal, bem como aprimorem a admissão celular local de iRNAs e de ácidos nucleicos.

[000265] As microemulsões da presente invenção também podem conter componentes adicionais e aditivos como sorbitano monostearato (Grill 3), Labrasol, e os intensificadores de penetração para aprimorar as propriedades da formulação e para intensificar a absorção dos iRNAs e de ácidos nucleicos da presente invenção. Os intensificadores de penetração usados nas microemulsões da presente invenção podem ser classificados como pertencentes a uma de cinco amplas categorias--tensoativos, ácidos graxos, sais biliares, agentes quelantes e não tensoativos sem quelante (Lee *et al.*, Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1991, página 92). Cada uma dessas classes foi discutida acima.

Intensificadores de Penetração

[000266] Em uma modalidade, a presente invenção emprega vários intensificadores de penetração para efetuar a aplicação de ácidos nucleicos, particularmente iRNAs, à pele de animais. A maioria dos fármacos está presente na solução sob as formas ionizada e não ionizada. No entanto, usualmente, apenas fármacos lipofílicos ou solúveis lipídicos cruzam prontamente membranas celulares. Foi verificado que mesmo fármacos não lipofílicos podem cruzar membranas celulares se a membrana a ser cruzada for tratada com um intensificador de penetração. Além de ajudar na difusão de fármacos não lipofílicos ao longo

de membranas celulares, os intensificadores de penetração também intensificam a permeabilidade de fármacos lipofílicos.

[000267] Os intensificadores de penetração podem ser classificados como pertencentes a uma de cinco amplas categorias, isto é, tensoativos, ácidos graxos, sais biliares, agentes quelantes, e não tensoativos sem quelante (consulte, por exemplo, Malmsten, M. *Surfactants and polymers in drug delivery*, Informa Health Care, Nova York, NY, 2002; Lee *et al.*, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, página 92). Cada uma das classes mencionadas acima de intensificadores de penetração é descrita abaixo em maiores detalhes.

[000268] Tensoativos: em conexão com a presente invenção, os tensoativos (ou "agentes de superfície ativa") são entidades químicas que, quando dissolvidas em uma solução aquosa, reduzem a tensão superficial da solução ou a tensão interfacial entre a solução aquosa e outro líquido, com o resultado que a absorção de iRNAs através da mucosa é intensificada. Além de sais biliares e de ácidos graxos, esses intensificadores de penetração incluem, por exemplo, lauril sulfato de sódio, éter polioxietileno-9-laurílico e éter de polioxietileno-20-cetila) (consulte, por exemplo, Malmsten, M. *Surfactants and polymers in drug delivery*, Informa Health Care, Nova York, NY, 2002; Lee *et al.*, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, página 92); e emulsões perfluoroquímicas, como FC-43. Takahashi *et al.*, *J. Pharm. Pharmacol.*, 1988, 40, 252).

[000269] Ácidos graxos: vários ácidos graxos e seus derivados que atuam como intensificadores de penetração incluem, por exemplo, ácido oleico, ácido láurico, ácido cáprico (ácido n-decanoico), ácido mirístico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido linoleico, ácido linolênico, dicaprato, tricaprato, monooleína (1-monooleoil-rac-glicerol), dilaurina, ácido caprilíco, ácido araquidônico, glicerol 1-monocaprato, 1-dodecilazaciclo-heptan-2-ona, acilcarnitinas, acilcolinas, ésteres de

alquila C₁₋₂₀ disso (por exemplo, metila, isopropila e t-butila), e mono e diglicerídeos disso (isto é, oleato, laurato, caprato, miristato, palmitato, estearato, linoleato, *etc.*) (consulte, por exemplo, Touitou, E., *et al.* Enhancement in Drug Delivery, CRC Press, Danvers, MA, 2006; Lee *et al.*, Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1991, página 92; Muranishi, Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1990, 7, 1 a 33; El Hariri *et al.*, J. Pharm. Pharmacol., 1992, 44, 651 a 654).

[000270] Sais biliares: a função fisiológica da bile inclui a facilitação da dispersão e da absorção de lipídeos e de vitaminas solúveis em gordura (consulte, por exemplo, Malmsten, M. Surfactants and polymers in drug delivery, Informa Health Care, Nova York, NY, 2002; Brunton, Capítulo 38 em: Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 9ª Ed., Hardman *et al.* Eds., McGraw-Hill, Nova York, 1996, páginas . 934 a 935). Vários sais biliares naturais, e seus derivados sintéticos, atuam como intensificadores de penetração. Dessa forma, o termo "sais biliares" inclui qualquer um dos componentes de ocorrência natural da bile bem como qualquer um de seus derivados sintéticos. Os sais biliares adequados incluem, por exemplo, ácido cólico (ou seu sal de sódio farmaceuticamente aceitável, colato de sódio), ácido desidrocólico (desidrocolato de sódio), ácido desoxicólico (desoxicolato de sódio), ácido glucólico (glucolato de sódio), ácido glicólico (glicocolato de sódio), ácido glicodesoxicólico (glicodesoxicolato de sódio), ácido taurocólico (taurocolato de sódio), ácido taurodesoxicólico (taurodesoxicolato de sódio), ácido quenodesoxicólico (queno-desoxicolato de sódio), ácido ursodesoxicólico (UDCA), tauro-24,25-dihidro-fusidato de sódio (STDHF), glicodi-hidrofusidato de sódio e éter polioxietileno-9-laurílico (POE) (consulte, por exemplo, Malmsten, M. Surfactants and polymers in drug delivery, Informa Health Care, Nova York, NY, 2002; Lee *et al.*, Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier

Systems, 1991, página 92; Swinyard, Capítulo 39 Em: Remington's Pharmaceutical Sciences, 18^a Ed., Gennaro, ed., Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1990, páginas 782 a 783; Muranishi, Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1990, 7, 1 a 33; Yamamoto *et al.*, J. Pharm. Exp. Ther., 1992, 263, 25; Yamashita *et al.*, J. Pharm. Sci., 1990, 79, 579 a 583).

[000271] Agentes Quelantes: os agentes quelantes, conforme usado em conexão com a presente invenção, podem ser definidos como compostos que removem íons metálicos da solução mediante a formação de complexos com o mesmo, com o resultado que a absorção de iRNAs através da mucosa é intensificada. Em relação a seu uso como intensificadores de penetração na presente invenção, os agentes quelantes têm a vantagem adicionada de servir também como inibidores de DNase, visto que a maioria das DNA nucleases caracterizadas exigem um íon de metal bivalente para catálise e são, dessa forma, inibidas por agentes quelantes (Jarrett, J. Chromatogr., 1993, 618, 315 a 339). Os agentes quelantes adequados incluem, mas não se limitam a etilenodiaminatetraacetato dissódico (EDTA), ácido cítrico, salicilatos (por exemplo, salicilato de sódio, 5-metoxisalicilato e homovanilato), derivados de N-acila de colágeno, lauret-9 e derivados de N-amino acila de β -dicetonas (enaminas) (consulte, por exemplo, Katdare, A. *et al.*, Excipient development for pharmaceutical, biotechnology, and drug delivery, CRC Press, Danvers, MA, 2006; Lee *et al.*, Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1991, página 92; Muranishi, Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1990, 7, 1 a 33; Buur *et al.*, J. Control Rel., 1990, 14, 43 a 51).

[000272] Não tensoativos sem quelante: conforme usado no presente documento, os compostos de intensificação de não tensoativo sem quelante podem ser definidos como compostos que demonstram atividade insignificativas como agentes quelantes ou como tensoativos,

mas que, apesar de tudo, intensificam a absorção de iRNAs através da mucosa alimentar (consulte, por exemplo, Muranishi, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1990, 7, 1 a 33). Essa classe de intensificadores de penetração inclui, por exemplo, ureias cíclicas insaturadas, derivados de 1-alquila e 1-alquenilazaciclo-alcanona (Lee *et al.*, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, página 92); e agentes anti-inflamatórios não esteroidais como diclofenac sódico, indometacina e fenilbutazona (Yamashita *et al.*, *J. Pharm. Pharmacol.*, 1987, 39, 621 a 626).

[000273] Os agentes que intensificam a admissão de iRNAs no nível celular também podem ser adicionados às composições farmacêuticas e a outras composições da presente invenção. Por exemplo, os lipídeos catiônicos, como lipofectina (Junichi *et al.*, Patente N^o U.S. 5.705.188), derivados de glicerol catiônico, e moléculas policatiônicas, como polilisina (Lollo *et al.*, Pedido PCT WO 97/30731), também são conhecidos por intensificarem a admissão celular de dsRNAs. Exemplos de reagentes de transfecção comercialmente disponíveis incluem, por exemplo, LipofectaminaTM (Invitrogen; Carlsbad, CA), Lipofectamina 2000TM (Invitrogen; Carlsbad, CA), 293fectinTM (Invitrogen; Carlsbad, CA), CellfectinTM (Invitrogen; Carlsbad, CA), DMRIE-CTM (Invitrogen; Carlsbad, CA), FreeStyleTM MAX (Invitrogen; Carlsbad, CA), LipofectaminaTM 2000 CD (Invitrogen; Carlsbad, CA), LipofectaminaTM (Invitrogen; Carlsbad, CA), RNAiMAX (Invitrogen; Carlsbad, CA), OligofectaminaTM (Invitrogen; Carlsbad, CA), OptifectTM (Invitrogen; Carlsbad, CA), Reagente de Transfecção X-tremeGENE Q2 (Roche; Grenzachstrasse, Suíça), Reagente de Transfecção DOTAP Liposomal (Grenzacherstrasse, Suíça), Reagente de Transfecção DOSPER Liposomal (Grenzacherstrasse, Suíça), ou Eugene (Grenzacherstrasse, Suíça), Reagente Transfectam® (Promega; Madison, WI), Reagente de Transfecção TransFastTM (Promega; Madison, WI), Reagente

Tfx™-20 (Promega; Madison, WI), Reagente Tfx™-50 (Promega; Madison, WI), DreamFect™ (OZ Biosciences; Marseille, França), Eco-Transfect (OZ Biosciences; Marseille, França), Reagente de Transfecção TransPass^a D1 (New England Biolabs; Ipswich, MA, EUA), LyoVec™/LipoGen™ (Invivogen; San Diego, CA, EUA), Reagente de Transfecção PerFectin (Genlantis; San Diego, CA, EUA), Reagente de Transfecção NeuroPORTER (Genlantis; San Diego, CA, EUA), reagente de Transfecção GenePORTER (Genlantis; San Diego, CA, EUA), reagente de Transfecção GenePORTER 2 (Genlantis; San Diego, CA, EUA), Reagente de Transfecção Cytofectin (Genlantis; San Diego, CA, EUA), Reagente de Transfecção BaculoPORTER (Genlantis; San Diego, CA, EUA), Reagente de transfecção TroganPORTER™ (Genlantis; San Diego, CA, EUA), RiboFect (Bioline; Taunton, MA, EUA), PlasFect (Bioline; Taunton, MA, EUA), UniFECTOR (B-Bridge International; Mountain View, CA, EUA), SureFECTOR (B-Bridge International; Mountain View, CA, EUA), ou HiFect™ (B-Bridge International; Mountain View, CA, EUA), entre outros.

[000274] Outros agentes podem ser utilizados para intensificar a penetração dos ácidos nucleicos administrados, incluindo glicóis como etileno glicol e propileno glicol, pirroles como 2-pirrol, azonas, e terpenos como limoneno e mentona.

Veículos

[000275] Certas composições da presente invenção também incorporam compostos veículos na formulação. Conforme usado no presente documento, "composto veículo" ou "veículo" pode se referir a um ácido nucleico, ou análogo do mesmo, que é inerte (isto é, não possui atividade biológica por si mesmo), mas é reconhecido como um ácido nucleico por processos *in vivo* que reduzem a biodisponibilidade de um ácido nucleico que tem atividade biológica, por exemplo, mediante a degradação do ácido nucleico biologicamente ativo ou da promoção se

sua remoção de circulação. A coadministração de um ácido nucleico e de um composto veículo, tipicamente com um excesso da última substância, pode resultar em uma redução substancial da quantidade de ácido nucleico recuperada no fígado, rins ou outros reservatórios extracirculatórios, presumidamente devido à competição entre o veículo composto e o ácido nucleico para um receptor comum. Por exemplo, a recuperação de um dsRNA parcialmente fosforotioato em tecido hepático pode ser reduzida quando o mesmo é coadministrado com ácido poli-inosínico, sulfato de dextrano, ácido policitídico ou ácido 4-acetamido-4'isotiociano-estilbeno-2,2'-dissulfônico (Miyao *et al.*, DsRNA Res. Dev., 1995, 5, 115 a 121; Takakura *et al.*, DsRNA & Nucl. Acid Drug Dev., 1996, 6, 177 a 183).

Excipientes

[000276] Em contraste a um composto veículo, um "veículo farmacêutico" ou "excipiente" é um solvente farmacêuticamente aceitável, agentes de suspensão ou qualquer outro veículo farmacologicamente inerte para a aplicação de um ou mais ácidos nucleicos em um animal. O excipiente pode ser líquido ou sólido e é selecionado, com a maneira planejada de administração em mente, de modo a fornecer o volume, consistência desejada, *etc.*, quando combinado a um ácido nucleico e a outros componentes de uma dada composição farmacêutica. Os típicos veículos farmacêuticos incluem, mas não se limitam a, agentes de ligação (por exemplo, amido de milho pré-gelatinizado, polivinilpirrolidona ou hidroxipropil metilcelulose, *etc.*); cargas (por exemplo, lactose e outros açúcares, celulose microcristalina, pectina, gelatina, sulfato de cálcio, etil celulose, poliacrilatos ou fosfato de cálcio e hidrogênio, *etc.*); lubrificantes (por exemplo, estearato de magnésio, talco, sílica, dióxido de silício coloidal, ácido esteárico, estearatos metálicos, óleos vegetais hidrogenados, amido de milho, polietileno glicóis, benzoato de sódio, acetato de sódio, *etc.*); desintegrantes (por

exemplo, amido, glicolato de amido sódico, *etc.*); e agentes umectantes (por exemplo, lauril sulfato de sódio, *etc.*).

[000277] Os excipientes orgânicos ou inorgânicos farmacêuticamente aceitáveis adequados para a administração não parenteral que não reagem de modo não prejudicial com ácidos nucleicos também podem ser usados para formular as composições da presente invenção. OS veículos farmacêuticamente aceitáveis adequados incluem, mas não se limitam a, água, soluções salinas, álcoois, polietileno glicóis, gelatina, lactose, amilose, estearato de magnésio, talco, ácido silícico, parafina viscosa, hidroximetilcelulose, polivinilpirrolidona e similares.

[000278] As formulações para a administração tópica de ácidos nucleicos podem incluir soluções aquosas estéreis e não estéreis soluções não aquosas em solventes comuns como álcoois, ou soluções dos ácidos nucleicos em bases oleosas líquidas ou sólidas. As soluções também podem conter tampões, diluentes e outros aditivos adequados. Os excipientes orgânicos ou inorgânicos farmacêuticamente aceitáveis adequados para a administração não parenteral que não reagem de modo prejudicial com ácidos nucleicos podem ser usados.

[000279] Os excipientes farmacêuticamente aceitáveis adequados incluem, mas não se limitam a, água, soluções salinas, álcool, polietileno glicóis, gelatina, lactose, amilose, estearato de magnésio, talco, ácido silícico, parafina viscosa, hidroximetilcelulose, polivinilpirrolidona e similares.

Outros Componentes

[000280] As composições da presente invenção podem conter adicionalmente outros componentes adjuntos convencionalmente encontrados em composições farmacêuticas, em seus níveis de uso estabelecidos na técnica. Dessa forma, por exemplo, as composições podem conter materiais farmacêuticamente ativos compatíveis adicionais como, por exemplo, antipruríticos, astringentes, anestésicos locais ou

agentes anti-inflamatórios, ou podem conter materiais adicionais úteis na formulação física de várias formas de dosagem das composições da presente invenção, como corantes, agentes flavorizantes, conservantes, antioxidantes, opacificantes, agentes espessantes e estabilizantes. No entanto, tais materiais, quando adicionados, não deveriam interferir indevidamente nas atividades biológicas dos componentes das composições da presente invenção. As formulações podem ser esterilizadas e, se for desejado, misturadas a agentes auxiliares, por exemplo, lubrificantes, conservantes, estabilizantes, agentes umectantes, emulsificantes, sais para influenciar a pressão osmótica, tampões, colorantes, flavorizantes e/ou substâncias aromáticas e similares que não interagem de modo prejudicial com o(s) ácido(s) nucleico(s) da formulação.

[000281] As suspensões aquosas podem conter substâncias que aumentam a viscosidade da suspensão incluindo, por exemplo, carboximetilcelulose sódica, sorbitol e/ou dextrano. A suspensão também pode conter estabilizantes.

[000282] Em algumas modalidades, as composições farmacêuticas apresentadas na invenção incluem (a) um ou mais compostos de iRNA e (b) um ou mais agentes biológicos anticitoquina que funcionam por um mecanismo diferente de RNAi. Exemplos de tais agentes biológicos incluem, agentes biológicos que direcionam IL1 β (por exemplo, anakinra), IL6 (por exemplo, tocilizumab), ou TNF (por exemplo, etanercept, infliximab, adlimumab ou certolizumab).

[000283] A eficácia terapêutica e a toxicidade de tais compostos podem ser determinadas por procedimentos farmacêuticos padrão em culturas celulares ou animais experimentais, por exemplo, para a determinação do LD50 (a dose letal para 50% da população) e do ED50 (a dose terapeuticamente eficaz em 50% da população). A razão da dose entre os efeitos tóxicos e terapêuticos é o índice terapêutico e

pode ser expressa como a razão LD50/ED50. Os compostos que exibem altos índices terapêuticos são preferências.

[000284] Os dados obtidos a partir de ensaios de cultura celular e estudos de animais podem ser usados na formulação de uma faixa de dosagem para o uso em seres humanos. A dosagem de composições aqui apresentadas encontra-se, em geral, dentro de uma faixa de concentrações circulantes que incluem o ED50 com pouca ou nenhuma toxicidade. A dosagem pode variar dentro dessa faixa dependendo da forma de dosagem empregada e da rota de administração utilizada. Para qualquer composto usado nos métodos apresentados na invenção, a dose terapeuticamente eficaz pode ser estimada inicialmente a partir de ensaios de cultura celular. Uma dose pode ser formulada em modelos de animais para alcançar uma faixa de concentração de plasma circulante do composto ou, quando for apropriado, do produto de polipeptídeo de uma sequência alvo (por exemplo, alcançar uma concentração diminuída do polipeptídeo) que inclui o IC50 (isto é, a concentração do composto de teste que alcança uma inibição quase máxima de sintomas) conforme determinado na cultura celular. Tais informações podem ser usadas para determinar mais precisamente as doses úteis em seres humanos. Os níveis no plasma podem ser medidos, por exemplo, por cromatografia líquida de alto desempenho.

[000285] Além de sua administração, conforme discutido acima, os iRNAs aqui descritos podem ser administrados em combinação a outros agentes conhecidos eficazes no tratamento e processos patológicos mediados por expressão de TMPRSS6. Em qualquer caso, o médico que administra pode ajustar a quantidade e o tempo da administração de iRNA na base dos resultados observados com o uso de medições padrão de eficácia conhecida na técnica ou aqui descrita.

Métodos para o Tratamento de Doenças ocasionadas pela Expressão de um Gene TMPRSS6

[000286] A invenção refere-se, em particular, ao uso de um TMPRSS6 de direcionamento de iRNA e de composições contendo pelo menos um tal iRNA para o tratamento de uma doença ou distúrbio mediado por TMPRSS6. Por exemplo, é usada uma composição contendo um iRNA que direciona um gene TMPRSS6 para o tratamento de um distúrbio associado a níveis elevados de ferro, como uma talassemia, (por exemplo, β -talassemia intermediária ou α -talassemia), hemocromatose primária, hemocromatose secundária, hemocromatose juvenil severa, anemia sideroblástica, anemia hemolítica, anemia diseritropoética, ou anemia de célula falciforme. Em uma modalidade, é usado um iRNA de TMPRSS6 para tratar uma hemoglobinaopatia. O iRNAs de TMPRSS6 apresentado na invenção também pode ser usado para tratar níveis elevados de ferro devido a outras afecções, como o alcoolismo crônico.

[000287] Em talassemias, a medula óssea sintetiza quantidades insuficientes de uma cadeia de hemoglobina; isso, por sua vez, reduz a produção de células vermelhas de sangue e ocasiona anemia. Ou a cadeia α ou a β pode ser afetada, mas β talassemias são mais comuns; neonatos são saudáveis devido ao fato de que seus corpos ainda produzem HbF, que não tem cadeias β ; durante os primeiros meses de vida, a medula óssea muda para a produção de HbA, e os sintomas começam a aparecer.

[000288] As β -talassemias resultam da mutação com alelos sem expressão (β^0) ou com pouca expressão (β^+) do gene HBB. A severidade de β -talassemias varia dependendo do genótipo, e inclui β -talassemia leve/traço (β/β^0 ou β/β^+), β -talassemia intermediária (β^0/β^+) e β -talassemia intensa (β^0/β^0 ou β^+/β^+).

[000289] A talassemia intermediária (TI) se apresenta tipicamente com pouca hemólise, embora a β -talassemia intensa (TM) seja tipicamente acompanhada de hemólise abundante que ocasiona, por exem-

plo, anemia e esplenomegalia; e eritropoiese altamente ineficaz, que ocasiona deslocamento de medula óssea (mudanças esqueléticas, oteopenia), síntese de eritropoietina aumentada, hepato-esplenomegalia, consumo de hematínicos (anemia megablástica), e teor elevado de ácido úrico no sangue. Os iRNAs apresentados na invenção, por exemplo, iRNAs de TMPRSS6, são mais bem adequados para o tratamento da sobrecarga de ferro que acompanha tipicamente a talassemia que é mais similar à TI (por exemplo, para o tratamento de indivíduos que têm um genótipo β^0/β^+ , β/β^0 ou β/β^+).

[000290] Os sintomas de β -talassemias também incluem, por exemplo, a complicação devido à terapia, por exemplo, sobrecarga de ferro, que ocasiona endocrinopatia, fibrose hepática e fibrose cardíaca. A administração de um agente de iRNA que direciona TMPRSS6 pode ser eficaz para o tratamento de um ou mais desses sintomas.

[000291] As α -talassemias resultam da mutação com alelos sem expressão (α^0) ou com pouca expressão (α^+) dos genes HBA1 ou HBA2. A severidade de α -talassemias varia dependendo do genótipo, e inclui talassemia traço ($-\alpha/\alpha\alpha$), Hb Bart e Hydrops fetalis (α^0/α^0), α -Talasemia leve ($--/\alpha\alpha$), ($-\alpha/-\alpha$), e doença HbH ($--/-\alpha$). As cadeias de α -globina inferiores são produzidas, resultando em um excesso de cadeias β em adultos e excesso de cadeias γ em neonatos. O excesso de cadeias β forma tetrâmeros instáveis (denominados Hemoglobina H ou HbH de 4 cadeias beta), que têm curvas de dissociação de oxigênio anormais. A administração de um agente de iRNA que direciona TMPRSS6 pode ser eficaz para o tratamento de sobrecarga de ferro em um indivíduo que tem uma α -talassemia.

[000292] Os sintomas de hemocromatose incluem, por exemplo, dor abdominal, dor nas articulações, fadiga, falta de energia, fraqueza, escurecimento da pele (denominada como frequência como "bronzeamento"), e perda de pelos do corpo. A administração de um agente de

iRNA que direciona TMPRSS6 pode ser eficaz pra o tratamento de um ou mais desses sintomas.

[000293] Outros sintomas associados à sobrecarga de ferro incluem risco aumentado para doença hepática (cirrose, câncer), ataque cardíaco ou falha no coração, diabetes mellitus, osteoartrite, osteoporose, síndrome metabólica, hipotireoidismo, hipogonadismo e, em alguns casos, morte prematura. A gestão inapropriada de ferro que resulta na sobrecarga também pode acelerar tais doenças neurodegenerativas como Alzheimer, Parkinson de início precoce, Huntington, epilepsia e esclerose múltipla. A administração de um iRNA que direciona TMPRSS6, por exemplo, um iRNA descrito nas Tabelas 2, 3 ou 4 pode tratar um ou mais desses sintomas, ou evitar o desenvolvimento ou a progressão de uma doença ou distúrbio que é agravado pelos níveis aumentados de ferro.

[000294] A invenção refere-se, ainda, ao uso de um iRNA ou a uma composição farmacêutica disso, por exemplo, para o tratamento de um distúrbio associado a níveis elevados de ferro, em combinação a outros métodos farmacêuticos e/ou outros métodos terapêuticos, por exemplo, com métodos farmacêuticos e/ou métodos terapêuticos conhecidos, como, por exemplo, aqueles que são atualmente empregados para o tratamento desses distúrbios. Por exemplo, em certas modalidades, um TMPRSS6 de direcionamento de iRNA é administrado em combinação a, por exemplo, quelantes de ferro (por exemplo, desferroxamina), ácido fólico, uma transfusão de sangue, uma flebotomia, agentes para gerenciar úlceras, agentes para aumentar os níveis de hemoglobina fetal (por exemplo, hidroxiureia), agentes para controlar infecção (por exemplo, antibióticos e antivirais), agentes para tratar o estado trombótico, ou um transplante de células-tronco ou de medula óssea. Um transplante de células-tronco pode utilizar células-tronco provenientes de um cordão umbilical, como de um parente, por exem-

plo, um irmão. Os quelantes de ferro exemplificadores incluem desferroxamina, Deferasirox (Exjade), deferoprona, vitamina E, óleo de germe de trigo, tocofersolan, e indicaxantina.

[000295] O iRNA e um agente terapêutico adicional podem ser administrados na mesma composição, por exemplo, de modo parenteral, ou o agente terapêutico adicional pode ser administrado como parte de uma composição separada ou por outro método aqui descrito. A administração do iRNA de TMPRSS6 e do agente terapêutico adicional pode ser ao mesmo tempo, ou em momentos diferentes, em qualquer ordem.

[000296] A invenção apresenta um método de administração de um agente de iRNA que direciona TMPRSS6 a um paciente que tem uma doença ou distúrbio mediado por expressão de TMPRSS6, como um distúrbio associado a níveis elevados de ferro. A administração do dsRNA pode reduzir os níveis de ferro, reduzir os níveis de ferritina e/ou reduzir os níveis de saturação de transferrina. Por exemplo, a administração do dsRNA pode reduzir os níveis de ferro sérico e/ou reduzir os níveis de ferritina sérica. Os níveis de saturação de transferrina podem ser reduzidos em 5%, 10%, 15%, 20%, 25% ou mais. Os níveis de saturação de transferrina podem ser reduzidos para abaixo de 50%, abaixo de 45%, abaixo de 40%, abaixo de 35%, abaixo de 35% ou menos. A saturação de transferrina é uma medição da quantidade de ferro ligada à transferrina sérica, e corresponde à razão entre o ferro sérico e a capacidade de ligação de ferro total.

[000297] Nesse contexto, entende-se por "reduzir" uma diminuição estatisticamente significativa em tal nível. A diminuição pode ser, por exemplo, pelo menos 10%, pelo menos 20%, pelo menos 30%, pelo menos 40% ou mais, e é, de preferência, reduzida a um nível aceito dentro da faixa de normal para um indivíduo sem tal distúrbio.

[000298] A eficácia do tratamento ou da prevenção da doença pode

ser avaliada, por exemplo, medindo-se a progressão da doença, a remissão da doença, a severidade do sintoma, a redução da dor, qualidade de vida, dose de uma medicação necessária para prolongar o efeito de tratamento, o nível de um marcador de doença ou qualquer outro parâmetro mensurável apropriado para uma dada doença tratada ou direcionada para a prevenção. Está bem dentro da capacidade do versado na técnica o monitoramento da eficácia do tratamento ou prevenção medindo-se qualquer um de tais parâmetros, ou qualquer combinação de parâmetros. Por exemplo, os níveis de saturação de transferrina ou de ferritina sérica podem ser monitorados para a eficácia de um dado regime de tratamento.

[000299] Os testes de nível de ferro são realizados tipicamente em uma amostra de um sangue do paciente. Um teste de nível de ferro mede a quantidade de ferro no soro sanguíneo que é transportado pela transferrina de proteínas. Um teste TIBC (capacidade de ligação de ferro total) mede a quantidade de ferro que o sangue transportaria se a transferrina estivesse totalmente saturada. Visto que a transferrina é produzida pelo fígado, a TIBC pode ser usada para monitorar a nutrição e a função do fígado. O teste de transferrina é uma medição direta de níveis de transferrina (também denominada siderofilina) no sangue. O nível de saturação de transferrina pode ser calculado dividindo-se o nível de ferro sérico pela TIBC. O teste de ferritina mede o nível de uma proteína no sangue que armazena ferro para uso posterior pelo corpo.

[000300] Os tratamentos de iRNA aqui descritos podem ser usados para tratar indivíduos que têm níveis elevados de ferro, conforme pode ser indicado por níveis de ferro no soro, por exemplo, níveis de ferro medindo mais do que 350 µg/dl, mais do que 500 µg/dl, mais do que 1.000 µg/dl, ou mais. Em uma modalidade, os níveis elevados de ferro no soro, por exemplo, maiores do que 15, 20, 25 ou 30 mg/g de peso

seco.

[000301] Os tratamentos de iRNA aqui descritos podem ser usados para tratar indivíduos que têm níveis elevados de ferro, conforme pode ser indicado por níveis elevados de ferritina no soro, por exemplo, níveis de ferritina medindo mais do que 300 µg/l, mais do que 500 µg/l, mais do que 1.000 µg/l, mais do que 1.500 µg/l, mais do que 2.000 µg/l, mais do que 2.500 µg/l ou 3.000 µg/l, ou mais.

[000302] Os tratamentos de iRNA aqui descritos podem ser usados para tratar indivíduos que têm níveis elevados de ferro, conforme pode ser indicado por níveis elevados de transferrina no soro, por exemplo, níveis de transferrina medindo mais do que 400 mg/dl, mais do que 500 mg/dl, mais do que 1.000 mg/dl, ou mais.

[000303] Os tratamentos de iRNA aqui descritos podem ser usados para tratar indivíduos que têm níveis moderadamente elevados de ferro, conforme pode ser indicado por níveis moderadamente elevados de saturação de transferrina, por exemplo, níveis de saturação de 40%, 45% ou 50% ou mais. Além disso, o tratamento aqui descrito também pode ser usado para evitar níveis elevados de ferro em indivíduos com apenas elevações leves na saturação de transferrina. Um versado na técnica pode monitorar facilmente os níveis de saturação de transferrina em indivíduos que recebem o tratamento com iRNA conforme aqui descrito e ensaio para uma redução nos níveis de saturação de transferrina de pelo menos 5% ou 10%.

[000304] Os tratamentos de iRNA aqui descritos podem ser usados para tratar indivíduos que têm níveis elevados de ferro, conforme pode ser indicado por um valor de TIBC maior do que 400 µg/dl, maior do que 500 µg/dl ou maior do que 1.000 µg/dl, ou mais.

[000305] Em algumas modalidades, os indivíduos que necessitam do tratamento com um siRNA de TMPRSS6 têm níveis diminuídos de hematócrito, níveis diminuídos de hemoglobina, largura de distribuição

aumentada de célula vermelha de sangue, número aumentado de reticulócitos, número diminuído de células vermelhas de sangue maduras, capacidade aumentada de ligação de ferro insaturado, eritropoiese ineficaz diminuída, hematopoiese extramedular diminuída e/ou níveis de expressão de HAMP1 diminuídos.

[000306] Um paciente pode ser adicionalmente monitorado pelo ensaio de nível de açúcar no sangue (glicose) ou de nível de α fetoproteína, por ecocardiograma (por exemplo, para examinar a função do coração), eletrocardiograma (ECG) (por exemplo, para verificar a atividade elétrica do coração), testes de imageamento (como varreduras por TC, MRI e ultrassom), e teste de função hepática. O excesso de mancha por ferro e de concentrações de ferro pode ser medido em amostras de biópsia de fígado, para confirmar a extensão da lesão no fígado, por exemplo, o estágio da doença hepática.

[000307] Um tratamento ou efeito preventivo é evidente onde há uma melhora estatisticamente significativa em um ou mais parâmetros do estado da doença, ou por uma falha para piorar ou para desenvolver sintomas onde os mesmos seriam, de outro modo, antecipados. Como um exemplo, uma mudança favorável de pelo menos 10% em um parâmetro mensurável da doença e, de preferência, pelo menos 20%, 30%, 40%, 50% ou mais pode ser indicativo de um tratamento eficaz. A eficácia para um dado fármaco ou formulação de iRNA de que o fármaco também pode ser julgada com o uso de modelo de animal experimental para a dada doença conforme conhecido na técnica. Usando-se um modelo de animal experimental, a eficácia do tratamento é evidenciada quando uma redução estatisticamente significativa em um marcador ou sintoma é observada.

[000308] Alternativamente, a eficácia pode ser medida por uma redução na severidade da doença conforme determinado pelo versado na técnica de diagnose com base em uma escala de classificação de

severidade de doença clinicamente aceita.

[000309] Aos pacientes, pode ser administrada uma quantidade terapêutica de iRNA, como 0,01 mg/kg, 0,05 mg/kg, 0,1 mg/kg, 0,5 mg/kg, 1,0 mg/kg, 1,5 mg/kg, 2,0 mg/kg ou 2,5 mg/kg de dsRNA. O iRNA pode ser administrado por infusão intravenosa ao longo de um período de tempo, como durante um período de 5 minutos, 10 minutos, 15 minutos, 20 minutos ou 25 minutos. A administração é repetida, por exemplo, em uma base regular, como quinzenal (isto é, a cada duas semanas) por um mês, dois meses, três meses, quatro meses ou mais. Após um regime de tratamento inicial, os tratamentos podem ser administrados em uma base menos frequente. Por exemplo, após a administração quinzenal por três meses, a administração pode ser repetida uma vez por mês, por seis meses ou um ano ou mais. A administração do iRNA pode reduzir os níveis de TMPRSS6, por exemplo, em uma célula, tecido, sangue, urina ou outro compartimento do paciente em pelo menos 10%, pelo menos 15%, pelo menos 20%, pelo menos 25%, pelo menos 30%, pelo menos 40%, pelo menos 50%, pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 80 % ou pelo menos 90% ou mais.

[000310] Antes da administração de uma dose completa do iRNA, pode ser administrada aos pacientes uma dose menor, como uma reação de infusão a 5%, e monitorados para efeitos adversos, como reação alérgica ou piora de sintomas. Em outro exemplo, o paciente pode ser monitorado para efeitos imunoestimulatórios indesejados, como níveis de citocina aumentados (por exemplo, TNF- α ou INF- α).

[000311] Muitos distúrbios associados aos níveis elevados de ferro são hereditários. Portanto, um paciente que necessita de um iRNA de TMPRSS6 pode ser identificado observando-se um histórico familiar. Um provedor cuidados de saúde, como um médico, enfermeira ou membro da família, pode observar o histórico familiar antes da prescri-

ção ou da administração de um dsRNA de TMPRSS6. Um teste de DNA também pode ser realizado no paciente a fim de identificar uma mutação no gene TMPRSS6, antes de um dsRNA de TMPRSS6 ser administrado ao paciente. Por exemplo, o diagnóstico de hemocromatose hereditária pode ser confirmado identificando-se as duas mutações de gene de HFE (Hemocromatose) C282Y e H63D, de acordo com N^o de Acesso GenBank CAB07442.1 (GI:1890180, registro datado de 23 de outubro de 2008).

[000312] Devido aos efeitos inibitórios na expressão de TMPRSS6, uma composição de acordo com a invenção ou uma composição farmacêutica preparada a partir disso pode melhorar a qualidade de vida.

Métodos para a modulação de expressão de um gene TMPRSS6

[000313] Em ainda outro aspecto, a invenção fornece um método para a modulação (por exemplo, inibição ou ativação) da expressão de um gene TMPRSS6 em um mamífero.

[000314] Em uma modalidade, o método inclui administrar uma composição apresentada na invenção ao mamífero de modo que a expressão do gene TMPRSS6 alvo seja diminuída, tal como por uma duração estendida, por exemplo, pelo menos dois, três, quatro dias ou mais, por exemplo, uma semana, duas semanas, três semanas ou quatro semanas ou mais. O efeito do gene alvo TMPRSS6 diminuído resulta preferencialmente em uma diminuição de absorção de ferro e/ou mobilização no corpo. A absorção diminuída de ferro ou mobilização podem ser manifestadas por uma diminuição observada de níveis de ferritina de soro, soro ou níveis de ferro em fígado, e/ou níveis de saturação de transferrina de soro. Em algumas modalidades, um ou mais dos níveis de ferritina de soro, soro ou níveis de ferro em fígado ou níveis de saturação de transferrina de soro são diminuídos em pelo menos 5%, pelo menos 10%, pelo menos 15%, pelo menos 20%, pelo menos 25%, pelo menos 30%, pelo menos 40%, pelo menos 50% ou pelo

menos 60% ou mais, conforme comparado aos níveis de pré-tratamento. Em algumas modalidades, os níveis de ferritina de soro são diminuídos em pelo menos 10%, pelo menos 15%, pelo menos 20%, pelo menos 25%, pelo menos 30%, pelo menos 40%, pelo menos 50% ou pelo menos 60% ou mais, conforme comparado aos níveis de pré-tratamento.

[000315] Em outra modalidade, o método inclui administrar uma composição conforme descrito no presente documento a um mamífero de modo que a expressão do gene TMPRSS6 alvo seja aumentada em, por exemplo, pelo menos 10% comparado a um animal não tratado. Em algumas modalidades, a ativação de TMPRSS6 ocorre em uma duração estendida, por exemplo, pelo menos dois, três, quatro dias ou mais, por exemplo, uma semana, duas semanas, três semanas, quatro semanas ou mais. Sem desejar estar limitado á teoria, um iRNA pode ativar a expressão de TMPRSS6 estabilizando-se o transcrito de mRNA de TMPRSS6, interagindo com um promotor no genoma, e/ou inibindo um inibidor de expressão de TMPRSS6.

[000316] Os iRNAs úteis para os métodos e composições apresentadas na invenção especificamente os RNAs (primários ou processados) alvo do gene TMPRSS6 alvo. As composições e métodos para inibir a expressão desses genes TMPRSS6 com o uso de iRNAs podem ser preparados e realizados conforme descrito em outro lugar no presente documento.

[000317] Em uma modalidade, o método inclui administrar uma composição que contém um iRNA, em que o iRNA inclui uma sequência de nucleotídeo que é complementar a pelo menos uma parte de um transcrito de RNA do gene de TMPRSS6 do mamífero a ser tratado. Quando o organismo a ser tratado é um mamífero tal como um ser humano, a composição pode ser administrada por qualquer meio conhecido na técnica incluindo, porém, sem limitação, rotas oral, intrape-

ritoneal ou parental, incluindo administração intracraniana (por exemplo, intraventricular, intraparênquima e intratecal), intravenosa, intramuscular, subcutânea, transdérmica, por vias respiratórias (aerossol), nasal, retal e tópica (incluindo bucal e sublingual). Em determinadas modalidades, as composições são administradas por meio de infusão ou injeção intravenosa.

[000318] A menos que seja definido de outro modo, todos os termos técnicos e científicos usados no presente documento têm o mesmo significado conforme comumente compreendido por alguém de habilidade comum na técnica ao qual esta invenção pertence. Embora métodos e materiais similares ou equivalentes àqueles descritos no presente documento possam ser usados na prática ou teste dos iRNAs e métodos apresentados na invenção, métodos e materiais adequados são descritos abaixo. Todas as publicações, pedidos de patente, patentes e outras referências mencionadas no presente documento são incorporadas a título de referência em sua integridade. No caso de conflito, o presente relatório descritivo, incluindo definições, tomará controle. Adicionalmente, os materiais, métodos e exemplos são ilustrativos somente e não são destinados a ser limitativos.

EXEMPLOS

Exemplo 1. Síntese de RNA de interferência (iRNA)

Fonte de reagentes

[000319] Onde a fonte de um reagente não for especificamente dada no presente documento, tal reagente pode ser obtida a partir de qualquer fornecedor de reagentes para biologia molecular em um padrão de qualidade/pureza para aplicação na biologia molecular.

Síntese de Oligonucleotídeo

[000320] As depositantes usaram diversos diferentes métodos para gerar as moléculas de iRNA descritas no presente documento. Esse exemplo descreve uma abordagem que foi usada. O artesão de habili-

dade comum pode usar qualquer método conhecido na técnica para preparar iRNAs, conforme descrito no presente documento.

[000321] Os oligonucleotídeos são sintetizados em um sintetizador de oligopiloto de AKTA. Suporte sólido de vidro poroso controlado comercialmente disponível (dT-CPG, 500Å, Síntese primária) e RNA fosforamiditas com grupos de proteção padrão, 5'-O-dimetoxitritil N6-benzoil-2'-*t*-butildimetilsilil-adenosina-3'-O-N,N'-diisopropil-2-cianoetilfosforamidita, 5'-O-dimetoxitritil-N4-acetil-2'-*t*-butildimetilsilil-citidina-3'-O-N,N'-diisopropil-2-cianoetilfosforamidita, 5'-O-dimetoxitritil-N2--isobutril-2'-*t*-butildimetilsilil-guanosina-3'-O-N,N'-diisopropil-2-cianoetilfosforamidita e 5'-O-dimetoxitritil-2'-*t*-butildimetilsilil-uridina-3'-O-N,N'-diisopropil-2-cianoetilfosforamidita (Tecnologias de Ácido Nucleico de Perfuração) foram usados para a síntese de oligonucleotídeo. As 2'-F fosforamiditas, 5'-O-dimetoxitritil-N4-acetil-2'-fluro-citidina-3'-O-N,N'-di-isopropil-2-cianoetil-fosforamidita e 5'-O-dimetoxitritil-2'-fluro-uridina-3'-O-N,N'-di-isopropil-2-cianoetil-fosforamidita foram adquiridos de (Promega). Todas as fosforamiditas são usadas em uma concentração de 0,2M em acetonitrila (CH₃CN) exceto para guanosina que é usada na concentração de 0,2M em 10% THF/ANC (v/v). O Tempo de acoplamento/reciclagem de 16 minutos é usado. O ativador é 5-etil tiotetrazol (0,75M, Produtos Químicos Internacionais Americanos); para a oxidação de PO, iodo/água/piridina é usada e para a oxidação de PS, PADS (2%) em 2,6-lutidina/ACN (1:1 v/v) é usada.

[000322] As fitas conjugadas de 3'-ligantes são sintetizadas com o uso de suporte sólido que contém o ligante correspondente. Por exemplo, a introdução de unidade de colesterol na sequência é realizada a partir de uma fosforamidita de hidroxiprolinol-colesterol. O colesterol é ligado a *trans*-4-hidroxiprolinol por meio de uma ligação de 6-aminohexanoato para obter uma porção de hidroxiprolinol colesterol. iRNAs rotulados de extremidade 5' Cy-3 e Cy-5,5 (fluoróforo) são sin-

tetizados a partir de Quasar-570 (Cy-3) fosforamidita correspondente são adquiridos de Biosearch Technologies. A conjugação de ligantes à extremidade 5' e ou a posição interna é alcançada por meio de uso de bloco de construção de fosforamidita ligante protegida apropriadamente. Um acoplamento estendido de 15 min de solução de 0,1 M de fosforamidita em CH₃CN anidro na presença de ativador de 5-(etiltio)-1H-tetrazol a um oligonucleotídeo ligado a suporte sólido. A oxidação do fosfito internucleotídeo ao fosfato é realizada com o uso de iodo-água padrão conforme relatado (1) ou por tratamento com *tert*-butil hidroperóxido/acetonitrila/água (10: 87: 3) com oligonucleotídeo conjugado com tempo de espera de oxidação de 10 min. O fosforotioato é introduzido pela oxidação de fosfito a fosforotioato por meio de uso de um reagente de transferência de enxofre tal como DDTT (adquiridos a partir dos produtos químicos AM), PADS e ou reagente Beaucage. A fosforamidita de colesterol é sintetizada no alojamento e usada em uma concentração de 0,1 M em dicloro metano. O tempo de acoplamento para a fosforamidita de colesterol é de 16 minutos.

Desproteção I (desproteção de Nucleobase)

[000323] Após a conclusão de síntese, o suporte é transferido a uma garrafa de vidro de 100 ml (VWR). O oligonucleotídeo é clivado do suporte com desproteção simultânea de base e grupos de fosfato com 80 ml de uma mistura de amônia etanólica [amônia: etanol (3:1)] por 6,5 h a 55 °C. A garrafa é resfriada brevemente em gelo e então a mistura de amônia etanólica é filtrada em uma nova garrafa de 250 ml. A CPG é lavada com porções de dois x 40 ml de etanol/água(1:1 v/v). O volume da mistura é então reduzido a ~ 30 ml por meio de evaporador rotatório. A mistura é então congelada em gelo seco e secada a vácuo em um speed vac.

Desproteção II (Remoção de grupo 2'-TBDMS)

[000324] O resíduo seco é ressuspenso em 26 ml de trietilamina, tri-

hidrofluoreto de trietilamina (TEA•3HF) ou HF de piridina e DMSO (3:4:6) e aquecido a 60 °C por 90 minutos para remover os grupos de *tert*-butildimetilsilil (TBDMS) na posição 2'. A reação é então extinta com 50 ml de 20 mM de acetato de sódio e o pH é ajustado a 6,5. O oligonucleotídeo é armazenado em um freezer até a purificação.

Análise

[000325] Os oligonucleotídeos são analisados por cromatografia de líquido de alto desempenho (HPLC) antes da purificação e seleção de tampão e a coluna depende da natureza da sequência e ou do ligante conjugado.

Purificação de HPLC

[000326] Os oligonucleotídeos conjugados por ligante são purificados por HPLC preparativo de fase reversa. Os oligonucleotídeos não conjugados são purificados por HPLC de troca de ânion em uma coluna de gel de TSK empacotada em casa. Os tampões são 20 mM de fosfato de sódio (pH 8,5) em 10% CH₃CN (tampão A) e 20 mM de fosfato de sódio (pH 8,5) em 10% CH₃CN, 1M NaBr (tampão B). As frações que contêm oligonucleotídeos de comprimento total são reunidas, dessalinizadas e liofilizadas. Aproximadamente, 0,15 de OD de oligonucleotídeos dessalinizados é diluído em água a 150 µl e então pipetado em frascos especiais para análise de CGE e LC/MS. Os compostos são então analisados por LC-ESMS e CGE.

Preparação de iRNA

[000327] Para a preparação geral de iRNA, quantidades equimolares de fitas senso e antissenso são aquecidas em 1xPBS a 95 °C por 5 min e lentamente resfriados à temperatura ambiente. A integridade do dúplice é confirmada por análise de HPLC.

[000328] As sequências de ácido nucleico são representadas abaixo com o uso de nomenclatura padrão e especificamente as abreviações de Tabela 1.

Tabela 1: Abreviações de monômeros de nucleotídeo usados em representação de sequência de ácido nucleico. Será compreendido que esses monômeros, quando presentes em um oligonucleotídeo, são mutuamente ligados por ligações de 5'-3'-fosfodiéster.

Abreviação	Nucleotídeo(s)
A	adenosina
C	citidina
G	guanosina
T	timidina
U	uridina
N	qualquer Nucleotídeo (G, A, C, T ou U)
a	2'-O-metiladenosina
c	2'-O-metilcitidina
g	2'-O-metilguanosina
u	2'-O-metiluridina
dT	2'-desoxitimidina
s	ligação de fosforotioato

Exemplo 2. siRNA de TMPRSS6 Design

Transcrições

[000329] TMPRSS6 de direcionamento de siRNAs foram projetados e sintetizados. O projeto usou transcrito humano NM_153609.2 (SEQ ID NO:1, FIG,1) a partir da coleta de NCBI Refseq.

[000330] Os dúplexes de siRNA foram projetados com 100% de identidade ao gene de TMPRSS6.

[000331] Os oligos de siRNAs derivados de um total de 655 TMPRSS6 humanos senso e 655 TMPRSS6 humanos antissenso foram projetados. Os oligos são apresentados na Tabela 2. Os oligos de siRNA derivados de TMPRSS6 humano de senso e antissenso adicionais são apresentados na Tabela 3. Os oligos de siRNA derivados de TMPRSS6 humano senso e antissenso com modificações são apre-

sentados na Tabela 4.

Tabela 2. Sequências de fitas senso e antissenso de TMPRSS6 dsRNAs humanos

Posição de base 5' no transcrito (NM_153609.2, SEQ ID NO:1)	Sequências senso (5' a 3')	SEQ ID NO:	Sequência antissenso (5' a 3')	SEQ ID NO:
36	CUCUGGUG-CGAGCUGACCU	9	AGGUCAG-CUCGCACCAGAG	10
46	AGCUGACCU-GAGAUGCACU	11	AGUGCAUCUCA-GGUCAGCU	12
72	UCUGUGAGCU-GUCUCGGCA	13	UGCCGAGACA-GCUCACAGA	14
78	AGCUGU-CUCGGCACCCACU	15	AGUGGGUG-CCGAGACAGCU	16
79	GCUGUCUCGG-CACCCACUU	17	AAGUGGGUG-CCGAGACAGC	18
100	AGUCACUG-CCGCCUGAUGU	19	ACAUCAGG-CGGCAGUGACU	20
104	ACUGCCGCCU-GAUGUUGUU	21	AACAACAUCA-GGCGGCAGU	22
105	CUGCCGCCU-GAUGUUGUUA	23	UAACAACAUCA-GGCGGCAG	24
107	GCCGCCUGAU-GUUGUUACU	25	AGUAACAACAU-CAGGCGGC	26
110	GCCUGAUGUU-GUUACUCUU	27	AAGAGUAACAA-CAUCAGGC	28
124	CUCUCCACUC-CAAAAGGA	29	UCCUUUUGGA-GUGGAAGAG	30
131	ACUCCAAAAG-GAUGCCCGU	31	ACGGGCAUC-CUUUUGGAGU	32
233	GUGAGGACUC-CAAGAGAAA	33	UUUCUCUUG-GAGUCCUCAC	34

Posição de base 5' no transcrito (NM_153609.2, SEQ ID NO:1)	Sequências senso (5' a 3')	SEQ ID NO:	Sequência anti-senso (5' a 3')	SEQ ID NO:
311	CUUCGG-CGGGGGUG-CUACU	35	AGUAGCAC-CCCCGCCGAAG	36
313	UCGG-CGGGGGUG-CUACUCU	37	AGAGUAGCAC-CCCCGCCGA	38
316	GCGGGGGUG-CUACUCUGGU	39	ACCAGAGUAG-CACCCCCGC	40
318	GGGGGUGCUA-CUCUGGUAU	41	AUACCAGA-GUAGCACCCCC	42
319	GGGGUGCUA-CUCUGGUAUU	43	AAUACCAGA-GUAGCACCCCC	44
329	UCUG-GUAUUUC-CUAGGGUA	45	UACCCUAGGA-AAUACCAGA	46
331	UGGUAUUUC-CUAGGGUACA	47	UGUACCCUAG-GAAAUACCA	48
332	GGUAUUUC-CUAGGGUACAA	49	UUGUAC-CCUAGGA-AAUACC	50
363	GGUCAGCCA-GGUGUACUCA	51	UGAGUACAC-CUGGCUGACC	52
367	AGCCAGGU-GUACUCAGGCA	53	UGCCUGAGUA-CACCUGGCU	54
375	GUACUCAGG-CAGUCUGCGU	55	ACGCAGACUG-CCUGAGUAC	56
377	ACUCAGGCAGU-CUGCGUGU	57	ACACGCAGA-CUGCCUGAGU	58
380	CAGGCAGU-CUGCGUGUACU	59	AGUACACGCA-GACUGCCUG	60

Posição de base 5' no transcrito (NM_153609.2, SEQ ID NO:1)	Sequências senso (5' a 3')	SEQ ID NO:	Sequência anti-senso (5' a 3')	SEQ ID NO:
382	GGCAGUCUG-CGUGUACUCA	61	UGAGUACACG-CAGACUGCC	62
383	GCAGUCUG-CGUGUACUCAA	63	UUGAGUACACG-CAGACUGC	64
384	CAGUCUGCGU-GUACUCAAU	65	AUUGAGUACA-CGCAGACUG	66
389	UGCGUGUACU-CAAUCGCCA	67	UGGCGAUUGA-GUACACGCA	68
391	CGUGUACU-CAAUCGCCACU	69	AGUGGCGAUU-GAGUACACG	70
392	GUGUACU-CAAUCGCCACUU	71	AAGUGG-CGAUUGAGUACAC	72
394	GUACUCAAUCG-CCACUUCU	73	AGAAGUGG-CGAUUGAGUAC	74
406	CACUUCUCCCA-GGAUCUUA	75	UAAGAUCUG-GGAGAAGUG	76
418	GAUCUUACCCG-CCGGGAU	77	AUUCCCGG-CGGGUAAGAUC	78
420	UCUUACCCG-CCGGGAUUCU	79	AGAUUCCCGG-CGGGUAAGA	80
421	CUUACCCG-CCGGGAUUCUA	81	UAGAUUC-CCGG-CGGGUAAG	82
423	UACCCGCCGG-GAAUCUAGU	83	ACUAGAUUC-CCGGCGGGUA	84
427	CGCCGGGAU-CUAGUGCCU	85	AGGCACUA-GAUUCCCGGCG	86
428	GCCGGGAU-CUAGUGCCUU	87	AAGGCACUA-GAUUCCCGGC	88

Posição de base 5' no transcrito (NM_153609.2, SEQ ID NO:1)	Sequências senso (5' a 3')	SEQ ID NO:	Sequência anti-senso (5' a 3')	SEQ ID NO:
446	UCCGCAGU-GAAACCGCCAA	89	UUGGCGGUUU-CACUGCGGA	90
447	CCGCAGU-GAAACCGCCAAA	91	UUUGG-CGGUUUCA-CUGCGG	92
502	CGCCUGGGAA-CUUACUACA	93	UGUAGUAA-GUUCCCAGGCG	94
503	GCCUGGGAA-CUUACUACAA	95	UUGUAGUAA-GUUCCCAGGC	96
505	CUGGGAACUUA-CUACAACU	97	AGUUGUAGUAA-GUUCCCAG	98
517	UACAACUCCAG-CUCCGUCU	99	AGACGGAG-CUGGAGUUGUA	100
518	ACAACUCCAG-CUCCGUCUA	101	UAGACGGAG-CUGGAGUUGU	102
520	AACUCCAGCUC-CGUCUAUU	103	AAUAGACGGAG-CUGGAGUU	104
541	UUUGGGGAGG-GACCCCUCA	105	UGAGGGGUC-CCUCCCCAAA	106
550	GGACCCCUAC-CUGCUUCU	107	AGAAGCAGGU-GAGGGGUCC	108
563	GCUUCUUCUG-GUUCAUUCU	109	AGAAUGAACCA-GAAGAAGC	110
566	UCUUCUGGUU-CAUUCUCCA	111	UGGAGAAU-GAACCAGAAGA	112
593	AGCACCG-CCGGCUGAUG-CU	113	AGCAUCAG-CCGGCGGUGCU	114

Posição de base 5' no transcrito (NM_153609.2, SEQ ID NO:1)	Sequências senso (5' a 3')	SEQ ID NO:	Sequência anti-senso (5' a 3')	SEQ ID NO:
680	UCCCCUACA-GGGCCGAGUA	115	UACUCGG-CCCUGUAGGG-GA	116
683	CCUACAGGG-CCGAGUACGA	117	UCGUACUCGG-CCCUGUAGG	118
686	ACAGGGCCGA-GUACGAAGU	119	ACUUCGUA-CUCGGCCCUGU	120
689	GGGCCGA-GUACGAAGUG-GA	121	UCCACUUCGUA-CUCGGCCC	122
710	CCGAGGG-CCUAGUGAUCCU	123	AGGAUCACU-AGGCCCUCCG	124
735	CAGUGUGAAA-GACAUAGCU	125	AGCUAUGU-CUUUCACACUG	126
759	GAAUCCACG-CUGGGUUGU	127	ACAACCCAG-CGUGGAAUUC	128
760	AAUCCACG-CUGGGUUGUU	129	AACAACCCAG-CGUGGAAUU	130
766	ACGCUGGGUU-GUUACCGCU	131	AGCGGUAA-CAACCCAGCGU	132
767	CGCUGGGUU-GUUACCGCUA	133	UAGCGGUAA-CAACCCAGCG	134
769	CUGGGUU-GUUACCGCUACA	135	UGUAG-CGGUAACAAC-CCAG	136
772	GGUUGUUAC-CGCUACAGCU	137	AGCUGUAG-CGGUAACAACC	138
776	GUUACCGCUA-CAGCUACGU	139	ACGUAGCU-GUAGCGGUAAAC	140

Posição de base 5' no transcrito (NM_153609.2, SEQ ID NO:1)	Sequências senso (5' a 3')	SEQ ID NO:	Sequência antis-senso (5' a 3')	SEQ ID NO:
872	AGGACCUCAUG-CUCAACU	141	AGUUUGAG-CAUGAGGUCCU	142
878	UCAUGCUCAAA-CUCCGGCU	143	AGCCGGA-GUUUGAGCAU-GA	144
970	AUCAC-CUCGGU-GUACGGCU	145	AGCCGUACAC-CGAGGUGAU	146
973	ACCUCGGU-GUACGGCUGCA	147	UGCAGCCGUA-CACCGAGGU	148
1033	AUCAUGG-CGGUCGUCUG-GA	149	UCCAGACGAC-CGCCAUGAU	150
1034	UCAUGG-CGGUCGUCUG-GAA	151	UUCCAGACGAC-CGCCAUGA	152
1067	GCUACUACGAC-CCCUUCGU	153	ACGAAGGGGUCGUAGUAGC	154
1091	CCGUGCAG-CCGGUGGUCUU	155	AAGACCACCGG-CUGCACGG	156
1106	UCUUCCAGG-CCUGUGAAGU	157	ACUUCACAGG-CCUGGAAGA	158
1114	GCCUGUGAA-GUGAACCUGA	159	UCAGGUUCA-CUUCACAGGC	160
1118	GUGAAGUGAAC-CUGACGCU	161	AGCGUCA-GGUUCACUUCAC	162
1133	CGCUGGACAA-CAGGCUCGA	163	UCGAGCCU-GUUGUCCAGCG	164
1135	CUGGACAACA-GGCUCGACU	165	AGUCGAGCCU-GUUGUCCAG	166

Posição de base 5' no transcrito (NM_153609.2, SEQ ID NO:1)	Sequências senso (5' a 3')	SEQ ID NO:	Sequência antis-senso (5' a 3')	SEQ ID NO:
1162	GUCCUCAGCAC- CCCGUACU	167	AGUACGGGGUG CUGAGGAC	168
1163	UCCUCAGCAC- CCCGUACUU	169	AA- GUACGGGGUG- CUGAGGA	170
1168	AGCACCCCGUA- CUUCCCCA	171	UGGGGAA- GUACGGGGUG- CU	172
1185	CAGCUACUA- CUCGCCCCAA	173	UUGGGGCGA- GUAGUAGCUG	174
1186	AGCUACUA- CUCGCCCCAAA	175	UUUGGGGCGA- GUAGUAGCU	176
1190	ACUACUCG- CCCCAAACCCA	177	UGGGUUUG- GGGCGAGUAGU	178
1195	UCGCCCCAAAC- CCACUGCU	179	AGCAGUG- GGUUUGGGG- CGA	180
1211	GCUCCUGG- CACCUCACGGU	181	ACCGU- GAGGUGCCAG- GAGC	182
1231	CCCUCUCUG- GACUACGGCU	183	AGCCGUAGUC- CAGAGAGGG	184
1244	ACGGCUUGG- CCCUCUGGUU	185	AACCAGAGGG- CCAAGCCGU	186
1245	CGGCTTGG- CCCTCTGTTT	187	AAACCAGAGGG- CCAAGCCG	188
1247	GCUUGGCCCU- CUGGUUUGA	189	UCAAACCA- GAGGGCCAAGC	190
1254	CCUCUGGUUU- GAUGCCUAU	191	AUAGGCAU- CAAACCAGAGG	192

Posição de base 5' no transcrito (NM_153609.2, SEQ ID NO:1)	Sequências senso (5' a 3')	SEQ ID NO:	Sequência anti-senso (5' a 3')	SEQ ID NO:
1285	CAGAAGUAU-GAUUUGCCGU	193	ACGGCAAU-CAUACUUCUG	194
1288	AAGUAU-GAUUUG-CCGUGCA	195	UGCACGG-CAAU-CAUACUU	196
1292	AUGAUUUG-CCGUGCACCCA	197	UGGGUG-CACGGCAAU-CAU	198
1306	ACCCAGGG-CCAGUGGACGA	199	UCGUCCACUG-GCCCUGGGU	200
1310	AGGGCCAGUG-GACGAUCCA	201	UGGAUCGUC-CACUGGCCCCU	202
1312	GGCCAGUGGA-CGAUCCAGA	203	UCUGGA-UCGUCCACUG-GCC	204
1313	GCCAGUGGA-CGAUCCAGAA	205	UUCUGGA-UCGUCCA-CUGGC	206
1360	CAGCCCUACG-CCGAGAGGA	207	UCCUCUCGG-CGUAGGGCUG	208
1443	CGGUGUG-CGGGUGCACU-AU	209	AUAGUGCAC-CCGCACACCG	210
1447	GUGCGGGUG-CACUAUGGCU	211	AGCCAUAGUG-CACCCGCAC	212
1448	UGCGGGUGCA-CUAUGGCUU	213	AAGCCAUAGUG-CACCCGCA	214
1451	GGGUGCACU-AUGGCUUGUA	215	UACAAGCCAU-AUGGCUUGUA	216

Posição de base 5' no transcrito (NM_153609.2, SEQ ID NO:1)	Sequências senso (5' a 3')	SEQ ID NO:	Sequência antis-senso (5' a 3')	SEQ ID NO:
1454	UGCACUAUGG-CUUGUACAA	217	UUGUACAAG-CCAUGUGCA	218
1486	UGCCCUUGGA-GAGUUCCUCU	219	AGAGGAACU-CUCCAGGGCA	220
1565	UGGAU-GAGAGAAACUG-CGU	221	ACGCAGUUUCU-CUCAUCCA	222
1611	GGACAGCA-CAUGCAUCUCA	223	UGAGAUGCAU-GUGCUGUCC	224
1613	ACAGCACAUG-CAUCUCACU	225	AGUGAGAUG-CAUGUGCUGU	226
1634	CCAAGGUCU-GUGAUGGGCA	227	UGCCCAUCACA-GACCUUGG	228
1646	AUGGGCAG-CCUGAUUGUCU	229	AGACAAUCAGG-CUGCCCAU	230
1649	GGCAGCCU-GAUUGUCUCAA	231	UUGAGACAAU-CAGGCUGCC	232
1654	CCUGAUUGU-CUCAACGGCA	233	UGCCGUUGA-GACAAUCAGG	234
1662	UCUCAACGGCA-GCGACGAA	235	UUCGUCGCUG-CCGUUGAGA	236
1687	UGCCAGGA-AGGGGUGCCAU	237	AUGGCAC-CCCUUCCUGG-CA	238
1696	GGGGUGCCAU-GUGGGACAU	239	AUGUCCCA-CAUGGCACCCC	240
1699	GUGCCAUGUG-GGACAUUCA	241	UGAAUGUCCCA-CAUGGCAC	242
1703	CAUGUGGGA-CAUUCACCUU	243	AAGGUGAAU-GUCCCACAUG	244

Posição de base 5' no transcrito (NM_153609.2, SEQ ID NO:1)	Sequências senso (5' a 3')	SEQ ID NO:	Sequência anti-senso (5' a 3')	SEQ ID NO:
1723	CAGUGUGAG-GACCGGAGCU	245	AGCUCCGGUC-CUCACACUG	246
1745	UGAAGAAG-CCCAACCCGCA	247	UGCGGGUUG-GGCUUCUUCA	248
1749	GAAGCCCAAC-CCGCAGUGU	249	ACACUG-CGGGUUGGG-CUUC	250
1830	CCCCUCCAG-CCGCAUUGUU	251	AACAAUGCGG-CUGGAGGGG	252
1897	CA-GGUUCGGGGUC GACACA	253	UGUGUCGAC-CCCGAACCUG	254
1898	AGGUUCGGGGU CGACACAU	255	AUGUGUCGAC-CCCGAACCU	256
1900	GUUCGGGGUCG ACACAUCU	257	AGAUGU-GUCGAC-CCCGAAC	258
1935	CGCUGACCG-CUGGGUGAUA	259	UAUCACCCAG-CGGUCAGCG	260
1936	GCUGACCG-CUGGGUGAUAA	261	UUAUCACCCAG-CGGUCAGC	262
1938	UGACCGCUG-GGUGAUACA	263	UGUUAUCAC-CCAGCGGUCA	264
1941	CCGCUGGGU-GAUAACAGCU	265	AGCUGUUAU-CACCCAGCGG	266
1997	UGCUGUGGAC-CGUGUCCU	267	AGGAACA-CGGUCCACAGCA	268
2023	GUGUGGCA-GAACUCGCGCU	269	AGCGCGAGUU-CUGCCACAC	270

Posição de base 5' no transcrito (NM_153609.2, SEQ ID NO:1)	Sequências senso (5' a 3')	SEQ ID NO:	Sequência anti-senso (5' a 3')	SEQ ID NO:
2078	UCCUGCAC-CCGUACCACGA	271	UCGUG-GUACGGGUG-CAGGA	272
2079	CCUGCAC-CCGUACCACGAA	273	UUCGUG-GUACGGGUG-CAGG	274
2081	UGCACCCGUAC-CACGAAGA	275	UCUUCGUG-GUACGGGUGCA	276
2186	CGCGCUCCCA-CUUCUUCGA	277	UCGAAGAA-GUGGGAGCGCG	278
2209	GGCCUGCA-CUGCUGGAUUA	279	UAAUCCAGCA-GUGCAGGCC	280
2215	CACUGCUGGA-UUACGGGCU	281	AGCCCGUAAUC-CAGCAGUG	282
2283	GGAUGUGCA-GUUGAUCCCA	283	UGGGAUCAA-CUGCACAUCC	284
2311	UGCAG-CGAGGU-CUAUCGCU	285	AGCGAUAGAC-CUCGCUGCA	286
2312	GCAGCGAGGU-CUAUCGCUA	287	UAGCGAUAGAC-CUCGCUGC	288
2315	GCGAGGU-CUAUCGCUACCA	289	UGGUAG-CGAUAGAC-CUCGC	290
2320	GUCUAUCG-CUACCAGGUGA	291	UCACCUG-GUAGCGAUAGAC	292
2333	AGGUGACG-CCACGCAUGCU	293	AGCAUGCGUG-GCGUCACCU	294

Posição de base 5' no transcrito (NM_153609.2, SEQ ID NO:1)	Sequências senso (5' a 3')	SEQ ID NO:	Sequência antis-senso (5' a 3')	SEQ ID NO:
2335	GUGACG- CCACGCAUG- CUGU	295	ACAGCAUG- CGUGGCGUCAC	296
2337	GACGCCACG- CAUGCUGUGU	297	ACACAGCAUG- CGUGGCGUC	298
2470	GGCUGUGG- CCGGCCUAACU	299	AGUUAGG- CCGGCCACA- GCC	300
2471	GCUGUGG- CCGGCCUAACUA	301	UAGUUAGG- CCGGCCACAGC	302
2473	UGUGGCCGG- CCUAACUACU	303	AGUAGUUAGG- CCGGCCACA	304
2480	GGCCUAACUA- CUUCGGCGU	305	ACGCCGAAGUA- GUUAGGCC	306
2482	CCUAACUA- CUUCGGCGUCU	307	AGACGCCGAA- GUAGUUAGG	308
2483	CUAACUA- CUUCGGCGU- CUA	309	UAGACGCCGAA- GUAGUUAG	310
2485	AACUACUUCGG- CGUCUACA	311	UGUAGACG- CCGAAGUAGUU	312
2501	ACACCCGCAU- CACAGGUGU	313	ACACCUGU- GAUGCGGGUGU	314
2506	CGCAUCACA- GGUGUGAUCA	315	UGAUCACACCU- GUGAUGCG	316
2525	GCUGGAUCCA- GCAAGUGGU	317	ACCACUUG- CUGGAUCCAGC	318
2551	GGAACUG- CCCCCUGCAAA	319	UUUGCA- GGGGGGCA- GUUCC	320

Posição de base 5' no transcrito (NM_153609.2, SEQ ID NO:1)	Sequências senso (5' a 3')	SEQ ID NO:	Sequência antis-senso (5' a 3')	SEQ ID NO:
2671	AGGAGGUGG-CAUCUUGUCU	321	AGACAAGAUG-CCACCUCCU	322
2674	AGGUGGCAU-CUUGUCUCGU	323	ACGAGACAA-GAUGCCACCU	324
2678	GGCAUCUUGU-CUCGUCCCU	325	AGGGACGAGA-CAAGAUGCC	326
2680	CAUCUUGU-CUCGUCCCUGA	327	UCAGGGACGA-GACAAGAUG	328
2681	AUCUUGU-CUCGUCCCU-GAU	329	AUCAGGGA-CGAGACAAGAU	330
2739	CAGCUG-GGGGUCAAGACGU	331	ACGUCUUGAC-CCCCAGCUG	332
2744	GGGGGUCAA-GACGUCCCCU	333	AGGGGACGU-CUUGACCCCC	334
2746	GGGUCAAGACGUCCCCUGA	335	UCAGGGGA-CGUCUUGACCC	336
2825	CCACUGCUG-CCUAAUGCAA	337	UUGCAUUAGG-CAGCAGUGG	338
2829	UGCUG-CCUAAUG-CAAGGCA	339	UGCCUUG-CAUUAGGCAGCA	340
2835	CUAAUGCAAGG-CAGUGGCU	341	AGCCACUG-CCUUGCAUUAG	342
2857	CAGCAAGAAUG-CUGGUUCU	343	AGAACCAG-CAUUCUUGCUG	344
2894	GAGGUGCG-CCCCACUCUGU	345	ACAGAGUG-GGGCGCACCUC	346

Posição de base 5' no transcrito (NM_153609.2, SEQ ID NO:1)	Sequências senso (5' a 3')	SEQ ID NO:	Sequência anti-senso (5' a 3')	SEQ ID NO:
2958	CUUCGGAAG- CCCCUGGUCU	347	AGACCAGGGG- CUUCCGAAG	348
2960	UCGGAAG- CCCCUGGUCUAA	349	UUAGACCA- GGGGCUUCCGA	350
2962	GGAAG- CCCCUGGU- CUAACU	351	AGUUAGACCA- GGGGCUUCC	352
2963	GAAGCCCCUG- GUCUAACUU	353	AAGUUAGACCA- GGGGCUUC	354
2968	CCUGGUCUAA- CUUGGGAU	355	AUCCCAAGUUA- GACCAGGG	356
2970	CUGGUCUAA- CUUGGGAUCU	357	AGAUCCTAA- GUUAGACCAG	358
2975	CUAACUUGGGA- UCUGGGAA	359	UUCCCAGAU- CCAAGUUAG	360
3006	CCAUCGGA- GGGGACCCUCA	361	UGAGGGUC- CCCUCCGAUGG	362
3045	UGGGCCUG- CUGCCACUGUA	363	UACAGUGGCA- GCAGGCCCA	364
3046	GGGCCUGCUG- CCACUGUAA	365	UUACAGUGG- CAGCAGGCCC	366
3052	GCUGCCACU- GUAAGCCAAA	367	UUUGGCUUA- CAGUGGCAGC	368
3056	CCACUGUAAG- CCAAAAGGU	369	ACCUUUUGG- CUUACAGUGG	370
3071	AGGUGGGGAA- GUCCUGACU	371	AGUCAGGA- CUUCCCCACCU	372
3174	GAAUAAAGCUG- CCUGAUCA	373	UGAUCAGGCA- GCUUUUUAUC	374

Posição de base 5' no transcrito (NM_153609.2, SEQ ID NO:1)	Sequências senso (5' a 3')	SEQ ID NO:	Sequência antis-senso (5' a 3')	SEQ ID NO:
3175	AAUAAAGCUG-CCUGAUCAA	375	UUGAUCAGG-CAGCUUUUAUU	376
3180	AGCUGCCU-GAUCAAAAAAA	377	UUUUUUUGAU-CAGGCAGCU	378

Tabela 3. Sequências de fitas senso e antissenso não modificadas de TMPRSS6 dsRNAs humanos

ID de Dú-plex	SEQ ID NO.: (senso)	Seq. de Trans Senso	Posição em NM_153609.2	Posição em NM_153609.2	SEQ ID NO.: (antissenso)	Seq. de Trans Antissenso
AD-46230.1	43	GGGGUGCUACUCUGGUAUU	319	319 a 337	44	AAUACCAGAGUAGCACCCC
AD-46231.1	111	UCUUCUGGUUCAUUCUCCA	566	566 a 584	112	UGGAGAAUGAACCAGAAGA
AD-46232.1	131	ACGCUGGGUUGUUACCGCU	766	766 a 784	132	AGCGGUAACAACCCAGCGU
AD-46233.1	193	CAGAAGUAUGAUUUGCCGU	1285	1285 a 1303	194	ACGGCAAUACUACUUCUG
AD-46234.1	259	CGCUGACCGCUGGGUGAUA	1935	1935 a 1953	260	UAUCACCCAGCGGUCAGCG
AD-46235.1	45	UCUGGUAUUUCCUAGGGUA	329	329 a 347	46	UACCCUAGGAAAUACCAGA
AD-46236.1	117	CCUACAGGGCCGAGUACGA	683	683 a 701	118	UCGUACUCGGCCCUGUAGG
AD-46237.1	133	CGCUGGGUUGUUACCGCUA	767	767 a 785	134	UAGCGGUAACAACCCAGCG
AD-46238.1	203	GGCCAGUGGACGAUCCAGA	1312	1312 a 1330	204	UCUGGAUCGUCCACUGGCC
AD-46239.1	263	UGACCGCUGGGUGAUAAACA	1938	1938 a 1956	264	UGUUAUCACCCAGCGGUCA
AD-46240.1	51	GGUCAGCCAGGUGUACUCA	363	363 a 381	52	UGAGUACACCUGGCUGACC
AD-46241.1	379	CUACAGGGCCGAGUACGAA	684	684 a 702	380	UUCGUACUCGGCCCUGUAG
AD-46242.1	135	CUGGGUUGUUACCGCUACA	769	769 a 787	136	UGUAGCGGUAACAACCCAG
AD-46243.1	217	UGCACUAUGGCUUGUACAA	1454	1454 a 1472	218	UUGUACAAGCCAUAGUGCA
AD-46244.1	604	CCUGGAGAGGUGUCCUUCA	2044	2044 a 2062	605	UGAAGGACACCUCUCCAGG
AD-46244.2	604	CCUGGAGAGGUGUCCUUCA	2044	2044 a 2062	605	UGAAGGACACCUCUCCAGG
AD-46245.1	53	AGCCAGGUGUACUCAGGCA	367	367 a 385	54	UGCCUGAGUACACCUGGCU
AD-46246.1	119	ACAGGGCCGAGUACGAAGU	686	686 a 704	120	ACUUCGUACUCGGCCCUGU

ID de Dú-plex	SEQ ID NO.: (senso)	Seq. de Trans Senso	Posição em NM_153609.2	Posição em NM_153609.2	SEQ ID NO.: (antissenso)	Seq. de Trans Antissenso
AD-46247.1	137	GGUUGUUACCGCUACAGCU	772	772 a 790	138	AGCUGUAGCGGUAACAACC
AD-46248.1	381	UGUGAUGGGGUCAAGGACU	1534	1534 a 1552	382	AGUCCUUGACCCCAUCACA
AD-46249.1	383	CUGGAGAGGUGUCCUUCAA	2045	2045 a 2063	384	UUGAAGGACACCUCUCCAG
AD-46250.1	89	UCCGCAGUGAAACCGCCAA	446	446 a 464	90	UUGGCGGUUUCACUGCGGA
AD-46251.1	121	GGGCCGAGUACGAAGUGGA	689	689 a 707	122	UCCACUUCGUACUCGGCCC
AD-46252.1	385	GGACCGACUGGCCAUGUUAU	921	921 a 939	386	AUACAUGGCCAGUCGGUCC
AD-46253.1	606	CAACGGCCUGGAUGAGAGA	1557	1557 a 1575	607	UCUCUCAUCCAGGCCGUUG
AD-46253.2	606	CAACGGCCUGGAUGAGAGA	1557	1557 a 1575	607	UCUCUCAUCCAGGCCGUUG
AD-46254.1	387	AGUUGAUCCACAGGACCU	2291	2291 a 2309	388	AGGUCCUGUGGGAUCAACU
AD-46255.1	91	CCGCAGUGAAACCGCCAAA	447	447 a 465	92	UUUGGCGGUUUCACUGCGG
AD-46256.1	123	CCGAGGGCCUAGUGAUCCU	710	710 a 728	124	AGGAUCACUAGGCCCUCCG
AD-46257.1	169	UCCUCAGCACCCCGUACUU	1163	1163 a 1181	170	AAGUACGGGGUGCUGAGGA
AD-46258.1	253	CAGGUUCGGGGUCGACACA	1897	1897 a 1915	254	UGUGUCGACCCCGAACCUG
AD-46259.1	293	AGGUGACGCCACGCAUGCU	2333	2333 a 2351	294	AGCAUGCGUGGCGUCACCU
AD-46260.1	389	AAACCGCCAAAGCCCAGAA	455	455 a 473	390	UUCUGGGCUUUGGCGGUUU
AD-46261.1	125	CAGUGUGAAAGACAUAGCU	735	735 a 753	126	AGCUAUGUCUUUCACACUG
AD-46262.1	183	CCCUCUCUGGACUACGGCU	1231	1231 a 1249	184	AGCCGUAGUCCAGAGAGGG
AD-46263.1	257	GUUCGGGGUCGACACAUCU	1900	1900 a 1918	258	AGAUGUGUCGACCCCGAAC
AD-46264.1	391	UGUGUGCCGGCUACCGCAA	2351	2351 a 2369	392	UUGCGGUAGCCGGCACACA
AD-46265.1	109	GCUUCUUCUGGUUCAUUCU	563	563 a 581	110	AGAAUGAACCAGAAGAAGC

ID de Dú-plex	SEQ ID NO.: (senso)	Seq. de Trans Senso	Posição em NM_153609.2	Posição em NM_153609.2	SEQ ID NO.: (antissenso)	Seq. de Trans Antissenso
AD-46266.1	393	AUCCACGCUGGGUUGUUA	761	761 a 779	394	UAACAACCCAGCGUGGAU
AD-46267.1	185	ACGGCUUGGCCCUCUGGUU	1244	1244 a 1262	186	AACCAGAGGGCCAAGCCGU
AD-46268.1	395	UCGCUGACCGCUGGGUGAU	1934	1934 a 1952	396	AUCACCCAGCGGUCAGCGA
AD-46269.1	608	AGUGGUGACCUGAGGAACU	2538	2538 a 2556	609	AGUUCCUCAGGUCACCACU
AD-46269.2	608	AGUGGUGACCUGAGGAACU	2538	2538 a 2556	609	AGUUCCUCAGGUCACCACU
AD-46270.1	397	CAAGCAGGGGGACAAGUAU	2612	2612 a 2630	398	AUACUUGUCCCCUGCUUG
AD-46271.1	399	UGAUGUCUGCUCCAGUGAU	2696	2696 a 2714	400	AUCACUGGAGCAGACAUCA
AD-46272.1	359	CUAACUUGGGAUCUGGGAA	2975	2975 a 2993	360	UUCCCAGAUCCCAAGUUAG
AD-46273.1	47	UGGUUUUCCUAGGGUACA	331	331 a 349	48	UGUACCCUAGGAAAUACCA
AD-46273.2	47	UGGUUUUCCUAGGGUACA	331	331 a 349	48	UGUACCCUAGGAAAUACCA
AD-46273.3	47	UGGUUUUCCUAGGGUACA	331	331 a 349	48	UGUACCCUAGGAAAUACCA
AD-46274.1	401	GAGGUGUCCUUAAGGUGA	2050	2050 a 2068	402	UCACCUUGAAGGACACCUC
AD-46276.1	403	AAGCAGGGGGACAAGUAUU	2613	2613 a 2631	404	AAUACUUGUCCCCCUGCUU
AD-46277.1	331	CAGCUGGGGGUCAAGACGU	2739	2739 a 2757	332	ACGUCUUGACCCCCAGCUG
AD-46278.1	405	CUUGGGAUCUGGGAAUGGA	2979	2979 a 2997	406	UCCAUUCCCAGAUCCCAAG
AD-46279.1	407	GGUAAUUCCUAGGGUACAA	332	332 a 350	408	UUGUACCCUAGGAAAUACC
AD-46280.1	409	GGCUACCGCAAGGGCAAGA	2359	2359 a 2377	410	UCUUGCCCUUGCGGUAGCC
AD-46282.1	411	GCAGGGGGACAAGUAUUCU	2615	2615 a 2633	412	AGAAUACUUGUCCCCCUGC
AD-46283.1	413	GCUCAGCAGCAAGAAUGCU	2851	2851 a 2869	414	AGCAUUCUUGCUGCUGAGC
AD-46284.1	415	UUGGGAUCUGGGAAUGGAA	2980	2980 a 2998	416	UCCAUUCCCAGAUCCCAA

ID de Dú-plex	SEQ ID NO.: (senso)	Seq. de Trans Senso	Posição em NM_153609.2	Posição em NM_153609.2	SEQ ID NO.: (antissenso)	Seq. de Trans Antissenso
AD-46285.1	417	CCAAAGCCCAGAAGAUGCU	461	461 a 479	418	AGCAUCUUCUGGGCUUUGG
AD-46286.1	419	GCUACCGCAAGGGCAAGAA	2360	2360 a 2378	420	UUCUUGCCCUUGCGGUAGC
AD-46286.2	419	GCUACCGCAAGGGCAAGAA	2360	2360 a 2378	420	UUCUUGCCCUUGCGGUAGC
AD-46288.1	423	UGGUGGCAGGAGGUGGCAU	2664	2664 a 2682	424	AUGCCACCUCCUGCCACCA
AD-46289.1	425	CCCACUCUGUACAGAGGCU	2903	2903 a 2921	426	AGCCUCUGUACAGAGUGGG
AD-46290.1	427	CUCACAGCCCAGACCCUCA	3128	3128 a 3146	428	UGAGGGUCUGGGCUGUGAG
AD-46291.1	429	CCUCUCUGGACUACGGCUU	1232	1232 a 1250	430	AAGCCGUAGUCCAGAGAGG
AD-46293.1	431	GUGGCAGGAGGUGGCAUCU	2666	2666 a 2684	432	AGAUGCCACCUCUGCCAC
AD-46294.1	433	UUCGGAAGCCCCUGGUCUA	2959	2959 a 2977	434	UAGACCAGGGGCUUCCGAA
AD-46295.1	435	AGCUCAGCUGCCCUUUGGA	3157	3157 a 3175	436	UCCAAAGGGCAGCUGAGCU
AD-46296.1	437	GGCCUGGAUGAGAGAAACU	1561	1561 a 1579	438	AGUUUCUCUCAUCCAGGCC
AD-46297.1	439	UGGCAGGAGGUGGCAUCUU	2667	2667 a 2685	440	AAGAUGCCACCUCUGCCA
AD-46298.1	349	UCGGAAGCCCCUGGUCUAA	2960	2960 a 2978	350	UUAGACCAGGGGCUUCCGA
AD-46299.1	421	GCUCAGCUGCCCUUUGGAA	3158	3158 a 3176	422	UUCCAAAGGGCAGCUGAGC
AD-46299.2	421	GCUCAGCUGCCCUUUGGAA	3158	3158 a 3176	422	UUCCAAAGGGCAGCUGAGC
AD-46300.1	441	ACUGUGACUGUGGCCUCCA	1808	1808 a 1826	442	UGGAGGCCACAGUCACAGU
AD-46301.1	321	AGGAGGUGGCAUCUUGUCU	2671	2671 a 2689	322	AGACAAGAUGCCACCUCU
AD-46302.1	443	CCCCUGGUCUAACUUGGGA	2967	2967 a 2985	444	UCCCAAGUUAGACCAGGGG
AD-46303.1	445	UCAGCUGCCCUUUGGAAUA	3160	3160 a 3178	446	UAUCCAAAGGGCAGCUGA
AD-46304.1	447	UCGGGGUCGACACAUCUGU	1902	1902 a 1920	448	ACAGAUGUGUCGACCCCGA

ID de Dú-plex	SEQ ID NO.: (senso)	Seq. de Trans Senso	Posição em NM_153609.2	Posição em NM_153609.2	SEQ ID NO.: (antissenso)	Seq. de Trans Antissenso
AD-46305.1	449	GUCCCUGAUGUCUGCUCCA	2691	2691 a 2709	450	UGGAGCAGACAUCAGGGAC
AD-46306.1	355	CCCUGGUCUAACUUGGGAU	2968	2968 a 2986	356	AUCCCAAGUUAGACCAGGG
AD-46307.1	610	CAGCUGCCCUUUGGAAUAA	3161	3161 a 3179	611	UUAUUCCAAAGGGCAGCUG
AD-46307.2	610	CAGCUGCCCUUUGGAAUAA	3161	3161 a 3179	611	UUAUUCCAAAGGGCAGCUG
AD-46308.1	451	UCAUCGCUGACCGCUGGGU	1931	1931 a 1949	452	ACCCAGCGGUCAGCGAUGA

Tabela 4. Sequências de fitas senso e antissenso modificadas de TMPRSS6 dsRNAs humanos

ID de Dúplex	SEQ ID NO.: (senso)	Sequências senso	Posição em NM_153609.2	Posição em NM_153609.2	SEQ ID NO.: (antissenso)	Sequências Antissenso
AD-46230.1	453	GGGGuGcuAcucuGGuAuudTsdT	319	319 a 337	454	AAuACcAGAGuAGcACCCcdTsdT
AD-46231.1	455	ucuucuGGuucAuucuccAdTsdT	566	566 a 584	456	UGGAGAAUGAACcAGAAGAdTsdT
AD-46232.1	457	AcGcuGGGuuGuuAccGcudTsdT	766	766 a 784	458	AGCGGuAAcAACCCAGCGUdTsdT
AD-46233.1	459	cAGAAGuAuGAuuuGccGudTsdT	1285	1285 a 1303	460	ACGGcAAAUcAuACUUCUGdTsdT
AD-46234.1	461	cGcuGAccGcuGGGuGAuAdTsdT	1935	1935 a 1953	462	uAUcACCcAGCGGUcAGCGdTsdT
AD-46235.1	463	ucuGGuAuuuuccuAGGGuAdTsdT	329	329 a 347	464	uACCCuAGGAAuACcAGAdTsdT
AD-46236.1	465	ccuAcAGGGccGAGuAcGAdTsdT	683	683 a 701	466	UCGuACUCGGCCCUGuAGGdTsdT
AD-46237.1	467	cGcuGGGuuGuuAccGcuAdTsdT	767	767 a 785	468	uAGCGGuAAcAACCCAGCGdTsdT
AD-46238.1	469	GGccAGuGGAcGAuccAGAdTsdT	1312	1312 a 1330	470	UCUGGAUCGUCcACUGGCCdTsdT
AD-46239.1	471	uGAccGcuGGGuGAuAAcAdTsdT	1938	1938 a 1956	472	UGUuAUcACCcAGCGGUcAdTsdT
AD-46240.1	473	GGucAGccAGGuGuAcucAdTsdT	363	363 a 381	474	UGAGuAcACCUGGCUGACcdTsdT
AD-46241.1	475	cuAcAGGGccGAGuAcGAAdTsdT	684	684 a 702	476	UUCGuACUCGGCCCUGuAGdTsdT
AD-46242.1	478	cuGGGuuGuuAccGcuAcAdTsdT	769	769 a 787	479	UGuAGCGGuAAcAACCCAGdTsdT
AD-46243.1	480	uGcAcuAuGGcuuGuAcAAdTsdT	1454	1454 a 1472	481	UUGuAcAAGCcAuAGUGcAdTsdT
AD-46244.1	482	ccuGGAGAGGuGuccuucAdTsdT	2044	2044 a 2062	483	UGAAGGAcACCUCUCcAGGdTsdT
AD-46244.2	482	ccuGGAGAGGuGuccuucAdTsdT	2044	2044 a 2062	483	UGAAGGAcACCUCUCcAGGdTsdT
AD-46245.1	484	AGccAGGuGuAcucAGGcAdTsdT	367	367 a 385	485	UGCCUGAGuAcACCUGGCUdTsdT
AD-46246.1	486	AcAGGGccGAGuAcGAAGudTsdT	686	686 a 704	487	ACUUCGuACUCGGCCCUGuUdTsdT

ID de Dúplex	SEQ ID NO.: (senso)	Sequências senso	Posição em NM_153609.2	Posição em NM_153609.2	SEQ ID NO.: (antissenso)	Sequências Antissenso
AD-46247.1	488	GGuuGuuAccGcuAcAGcudTsdT	772	772 a 790	489	AGCUGuAGCGGuAAcAACCCdTsdT
AD-46248.1	490	uGuGAuGGGGucAAGGAcudTsdT	1534	1534 a 1552	491	AGUCCUUGACCCcAUcAcAdTsdT
AD-46249.1	492	cuGGAGAGGuGuccuucAAAdTsdT	2045	2045 a 2063	493	UUGAAGGAcACCUCUCcAGdTsdT
AD-46250.1	494	uccGcAGuGAAAccGccAAAdTsdT	446	446 a 464	495	UUGGCGGUUUcACUGCGGAdTsdT
AD-46251.1	496	GGGccGAGuAcGAAGuGGAdTsdT	689	689 a 707	497	UCcACUUCGuACUCGGCCCCdTsdT
AD-46252.1	498	GGAccGAcuGGccAuGuAudTsdT	921	921 a 939	499	AuAcAUGGCcAGUCGGUCCdTsdT
AD-46253.1	500	cAAcGGccuGGAuGAGAGAdTsdT	1557	1557 a 1575	501	UCUCUcAUCcAGGCCGUUGdTsdT
AD-46253.2	500	cAAcGGccuGGAuGAGAGAdTsdT	1557	1557 a 1575	501	UCUCUcAUCcAGGCCGUUGdTsdT
AD-46254.1	502	AGuuGAucccAcAGGAccudTsdT	2291	2291 a 2309	503	AGGUCCUGUGGGAUcAACUdTsdT
AD-46255.1	504	ccGcAGuGAAAccGccAAAdTsdT	447	447 a 465	505	UUUGGCGGUUUcACUGCGGdTsdT
AD-46256.1	506	ccGAGGGccuAGuGAuccudTsdT	710	710 a 728	507	AGGAUcACuAGGCCUCUGGdTsdT
AD-46257.1	508	uccucAGcAccccGuAcuudTsdT	1163	1163 a 1181	509	AAGuACGGGGUGCUGAGGAdTsdT
AD-46258.1	510	cAGGuucGGGGucGAcAcAdTsdT	1897	1897 a 1915	511	UGUGUCGACCCCGAACCUgdTsdT
AD-46259.1	512	AGGuGAcGccAcGcAuGcudTsdT	2333	2333 a 2351	513	AGcAUGCGUGGCGUcACCUdTsdT
AD-46260.1	514	AAAccGccAAAGcccAGAAAdTsdT	455	455 a 473	515	UUCUGGGCUUUGGCGGUUUdTsdT
AD-46261.1	516	cAGuGuGAAAGAcAuAGcudTsdT	735	735 a 753	517	AGCuAUGUCUUUcAcACUGdTsdT
AD-46262.1	518	cccucucuGGAcuAcGGcudTsdT	1231	1231 a 1249	519	AGCCGuAGUCcAGAGAGGGdTsdT
AD-46263.1	520	GuucGGGGucGAcAcAucudTsdT	1900	1900 a 1918	521	AGAUGUGUCGACCCCGAACdTsdT
AD-46264.1	522	uGuGuGccGGcuAccGcAAAdTsdT	2351	2351 a 2369	523	UUGCGGuAGCCGGcAcAcAdTsdT

ID de Dúplex	SEQ ID NO.: (senso)	Sequências senso	Posição em NM_153609.2	Posição em NM_153609.2	SEQ ID NO.: (antissenso)	Sequências Antissenso
AD-46265.1	524	GcuucuucuGGuucAuucudTsdT	563	563 a 581	525	AGAAUGAACcAGAAGAAGCdTsdT
AD-46266.1	526	AuuccAcGcuGGGuuGuuAdTsdT	761	761 a 779	527	uAAcAACCcAGCGUGGAAUdTsdT
AD-46267.1	528	AcGGcuuGGccucuGGuudTsdT	1244	1244 a 1262	529	AACcAGAGGGCcAAGCCGUdTsdT
AD-46268.1	530	ucGcuGAccGcuGGGuGAudTsdT	1934	1934 a 1952	531	AUcACCcAGCGGUcAGCGAdTsdT
AD-46269.1	532	AGuGGuGAccuGAGGAAdTsdT	2538	2538 a 2556	533	AGUUCcUcAGGUcACcACUdTsdT
AD-46269.2	532	AGuGGuGAccuGAGGAAdTsdT	2538	2538 a 2556	533	AGUUCcUcAGGUcACcACUdTsdT
AD-46270.1	534	cAAGcAGGGGGAcAAGuAudTsdT	2612	2612 a 2630	535	AuACUUGUCCCCUGCUUGdTsdT
AD-46271.1	536	uGAuGucuGuccAGuGAudTsdT	2696	2696 a 2714	537	AUcACUGGAGcAGAcAUcAdTsdT
AD-46272.1	538	cuAAcuuGGGAucuGGGAAdTsdT	2975	2975 a 2993	539	UUCcCAGAUCcAAGUuAGdTsdT
AD-46273.1	540	uGGuAuuuccuAGGGuAcAdTsdT	331	331 a 349	541	UGuACCCuAGGAAuACcAdTsdT
AD-46273.2	540	uGGuAuuuccuAGGGuAcAdTsdT	331	331 a 349	541	UGuACCCuAGGAAuACcAdTsdT
AD-46273,3	540	uGGuAuuuccuAGGGuAcAdTsdT	331	331 a 349	541	UGuACCCuAGGAAuACcAdTsdT
AD-46274.1	542	GAGGuGuccuucAAGGuGAdTsdT	2050	2050 a 2068	543	UcACCUUGAAGGAcACCUCdTsdT
AD-46276.1	544	AAGcAGGGGGAcAAGuAuudTsdT	2613	2613 a 2631	545	AAuACUUGUCCCCUGCUUdTsdT
AD-46277.1	546	cAGcuGGGGGucAAGAcGudTsdT	2739	2739 a 2757	547	ACGUUUGACCCcAGCUGdTsdT
AD-46278.1	548	cuuGGGAucuGGGAuGGAdTsdT	2979	2979 a 2997	549	UCcAUUCCcAGAUCcAAGdTsdT
AD-46279.1	550	GGuAuuuccuAGGGuAcAAdTsdT	332	332 a 350	551	UUGuACCCuAGGAAuACCdTsdT
AD-46280.1	552	GGcuAccGcAAGGGcAAGAdTsdT	2359	2359 a 2377	553	UCUUGCCCUUGCGGuAGCCdTsdT
AD-46282.1	554	GcAGGGGGAcAAGuAuucudTsdT	2615	2615 a 2633	555	AGAAuACUUGUCCCCUGCdTsdT

ID de Dúplex	SEQ ID NO.: (senso)	Sequências senso	Posição em NM_153609.2	Posição em NM_153609.2	SEQ ID NO.: (antissenso)	Sequências Antissenso
AD-46283.1	556	GcucAGcAGcAAGAAuGcudTsdT	2851	2851 a 2869	557	AGcAUUCUUGCUGCUGAGCdTsdT
AD-46284.1	558	uuGGGAucuGGGAuGGAAdTsdT	2980	2980 a 2998	559	UUCcAUUCCcAGAUCcCAAdTsdT
AD-46285.1	560	ccAAAGcccAGAAGAuGcudTsdT	461	461 a 479	561	AGcAUCUUCUGGGCUUUGGdTsdT
AD-46286.1	562	GcuAccGcAAGGGcAAGAAAdTsdT	2360	2360 a 2378	563	UUCUUGCCCUUGCGGuAGCdTsdT
AD-46286.2	562	GcuAccGcAAGGGcAAGAAAdTsdT	2360	2360 a 2378	563	UUCUUGCCCUUGCGGuAGCdTsdT
AD-46288.1	564	uGGuGGcAGGAGGuGGcAudTsdT	2664	2664 a 2682	565	AUGCcACCUCCUGCcACcAdTsdT
AD-46289.1	566	cccAcucuGuAcAGAGGcudTsdT	2903	2903 a 2921	567	AGCCUCUGuAcAGAGUGGGdTsdT
AD-46290.1	568	cucAcAGcccAGAcccucAdTsdT	3128	3128 a 3146	569	UGAGGGUCUGGGCUGUGAGdTsdT
AD-46291.1	570	ccucucuGGAcuAcGGcuudTsdT	1232	1232 a 1250	571	AAGCCGuAGUCcAGAGAGGdTsdT
AD-46293.1	572	GuGGcAGGAGGuGGcAucudTsdT	2666	2666 a 2684	573	AGAUGCcACCUCCUGCcACdTsdT
AD-46294.1	574	uucGGAAGccccuGGucuAdTsdT	2959	2959 a 2977	575	uAGACcAGGGGCUUCCGAAdTsdT
AD-46295.1	576	AGcucAGcuGccuuuuGGAAdTsdT	3157	3157 a 3175	577	UCcAAAGGGcAGCUGAGCUdTsdT
AD-46296.1	578	GGccuGGAuGAGAGAAAcudTsdT	1561	1561 a 1579	579	AGUUUCUCUcAUCcAGGCCdTsdT
AD-46297.1	580	uGGcAGGAGGuGGcAucuudTsdT	2667	2667 a 2685	581	AAGAUGCcACCUCCUGCcAdTsdT
AD-46298.1	582	ucGGAAGccccuGGucuAAdTsdT	2960	2960 a 2978	583	UuAGACcAGGGGCUUCCGAAdTsdT
AD-46299.1	584	GcucAGcuGccuuuuGGAAdTsdT	3158	3158 a 3176	585	UUCcAAAGGGcAGCUGAGCdTsdT
AD-46299.2	584	GcucAGcuGccuuuuGGAAdTsdT	3158	3158 a 3176	585	UUCcAAAGGGcAGCUGAGCdTsdT
AD-46300.1	586	AcuGuGAcuGuGGccuccAdTsdT	1808	1808 a 1826	587	UGGAGGCcAcAGUcAcAGUdTsdT
AD-46301.1	588	AGGAGGuGGcAucuuGucudTsdT	2671	2671 a 2689	589	AGAcAAGAUGCcACCUCCUdTsdT

ID de Dúplex	SEQ ID NO.: (senso)	Sequências senso	Posição em NM_153609.2	Posição em NM_153609.2	SEQ ID NO.: (antissenso)	Sequências Antissenso
AD-46302.1	590	ccccuGGucuAAcuuGGGAdTsdT	2967	2967 a 2985	591	UCCcAAGUuAGACcAGGGGdTsdT
AD-46303.1	592	ucAGcuGccuuuuGGAAuAdTsdT	3160	3160 a 3178	593	uAUUCcAAAGGGcAGCUGAdTsdT
AD-46304.1	594	ucGGGGucGAcAcAucuGudTsdT	1902	1902 a 1920	595	AcAGAUGUGUCGACCCCGAdTsdT
AD-46305.1	596	GucccuGAuGucuGcuccAdTsdT	2691	2691 a 2709	597	UGGAGcAGAcAUcAGGGACdTsdT
AD-46306.1	598	cccuGGucuAAcuuGGGAudTsdT	2968	2968 a 2986	599	AUCCcAAGUuAGACcAGGGdTsdT
AD-46307.1	600	cAGcuGccuuuuGGAAuAAdTsdT	3161	3161 a 3179	601	UuAUUCcAAAGGGcAGCUGdTsdT
AD-46307.2	600	cAGcuGccuuuuGGAAuAAdTsdT	3161	3161 a 3179	201	UuAUUCcAAAGGGcAGCUGdTsdT
AD-46308.1	602	ucAucGcuGAccGcuGGGudTsdT	1931	1931 a 1949	603	ACCcAGCGGUcAGCGAUGAdTsdT

Síntese de sequências de TMPRSS6

[000332] As sequências de iRNA de TMPRSS6 podem ser sintetizadas em um sintetizador MerMade 192 em escala de 1 µmol.

[000333] A química Endolight pode ser aplicada conforme detalhado abaixo.

[000334] Todas as pirimidinas (citosina e uridina) na fita senso continuam bases de 2'-O-Metil (2' O-Metil C e 2'-O-Metil U).

[000335] Na fita antissenso, as pirimidinas adjacentes (voltados à posição 5') ao ribo A nucleosídeo podem ser substituídas por seus nucleosídeos 2-O-Metil correspondentes.

[000336] Uma extensão de dTsdT de duas bases em extremidade 3' tanto de sequências senso quanto de sequências antissenso pode ser introduzida.

[000337] O arquivo de sequência pode ser convertido em um arquivo de texto para tornar o mesmo compatível para carregamento no software de síntese de MerMade 192.

Síntese, Clivagem e desproteção

[000338] A síntese de sequências de TMPRSS6 usa síntese de Oligonucleotídeo de suporte sólido com o uso de química de fosforamídita.

[000339] A síntese das sequências acima pode ser realizada em escala de 1 µm em placa com 96 alvéolos. As soluções de amidita podem ser preparadas em concentrações de 0,1 M e etil tio tetrazol (0,6M em acetonitrila) podem ser usadas como ativador.

[000340] As sequências sintetizadas podem ser clivadas e desprotegidas em placas com 96 alvéolos, com o uso de metilamina na primeira etapa e reagente de fluoreto na segunda etapa. As sequências brutas podem ser precipitadas com o uso de acetona: mistura de etanol (80:20) e os péletes ressuspensos em 0,02M de tampão de acetato de sódio. As amostras de cada sequência podem ser analisadas por LC-

MS para confirmar a identidade e por UV para quantificação. Um grupo selecionado de amostras também pode ser analisado por cromatografia de IEX para determinar a pureza.

Purificação e dessalinização

[000341] Todas as sequências podem ser preparadas no sistema de purificação explorador de AKTA com o uso da coluna de fonte 15Q. A injeção de amostra e coleta pode ser realizada em placas de 96 alvéolos (alvéolo profundo de 1,8ml). Um único pico que corresponde à sequência de comprimento total pode ser coletado no eluente. As sequências purificadas podem ser dessalinizadas em uma coluna Sephadex G25 com o uso de purificador AKTA. As sequências dessalinizadas de TMPRSS6 podem ser analisadas para concentração (por medição de UV em A260) e pureza (por HPLC de troca de íon). As únicas fitas podem ser então submetidas ao recozimento.

Exemplo 3. Triagem *In vitro* de duplex de siRNA de TMPRSS6 para TMPRSS6 atividade de redução de expressão.

[000342] Os dúplexes de siRNA de TMPRSS6 foram triados para a atividade de redução de expressão da expressão de TMPRSS6 *in vitro*. A triagem de dose única, triagem de resposta à dose e viabilidade de células hospedeiras foram avaliadas.

Triagem *In vitro*:

Cultura celular e transfecções de dose única e estudos de resposta de dose:

[000343] As células HeLa ou Hep3B (ATCC, Manassas, VA) foram cultivadas à próxima confluência a 37 °C em uma atmosfera de 5% CO₂ em X (ATCC) suplementada com 10% de FBS, estreptomicina e glutamina (ATCC) antes de ser liberada da placa por meio de tripsinização. A transfecção foi realizada adicionando-se 14,8 µl de Opti-MEM somado a 0,2 µl de Lipofectamina RNAiMax por alvéolo (Invitrogen, Carlsbad CA. cat nº 13778-150) a 5 µl de dúplexes de siRNA por alvé-

olo em uma placa de 96 alvéolos e incubada em temperatura ambiente por 15 minutos. 80 µl de meio de cultivo completo sem antibiótico que contém $\sim 2 \times 10^4$ células HeLa ou Hep3B foram então adicionados à mistura de siRNA. As células foram incubadas tanto por 24 horas como por 120 horas antes da purificação de RNA. Os experimentos de dose única foram realizados em concentração final de dúplex de 10 nM e 0,1 nM e experimentos de resposta à dose foram feitos em concentração final de dúplex de 10, 1, 0,5, 0,1, 0,05, 0,01, 0,005, 0,001, 0,0005, 0,0001, 0,00005, 0,00001 nM.

Isolamento total de RNA com o uso de Kit de isolamento de DYNABEADS® mRNA (Invitrogen, parte nº:610-12):

[000344] As células foram coletadas e lisadas em 150 µl de tampão de lise/ligação então misturadas por 5 minutos em 850 rpm com o uso de um misturador térmico Eppendorf ® (a velocidade de mistura foi então a mesma ao longo de todo o processo). Dez microlitros de microesferas magnéticas e 80 µl de mistura de tampão de lise/ligação foram adicionados a uma placa de fundo arredondado e misturados por 1 minuto. As Microesferas magnéticas foram capturadas com o uso de um suporte magnético e o sobrenadante foi removido sem atrapalhar as microesferas. Após a remoção do sobrenadante, as células lisadas foram adicionadas às microesferas remanescentes e misturadas por 5 minutos. Após a remoção do sobrenadante, as microesferas magnéticas foram lavadas duas vezes com 150 µl de Tampão de lavagem A e misturadas por um minuto. As microesferas foram capturadas novamente e o sobrenadante foi removido. As microesferas foram então lavadas com 150 µl de Tampão de lavagem B, capturadas e o sobrenadante foi removido. As microesferas foram em seguida lavadas com 150 µl de Tampão de eluição, capturadas e removidas de sobrenadante. As microesferas foram então permitidas a secar por dois minutos. Após a secagem, 50 µl de tampão de eluição foram adicionados

e misturados por cinco minutos em 70 °C. As microesferas foram capturadas em um ímã por cinco minutos. 40 µl de sobrenadante foram removidos e adicionados à outra placa de 96 alvéolos.

Síntese de cDNA com o uso de Kit de transcrição reversa de cDNA de ABI de alta capacidade de ABI (Applied Biosystems, Foster City, CA, Cat nº4368813):

[000345] Uma mistura principal de 2 µl de tampão 10X, 0,8 µl de 25X dNTPs, 2 µl de Iniciadores primários, 1 µl de transcriptase reversa, 1 µl de inibidores de RNase e 3,2 µl de H₂O por reação foram adicionados em 10 µl total RNA. cDNA foi gerado com o uso de um termociclador Bio-Rad C-1000 ou S-1000 (Hercules, CA) através das etapas a seguir: 25 °C 10 min, 37 °C 120 min, 85 °C 5 segundos, mantendo-se 4 °C.

PCR em tempo real:

[000346] 2 µl de cDNA foram adicionadas a uma mistura principal que contém 0,5 µl GAPDH TaqMan Probe (Applied Biosystems Cat nº4326317E), 0,5 µl de sonda TMPRSS6 TaqMan (Applied Biosystems cat nº Hs00542184_m1) e 5 µl de mistura principal de sonda Lightcycler 480 (Roche Cat nº04887301001) por alvéolo em uma placa de 50 alvéolos 384 (Roche cat nº 04887301001). O PCR em tempo real foi feito em um sistema PCR em tempo real ABI 7900HT (Applied Biosystems) com o uso do ensaio $\Delta\Delta C_t$ (RQ). Cada dúplex foi testado em duas transfecções independentes e cada transfecção foi analisada em duplicata, a menos que observado de outro modo nas Tabelas de resumo.

[000347] Para calcular a mudança relativa de dobra, os dados em tempo real foram analisados com o uso do método $\Delta\Delta C_t$ e normalizados para ensaios realizados com células transfectadas com AD-1955 de 10 nM ou células transfectadas em simulação. IC₅₀s foi calculado com o uso de um modelo de encaixe de parâmetro 4 com o uso de

XLFit e normalizado para as células transfectadas com AD-1955 na mesma faixa de dosagem ou a sua própria mais baixa.

[000348] *Triagens de viabilidade.* As células HeLa ou Hep3B (ATCC, Manassas, VA) foram cultivadas à confluência próxima a 37 °C em uma atmosfera de 5% CO₂ em X (ATCC) suplementada com 10% FBS, de estreptomicina e glutamina (ATCC) antes de serem liberadas da placa por tripsinização. A viabilidade celular foi medida nos dias 3 e 5 em Células HeLa e Hep3B que seguem transfecção com 100, 10, 1, 0,1, 0,01 e 0,0001 nM siRNA. As células foram chapeadas em uma densidade de 2,5X10³-5X10³ células por alvéolo em placa com 96 alvéolos. Cada siRNA foi analisado em triplicata e os dados mediados. Os PLK1 e AD-19200 de direcionamento de siRNAs foram incluídos como controles positivo para perda de viabilidade e AD-1955 como um controle negativo. PLK1 e AD-19200 resultam em uma perda dependente de dose de viabilidade. Para medir a viabilidade, 20ul de CellTiter Blue (Promega) foi adicionado a cada alvéolo da placa com 96 alvéolos depois de 3 e 5 dias e encubado a 37°C por 2 horas. As placas foram então lidas em um Espectrofotômetro (Dispositivos moleculares) a 560_{Ex}/590_{Em}. A viabilidade foi expressa como o valor médio de unidades de luz de três transfecções replicadas +/- desvio padrão.

Redução de expressão *In vitro* de expressão de TMPRSS6 por duplexes de siRNA de TMPRSS6.

[000349] A Tabela 5 apresenta dados que indicam a redução de expressão de TMPRSS6 em células Hep3B transfectadas com TMPRSS6 de direcionamento de siRNAs. Os dados são expressos como uma fração de Mensagem de TMPRSS6 que permanece nas células transfectadas com TMPRSS6 de direcionamento de siRNAs, relativos às células transfectadas com um controle negativo siRNA, AD-1955. As células que não foram tratadas (células "virgens") serviram como um segundo controle negativo. Todos os siRNAs foram tes-

tados pelo menos duas vezes e reações qPCR também foram realizadas em duplicata. Os experimentos de dose única foram realizados em concentração dúplex de siRNA final de 10 nM e 0,1 nM.

Tabela 5. expressão de TMPRSS6 em triagem de dose única *in vitro*.

ID de Dúplex	10 nM de média	0,1 nM de média	10 nM SD	0,1 nM SD
AD-46230.1	0,89	1,14	0,036	0,145
AD-46230.1	0,85	1,22	0,039	0,063
AD-46231.1	0,11	0,29	0,017	0,007
AD-46232.1	0,78	0,87	0,03	0,023
AD-46233.1	0,6	0,98	0,033	0,046
AD-46234.1	0,79	1,06	0,082	0,068
AD-46235.1	0,18	0,87	0,009	0,066
AD-46235.1	0,18	0,96	0,009	0,132
AD-46236.1	0,15	1,06	0,007	0,036
AD-46237.1	0,81	0,98	0,043	0,027
AD-46238.1	0,71	0,99	0,069	0,031
AD-46239.1	0,83	1,3	0,035	0,073
AD-46240.1	0,89	0,99	0,027	0,079
AD-46240.1	0,88	1	0,009	0,034
AD-46241.1	0,6	0,9	0,029	0,029
AD-46242.1	0,81	0,91	0,016	0,049
AD-46243.1	0,82	0,87	0,029	0,066
AD-46244.1	0,19	0,43	0,018	0,028
AD-46245.1	0,48	0,79	0,148	0,016
AD-46245.1	0,51	0,82	0,147	0,028
AD-46246.1	0,39	0,89	0,012	0,043
AD-46247.1	0,84	0,9	0,047	0,019
AD-46248.1	0,68	0,95	0,059	0,075

ID de Dúplex	10 nM de média	0,1 nM de média	10 nM SD	0,1 nM SD
AD-46249.1	0,17	0,29	0,005	0,152
AD-46250.1	0,19	0,53	0,017	0,011
AD-46251.1	0,16	0,47	0,007	0,005
AD-46252.1	1,04	1,08	0,031	0,038
AD-46253.1	0,27	0,45	0,02	0,031
AD-46254.1	1,03	1,08	0,221	0,021
AD-46255.1	0,52	0,84	0,029	0,036
AD-46256.1	0,81	1,02	0,025	0,015
AD-46257.1	0,64	0,97	0,016	0,076
AD-46258.1	0,91	0,98	0,054	0,059
AD-46259.1	0,77	1,03	0,052	0,067
AD-46260.1	1,24	1	0,634	0,031
AD-46261.1	0,12	0,19	0,007	0,006
AD-46262.1	0,58	1,27	0,016	0,024
AD-46263.1	0,79	0,95	0,03	0,021
AD-46264.1	0,93	1,16	0,052	0,095
AD-46265.1	0,09	0,47	0,007	0,017
AD-46266.1	0,25	0,8	0,024	0,018
AD-46267.1	0,65	0,84	0,058	0,02
AD-46268.1	0,92	1	0,008	0,048
AD-46269.1	0,37	0,52	0,037	0,024
AD-46270.1	0,26	0,55	0,01	0,03
AD-46271.1	0,35	0,8	0,044	0,029
AD-46272.1	0,62	0,91	0,015	0,061
AD-46273.1	0,18	0,3	0,02	0,012
AD-46274.1	0,88	0,85	0,04	0,016
AD-46276.1	0,33	0,64	0,024	0,024

ID de Dúplex	10 nM de média	0,1 nM de média	10 nM SD	0,1 nM SD
AD-46277.1	0,85	0,89	0,12	0,026
AD-46278.1	0,24	0,7	0,019	0,059
AD-46279.1	0,55	0,79	0,008	0,025
AD-46280.1	0,96	0,84	0,059	0,042
AD-46282.1	0,21	0,47	0,017	0,004
AD-46283.1	0,62	1,01	0,05	0,03
AD-46284.1	0,42	0,78	0,016	0,019
AD-46285.1	0,37	0,86	0,014	0,042
AD-46286.1	0,19	0,49	0,019	0,027
AD-46288.1	0,65	0,88	0,052	0,032
AD-46289.1	0,89	0,92	0,062	0,032
AD-46290.1	0,83	0,9	0,035	0,029
AD-46291.1	0,65	0,87	0,014	0,014
AD-46293.1	0,31	0,68	0,012	0,054
AD-46294.1	0,25	0,7	0,015	0,031
AD-46295.1	0,2	0,42	0,004	0,029
AD-46296.1	0,43	0,83	0,012	0,043
AD-46297.1	0,3	0,6	0,009	0,017
AD-46298.1	0,91	0,91	0,08	0,008
AD-46299.1	0,26	0,57	0,018	0,052
AD-46300.1	0,98	0,91	0,037	0,024
AD-46301.1	0,65	0,87	0,018	0,051
AD-46302.1	0,92	1,01	0,021	0,048
AD-46303.1	0,13	0,43	0,008	0,019
AD-46304.1	1,11	1,01	0,016	0,056
AD-46305.1	0,21	0,73	0,029	0,011
AD-46306.1	0,84	0,96	0,114	0,092

ID de Dúplex	10 nM de média	0,1 nM de média	10 nM SD	0,1 nM SD
AD-46307.1	0,27	0,49	0,007	0,019
AD-46308.1	0,69	0,83	0,02	0,024
Virgem	1,04	1,06	0,021	0,018
Virgem	1,07	1,29	0,065	0,059
AD-1955	0,85	0,85	0,055	0,071
AD-1955	1,1	0,97	0,034	0,04
AD-1955	1	0,98	0,036	0,058
AD-1955	1,04	0,98	0,053	0,049
AD-1955	1,04	1,08	0,021	0,039
AD-1955	0,98	1,19	0,049	0,058

IC₅₀ de Dúplexes selecionados de siRNA de TMPRSS6 em triagem de resposta de dose *in vitro*.

[000350] A Tabela 6 apresenta os valores de IC₅₀ de dúplexes selecionados de siRNA de TMPRSS6 determinados a partir das triagens de resposta de dose *in vitro*. Os dúplexes de siRNA de TMPRSS6 que foram eficazes na triagem de dose única de 10 nM e 0,1 nM (Tabela 5) foram testados para TMPRSS6 atividade de redução de expressão em uma resposta de dose em 1 e 5 dias seguindo a transfecção em células Hep3B. Os experimentos de resposta à dose foram conduzidos em concentração dúplex de siRNA final de 10, 1, 0,5, 0,1, 0,05, 0,01, 0,005, 0,001, 0,0005, 0,0001, 0,00005, 0,00001 nM. Para normalização, a redução de expressão de TMPRSS6 foi medida em relação ao controle de não direcionamento, AD-1955 ou ao valor obtido na menor concentração de siRNA para cada dúplex testado.

Tabela 6. IC₅₀ de dúplexes selecionados de siRNA de TMPRSS6 em triagem de resposta de dose *in vitro*.

	Normalizado para baixa dose		Normalizado para AD- 1955	
ID de Dúplex	Dia 1 (nM)	Dia 5 (nM)	Dia 1 (nM)	Dia 5 (nM)
AD-46250.1	0,57	0,08	0,22	0,04
AD-46265.1	0,14	0,07	0,2	0,03
AD-46231.1	0,07	0,04	0,06	0,02
AD-46251.1	0,27	0,1	0,37	0,07
AD-46261.1	0,04	0,09	0,08	0,05
AD-46253.1	0,78	0,07	0,35	0,13
AD-46244.1	0,14	0,13	0,2	0,32
AD-46269.1	0,06	0,57	0,07	1,16
AD-46270.1	0,94	No IC50	0	No IC50
AD-46282.1	1,16	No IC50	0,02	No IC50
AD-46297.1	0,05	No IC50	0,08	No IC50
AD-46299.1	0,01	3,89	0,03	0,69
AD-46303.1	0,01	2,47	0,03	0,04
AD-46307.1	1,02	0,02	2,68	0,15
AD-46273.1	0,23	0,03	0,72	0,1
	Normalizado para baixa dose		Normalizado para AD- 1955	
AD-46286.1	0,22	0,46	0,53	0,46
AD-46249.1	0,27	1,96	0,31	5,87
AD-46295.1	0,76	0,31	0,24	0,1

Triagem de viabilidade *in vitro* de Linhas de células HeLa e HEP3B transfectadas com dúplexes de siRNA de TMPRSS6.

[000351] A Tabela 7 apresenta dados de viabilidade de linhas de cé-

lulas HeLa e HEP3B transfectadas com dúplexes de siRNA de TMPRSS6. Os dados de viabilidade são expressos como unidades de fluorescências brutas médias, em que valores menores representam menor viabilidade. O erro é expresso como o desvio padrão a partir de três transfecções replicadas.

Tabela 7. Viabilidade de linhas de células HeLa e HEP3B transfectadas com dúplexes de siRNA de TMPRSS6.

	HeLa Dia 3 10 nM	HeLa Dia 3 1 nM	HeLa Dia 3 0,1 nM	HeLa Dia 3 0,01 nM	HeLa Dia 3 0,001 nM	HeLa Dia 3 0,0001 nM		HeLa Dia 3 10 nM SD	HeLa Dia 3 1 nM SD	HeLa Dia 3 0,1 nM SD	HeLa Dia 3 0,01 nM SD	HeLa Dia 3 0,001 nM SD	HeLa Dia 3 0,0001 nM SD
AD-46250.1	5260	13504	29520	30542	30924	30956		150	62	272	220	799	751
AD-46265.1	12234	29940	32497	33323	32124	32882		968	884	1071	946	707	595
AD-46231.1	25177	28407	32021	32650	33375	32704		710	420	127	1697	356	667
AD-46251.1	29528	30151	30215	32163	31743	31726		416	102	31	1588	518	1091
AD-46261.1	16677	26331	30594	31681	32847	31544		390	277	431	1375	681	583
AD-46253.1	21580	28887	30953	31684	32457	31491		1158	437	524	944	229	455
AD-46244.1	13230	16369	26545	31359	32753	32280		197	165	255	357	589	1318
AD-46269.1	9978	19514	29290	30839	31529	31173		597	360	1406	400	743	626
AD-46270.1	17543	17834	31180	31087	32793	31314		370	1026	771	552	391	1293
AD-46282.1	29055	32421	31840	31006	34287	32185		446	618	430	855	323	133
AD-46297.1	8126	16696	28128	33928	33955	32322		193	598	733	895	1266	392
AD-46299.1	31922	30196	30880	30447	31900	32608		1459	617	58	194	773	964
AD-46303.1	27309	28325	27975	29319	30310	30935		1363	572	421	295	306	95
AD-46307.1	33156	33240	32059	33072	32135	33307		667	258	775	1164	102	286
AD-46273.1	24465	29130	30417	33043	34639	31876		142	768	271	261	853	800
AD-46286.1	3640	9590	29713	33138	32877	30814		34	631	371	1185	1641	599
AD-46249.1	17315	25591	30443	31599	32719	29855		981	258	578	482	1412	886
AD-46295.1	30565	31730	30772	31777	32874	30916		403	261	1223	1880	981	441
AD-19200	9727	15752	31352	32521	30110	30650		648	699	763	1543	55	9
PLK	1166	1626	27849	29902	30512	30273		23	44	91	299	362	563
AD-1955	26502	30164	30267	31906	33309	30906		5669	134	353	645	233	696

	HeLa Dia 3 10 nM	HeLa Dia 3 1 nM	HeLa Dia 3 0,1 nM	HeLa Dia 3 0,01 nM	HeLa Dia 3 0,001 nM	HeLa Dia 3 0,0001 nM		HeLa Dia 3 10 nM SD	HeLa Dia 3 1 nM SD	HeLa Dia 3 0,1 nM SD	HeLa Dia 3 0,01 nM SD	HeLa Dia 3 0,001 nM SD	HeLa Dia 3 0,0001 nM SD
Virgem	32821	32311	30805	31683	33238	31470		1455	631	555	557	288	164
Virgem	33594	32373	32005	34024	35629	33401		554	253	754	899	55	649
Virgem	30695	30651	29956	31377	32734	32527		304	299	807	874	646	225

	HeLa Dia 5 10 nM	HeLa Dia 5 1 nM	HeLa Dia 5 0,1 nM	HeLa Dia 5 0,01 nM	HeLa Dia 5 0,001 nM	HeLa Dia 5 0,0001 nM		HeLa Dia 5 10 nM SD	HeLa Dia 5 1 nM SD	HeLa Dia 5 0,1 nM SD	HeLa Dia 5 0,01 nM SD	HeLa Dia 5 0,001 nM SD	HeLa Dia 5 0,0001 nM SD
AD-46250.1	2344	25502	46627	44986	46479	46070		44	1916	157	913	598	2016
AD-46265.1	10411	46611	48725	47425	47238	47942		300	327	602	1479	2145	1690
AD-46231.1	41079	46963	48575	48060	47467	48500		1645	319	243	998	1821	1203
AD-46251.1	42551	47044	49088	48269	47755	48719		1597	420	162	1105	1434	1232
AD-46261.1	37500	46441	48702	47953	47776	48878		689	441	451	1447	1614	1159
AD-46253.1	31772	45899	48606	47801	47693	49237		1310	65	648	1550	1365	789
AD-46244.1	11597	28046	46020	47413	47670	49430		967	527	395	1336	937	869
AD-46269.1	10704	37735	47496	47629	47496	49194		317	161	198	1359	1502	986
AD-46270.1	16356	26284	48520	48011	48016	49358		382	663	497	1121	1024	681
AD-46282.1	22372	42327	47297	47478	47450	49349		656	715	343	1513	2057	883
AD-46297.1	4228	26993	47037	47269	46961	48993		41	657	593	1847	1574	639
AD-46299.1	45283	45485	46334	43966	42922	46772		1088	908	382	2057	3580	1131
AD-46303.1	42669	46358	46240	45624	46920	46764		849	183	791	890	90	539
AD-46307.1	47710	47466	47974	47671	47911	48505		273	539	680	399	238	309
AD-46273.1	36834	45018	47522	47912	48316	48804		680	432	104	619	308	248

	HeLa Dia 3 10 nM	HeLa Dia 3 1 nM	HeLa Dia 3 0,1 nM	HeLa Dia 3 0,01 nM	HeLa Dia 3 0,001 nM	HeLa Dia 3 0,0001 nM		HeLa Dia 3 10 nM SD	HeLa Dia 3 1 nM SD	HeLa Dia 3 0,1 nM SD	HeLa Dia 3 0,01 nM SD	HeLa Dia 3 0,001 nM SD	HeLa Dia 3 0,0001 nM SD
AD-46286.1	2970	31215	47504	47883	48062	48999		515	1262	1093	826	87	541
AD-46249.1	20356	44959	48534	47988	48053	49145		884	1033	1238	1045	619	530
AD-46295.1	46448	48014	49195	48654	48432	49355		685	1021	746	1183	645	407
AD-19200	26444	35772	39724	48377	48373	49509		725	1009	1246	540	762	408
PLK	1105	1804	37258	47955	47893	49416		44	95	1110	781	474	515
AD-1955	44857	47272	48354	48050	48668	49721		322	388	756	880	585	490
Virgem	48734	48454	48549	47246	48004	49067		850	303	743	1166	349	102
Virgem	48318	47839	45252	47098	47128	48914		969	527	223	797	548	526
Virgem	45189	45096	45508	44334	45177	47004		1327	938	579	1342	930	350

	Hep3B Dia 3 10 nM	Hep3B Dia 3 1 nM	Hep3B Dia 3 0,1 nM	Hep3B Dia 3 0,01 nM	Hep3B Dia 3 0,001 nM	Hep3B Dia 3 0,0001 nM		Hep3B Dia 3 10 nM SD	Hep3B Dia 3 1 nM SD	Hep3B Dia 3 0,1 nM SD	Hep3B Dia 3 0,01 nM SD	Hep3B Dia 3 0,001 nM SD	Hep3B Dia 3 0,0001 nM SD
AD-46250.1	4495	4905	6786	7022	6122	6033		225	105	56	85	151	49
AD-46265.1	6453	6990	6917	6685	6165	5974		187	79	103	70	121	21
AD-46231.1	6478	7042	6808	6444	6173	5987		97	19	35	66	131	69
AD-46251.1	5663	5990	6084	6241	5869	6298		445	38	73	69	63	88
AD-46261.1	5380	6025	5824	6325	5801	6076		376	14	29	67	81	65
AD-46253.1	5417	6078	5840	6113	5568	6503		549	29	103	81	20	72
AD-46244.1	4743	5479	5884	6078	6170	6593		29	43	51	168	60	70
AD-46269.1	2788	2958	5479	5878	5899	5739		64	14	97	215	80	22
AD-46270.1	4378	4720	5579	6127	6066	6522		235	94	167	17	43	260

	HeLa Dia 3 10 nM	HeLa Dia 3 1 nM	HeLa Dia 3 0,1 nM	HeLa Dia 3 0,01 nM	HeLa Dia 3 0,001 nM	HeLa Dia 3 0,0001 nM		HeLa Dia 3 10 nM SD	HeLa Dia 3 1 nM SD	HeLa Dia 3 0,1 nM SD	HeLa Dia 3 0,01 nM SD	HeLa Dia 3 0,001 nM SD	HeLa Dia 3 0,0001 nM SD
AD-46282.1	5096	5932	6258	5988	6068	6724		101	34	32	107	59	20
AD-46297.1	1134	1325	4477	6051	6199	6626		40	64	80	101	134	55
AD-46299.1	5875	5836	6251	5872	6016	6726		47	64	39	54	81	104
AD-46303.1	6879	7060	6801	6793	6306	6827		43	32	59	60	126	65
AD-46307.1	6951	6826	6613	6511	6119	7093		97	148	46	82	97	91
AD-46273.1	6628	6749	6711	6839	6237	6958		122	24	59	59	48	109
AD-46286.1	5384	5405	5755	6469	6299	6207		81	5	45	33	95	58
AD-46249.1	3955	4239	5214	6549	6171	6537		141	70	134	37	35	27
AD-46295.1	6186	6535	5776	6500	6247	6252		96	34	141	35	41	35
AD-19200	2304	3860	5592	6634	6063	6111		95	24	43	41	67	74
PLK	1484	1668	3385	6283	5714	6015		36	52	130	94	112	143
AD-1955	5718	5826	5633	6356	6369	6460		27	60	16	80	108	122
Virgem	5799	6503	6350	6351	6002	6449		69	98	44	40	72	66
Virgem	5623	6550	5950	6103	5574	6489		23	49	37	82	59	93
Virgem	5895	6021	5550	5908	5573	6769		72	27	55	90	64	42

	Hep3B Dia 5 10 nM	Hep3B Dia 5 1 nM	Hep3B Dia 5 0,1 nM	Hep3B Dia 5 0,01 nM	Hep3B Dia 5 0,001 nM	Hep3B Dia 5 0,0001 nM		Hep3B Dia 5 10 nM SD	Hep3B Dia 5 1 nM SD	Hep3B Dia 5 0,1 nM SD	Hep3B Dia 5 0,01 nM SD	Hep3B Dia 5 0,001 nM SD	Hep3B Dia 5 0,0001 nM SD
AD-46250.1	4758	5572	9636	12294	11079	10674		311	285	180	901	575	403
AD-46265.1	9937	12543	10822	13430	12967	12089		323	1714	1094	107	1407	704
AD-46231.1	12650	13786	11763	13765	14003	13857		1002	422	1551	177	213	320

	HeLa Dia 3 10 nM	HeLa Dia 3 1 nM	HeLa Dia 3 0,1 nM	HeLa Dia 3 0,01 nM	HeLa Dia 3 0,001 nM	HeLa Dia 3 0,0001 nM		HeLa Dia 3 10 nM SD	HeLa Dia 3 1 nM SD	HeLa Dia 3 0,1 nM SD	HeLa Dia 3 0,01 nM SD	HeLa Dia 3 0,001 nM SD	HeLa Dia 3 0,0001 nM SD
AD-46251.1	8543	9397	10581	13642	12990	13568		518	1054	707	289	1247	475
AD-46261.1	10459	11700	11735	13764	13738	13210		148	1308	459	277	712	210
AD-46253.1	11125	12124	11533	14213	13967	11946		473	1531	772	262	679	1015
AD-46244.1	7330	7939	10428	12695	13584	11852		451	416	1104	61	358	1473
AD-46269.1	2316	2442	11476	13621	12821	11090		507	623	574	299	831	298
AD-46270.1	6643	5235	11774	12788	13487	11895		179	386	709	1032	635	760
AD-46282.1	7767	10214	12650	12859	12980	11175		214	1116	569	1282	925	169
AD-46297.1	1012	1124	9438	12403	12063	11599		47	96	162	990	1118	83
AD-46299.1	13643	13396	12404	12113	12782	12913		1585	2086	202	896	1040	1209
AD-46303.1	10567	12918	10617	11203	11189	11260		456	1263	106	309	310	153
AD-46307.1	13787	14089	11830	13512	13489	12773		208	467	900	60	504	203
AD-46273.1	13801	13484	12719	14212	14305	12499		386	219	1250	382	128	176
AD-46286.1	5783	6472	10990	14352	14424	12234		93	78	472	632	103	649
AD-46249.1	3763	5086	10729	14293	14283	12608		269	124	453	570	443	633
AD-46295.1	14870	15096	11289	14697	14336	12000		539	224	453	698	689	903
AD-19200	1546	6337	10310	14261	13551	11486		132	379	456	250	646	754
PLK	1337	1636	6996	14661	13860	12555		31	79	759	740	423	296
AD-1955	11717	12560	12164	14504	13008	11077		1146	1210	1289	392	1405	56
Virgem	13989	14873	11512	14022	13458	11399		404	316	267	412	635	114
Virgem	14167	14550	11269	14247	13793	11771		197	426	230	640	664	888
Virgem	13857	14632	10432	13485	14164	12808		231	1150	474	546	177	1028

Exemplo 4. Seleção de indução de dúplex siRNA de TMPRSS6.

[000352] Para selecionar siRNAs específicos de TMPRSS6 para uso em experimentação *in vivo* adicional, siRNAs quimicamente modificados foram triados por transfecção em células de hepatoma humano de HEP3B para a atividade de silenciamento de gene de TMPRSS6. Dois siRNAs de grande potencial com mínimo potencial de erro previsto e com reatividade de múltiplas espécies, que inclui macaco cinomolgo humano, rato e camundongo, foram selecionados para avaliação *in vivo*. A potência dos dois siRNAs de TMPRSS6 selecionados também foi confirmada nos hepatócitos primários de camundongo, em que tanto siRNA de TMPRSS6-1 (AD-46273) quanto siRNA de TMPRSS6-2 (AD-46286) demonstraram forte atividade de silenciamento de gene de TMPRSS6, com siRNA de TMPRSS6-1 (AD-46273) que demonstra um IC₅₀ de 70 pM (Figura 2A) e siRNA de TMPRSS6-2 (AD-46286) que demonstra um IC₅₀ de 140 pM (Figura 2B).

Exemplo 5. O efeito de silenciamento mediado de siRNA de TMPRSS6 de TMPRSS6 em camundongos WT C57BL/6.

[000353] O efeito de siRNA de TMPRSS6 em expressão TMPRSS6 e HAMP1 mRNA em camundongos WT C57BL/6.

[000354] De modo a avaliar o efeito de siRNA de LNP-TMPRSS6-1 (AD-46273) e siRNA de LNP-TMPRSS6-2 (AD-46286) *in vivo*, camundongos WT C57BL/6 fêmea com 8 semanas foram dosados por meio de injeção de veia caudal IV com 1mg/kg de siRNA de LNP-TMPRSS6-1 (AD-46273) ou siRNA de LNP-TMPRSS6-2 (AD-46286) ou LNP-AD-1955I (siRNA que direciona o gene LUCIFERASE não mamífero). Os siRNAs de TMPRSS6 foram formulados com LNP11 (MC3). Os camundongos foram sacrificados 24 horas após a dosagem e os fígados removidos, congelados instantaneamente e transformados em pó. Uma pequena quantidade (~20mg) de pó de fígado foi dividida em tampão de lise e usada para análise de mRNA por

TaqMan®. Um total de cinco camundongos foi usado por grupo. Os dados são expressos como um percentual de relações de controle de LNP-Luc de mRNA de TMPRSS6 alvo em relação ao mRNA de actina B. Conforme mostrado na Figura 3A, houve uma inibição dependente de dose específica e potente de expressão de mRNA de TMPRSS6 de fígado por siRNA de LNP-TMPRSS6-1 (AD-46273) e siRNA de LNP-TMPRSS6-2 (AD-46286) (meio de representação de dados +/-desvio padrão), com um ED₅₀ de 0,035 mg/kg e um ED₅₀ de 0,18 mg/kg, respectivamente. Conforme mostrado na Figura 3B, houve também uma inibição dependente de dose de expressão mRNA de HAMP1 de fígado por siRNA de LNP-TMPRSS6-1 (AD-46273) e siRNA de LNP-TMPRSS6-2 (AD-46286).

[000355] A duração de silenciamento mediado de siRNA de TMPRSS6 de TMPRSS6 e expressão de gene HAMP1 em camundongos WT C57BL/6.

[000356] De modo a avaliar a duração da redução de expressão mediada por siRNA de TMPRSS6 de TMPRSS6 e expressão de gene HAMP1, ao camundongo WT C57BL/6 de 8 semanas foi administrado uma única dose de 1mg/kg por meio de injeção de veia caudal IV com siRNA de LNP-TMPRSS6-1 (AD-46273) ou controle de LNP-Luc (LNP-AD-1955) ou PBS; todos os agentes de siRNA foram distribuídos como formulações de LNP11. Os camundongos foram sacrificados em 6 horas, 24 horas, 48 horas, 3 dias, 7 dias e 14 dias. O nível de expressão de mRNA de TMPRSS6 e HAMP1 no fígado foi analisado com o uso de ensaio TaqMan® e normalizado para a B-actina. Cinco camundongos foram usados por grupo e os dados são representados na Figura 4 como meios +/- desvio padrão. Conforme mostrado na Figura 4, 1 a dose única de mg/kg de siRNA de LNP-TMPRSS6-1 (AD-46273) reduziu a expressão de mRNA de TMPRSS6 em até seis horas após a dosagem e expressão de mRNA de TMPRSS6 reduzida a aproxima-

damente 90% de controle de LNP-Luc ou controle de PBS para a duração do período de tempo de duas semanas. A expressão de gene HAMP1 aumentou iniciando 24 horas após a dosagem e foi mantida pela duração do período de tempo de duas semanas, com um aumento máximo de 200% de controle no dia 14 após a dosagem (Figura 4). Adicionalmente, os níveis de ferro em soro foram analisados como porcentagem de saturação de transferrina (Tf) com o uso de um Olympus AU 400. O nível de saturação de transferrina foi calculado como a razão de ferro em soro na capacidade de ligação total de ferro (TIBC) e é expresso como um percentual de saturação de transferrina. O percentual de saturação de transferrina foi reduzido por aproximadamente 50% iniciando 24 horas após a dosagem e mantida durante o período de tempo de duas semanas, indicando que os níveis de ferro em circulação no soro diminuíram (Figura 4). O nível de silenciamento mediado de siRNA de TMPRSS6 de TMPRSS6 necessário para manter os efeitos mediados de siRNA de TMPRSS6 na expressão de gene HAMP1 e níveis de ferro em soro na camundongos WT C57BL/6.

[000357] De modo a avaliar o nível de silenciamento mediado de siRNA de TMPRSS6 de TMPRSS6 necessário para manter os efeitos mediados de siRNA de TMPRSS6 na expressão de gene HAMP1 e níveis de ferro em soro na camundongos WT C57BL/6; os camundongos C57BL/6 foram dosados com 0,3 mg/kg siRNA de LNP-TMPRSS6-1 (AD-46273) ou controle de LNP-Luc ou PBS; todos os agentes de siRNA foram distribuídos como formulações de LNP11. Os camundongos foram sacrificados em 5 horas, 24 horas, 48 horas, 3 dias, 7 dias, 14 dias, 21, dias e 28 dias após a dosagem. O nível de expressão de mRNA de TMPRSS6 e HAMP1 foi analisado com o uso de ensaio de ensaio de TaqMan® e normalizado para B-actina. Cincos camundongos foram usados por grupo e os dados são representados na Figura 5 como meio +/- desvio padrão. Conforme mostrado na Figura 5, a redu-

ção máxima de expressão de gene de TMPRSS6 de 90% foi alcançada 24 horas após a dosagem e mantida até o dia três após a dosagem. No dia sete após a dosagem, a expressão de gene de TMPRSS6 foi reduzida em aproximadamente 85%; expressão de gene HAMP1 foi induzida em aproximadamente 250% de controle; e a saturação de transferrina (%) foi reduzida em aproximadamente 50% (Figura 5). No dia 21 após a dosagem, a expressão de gene de TMPRSS6 foi reduzida em aproximadamente 40%; a expressão de gene HAMP1 fora normalizada; e os níveis de ferro em soro, conforme medido por saturação de transferrina (%), começaram a retornar aos níveis normais (Figura 5). Em sumário, a redução de expressão máxima de expressão de mRNA de TMPRSS6 foi alcançada em 24 horas após a dosagem e retornado a aproximadamente 50% de níveis normais de expressão por 3 semanas após a dosagem; níveis de mRNA de hepcidina diminuíram quão logo 24 horas e mantidos em até sete dias após a dosagem; níveis de hepcidina retornaram aos níveis de controle no dia quatorze após a dosagem; e a saturação de transferrina, conforme um indicador de níveis de ferro em circulação foi reduzido em 50% de níveis de controle quão logo 24 horas após a dosagem e foi normalizada até a semana quatro. Desse modo, os dados apresentados na Figura 5 ilustram que mais de 50% em silenciamento de TMPRSS6 é exigido para manter os efeitos mediados de siRNA de LNP-TMPRSS6-1 (AD-46273) na expressão de gene HAMP1 e os níveis de ferro em soro.

[000358] O efeito de silenciamento mediado de siRNA de TMPRSS6 de TMPRSS6 nos parâmetros hematológicos na camundongos WT C57BL/6.

[000359] De modo a avaliar o efeito de silenciamento mediado de siRNA de TMPRSS6 de TMPRSS6 nos parâmetros hematológicos, incluindo hemoglobina (HGB) e hematócrito; os camundongos WT C57BL/6 foram dosados com 1 mg/kg dose única de siRNA de

TMPRSS6-1 (AD-46273) ou controle de LNP-Luc ou PBS; e subsequentemente sacrificados em diferentes pontos de tempo em até duas semanas após a dosagem. Os parâmetros hematológicos que incluem hemoglobina (HGB), hematócrito, volume corpuscular de meio (MCV), hemoglobina corpuscular de meio (MCH), concentração de hemoglobina corpuscular de meio (MCHC) e o teor de hemoglobina de reticulócito (Chr) foram analisados com o uso do analisador Advia 120. Conforme mostrado nas Figuras. 6A e 6B, o silenciamento de TMPRSS6 em camundongos Th3/+ induziu a uma HGB (Figura 6A) de diminuição e uma diminuição de hematócrito (Figura 6B) na camundongos WT C57BL/6. Houve um efeito similar no volume corpuscular de meio (MCV), hemoglobina corpuscular de meio (MCH), concentração de hemoglobina corpuscular de meio (MCHC) e no teor de hemoglobina de reticulócito (Chr).

Exemplo 6. O efeito de silenciamento mediado de siRNA de TMPRSS6 de TMPRSS6 em camundongos talassêmicos (Th3/+).

[000360] O efeito de silenciamento mediado de siRNA de TMPRSS6 de TMPRSS6 nos parâmetros de ferro em soro em camundongos talassêmicos (Th3/+).

[000361] Para avaliar o efeito de silenciamento mediado de siRNA de TMPRSS6 de TMPRSS6 nos parâmetros de ferro em soro, incluindo níveis de ferro, capacidade de ligação com ferro não saturado (UIBC) e saturação de Tf em camundongos talassêmicos (Th3/+), camundongos Th3/+ de seis semanas foram dosados por meio de injeção de veia caudal com 1 mg/kg de siRNA de LNP-TMPRSS6-1 (AD-46273) ou controle de LNP-Luc ou PBS e os camundongos foram sacrificados duas semanas após a dosagem. Cincos camundongos foram usados por grupo e os dados representados na Figura 7 como meio +/- desvio padrão, com ** que indica um valor $P < 0,01$ e *** que indica um valor $P < 0,001$. Conforme mostrado na Figura 7, o silenciamento de

TMPRSS6 em camundongos Th3/+ induziu a uma redução significativa de ferro em soro, UIBC e saturação de Tf em comparação ao grupo de controle PBS.

[000362] O efeito de silenciamento mediado de siRNA de TMPRSS6 de TMPRSS6 nos parâmetros de reticulócito e eritrócito em camundongos talassêmicos (Th3/+).

[000363] Para avaliar o efeito de silenciamento mediado de siRNA de TMPRSS6 de TMPRSS6 em parâmetros de reticulócito e eritrócito, incluindo número de reticulócito, teor de hemoglobina de reticulócito (CHr) e número de eritrócito (RBC), em camundongos talassêmicos (Th3/+); os camundongos Th3/+ de seis semanas foram dosados por meio de injeção de veia caudal, com 1 mg/kg de siRNA de LNP-TMPRSS6-1 (AD-46273) ou controle de LNP-Luc ou PBS e os camundongos foram sacrificados duas semanas após a dosagem. Os parâmetros de Reticulócito e eritrócito, incluindo número de reticulócito, teor de hemoglobina de reticulócito (CHr) e número de eritrócito (RBC) foram analisados com o uso de analisador Advia 120. Cincos camundongos foram usados por grupo e os dados são representados nas Figuras. 8A a 8C como meio \pm desvio padrão, com ** que indica um valor $P < 0,01$ e *** que indica um valor $P < 0,001$. Conforme mostrado nas Figuras. 8A e 8B, respectivamente, o silenciamento de TMPRSS6 os camundongos Th3/+ induziu a uma redução significativa no número de reticulócitos como alvéolo como o teor de hemoglobina de reticulócitos (Chr). Adicionalmente, o silenciamento de TMPRSS6 nos camundongos Th3/+ induziu a um aumento significativo no número de eritrócitos maduros (RBC) (Figura 8C), que demonstra um aprimoramento significativo na eritropoese ineficaz, hematopoese extramedular e produção de célula sanguínea vermelha.

[000364] O efeito de silenciamento mediado de siRNA de TMPRSS6 de TMPRSS6 nos parâmetros hematológicos em camundongos talas-

sêmicos (Th3/+).

[000365] Para avaliar o efeito de silenciamento mediado de siRNA de TMPRSS6 de TMPRSS6 nos parâmetros hematológicos, incluindo hematócrito (HCT), hemoglobina (HGB), largura de distribuição de célula sanguínea vermelha (RDW) e valor de corpúsculo de meio (MCV) em camundongos talassêmicos (Th3/+); os camundongos Th3/+ de seis semanas foram dosados por meio de injeção de veia caudal, com 1 mg/kg de siRNA de LNP-TMPRSS6-1 (AD-46273) ou controle de LNP-Luc ou PBS e os camundongos foram sacrificados duas semanas após a dosagem. Os parâmetros hematológicos que incluem o hematócrito (HCT), hemoglobina (HGB), largura de distribuição de célula sanguínea vermelha (RDW) e o valor de corpúsculo de meio (MCV); foram analisados com o uso de analisador Advia 120. Cincos camundongos foram usados por grupo e os dados são representados na Figura 9 como meio \pm desvio padrão, com ** que indica um valor $P < 0,01$ e *** que indica um valor $P < 0,001$. O silenciamento de TMPRSS6 nos camundongos Th3/+ induziu a um aumento significativo de HCT (Figura 9A), um aumento significativo de HGB (Figura 9B), uma diminuição significativa de RDW (Figura 9C) e uma diminuição significativa de MCV (Figura 9D). Os dados apresentados na Figura 9 ilustram uma normalização do fenótipo de β -talassemia nesses parâmetros hematológicos após a administração do siRNA de LNP-TMPRSS6-1 (AD-46273).

[000366] O efeito de silenciamento mediado de siRNA de TMPRSS6 de TMPRSS6 na morfologia de sangue periférico em camundongos talassêmicos (Th3/+).

[000367] Para avaliar o efeito de silenciamento mediado de siRNA de TMPRSS6 de TMPRSS6 na morfologia de sangue periférico nos camundongos talassêmicos (Th3/+); os camundongos Th3/+ de seis semanas foram dosados por meio de injeção de veia caudal com, 1 mg/kg de siR-

NA de LNP-TMPRSS6-1 (AD-46273) ou controle de LNP-Luc e os camundongos foram sacrificados duas semanas após a dosagem. A mancha de May-Grunwald/Gimsa mostrada em ampliação de 10X mostrou uma diminuição marcada de policromasia nos camundongos Th3/+ tratado com o siRNA de TMPRSS6 em comparação ao controle, representativo do número diminuído de reticulócito como alvéolo como uma normalização voltada à tendência geral da morfologia de célula sanguínea vermelha madura. A mancha May-Grunwald/Gimsa em ampliação de 10X também mostrou que ligeira anisocitose foi induzida pelo animal WT siRNA de TMPRSS6 quando comparado ao animal de controle de WT.

[000368] O efeito de silenciamento mediado de siRNA de TMPRSS6 de TMPRSS6 em arquitetura esplênica em camundongos talassêmicos (Th3/+).

[000369] Para avaliar o efeito de silenciamento mediado de siRNA de TMPRSS6 de TMPRSS6 na arquitetura esplênica em camundongos talassêmicos (Th3/+); os camundongos Th3/+ de seis semanas foram dosados por meio de injeção de veia caudal, com 1 mg/kg de siRNA de LNP-TMPRSS6-1 (AD-46273) ou controle de LNP-Luc ou PBS e os camundongos foram sacrificados duas semanas após a dosagem. A mancha de hematoxilina e eosina (H&E) em ampliação de 10X mostrou que os camundongos Th3/+ tratados com o siRNA de TMPRSS6 comparados ao controle tiveram uma normalização de arquitetura esplênica, incluindo uma redução na eritropoese extramedular sinusoidal e a reaparição de nódulos pulpare brancos.

[000370] O efeito de silenciamento mediado de siRNA de TMPRSS6 de TMPRSS6 em teor de ferro em baço e fígado em camundongos talassêmicos (Th3/+).

[000371] Para avaliar o efeito de silenciamento mediado de siRNA de TMPRSS6 de TMPRSS6 em teor de ferro em baço e fígado em camundongos talassêmicos (Th3/+); os camundongos Th3/+ de seis se-

manas foram dosados por meio de injeção de veia caudal, com 1 mg/kg de siRNA de LNP-TMPRSS6-1 (AD-46273) ou controle de LNP-Luc ou PBS e os camundongos foram sacrificados duas semanas após a dosagem. Cincos camundongos foram usados por grupo e os dados são representados nas Figuras. 10A a 10C como meio \pm desvio padrão, com ** que indica um valor $P < 0,01$ e *** que indica um valor $P < 0,001$. O silenciamento de TMPRSS6 nos camundongos Th3/+ induziu a uma redução significativa de teor de ferro me baço e peso de baço (Figura 10A e Figura 10B, respectivamente), que indica uma normalização de hematopoese extramedular. Uma tendência a um teor de ferro em fígado de redução também foi observada, mas não foi estatisticamente significativa (Figura 10C).

[000372] Os resultados acima demonstraram que o silenciamento de TMPRSS6 por administração sistêmica de siRNAs formulados aumenta a expressão de HAMP a níveis suficientes para aprimorar o fenótipo em um modelo de camundongo de β -talassemia intermediária. Portanto, os LNP-TMPRSS6-siRNAs são desenvolvidos para distúrbios de sobrecarga de ferro congênita caracterizado por níveis anormalmente baixos de hepcidina, (por exemplo, β -talassemia intermediária e hemocromatose hereditária).

EQUIVALENTES

[000373] Aqueles versados na técnica reconhecerão ou serão capazes de verificar o uso de não mais do que experimentação de rotina, muitos equivalentes às modalidades específicas da invenção descrita no presente documento. Tais equivalentes são destinados a serem abrangidos pelas reivindicações a seguir.

REIVINDICAÇÕES

1. Composição farmacêutica para inibir a expressão de um gene de TMPRSS6, caracterizada pelo fato de que compreende:

um ácido ribonucleico fita dupla (dsRNA) compreendendo uma fita senso e uma fita antissenso, em que a fita antissenso compreende uma região de complementaridade a um transcrito de RNA de TMPRSS6 que compreende uma sequência selecionada dentre o grupo consistindo de SEQ ID NO: 420, SEQ ID NO: 112, SEQ ID NO: 110, SEQ ID NO: 90 e SEQ ID NO: 48, e em que o referido dsRNA compreende pelo menos um nucleotídeo modificado; e

uma formulação de lipídeo.

2. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a fita senso compreende uma sequência selecionada dentre o grupo consistindo de SEQ ID NO: 419, SEQ ID NO: 111, SEQ ID NO: 109, SEQ ID NO: 89 e SEQ ID NO: 47.

3. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que o referido nucleotídeo modificado é escolhido dentre um nucleotídeo modificado de 2'-O-metila, um nucleotídeo que compreende um grupo 5'-fosforotioato, ou um nucleotídeo terminal ligado a um grupo de bisdecilamida de ácido dodecanoico ou derivado de colesterol.

4. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que o referido nucleotídeo modificado é escolhido dentre um nucleotídeo de 2'-desóxi-2'-fluoro modificado, um nucleotídeo de 2'-desóxi modificado, um nucleotídeo fechado, um nucleotídeo abásico, um nucleotídeo 2'-amino modificado, um nucleotídeo 2'-alquil modificado, um nucleotídeo de morfolino, um fosforamido e uma base não natural que compreende nucleotídeo.

5. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a fita antissenso apresenta uma

região de complementaridade com o transcrito de RNA de TMPRSS6 de pelo menos 17 nucleotídeos de comprimento.

6. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 5, caracterizada pelo fato de que a região de complementaridade tem entre 19 e 21 nucleotídeos de comprimento.

7. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que cada fita não tem mais do que 30 nucleotídeos de comprimento.

8. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que pelo menos uma fita compreende uma protrusão (overhang) 3' de pelo menos 1 nucleotídeo ou pelo menos 2 nucleotídeos.

9. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que compreende ainda um ligante.

10. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 9, caracterizada pelo fato de que o ligante é conjugado à extremidade 3' da fita senso do dsRNA.

11. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a fita antissenso tem entre 19 e 24 nucleotídeos de comprimento.

12. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que compreende uma fita senso que compreende uma sequência selecionada dentre o grupo consistindo de SEQ ID NO: 419, SEQ ID NO: 111, SEQ ID NO: 109, SEQ ID NO: 89 e SEQ ID NO: 47 e uma sequência antissenso que compreende uma sequência selecionada dentre o grupo consistindo de SEQ ID NO: 420, SEQ ID NO: 112, SEQ ID NO: 110, SEQ ID NO: 90 e SEQ ID NO: 48, e em que cada sequência tem entre 19 e 24 nucleotídeos de comprimento.

13. Método para inibição da expressão de TMPRSS6 em

uma célula, caracterizado pelo fato de que compreende:

(a) introduzir na célula um dsRNA compreendendo uma fita senso e uma fita antissenso, em que a referida fita antissenso compreende uma região de complementaridade com um transcrito de RNA de TMPRSS6 compreendendo uma sequência selecionada dentre o grupo que consiste em SEQ ID NO: 420, SEQ ID NO: 112, SEQ ID NO: 110, SEQ ID NO: 90 e SEQ ID NO: 48, e em que o referido dsRNA compreende pelo menos um nucleotídeo modificado; e

(b) manter a célula produzida na etapa (a) por um tempo suficiente para obter a degradação do transcrito de mRNA de um gene de TMPRSS6, inibindo desse modo a expressão do gene de TMPRSS6 na célula.

14. Método, de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo fato de que a fita senso compreende uma sequência selecionada dentre o grupo consistindo de SEQ ID NO: 419, SEQ ID NO: 111, SEQ ID NO: 109, SEQ ID NO: 89 e SEQ ID NO: 47.

15. Método, de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo fato de que o referido nucleotídeo modificado é escolhido dentre um nucleotídeo modificado de 2'-O-metila, um nucleotídeo que compreende um grupo 5'-fosforotioato, ou um nucleotídeo terminal ligado a um grupo de bisdecilamida de ácido dodecanoico ou derivado de colesterila.

16. Método, de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo fato de que o referido nucleotídeo modificado é escolhido dentre um nucleotídeo de 2'-desóxi-2'-fluoro modificado, um nucleotídeo de 2'-desóxi modificado, um nucleotídeo fechado, um nucleotídeo abásico, um nucleotídeo 2'-amino modificado, um nucleotídeo 2'-alquil modificado, um nucleotídeo de morfolino, um fosforamidato e uma base não natural que compreende nucleotídeo.

17. Método, de acordo com a reivindicação 13, caracteriza-

do pelo fato de que a fita antissenso apresenta uma região de complementaridade com o transcrito de RNA de TMPRSS6 de pelo menos 17 nucleotídeos de comprimento.

18. Método, de acordo com a reivindicação 18, caracterizado pelo fato de que a região de complementaridade tem entre 19 e 21 nucleotídeos de comprimento.

19. Método, de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo fato de que cada fita não tem mais do que 30 nucleotídeos de comprimento.

20. Método, de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo fato de que pelo menos uma fita compreende uma protrusão (overhang) 3' de pelo menos 1 nucleotídeo ou pelo menos 2 nucleotídeos.

21. Método, de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo fato de que compreende ainda um ligante.

22. Método, de acordo com a reivindicação 21, caracterizado pelo fato de que o ligante é conjugado à extremidade 3' da fita sentido do dsRNA.

23. Método, de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo fato de que a fita antissenso tem entre 19 e 24 nucleotídeos de comprimento.

24. Método, de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo fato de que compreende uma fita sentido que compreende uma sequência selecionada dentre o grupo consistindo de SEQ ID NO: 419, SEQ ID NO: 111, SEQ ID NO: 109, SEQ ID NO: 89 e SEQ ID NO: 47 e uma sequência antissenso que compreende uma sequência selecionada dentre o grupo consistindo de SEQ ID NO: 420, SEQ ID NO: 112, SEQ ID NO: 110, SEQ ID NO: 90 e SEQ ID NO: 48, e em que cada sequência tem entre 19 e 24 nucleotídeos de comprimento.

25. Uso de uma quantidade terapeuticamente eficaz de um

dsRNA, caracterizado pelo fato de que é para a preparação de uma composição farmacêutica, como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 12, para o tratamento de um distúrbio mediado pela expressão de TMPRSS6 em um ser humano em necessidade do mesmo, em que o referido dsRNA compreende uma fita senso e uma fita antissenso, em que a referida fita antissenso compreende uma região de complementaridade com um transcrito de RNA de TMPRSS6 compreendendo uma sequência selecionada dentre o grupo que consiste em SEQ ID NO: 420, SEQ ID NO: 112, SEQ ID NO: 110, SEQ ID NO: 90 e SEQ ID NO: 48, e em que o referido dsRNA compreende pelo menos um nucleotídeo modificado.

26. Uso, de acordo com a reivindicação 25, caracterizado pelo fato de que o ser humano tem um distúrbio associado a hemocromatose, uma β -talassemia ou uma β -talassemia intermediária.

27. Uso, de acordo com a reivindicação 25, caracterizado pelo fato de que a fita senso compreende uma sequência selecionada dentre o grupo consistindo de SEQ ID NO: 419, SEQ ID NO: 111, SEQ ID NO: 109, SEQ ID NO: 89 e SEQ ID NO: 47.

28. Uso, de acordo com a reivindicação 25, caracterizado pelo fato de que o referido nucleotídeo modificado é escolhido dentre um nucleotídeo modificado de 2'-O-metila, um nucleotídeo que compreende um grupo 5'-fosforotioato, ou um nucleotídeo terminal ligado a um grupo de bisdecilamida de ácido dodecanoico ou derivado de colesterol.

29. Uso, de acordo com a reivindicação 25, caracterizado pelo fato de que o referido nucleotídeo modificado é escolhido dentre um nucleotídeo de 2'-desóxi-2'-fluoro modificado, um nucleotídeo de 2'-desóxi modificado, um nucleotídeo fechado, um nucleotídeo abásico, um nucleotídeo 2'-amino modificado, um nucleotídeo 2'-alquil modificado, um nucleotídeo de morfolino, um fosforamidato e uma base não

natural que compreende nucleotídeo.

30. Uso, de acordo com a reivindicação 25, caracterizado pelo fato de que a fita antissenso apresenta uma região de complementaridade com o transcrito de RNA de TMPRSS6 de pelo menos 17 nucleotídeos de comprimento.

31. Uso, de acordo com a reivindicação 30, caracterizado pelo fato de que a região de complementaridade tem entre 19 e 21 nucleotídeos de comprimento.

32. Uso, de acordo com a reivindicação 25, caracterizado pelo fato de que cada fita não tem mais do que 30 nucleotídeos de comprimento.

33. Uso, de acordo com a reivindicação 25, caracterizado pelo fato de que pelo menos uma fita compreende uma protrusão (overhang) 3' de pelo menos 1 nucleotídeo ou pelo menos 2 nucleotídeos.

34. Uso, de acordo com a reivindicação 25, caracterizado pelo fato de que compreende ainda um ligante.

35. Uso, de acordo com a reivindicação 34, caracterizado pelo fato de que o ligante é conjugado à extremidade 3' da fita senso do dsRNA.

36. Uso, de acordo com a reivindicação 25, caracterizado pelo fato de que a fita antissenso tem entre 19 e 24 nucleotídeos de comprimento.

37. Uso, de acordo com a reivindicação 25, caracterizado pelo fato de que compreende uma fita senso que compreende uma sequência selecionada dentre o grupo consistindo de SEQ ID NO: 419, SEQ ID NO: 111, SEQ ID NO: 109, SEQ ID NO: 89 e SEQ ID NO: 47 e uma sequência antissenso que compreende uma sequência selecionada dentre o grupo consistindo de SEQ ID NO: 420, SEQ ID NO: 112, SEQ ID NO: 110, SEQ ID NO: 90 e SEQ ID NO: 48, e em que cada sequência tem entre 19 e 24 nucleotídeos de comprimento.

FIG. 1

```

1  cttgagccag acccagtcga gctctggtgc ctgccctctg gtgcgagctg acctgagatg
61  cacttccctc ctctgtgagc tgtctcggca cccacttgca gtcactgccg cctgatgttg
121 ttactcttcc actccaaaag gatgcccggt gccgagggcc cccaggtggc tggcgggagc
181 ggggacggag gtgatggcga ggaagcggag ccggagggga tgttcaaggc ctgtgaggac
241 tccaagagaa aagcccgggg ctacctccgc ctggtgcccc tgtttgtgct gctggccctg
301 ctgctgctgg cttcggcggg ggtgctactc tggattttcc tagggtaaca ggcgagggtg
361 atggtcagcc aggtgtactc aggcagtctg cgtgtactca atcgccactt ctcccaggat
421 cttacccgcc gggaatctag tgccttccgc agtgaaaccg ccaaagccca gaagatgctc
481 aaggagctca tcaccagcac ccgcctggga acttactaca actccagctc cgtctattcc
541 tttggggagg gacccctcac ctgcttcttc tggttcattc tccaaatccc cgagcaccgc
601 cggctgatgc tgagccccga ggtggtgcag gcactgctgg tggaggagca gctgtccaca
661 gtcaacagct cggtgccgtt cccctacagg gccgagtacg aagtggaccc cgagggccta
721 gtgatcctgg aagccagtgt gaaagacata gctgcattga attccacgct gggttgttac
781 cgctacagct acgtgggcca gggccaggtc ctccggctga aggggcctga ccacctggcc
841 tccagctgcc tgtggcacct gcagggcccc aaggacctca tgctcaaact ccggctggag
901 tggacgctgg cagagtgcgg ggaccgactg gccatgtatg acgtggccgg gcccctggag
961 aagaggctca tcacctcggt gtacggctgc agccgccagg agcccggtgt ggaggttctg
1021 gcgtcggggg ccatcatggc ggtcgtctgg aagaagggcc tgacagcta ctacgacccc
1081 ttcgtgctct ccgtgcagcc ggtggtcttc caggcctgtg aagtgaacct gacgtggac
1141 aacaggctcg actcccaggg cgtcctcagc acccgtactt tcccagcta ctactcgccc
1201 caaaccactt gtcctggcca cctcacggtg cctctctctg actacgctt ggccctctgg
1261 tttgatgcct atgcaactgag gaggcagaag tatgatttgc cgtgcaccca gggccagtgg
1321 acgatccaga acaggaggct gtgtggcttg cgcatectgc agccctacgc cgagaggatc
1381 ccggtgggtg ccacggccgg gatcaccatc aacttcacct ccagatctc cctcacgggg
1441 cccggtgtgc ggtgcaacta tggctgttac aaccagtcgg acccctgccc tggagagttc
1501 ctctgttctg tgaatggact ctgtgtccct gctgtgatg gggtaagga ctgccccaac
1561 ggcctggatg agagaaactg cgtttgcaga gccacattcc agtgcaaaga ggacagcaca
1621 tgcattctac tgcccaaggt ctgtgatggg cagcctgatt gtctcaacgg cagcgacgaa
1681 gagcagtgcc aggaaggggt gccatgtggg acattcacct tccagtgtga ggaccggagc
1741 tgcgtgaaga agcccaacct gcagtgtgat gggcgggccc actgcaggga cggctcggtg
1801 gaggagcact gtgactgtgg cctccagggc cctccagccg gcattgttgg tggagctgtg
1861 tcctccgagg gtgagtggcc atggcaggcc agcctccagg ttcggggctg acacatctgt
1921 gggggggccc tcatcgctga ccgctgggtg ataacagctg cccactgctt ccaggaggac
1981 agcatggcct ccacgggtgt gtggaccgtg ttcttgggca aggtgtggca gaactcgccg
2041 tggcctggag aggtgtcctt caaggtgagc cgctgtctcc tgcacccgta ccacgaagag
2101 gacagccatg actacgacgt ggcgctgtct cagctcgacc acccggtggt gcgctcgccc
2161 gccgtgcgcc ccgtctgcct gccgcgcgcg tcccacttct toagcccgg cctgcactgc
2221 tggattacgg gctggggcgc cttgcgcgag gggggcccca tcagcaacgc tctgcagaaa
2281 gtggatgtgc agttgatccc acaggacctg tgcagcgagg tctatcgcta ccaggtagcg
2341 ccacgcagtc tgtgtgccgg ctaccgcaag ggcaagaagg atgcctgtca gggtagctca
2401 ggtggtccgc tgggtgtgca ggcaactcag ggccgctggt tccctggcggg gctggtcagc
2461 tggggccttg gctgtggcgg gcctaactac ttggcgtctt acaccgcgat cacagggtgtg
2521 atcagctgga tccagcaagt ggtgacctga ggaactgccc cctgcaaaag cagggccccc
2581 ctccctggact cagagagccc agggcaactg ccaagcaggg ggacaagtat tctggcgggg
2641 ggtgggggag agagcaggcc ctgtggtggc aggaggtggc atcttgtctc gtccctgatg
2701 tctgctccag tgatggcagg aggatggaga agtgccagca gctgggggtc aagacgtccc
2761 ctgaggaccc agggccacac ccagcccttc tgcctcccaa ttctctctcc tccgtccctt
2821 tcctccactg ctgcctaatt caaggcagtg gctcagcagc aagaatgtct gttctacatc
2881 ccaggagtg tctgaggtgc gcccactct gtacagaggc tgtttgggca gccttgctc
2941 cagagagcag attccagctt cggaagcccc tggctaaact tgggatctgg gaatggaagg
3001 tgctcccatc ggaggggacc ctccagagccc tggagactgc caggtggggc tgctgccact
3061 gtaagccaaa aggtggggaa gtccctgactc cagggtcctt gcccacccc tgccctgccac
3121 ctggggccctc acagcccaga ccctcactgg gaggtgagct cagctgccct ttggaataaa
3181 gctgcctgat caaaaaaaaa aaaaaaaaaa aa

```


FIG. 2A

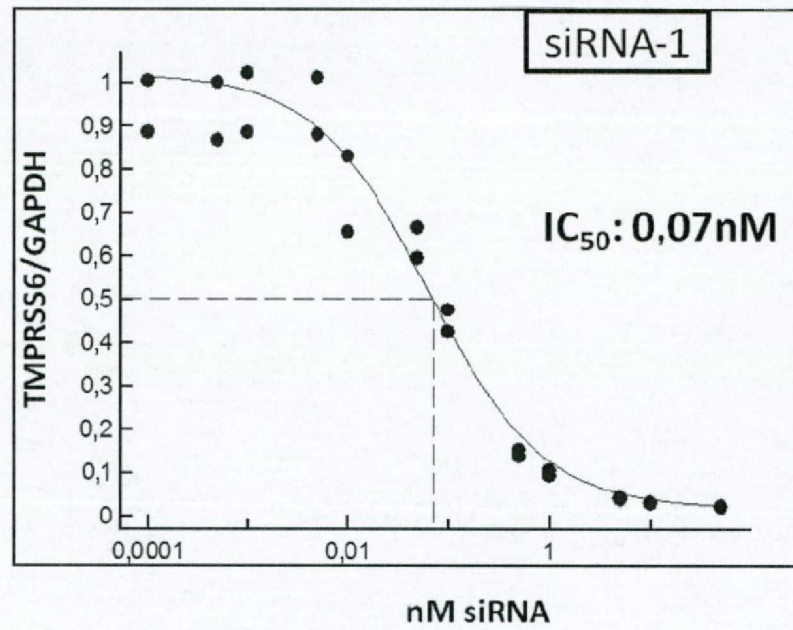


FIG. 2B

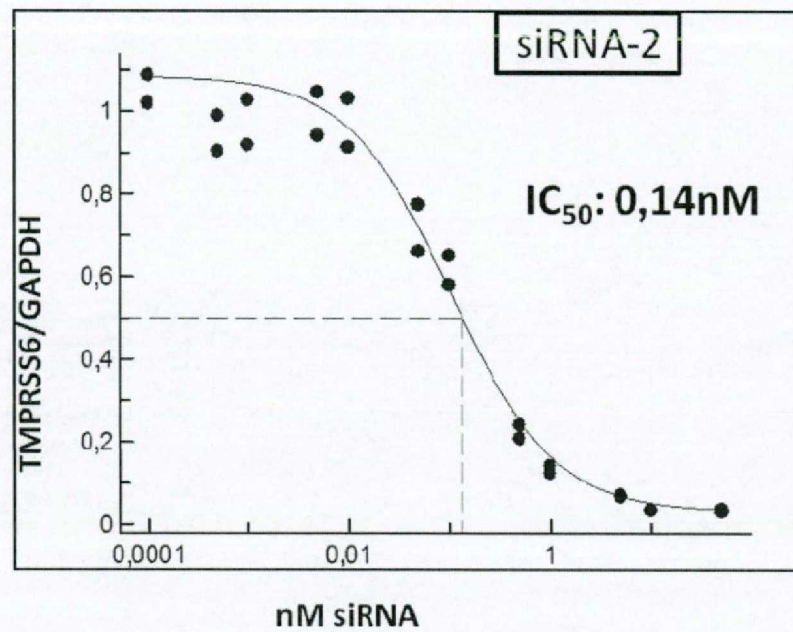


FIG. 3A

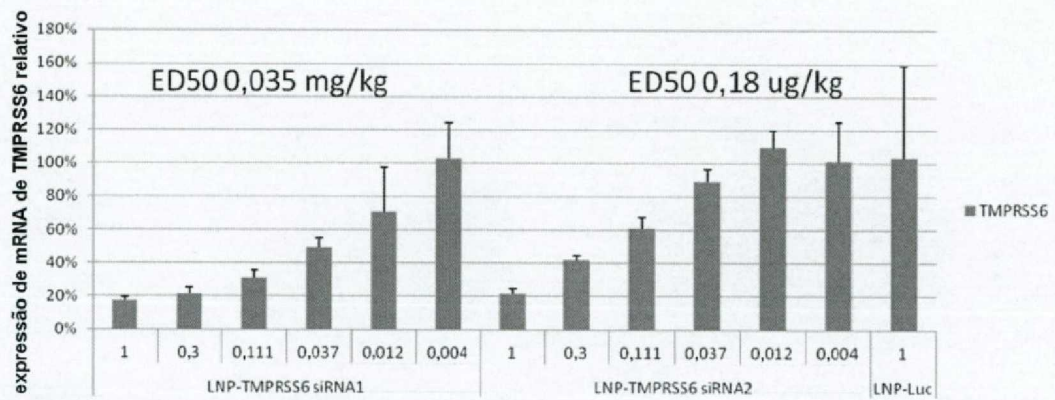


FIG. 3B

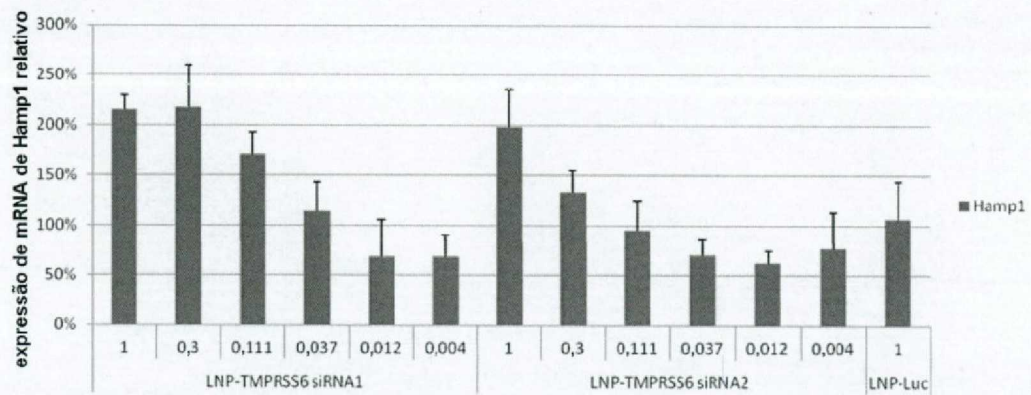


FIG. 4

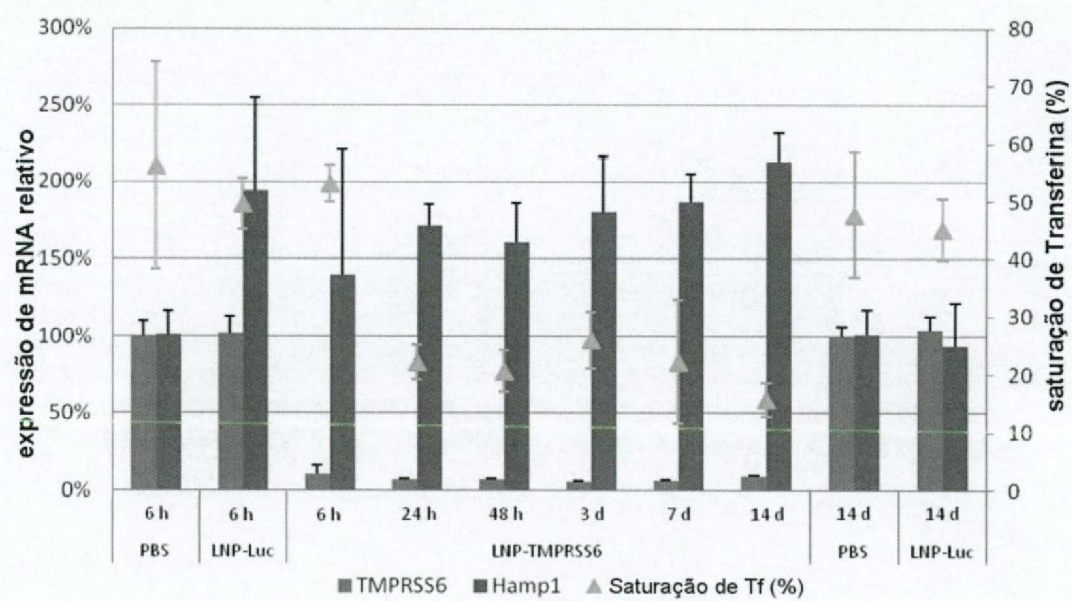


FIG. 5

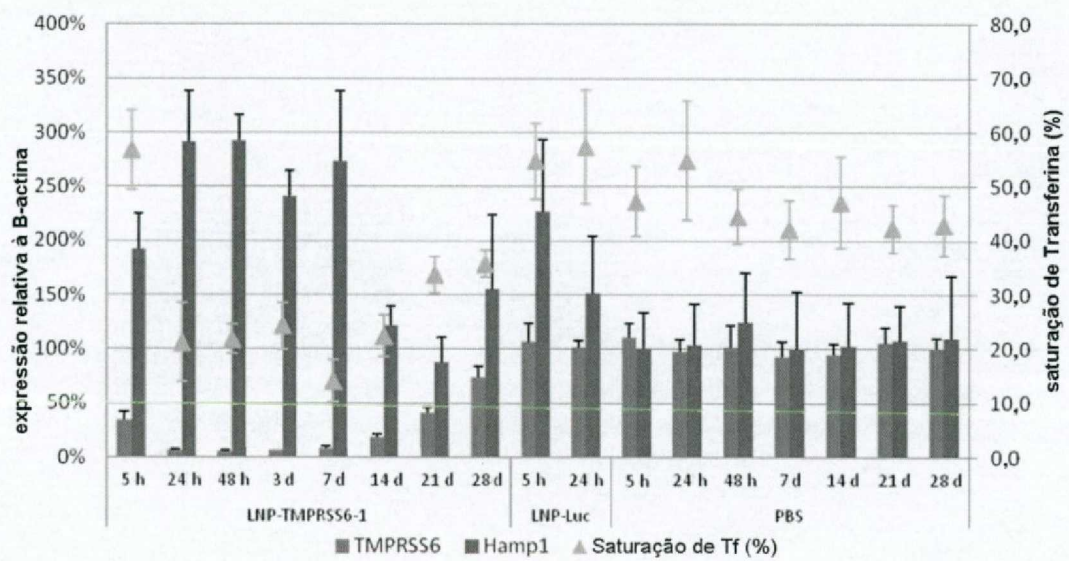


FIG. 6A

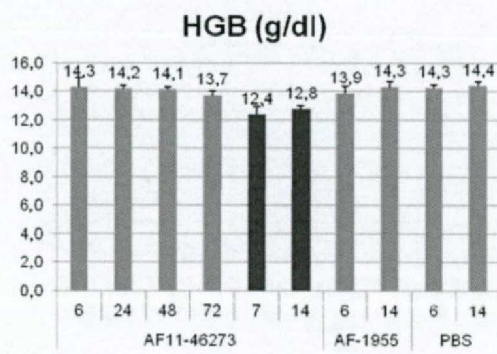


FIG. 6B

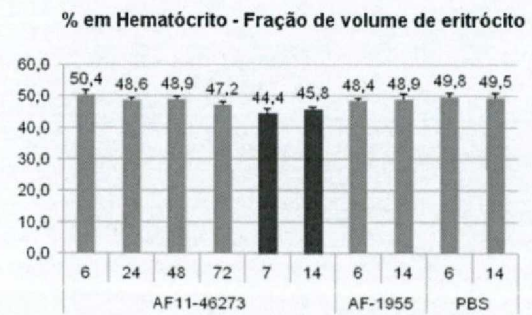


FIG. 7

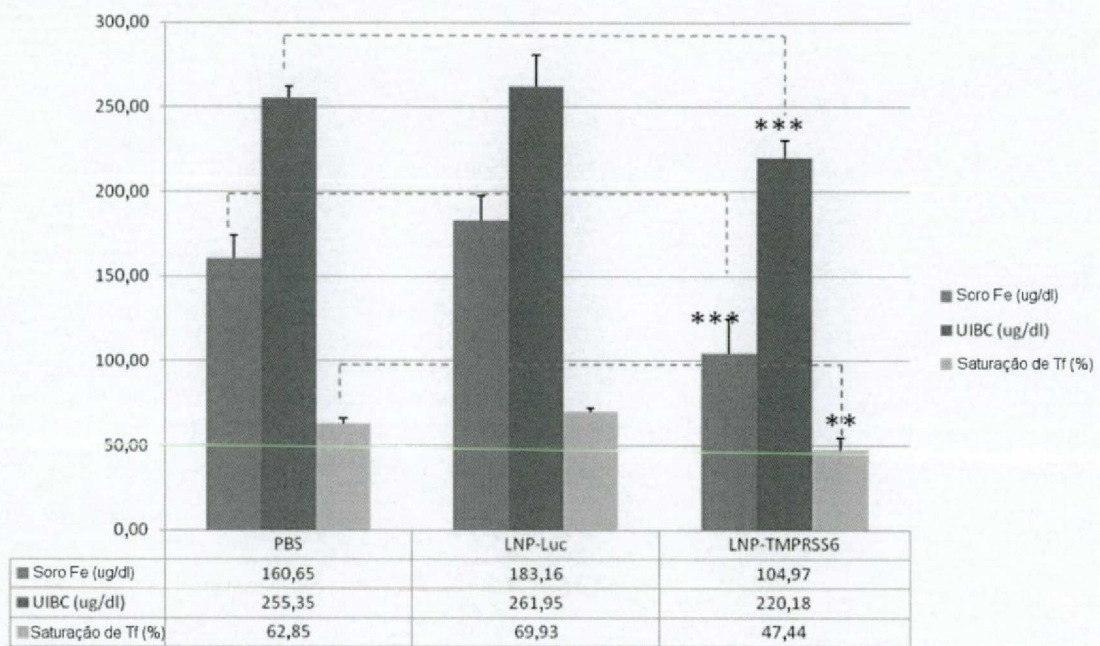


FIG. 8A

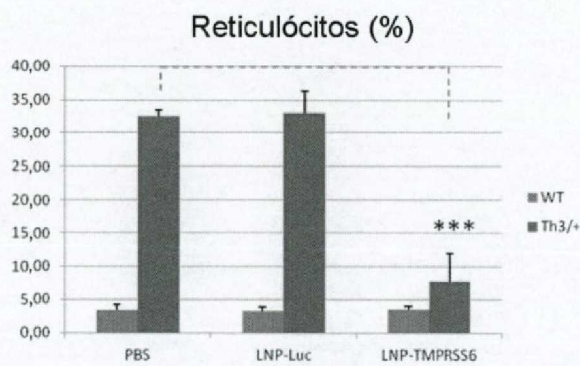


FIG. 8B

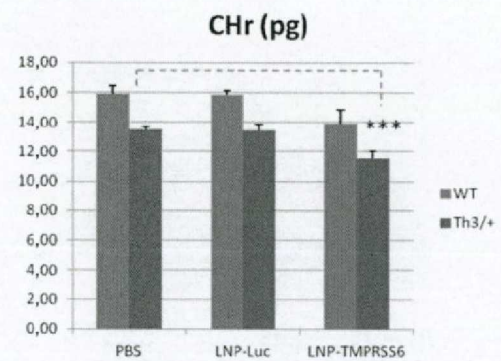


FIG. 8C

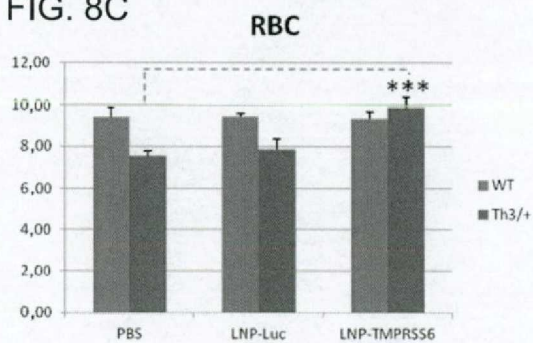


FIG. 9A

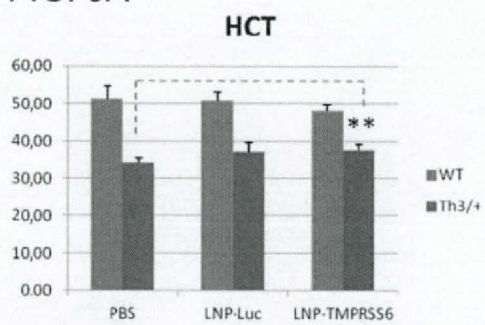


FIG. 9B

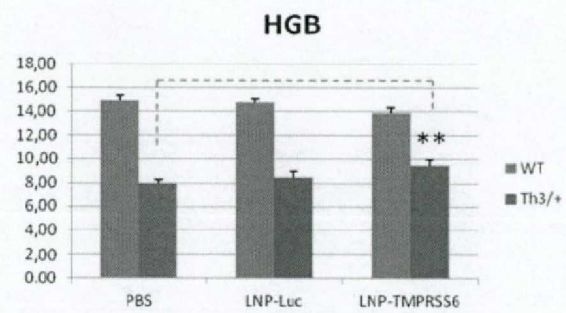


FIG. 9C

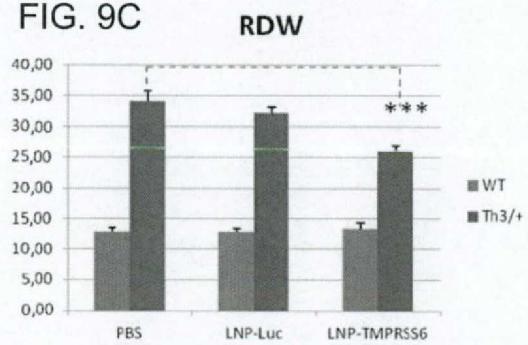


FIG. 9D

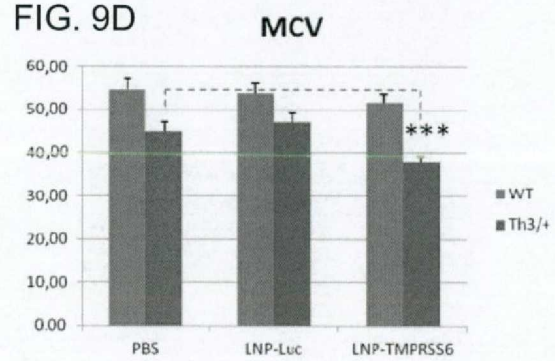


FIG. 10A

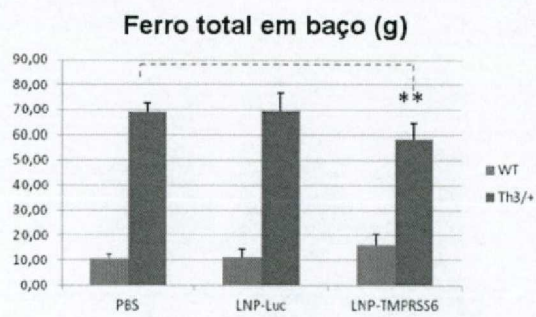


FIG. 10B

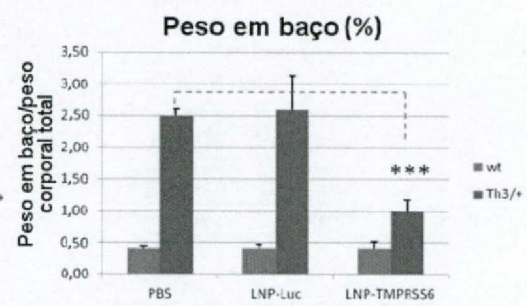


FIG. 10C

