



República Federativa do Brasil

Ministério do Desenvolvimento, Indústria,
Comércio e Serviços

Instituto Nacional da Propriedade Industrial



(11) BR 112017008868-1 B1

(22) Data do Depósito: 10/11/2015

(45) Data de Concessão: 21/03/2023

(54) Título: AGENTE DE RNAI DE FITA DUPLA, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, E SEUS USOS

(51) Int.Cl.: C12N 15/113; A61K 31/713.

(52) CPC: C12N 15/113; A61K 31/713.

(30) Prioridade Unionista: 10/11/2014 US 62/077,672; 10/11/2014 US 62/077,799; 24/03/2015 US 62/137,464.

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

(72) Inventor(es): GREGORY HINKLE; LAURA SEPP-LORENZINO; VASANT JADHAV; MARTIN MAIER; STUART MILSTEIN; MUTHIAH MANOHARAN; KALLANTHOTTATHIL G. RAJEEV.

(86) Pedido PCT: PCT US2015059916 de 10/11/2015

(87) Publicação PCT: WO 2016/077321 de 19/05/2016

(85) Data do Início da Fase Nacional: 27/04/2017

(57) Resumo: COMPOSIÇÕES DE IRNA DO VÍRUS DA HEPATITE B (HBV) E MÉTODOS DE SEU USO. A presente invenção refere-se aos agentes de RNAi, por exemplo, agentes de RNAi de filamento duplo, que direciona o genoma do vírus da hepatite B (HBV), e métodos de uso de tais agentes de RNAi para inibir a expressão de um ou mais genes do HBV e métodos de tratamento de indivíduos tendo uma infecção por HBV e/ou distúrbio associado ao HBV, por exemplo, infecção crônica de hepatite B.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**AGENTE DE RNAI DE FITA DUPLA, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, E SEUS USOS**".

Pedidos Relacionados

[001] Este pedido reivindica o benefício da prioridade para o Pedido Provisório dos E.U.A. 62/077.799, depositado a 10 de novembro de 2014, e Pedido Provisório dos E.U.A. 62/137.464, depositado a 24 de março de 2015. A totalidade dos conteúdos de cada um dos pedidos de patentes anteriores é aqui incorporada por referência.

[002] Este pedido reivindica também prioridade para o Pedido Provisório dos E.U.A. 62/077.672, depositado a 10 de novembro de 2014, cuja totalidade do conteúdos é incorporada aqui por referência.

[003] Este pedido está relacionado com o Pedido de Patente Internacional PCT/US2015/XXXXX, intitulado "Hepatitis D Viris (HDV) RNAi Compositions and Methods of Use Thereof," depositado a 10 de novembro de 2015, cuja totalidade dos conteúdos é aqui incorporada por referência.

Listagem de Sequências

[004] O presente pedido contém uma Listagem de Sequências que foi submetida eletronicamente em formato ASCII e é deste modo incorporada por referência na sua totalidade. A dita cópia ASCII, criada em 5 de novembro de 2015, é chamada 121301-02320_SL.txt e tem 385.791 bytes em tamanho.

Antecedentes da Invenção

[005] A nível mundial, mais de 400 milhões de pessoas estão cronicamente infectadas com HBV e correm, assim, um maior risco de desenvolver doença hepática grave, tal como hepatite crônica, cirrose, insuficiência hepática e carcinoma hepatocelular (HCC), resultando em aproximadamente 600.000 mortes por ano.

[006] A evolução natural da infecção crônica pelo HBV inclui

quatro fases consecutivas: (1) fase inicial 'imunotolerante', altos níveis de replicação do vírus e inflamação mínima do fígado; (2) fase imunorreativa, inflamação hepática significativa e aminotransferases elevadas no soro; com alguns pacientes progredindo para (3) fase 'não replicativa', seroconversão para anti-HBe; nível baixo ou indetectável de viremia (abaixo de 2000 UI/mL em ensaios baseados em PCR); resolução da inflamação hepática; e (4) hepatite B crônica HBeAg-negativa, devido ao surgimento de mutações virais específicas que impedem a produção de HBeAg, mas não impedem a replicação do vírus. Esta forma de hepatite B crônica (CHB) é caracterizada por flutuação dos níveis séricos de HBV DNA e dos níveis séricos de aminotransferases (ALT e AST), e doença hepática progressiva. É importante notar que a CHB pode apresentar-se como CHB HBeAg-positiva ou HBeAg-negativa. Estudos longitudinais de pacientes com CHB indicam que a incidência cumulativa de 5 anos de cirrose em desenvolvimento varia de 8 a 20%. A incidência cumulativa de 5 anos de descompensação hepática é aproximadamente 20%. A incidência mundial de HCC aumentou e constitui atualmente o quinto tipo de câncer mais comum. A incidência anual de HCC relacionado com HBV é elevada, variando de 2 a 5% quando a cirrose é estabelecida.

[007] O objetivo principal do tratamento de HBV é suprimir permanentemente a replicação do HBV e melhorar a doença hepática. Objetivos clinicamente importantes a curto prazo são alcançar a seroconversão HBeAg, normalização de ALT e AST séricos, resolução de inflamação do fígado e evitar a descompensação hepática. O objetivo final do tratamento é conseguir uma resposta durável para prevenir o desenvolvimento de cirrose, câncer de fígado e prolongar a sobrevivência. A infecção por HBV não pode ser erradicada completamente devido à persistência de uma forma particular de DNA viral circular covalentemente fechado (ccc HBV DNA) nos núcleos de

hepatócitos infectados. No entanto, a eliminação induzida por tratamento de HBsAg sérico é um marcador da cessação da infecção crônica pelo HBV e tem sido associada com o melhor resultado a longo prazo.

[008] Os atuais métodos padrão de tratamento para HBV incluem imunoterapias com base em interferon ou timosina $\alpha 1$ e a supressão da produção viral por inibição da polimerase do HBV. Inibidores de polimerase do HBV são eficazes na redução da produção viral, mas têm pouco ou nenhum efeito na redução rápida de HBsAg ou podem reduzir lentamente HBsAg com tratamento a longo prazo em um número limitado de pacientes (como é o caso do Tenofovir disoproxil fumarato). A imunoterapia com base em interferon pode conseguir uma redução da produção viral e a remoção precoce de HBsAg do sangue, mas apenas em uma pequena porcentagem dos pacientes tratados. O papel geralmente aceito de HBsAg no sangue é sequestrar os anticorpos anti-HBsAg e permitir que as partículas virais infecciosas escapem à detecção imunológica, que é provavelmente uma das razões pelas quais a infecção pelo HBV permanece uma doença crônica. Além disso, HBsAg, HBeAg e HBcAg têm propriedades imuno-inibitórias e a persistência destas proteínas virais no sangue de doentes após a administração de qualquer dos tratamentos atualmente disponíveis para HBV é susceptível de ter um impacto significativo na prevenção de doentes para alcançar controle imunológico da sua infecção pelo HBV.

[009] Embora as três proteínas HBV primárias (HBsAg, HBeAg e HBcAg) tenham propriedades imuno-inibitórias, HBsAg compreende a esmagadora maioria das proteínas HBV na circulação de indivíduos infectados com HBV. Além disso, apesar de a remoção (através de seroconversão) de HBeAg ou reduções de viremia sérica não estarem correlacionados com o desenvolvimento de controle sustentado da infecção por HBV, a remoção de HBsAg sérico do sangue (e

seroconversão) na infecção pelo HBV é um indicador de prognóstico reconhecido da resposta antiviral no tratamento que levará ao controle da infecção pelo HBV sem tratamento (off treatment) (embora isso só ocorre em uma pequena fração dos pacientes que recebem imunoterapia). Assim, apesar da redução das três principais proteínas HBV (HBsAg, HBeAg e HBcAg) poder resultar na remoção ideal do efeito inibitório, é provável que a remoção de HBsAg seja suficiente por si só para remover a maior parte da inibição viral da função imunológica em indivíduos com infecção por HBV.

[0010] Portanto, na ausência de qualquer regime atual de tratamento que possa restaurar o controle imunológico do HBV em uma grande proporção de pacientes, há uma necessidade de um tratamento eficaz contra a infecção pelo HBV que possa inibir a replicação viral, bem como restaurar o controle imunológico na maioria dos pacientes. Conformemente, existe uma necessidade na técnica de terapias e terapias de combinação alternativas para indivíduos infectados com HBV e/ou tendo uma doença associada a HBV.

Sumário da Invenção

[0011] A presente invenção proporciona composições de RNAi que efetuam a clivagem mediada pelo complexo silenciador induzido por RNA (RISC) de transcritos RNA de um gene do vírus da hepatite B (HBV). O gene HBV pode estar dentro de uma célula, por exemplo, uma célula dentro de um indivíduo, tal como um ser humano.

[0012] A presente invenção proporciona também métodos e terapias para tratamento de um indivíduo tendo um distúrbio que beneficiaria de inibição ou redução da expressão de um gene HBV, por exemplo, uma infecção por HBV e/ou uma doença associada ao HBV, tal como infecção de hepatite B crônica (CHB), cirrose, insuficiência hepática e carcinoma hepatocelular (HCC), usando composições de RNAi que efetuam a clivagem mediada pelo complexo silenciador

induzido por RNA (RISC) de transcritos de um gene HBV para inibição da expressão de um gene HBV.

[0013] Os agentes de RNAi da invenção foram concebidos para regiões-alvo no genoma HBV que são conservadas em todos os 8 sorotipos do HBV. Além disso, os agentes de RNAi da invenção foram concebidos para inibir todas as etapas do ciclo de vida do HBV, por exemplo, replicação, montagem, secreção de vírus e secreção de antígenos sub-virais, por inibição da expressão de mais de um gene HBV. Em particular, uma vez que a transcrição do genoma do HBV resulta em RNAs policistrônicos sobrepostos, um agente de RNAi da invenção tendo como alvo um único gene HBV resulta em inibição significativa da expressão da maioria ou de todos os transcritos de HBV. Por exemplo, uma vez que o genoma do HBV é transcrito em um único mRNA, um agente de RNAi da invenção tendo como alvo o gene S resultará na inibição não apenas da expressão do gene S, mas também da expressão do gene "a jusante" da transcriptase reversa. Além disso, os agentes de RNAi da invenção foram concebidos para inibir a replicação viral do HBV visando genes estruturais de HBV e o gene X de HBV, permitindo assim que o sistema imunitário de um indivíduo detecte e responda à presença de HBsAg para produzir anticorpos anti-HBV para eliminar uma infecção pelo HBV. Sem a intenção de ser limitada pela teoria, acredita-se que uma combinação ou subcombinação das propriedades precedentes e os locais alvo específicos e/ou as modificações específicas destes agentes de RNAi conferem aos agentes de RNAi da invenção melhor eficácia, estabilidade, segurança, potência e durabilidade.

[0014] Em conformidade, em um aspecto, a presente invenção fornece agentes de RNAi de fita dupla para inibir a expressão do vírus da hepatite B (HBV) em uma célula. Os agentes de RNAi de fita dupla incluem um filamento senso e um filamento antissenso formando uma

região de fita dupla, em que o dito filamento senso compreende pelo menos 15 nucleotídeos contíguos diferindo por não mais do que 3 nucleotídeos da sequência de nucleotídeos de SEQ ID NO:1 e o dito filamento antissenso compreende pelo menos 15 nucleotídeos contíguos diferindo por não mais do que 3 nucleotídeos da sequência de nucleotídeos de SEQ ID NO:2, em que substancialmente todos os nucleotídeos do dito filamento senso e substancialmente todos os nucleotídeos do dito filamento antissenso são nucleotídeos modificados, em que o dito filamento senso está conjugado com um ligante ligado no terminal 3' e em que o ligante é um ou mais derivados de GalNAc ligados através de um ligante ramificado bivalente ou trivalente.

[0015] Em uma modalidade, a uma ou mais das 3 diferenças de nucleotídeos na sequência de nucleotídeos do filamento antissenso é uma incompatibilidade de nucleotídeos no filamento antissenso.

[0016] Em outra modalidade, a uma ou mais das 3 diferenças de nucleotídeos na sequência de nucleotídeos do filamento antissenso é uma incompatibilidade de nucleotídeos no filamento senso.

[0017] Em uma modalidade, todos os nucleotídeos do dito filamento senso e todos os nucleotídeos do dito filamento antissenso são nucleotídeos modificados.

[0018] Em uma modalidade, o filamento senso e o filamento antissenso compreendem **uma região de complementaridade que compreende pelo menos 15 nucleotídeos contíguos diferindo em não mais do que 3 nucleotídeos em relação a qualquer uma das sequências listadas em qualquer uma das Tabelas 3, 4, 6, 7, 12, 13, 22, 23, 25 e 26.**

[0019] Em uma modalidade, o pelo menos um dos ditos nucleotídeos modificados é selecionado de um desóxi-nucleotídeo, um nucleotídeo de desóxi-timina (dT) 3' terminal, um nucleotídeo modificado por 2'-O-metila, um nucleotídeo modificado por 2'-flúor, um

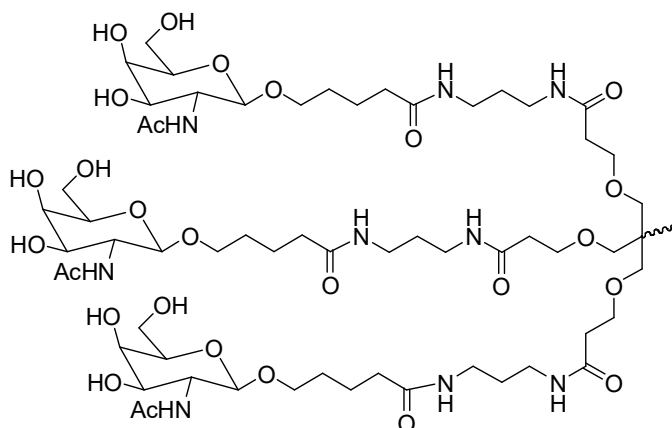
nucleotídeo modificado por 2'-desóxi, um nucleotídeo bloqueado, um nucleotídeo desbloqueado, um nucleotídeo restrito de forma adaptável, um nucleotídeo de etila constrito, um nucleotídeo abásico, um nucleotídeo modificado por 2'-amino, um nucleotídeo modificado por 2'-O-alila, um nucleotídeo modificado por 2'-C-alquila, um nucleotídeo modificado por 2'-hidroxila, um nucleotídeo modificado por 2'-metoxietila, um nucleotídeo modificado por 2'-O-alquila, um nucleotídeo de morfolino, um fosforamidato, um nucleotídeo compreendendo base não natural, um nucleotídeo modificado por tetra-hidropirano, um nucleotídeo modificado por 1,5-anidroexitol, um nucleotídeo modificado por ciclo-hexenila, um nucleotídeo compreendendo um grupo fosforotioato, um nucleotídeo compreendendo um grupo metilfosfonato, um nucleotídeo compreendendo um 5'-fosfato, e um nucleotídeo compreendendo um imitador de 5'-fosfato.

[0020] Em uma modalidade, a pelo menos um filamento compreende uma projeção 3' de pelo menos 1 nucleotídeo. Em outra modalidade, a pelo menos um filamento compreende uma projeção 3' de pelo menos 2 nucleotídeos.

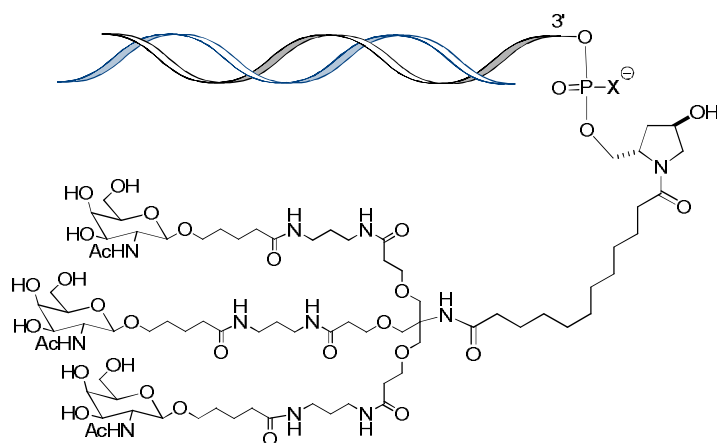
[0021] Em uma modalidade, a região de fita dupla tem 15 a 30 pares de nucleotídeos em comprimento. Em outra modalidade, a região de fita dupla tem 17 a 23 pares de nucleotídeos em comprimento. Ainda em outra modalidade, a região de fita dupla tem 17 a 25 pares de nucleotídeos em comprimento. Em uma modalidade, a região de fita dupla tem 23 a 27 pares de nucleotídeos em comprimento. Em outra modalidade, a região de fita dupla tem 19 a 21 pares de nucleotídeos em comprimento. Ainda em outra modalidade, a região de fita dupla tem 21 a 23 pares de nucleotídeos em comprimento.

[0022] Em uma modalidade, cada filamento tem 15 a 30 nucleotídeos. Em outra modalidade, cada filamento tem 19 a 30 nucleotídeos.

[0023] Em uma modalidade, o ligante é



[0024] Em uma modalidade, o agente de RNAi está conjugado com o ligante como mostrado no seguinte esquema



em que X é O ou S.

[0025] Em uma modalidade, o agente de RNAi é selecionado do grupo de agentes de RNAi listados em qualquer uma das **Tabelas 3, 4, 6, 7, 12, 13, 22, 23, 25 e 26.**

[0026] Em um aspecto, a presente invenção fornece agentes de RNAi de fita dupla para inibir a expressão do vírus da hepatite B (HBV) em uma célula. Os agentes de RNAi de fita dupla incluem **um filamento senso e um filamento antissenso** formando uma região de fita dupla, em que o dito filamento senso compreende 5'-UCGUGGUGGACUUCUCUCA -3' (SEQ ID NO:5) e o dito filamento antissenso compreende 5'-UGAGAGAAGUCCACCACGAUU -3' (SEQ ID NO:6), em que substancialmente todos os nucleotídeos do dito

filamento senso e substancialmente todos os nucleotídeos do dito filamento antissenso são nucleotídeos modificados, em que o dito filamento senso está conjugado com um ligante ligado no terminal 3' e em que o ligante é um ou mais derivados de GalNAc ligados através de um ligante ramificado bivalente ou trivalente.

[0027] A presente invenção fornece também agentes de RNAi, compreendendo sequências de nucleotídeos senso e antissenso que são pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idênticas ao longo de todo o seu comprimento às sequências de nucleotídeos senso e antissenso precedentes.

[0028] Em outro aspecto, a presente invenção fornece agentes de RNAi de fita dupla para inibir a expressão do vírus da hepatite B (HBV) em uma célula. Os agentes de RNAi de fita dupla incluem um filamento senso e um filamento antissenso formando uma região de fita dupla, em que o dito filamento senso compreende 5'-GUGCACUUCGCUUCACCUCUA -3' (SEQ ID NO:7) e o dito filamento antissenso compreende 5'-UAGAGGUGAAGCGAAGUGCACUU -3' (SEQ ID NO:8), em que substancialmente todos os nucleotídeos do dito filamento senso e substancialmente todos os nucleotídeos do dito filamento antissenso são nucleotídeos modificados, em que o dito filamento senso está conjugado com um ligante ligado no terminal 3' e em que o ligante é um ou mais derivados de GalNAc ligados através de um ligante ramificado bivalente ou trivalente. A presente invenção fornece também agentes de RNAi, compreendendo sequências de nucleotídeos senso e antissenso que são pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idênticas ao longo de todo o seu comprimento às sequências de nucleotídeos senso e antissenso precedentes.

[0029] Em outro aspecto, a presente invenção fornece agentes de RNAi de fita dupla para inibir a expressão do vírus da hepatite B (HBV)

em uma célula. Os agentes de RNAi de fita dupla incluem **um filamento senso e** um filamento antissenso formando uma região de fita dupla, em que o dito filamento senso compreende 5'-CGUGGUGGACUUCUCUCAAUU -3' (SEQ ID NO:9) e o dito filamento antissenso compreende 5'-AAUUGAGAGAAGUCCACCAGCAG -3' (SEQ ID NO:10), em que substancialmente todos os nucleotídeos do dito filamento senso e substancialmente todos os nucleotídeos do dito filamento antissenso são nucleotídeos modificados, em que o dito filamento senso está conjugado com um ligante ligado no terminal 3' e em que o ligante é um ou mais derivados de GalNAc ligados através de um ligante ramificado bivalente ou trivalente. A presente invenção fornece também agentes de RNAi, compreendendo sequências de nucleotídeos senso e antissenso que são pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idênticas ao longo de todo o seu comprimento às sequências de nucleotídeos senso e antissenso precedentes.

[0030] Em outro aspecto, a presente invenção fornece agentes de RNAi de fita dupla para inibir a expressão do vírus da hepatite B (HBV) em uma célula. Os agentes de RNAi de fita dupla incluem **um filamento de senso e** um filamento antissenso, formando uma região de fita dupla, em que o filamento de senso compreende 5'-CGUGGUGGUCUUCUCUAAAUU -3' (SEQ ID NO:37) e o filamento antissenso compreende 5'-AAUUGAGAGAAGUCCACCAGCUU -3' (SEQ ID NO:38),

em que substancialmente todos os nucleotídeos do filamento senso e substancialmente todos os nucleotídeos do filamento antissenso são nucleotídeos modificados, em que o dito filamento senso é conjugado com um ligante ligado no terminal 3' e em que o ligante é um ou mais derivados de GalNAc ligados através de um ligante ramificado bivalente ou trivalente. A presente invenção fornece também agentes de RNAi,

compreendendo sequências de nucleotídeos senso e antissenso que são pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idênticas ao longo de todo o seu comprimento às sequências de nucleotídeos senso e antissenso precedentes.

[0031] Em outro aspecto, a presente invenção fornece agentes de RNAi de fita dupla para inibir a expressão do vírus da hepatite B (HBV) em uma célula. Os agentes de RNAi de fita dupla incluem **um filamento senso e** um filamento antissenso formando uma região de fita dupla, em que o dito filamento senso compreende 5'-GGUGGACUUCUCUCAAUUUUA -3' (SEQ ID NO:11) e o dito filamento antissenso compreende 5'- UAAAAUUGAGAGAAGUCCACCAC -3' (SEQ ID NO:12), em que substancialmente todos os nucleotídeos do dito filamento senso e substancialmente todos os nucleotídeos do dito filamento antissenso são nucleotídeos modificados, em que o dito filamento senso está conjugado com um ligante ligado no terminal 3' e em que o ligante é um ou mais derivados de GalNAc ligados através de um ligante ramificado bivalente ou trivalente. A presente invenção fornece também agentes de RNAi, compreendendo sequências de nucleotídeos senso e antissenso que são pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idênticas ao longo de todo o seu comprimento às sequências de nucleotídeos senso e antissenso precedentes.

[0032] Em outro aspecto, a presente invenção fornece agentes de RNAi de fita dupla para inibir a expressão do vírus da hepatite B (HBV) em uma célula. Os agentes de RNAi de fita dupla incluem **um filamento senso e** um filamento antissenso formando uma região de fita dupla, em que o dito filamento senso compreende 5'-GUGUGCACUUCGCUUCACA -3' (SEQ ID NO:39) e o dito filamento antissenso compreende 5'- UGUGAAGCGAAGUGCACACUU -3' (SEQ ID NO:40), em que substancialmente todos os nucleotídeos do dito

filamento senso e substancialmente todos os nucleotídeos do dito filamento antissenso são nucleotídeos modificados, em que o dito filamento senso está conjugado com um ligante ligado no terminal 3' e em que o ligante é um ou mais derivados de GalNAc ligados através de um ligante ramificado bivalente ou trivalente. A presente invenção fornece também agentes de RNAi, compreendendo sequências de nucleotídeos senso e antissenso que são pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idênticas ao longo de todo o seu comprimento às sequências de nucleotídeos senso e antissenso precedentes.

[0033] Em uma modalidade, todos os nucleotídeos do dito filamento senso e todos os nucleotídeos do dito filamento antissenso compreendem uma modificação.

[0034] Em uma modalidade, o pelo menos um dos ditos nucleotídeos modificados é selecionado de um desóxi-nucleotídeo, um nucleotídeo de desóxi-timina (dT) 3' terminal, um nucleotídeo modificado por 2'-O-metila, um nucleotídeo modificado por 2'-flúor, um nucleotídeo modificado por 2'-desóxi, um nucleotídeo bloqueado, um nucleotídeo desbloqueado, um nucleotídeo restrito de forma adaptável, um nucleotídeo de etila constrito, um nucleotídeo abásico, um nucleotídeo modificado por 2'-amino, um nucleotídeo modificado por 2'-O-alila, um nucleotídeo modificado por 2'-C-alquila, um nucleotídeo modificado por 2'-hidroxila, um nucleotídeo modificado por 2'-metoxietila, um nucleotídeo modificado por 2'-O-alquila, um nucleotídeo de morfolino, um fosforamidato, um nucleotídeo compreendendo base não natural, um nucleotídeo modificado por tetra-hidropirano, um nucleotídeo modificado por 1,5-anidroexitol, um nucleotídeo modificado por ciclo-hexenila, um nucleotídeo compreendendo um grupo fosforotioato, um nucleotídeo compreendendo um grupo metilfosfonato, um nucleotídeo compreendendo um 5'-fosfato, e um nucleotídeo

compreendendo um imitador de 5'-fosfato.

[0035] Em uma modalidade, o imitador de 5'-fosfato é um 5'-vinil fosfato (5'-VP).

[0036] Em uma modalidade, o filamento senso compreende 5'-uscsguGfgUfGfGfacuucucuca – 3' (SEQ ID NO:13) e o filamento antissenso compreende 5'-usGfsagaGfaAfGfuccaCfcAfcgasusu – 3' (SEQ ID NO:14), em que A, C, G e U são ribose, A, C, G ou U; a, g, c e u são 2'-O-metil (2'-OMe), A, U, C ou G; Af, Cf, Gf ou Uf são 2'-flúor A, G, C ou U; e s é uma ligação de fosforotioato.

[0037] Em outra modalidade, o filamento senso compreende 5'-uscsguGfgUfGfGfacuucucuca – 3' (SEQ ID NO:15) e o filamento antissenso compreende 5'-PusGfsagaGfaAfGfuccaCfcAfcgasusu – 3' (SEQ ID NO:16), em que A, C, G e U são ribose, A, C, G ou U; a, g, c e u são 2'-O-metil (2'-OMe), A, U, C ou G; Af, Cf, Gf ou Uf são 2'-flúor A, G, C ou U; e s é uma ligação de fosforotioato; e P é um 5'-fosfato ou imitador de 5'-fosfato.

[0038] Em uma modalidade, o filamento senso compreende 5'-gsusgcacUfuCfGfCfuucaccucua – 3' (SEQ ID NO:17) e o filamento antissenso compreende 5'-usAfsgagGfugaagcgAfaGfugcacsusu – 3' (SEQ ID NO:18), em que A, C, G e U são ribose, A, C, G ou U; a, g, c e u são 2'-O-metil (2'-OMe), A, U, C ou G; Af, Cf, Gf ou Uf são 2'-flúor A, G, C ou U; e s é uma ligação de fosforotioato.

[0039] Em outra modalidade, o filamento senso compreende 5'-gsusgcacUfuCfGfCfuucaccucua – 3' (SEQ ID NO:19) e o filamento antissenso compreende 5'-PusAfsgagGfugaagcgAfaGfugcacsusu – 3' (SEQ ID NO:20), em que A, C, G e U são ribose, A, C, G ou U; a, g, c e u são 2'-O-metil (2'-OMe), A, U, C ou G; Af, Cf, Gf ou Uf são 2'-flúor A, G, C ou U; e s é uma ligação de fosforotioato; e P é um 5'-fosfato ou imitador de 5'-fosfato.

[0040] Em uma modalidade, o filamento senso compreende 5'-

csgsugguGfgAfCfUfucucUfCfaauu – 3' (SEQ ID NO:21) e o filamento antissenso compreende 5'-asAfsuugAfgAfgAfaguCfcAfccagcsasg – 3' (SEQ ID NO:22), em que A, C, G e U são ribose, A, C, G ou U; a, g, c e u são 2'-O-metil (2'-OMe), A, U, C ou G; Af, Cf, Gf ou Uf são 2'-flúor A, G, C ou U; e s é uma ligação de fosforotioato.

[0041] Em outra modalidade, o filamento senso compreende 5'-csgsugguGfgAfCfUfucucUfCfaauu – 3' (SEQ ID NO:23) e o filamento antissenso compreende 5'-PasAfsuugAfgAfgAfaguCfcAfccagcsasg – 3' (SEQ ID NO:24), em que A, C, G e U são ribose, A, C, G ou U; a, g, c e u são 2'-O-metil (2'-OMe), A, U, C ou G; Af, Cf, Gf ou Uf são 2'-flúor A, G, C ou U; e s é uma ligação de fosforotioato; e P é um 5'-fosfato ou imitador de 5'-fosfato.

[0042] Em outra modalidade, o filamento senso compreende 5'-csgsuggudGguacdTucucuaaaauu – 3' (SEQ ID NO:35) e o filamento antissenso compreende 5'-asdAsuugagagdAagudCcaccagcsusu – 3' (SEQ ID NO:36), em que A, C, G e U são ribose, A, C, G ou U; a, g, c e u são 2'-O-metil (2'-OMe), A, U, C, ou G; dA, dC, dG e dT são desoxirribose A, C, G e T; e s é uma ligação de fosforotioato.

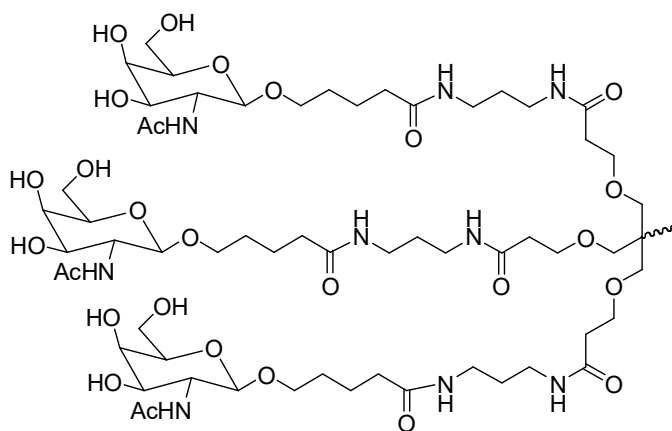
[0043] Em uma modalidade, o filamento senso compreende 5'-gsgsuggaCfuUfCfUfcucaAfUfuuua – 3' (SEQ ID NO:25) e o filamento antissenso compreende 5'-usAfsaaaUfuGfAfgagaAfgUfccaccsasc – 3' (SEQ ID NO:26), em que A, C, G e U são ribose, A, C, G ou U; a, g, c e u são 2'-O-metil (2'-OMe), A, U, C ou G; Af, Cf, Gf ou Uf são 2'-flúor A, G, C ou U; e s é uma ligação de fosforotioato.

[0044] Em outra modalidade, o filamento senso compreende 5'-gsgsuggaCfuUfCfUfcucaAfUfuuua – 3' (SEQ ID NO:27) e o filamento antissenso compreende 5'-PusAfsaaaUfuGfAfgagaAfgUfccaccsasc – 3' (SEQ ID NO:28), em que A, C, G e U são ribose, A, C, G ou U; a, g, c e u são 2'-O-metil (2'-OMe), A, U, C ou G; Af, Cf, Gf ou Uf são 2'-flúor A, G, C ou U; e s é uma ligação de fosforotioato; e P é um 5'-fosfato ou

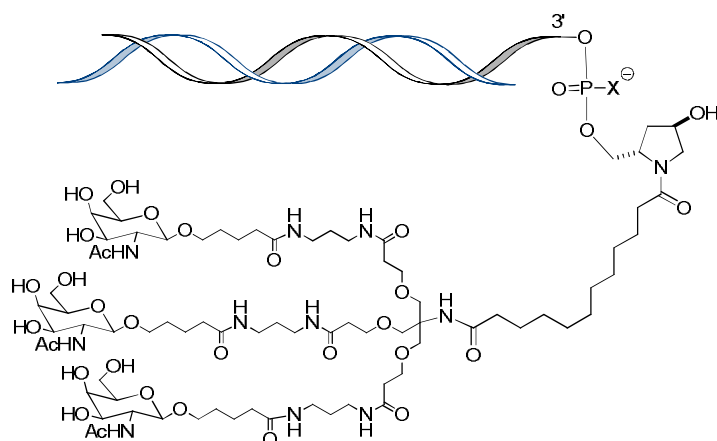
imitador de 5'-fosfato.

[0045] Em outra modalidade, o filamento senso compreende 5'-gsusguGfcAfCfUfucgcuucaca -3' (SEQ ID NO:41) e o filamento antissenso compreende 5'-usGfsugaAfgCfGfaaguGfcAfcacsusu -3' (SEQ ID NO:42), em que A, C, G e U são ribose, A, C, G ou U; a, g, c e u são 2'-O-metil (2'-OMe), A, U, C ou G; Af, Cf, Gf ou Uf são 2'-flúor A, G, C ou U; e s é uma ligação de fosforotioato.

[0046] Em uma modalidade, o ligante é



[0047] Em uma modalidade, o agente de RNAi está conjugado com o ligante como mostrado no seguinte esquema



em que X é O ou S.

[0048] Em uma modalidade, o P é um imitador de 5'-fosfato. Em uma modalidade, o imitador de 5'-fosfato é um 5'-vinil fosfato (5'-VP).

[0049] Em outro aspecto, a presente invenção providencia composições compreendendo dois ou mais agentes de RNAi de fita

dupla para inibição da expressão do vírus da hepatite B (HBV) em uma célula, em que cada agente de RNAi de fita dupla compreende independentemente um filamento senso e um filamento antissenso formando uma região de fita dupla, em que cada uma dos ditos filamentos senso compreende independentemente pelo menos 15 nucleotídeos contíguos diferindo por não mais do que 3 nucleotídeos da sequência de nucleotídeos de SEQ ID NO:1 e cada um dos ditos filamentos antissenso compreende independentemente pelo menos 15 nucleotídeos contíguos diferindo por não mais do que 3 nucleotídeos da sequência de nucleotídeos de SEQ ID NO:2, em que substancialmente todos os nucleotídeos de cada um dos ditos filamentos senso e substancialmente todos os nucleotídeos de cada um dos ditos filamentos antissenso são nucleotídeos modificados independentemente, em que cada uma dos ditos filamentos senso está independentemente conjugada com um ligante ligado no terminal 3' e em que o ligante é um ou mais derivados de GalNAc ligados através de um ligante ramificado bivalente ou trivalente.

[0050] Em uma modalidade, a uma ou mais das 3 diferenças de nucleotídeos na sequência de nucleotídeos do filamento antissenso é uma incompatibilidade de nucleotídeos no filamento antissenso. Em outra modalidade, a uma ou mais das 3 diferenças de nucleotídeos na sequência de nucleotídeos do filamento antissenso é uma incompatibilidade de nucleotídeos no filamento senso.

[0051] Em uma modalidade, todos os nucleotídeos do dito filamento senso e todos os nucleotídeos do dito filamento antissenso são nucleotídeos modificados.

[0052] Em uma modalidade, o filamento senso e o dito filamento antissenso compreendem uma região de complementaridade que compreende pelo menos 15 nucleotídeos contíguos diferindo em não mais do que 3 nucleotídeos em relação a qualquer uma das

sequências listadas em qualquer uma das Tabelas 3, 4, 6, 7, 12, 13, 22, 23, 25 e 26.

[0053] Em uma modalidade, o pelo menos um dos ditos nucleotídeos modificados é selecionado de um desóxi-nucleotídeo, um nucleotídeo de desóxi-timina (dT) 3' terminal, um nucleotídeo modificado por 2'-O-metila, um nucleotídeo modificado por 2'-flúor, um nucleotídeo modificado por 2'-desóxi, um nucleotídeo bloqueado, um nucleotídeo desbloqueado, um nucleotídeo restrito de forma adaptável, um nucleotídeo de etila constrito, um nucleotídeo abásico, um nucleotídeo modificado por 2'-amino, um nucleotídeo modificado por 2'-O-alila, um nucleotídeo modificado por 2'-C-alquila, um nucleotídeo modificado por 2'-hidroxila, um nucleotídeo modificado por 2'-metoxietila, um nucleotídeo modificado por 2'-O-alquila, um nucleotídeo de morfolino, um fosforamidato, um nucleotídeo compreendendo base não natural, um nucleotídeo modificado por tetra-hidropirano, um nucleotídeo modificado por 1,5-anidroexitol, um nucleotídeo modificado por ciclo-hexenila, um nucleotídeo compreendendo um grupo fosforotioato, um nucleotídeo compreendendo um grupo metilfosfonato, um nucleotídeo compreendendo um 5'-fosfato, e um nucleotídeo compreendendo um imitador de 5'-fosfato.

[0054] Em outro aspecto, a presente invenção fornece composições para inibir a expressão do vírus da hepatite B (HBV) em uma célula, a composição compreendendo (a) um primeiro agente de RNAi de fita dupla compreendendo **um primeiro filamento senso e** um primeiro filamento antissenso formando uma região de fita dupla, em que substancialmente todos os nucleotídeos do dito **primeiro** filamento senso e substancialmente todos os nucleotídeos do **primeiro** filamento antissenso são nucleotídeos modificados, em que o dito **primeiro** filamento senso é conjugado com um ligante ligado ao terminal 3' e em que o ligante é um ou mais derivados de GalNAc ligados através de um

ligante ramificado bivalente ou trivalente; e (b) um segundo agente de RNAi de fita dupla compreendendo um segundo filamento senso e um segundo filamento antissenso formando uma região de fita dupla, em que substancialmente todos os nucleotídeos do dito segundo filamento de senso e substancialmente todos os nucleotídeos do dito segundo filamento antissenso são nucleotídeos modificados, em que o dito segundo filamento senso é conjugado com um ligante ligado ao terminal 3', e em que o ligante é um ou mais derivados de GalNAc ligados através de um ligante ramificado bivalente ou trivalente; em que os primeiro e segundo filamentos senso compreendem cada uma independentemente uma sequência selecionada do grupo que consiste em

5'- UCGUGGUGGACUUCUCUCA -3' (SEQ IDNO:5),
 5'- GUGCACUUCGCUUCACCUCUA -3' (SEQ IDNO:7),
 5'- CGUGGUGGACUUCUCUCAAUU -3' (SEQ IDNO:9),
 5'- CGUGGUGGUCUUCUCUAAAUU -3' (SEQ IDNO:37),
 5'- GGUGGACUUCUCUCAAUUUUA -3' (SEQ IDNO:11), e
 5'- GUGUGCACUUCGCUUCACA -3' (SEQ IDNO:39) (ou uma sequência de nucleotídeos que é pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idêntica ao longo de todo seu comprimento às sequência de nucleotídeos precedentes), e em que os primeiro e segundo filamentos antissenso compreendem cada uma independentemente uma sequência selecionada do grupo que consiste em

5'- UGAGAGAAGUCCACCACGAUU -3' (SEQ ID NO:6),
 5'- UAGAGGUGAAGCGAAGUGCACUU -3' (SEQ ID NO:8),
 5'- AAUUGAGAGAAGUCCACCAGCAG -3' (SEQ ID NO:10),
 5'- AAUUGAGAGAAGUCCACCAGCUU -3' (SEQ ID NO:38),
 5'- UAAAAUUGAGAGAAGUCCACCAC -3' (SEQ ID NO:12), e
 5'- UGUGAAGCGAAGUGCACACUU -3' (SEQ ID NO:40) (ou uma

sequência de nucleotídeos que é pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idêntica ao longo de todo o seu comprimento às sequências de nucleotídeos precedentes).

[0055] Em uma modalidade, o primeiro e segundo filamento senso e/ou todos os nucleotídeos do primeiro e segundo filamento antissenso compreendem uma modificação.

[0056] Em uma modalidade, o pelo menos um dos ditos nucleotídeos modificados é selecionado de um desóxi-nucleotídeo, um nucleotídeo de desóxi-timina (dT) 3' terminal, um nucleotídeo modificado por 2'-O-metila, um nucleotídeo modificado por 2'-flúor, um nucleotídeo modificado por 2'-desóxi, um nucleotídeo bloqueado, um nucleotídeo desbloqueado, um nucleotídeo restrito de forma adaptável, um nucleotídeo de etila constrito, um nucleotídeo abásico, um nucleotídeo modificado por 2'-amino, um nucleotídeo modificado por 2'-O-alila, um nucleotídeo modificado por 2'-C-alquila, um nucleotídeo modificado por 2'-hidroxila, um nucleotídeo modificado por 2'-metoxietila, um nucleotídeo modificado por 2'-O-alquila, um nucleotídeo de morfolino, um fosforamidato, um nucleotídeo compreendendo base não natural, um nucleotídeo modificado por tetra-hidropirano, um nucleotídeo modificado por 1,5-anidroexitol, um nucleotídeo modificado por ciclo-hexenila, um nucleotídeo compreendendo um grupo fosforotioato, um nucleotídeo compreendendo um grupo metilfosfonato, um nucleotídeo compreendendo um 5'-fosfato, e um nucleotídeo compreendendo um imitador de 5'-fosfato.

[0057] Em uma modalidade, os primeiro e segundo agentes RNAi são selecionados do grupo que consiste em:

5'-uscsGuGfGUfGfGfacuucucuca – 3' (SEQ ID NO:13)

5'-usGfsagaGfaAfGfuccaCfcAfcgasusu – 3' (SEQ ID NO:14);

5'-uscsGuGfGUfGfGfacuucucuca – 3' (SEQ ID NO:15)

5'-PusGfsagaGfaAfGfuccaCfcAfcgasusu – 3' (SEQ ID NO:16);

5'-gsusgcacUfuCfGfCfuucaccucua – 3' (SEQ ID NO:17)
 5'-usAfsagGfugaagcgAfaGfugcacsusu – 3' (SEQ ID NO:18);
 5'-gsusgcacUfuCfGfCfuucaccucua – 3' (SEQ ID NO:19)
 5'-PusAfsagGfugaagcgAfaGfugcacsusu – 3' (SEQ ID NO:20);
 5'-csgsugguGfgAfCfUfucucUfCfaauu – 3' (SEQ ID NO:21)
 5'-asAfsuugAfgAfgAfaguCfcAfccagcsasg – 3' (SEQ ID NO:22);
 5'- csgsugguGfgAfCfUfucucUfCfaauu – 3' (SEQ ID NO:23)
 5'-PasAfsuugAfgAfgAfaguCfcAfccagcsasg – 3' (SEQ ID NO:24);
 5'-csgsuggudGgucdTucucuaaaauu – 3' (SEQ ID NO:35)
 5'- asdAsuugagagdAagudCcaccagcsusu – 3' (SEQ ID NO:36);
 5'- gsgsuggaCfuUfCfUfcucaAfUfuuuu – 3' (SEQ ID NO:25)
 5'- usAfsaaaUfuGfAfgagaAfgUfccaccsasc – 3' (SEQ ID NO:26);
 5'- gsgsuggaCfuUfCfUfcucaAfUfuuuu – 3' (SEQ ID NO:27)
 5'- PusAfsaaaUfuGfAfgagaAfgUfccaccsasc – 3' (SEQ ID NO:28); e
 5'- gsusguGfcAfCfUfucgcuucaca -3' (SEQ ID NO:41)
 5'- usGfsugaAfgCfGfaaguGfcAfcacsusu -3' (SEQ ID NO:42), em que A,
 C, G e U são ribose A, C, G ou U; a, g, c e u são 2'-O-metila (2'-OMe)
 A, U, C ou G; Af, Cf, Gf ou Uf são 2'-flúor A, G, C ou U; dA, dC, dG e dT
 são desoxirribose A, C, G e T; s é uma ligação fosforotioato; e P é um
 5'-fosfato ou imitador de 5'-fosfato.

[0058] Em uma modalidade, o primeiro e segundo agentes de RNAi são

5'-uscsguGfgUfGfGfacuucucuca – 3' (SEQ ID NO:15)
 5'-PusGfsagaGfaAfGfuccaCfcAfcgasusu – 3' (SEQ ID NO:16);
 5'-csgsugguGfgAfCfUfucucUfCfaauu – 3' (SEQ ID NO:21)
 5'-asAfsuugAfgAfgAfaguCfcAfccagcsasg – 3' (SEQ ID NO:22), em que
 A, C, G e U são ribose A, C, G ou U; a, g, c e u são 2'-O-metila (2'-OMe)
 A, U, C ou G; Af, Cf, Gf ou Uf são 2'-flúor A, G, C ou U; s é uma ligação
 fosforotioato; e P é um 5'-fosfato ou imitador de 5'-fosfato.

[0059] Em outra modalidade, o primeiro e segundo agentes de RNAi

são

5'- gsgsuggaCfuUfCfUfcucaAfUfuuuua – 3' (SEQ ID NO:25)

5'- usAfsaaaUfuGfAfgagaAfgUfccaccsasc – 3' (SEQ ID NO:26); e

5'- gsusguGfcAfCfUfucgcuucaca -3' (SEQ ID NO:41)

5'- usGfsugaAfgCfGfaaguGfcAfcacsusu -3' (SEQ ID NO:42),

em que A, C, G e U são ribose A, C, G ou U; a, g, c e u são 2'-O-metila (2'-OMe) A, U, C ou G; Af, Cf, Gf ou Uf são 2'-flúor A, G, C ou U; s é uma ligação fosforotioato; e P é um 5'-fosfato ou imitador de 5'-fosfato.

[0060] Em um aspecto, a presente invenção fornece um agente de RNAi de fita dupla compreendendo os agentes de RNAi listados em qualquer uma das **Tabelas 3, 4, 6, 7, 12, 13, 22, 23, 25 e 26**.

[0061] A presente invenção também fornece vetores e células compreendendo o agente de RNAi de fita dupla da invenção.

[0062] Em outro aspecto, a presente invenção fornece composições farmacêuticas compreendendo os agentes de RNAi de fita dupla da invenção, ou as composições da invenção ou os vetores da invenção.

[0063] Em uma modalidade, o agente de RNAi de fita dupla é administrado em uma solução não tamponada. Em uma modalidade, a solução não tamponada é salino ou água.

[0064] Em outra modalidade, o agente de RNAi de fita dupla é administrado com uma solução tampão. Em uma modalidade, a solução tampão compreende acetato, citrato, prolamina, carbonato, ou fosfato ou qualquer sua combinação. Em outra modalidade, a solução tampão é salino tamponado com fosfato (PBS).

[0065] Em um aspecto, a presente invenção proporciona métodos de inibição da expressão do gene do vírus da hepatite B (HBV) em uma célula. Os métodos incluem contatar a célula com o agente de RNAi de fita dupla da invenção ou a composição da invenção, ou o vetor da invenção, ou a composição farmacêutica da invenção; e manter a célula produzida por um período de tempo suficiente para se obter degradação

do transcrito de mRNA de um gene HBV, desse modo inibindo a expressão do gene HBV na célula.

[0066] Em uma modalidade, o gene HBV é selecionado do grupo constituído de C, X, P, S e uma combinação dos mesmos.

[0067] Em um aspecto, a presente invenção proporciona métodos de inibição da replicação de um vírus da hepatite B (HBV) em uma célula. Os métodos incluem contatar a célula com o agente de RNAi de fita dupla da invenção ou a composição da invenção, ou o vetor da invenção, ou a composição farmacêutica da invenção; e manter a célula produzida por um período de tempo suficiente para se obter degradação do transcrito de mRNA de um gene HBV, desse modo inibindo a replicação do HBV na célula.

[0068] Em uma modalidade, a célula está dentro de um indivíduo. Em uma modalidade, o indivíduo é um ser humano.

[0069] Em uma modalidade, o indivíduo sofre de uma doença associada a HBV.

[0070] Em uma modalidade, a expressão do gene HBV é inibida em pelo menos cerca de 30%, cerca de 40%, cerca de 50%, cerca de 60%, cerca de 70%, cerca de 80%, cerca de 90%, cerca de 95%, cerca de 98%, ou cerca de 100%.

[0071] Em uma modalidade, a replicação do gene HBV na célula é inibida em pelo menos cerca de 30%, cerca de 40%, cerca de 50%, cerca de 60%, cerca de 70%, cerca de 80%, cerca de 90%, cerca de 95%, cerca de 98%, ou cerca de 100%.

[0072] Em um aspecto, a presente invenção proporciona métodos de reduzir o nível de DNA de vírus da hepatite B (HBV) em um indivíduo infectado com HBV. Os métodos incluem administrar ao indivíduo uma quantidade terapêuticamente eficaz do agente de RNAi de fita dupla da invenção, ou a composição da invenção, ou o vetor da invenção ou a composição farmacêutica da invenção, reduzindo assim o nível de ccc

DNA de HBV no indivíduo.

[0073] Em outro aspecto, a presente invenção proporciona métodos de reduzir o nível de um antígeno de vírus da hepatite B (HBV) em um indivíduo infectado com HBV. Os métodos incluem administrar ao indivíduo uma quantidade terapêuticamente eficaz do agente de RNAi de fita dupla da invenção, ou a composição da invenção, ou o vetor da invenção ou a composição farmacêutica da invenção, reduzindo assim o nível de antígeno de HBV no indivíduo.

[0074] Em uma modalidade, o antígeno de HBV é HBsAg. Em outra modalidade, o antígeno de HBV é HBeAg.

[0075] Em outro aspecto, a presente invenção proporciona métodos de reduzir a carga viral de vírus da hepatite B (HBV) em um indivíduo infectado com HBV. Os métodos incluem administrar ao indivíduo uma quantidade terapêuticamente eficaz do agente de RNAi de fita dupla da invenção, ou a composição da invenção, ou o vetor da invenção ou a composição farmacêutica da invenção, reduzindo assim a carga viral de HBV no indivíduo.

[0076] Em ainda outro aspecto, a presente invenção proporciona métodos de reduzir o nível de alanina aminotransferase (ALT) em um indivíduo infectado com HBV. Os métodos incluem administrar ao indivíduo uma quantidade terapêuticamente eficaz do agente de RNAi de fita dupla da invenção, ou a composição da invenção, ou o vetor da invenção ou a composição farmacêutica da invenção, reduzindo assim o nível de ALT no indivíduo.

[0077] Em outro aspecto, a presente invenção proporciona métodos de reduzir o nível de aspartato aminotransferase (AST) em um indivíduo infectado com HBV. Os métodos incluem administrar ao indivíduo uma quantidade terapêuticamente eficaz do agente de RNAi de fita dupla da invenção, ou a composição da invenção, ou o vetor da invenção ou a composição farmacêutica da invenção, reduzindo assim o nível de AST

no indivíduo.

[0078] Em outro aspecto, a presente invenção proporciona métodos de aumentar o nível de anticorpos de vírus anti-hepatite B (HBV) em um indivíduo infectado com HBV. Os métodos incluem administrar ao indivíduo uma quantidade terapêuticamente eficaz do agente de RNAi de fita dupla da invenção, ou a composição da invenção, ou o vetor da invenção ou a composição farmacêutica da invenção, aumentando assim o nível de anticorpos anti-HBV no indivíduo.

[0079] Em um aspecto, a presente invenção proporciona métodos de tratamento de um indivíduo tendo uma infecção pelo vírus da hepatite B (HBV). Os métodos incluem administrar ao indivíduo uma quantidade terapêuticamente eficaz do agente de RNAi de fita dupla da invenção, ou a composição da invenção, ou o vetor da invenção ou a composição farmacêutica da invenção, tratando assim o dito indivíduo.

[0080] Em outro aspecto, a presente invenção proporciona métodos de tratamento de um indivíduo tendo um distúrbio associado ao vírus da hepatite B (HBV). Os métodos incluem administrar ao indivíduo uma quantidade terapêuticamente eficaz do agente de RNAi de fita dupla da invenção, ou a composição da invenção, ou o vetor da invenção ou a composição farmacêutica da invenção, tratando assim o dito indivíduo.

[0081] Em uma modalidade, o distúrbio associado a HBV é selecionado do grupo constituído por infecção pelo vírus da hepatite D, delta hepatite, hepatite B aguda; hepatite B aguda fulminante; hepatite B crônica; fibrose hepática; doença hepática de estágio final; carcinoma hepatocelular.

[0082] Em uma modalidade, o distúrbio associado a HBV é hepatite crônica e o indivíduo é HBeAg positivo. Em outra modalidade, o distúrbio associado a HBV é hepatite crônica e o indivíduo é HBeAg negativo.

[0083] Em um aspecto, a presente invenção proporciona métodos de tratamento de um indivíduo tendo uma infecção pelo vírus da hepatite

B (HBV). Os métodos incluem a administração ao indivíduo de uma quantidade terapêuticamente eficaz de um agente de RNAi de fita dupla, em que o dito agente de RNAi de fita dupla compreende um filamento senso e um filamento antissenso, formando uma região de fita dupla, em que o dito filamento senso compreende 5'-UCGUGGUGGACUUCUCUCA -3' (SEQ ID NO:5) (ou uma sequência de nucleotídeos que é pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idêntica ao longo de todo o seu comprimento à sequência de nucleotídeos precedentes) e o dito filamento antissenso compreende 5'-UGAGAGAAGUCCACCACGAUU -3' (SEQ ID NO:6) (ou uma sequência de nucleotídeos que é pelo menos 90% 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idêntica ao longo de todo o seu comprimento à sequência de nucleotídeos precedentes), em que substancialmente todos os nucleotídeos do dito filamento senso e substancialmente todos os nucleotídeos do dito filamento antissenso são nucleotídeos modificados, em que o dito filamento senso está conjugado com um ligante ligado ao terminal 3' e em que o ligante é um ou mais derivados de GalNAc ligados através de um ligante ramificado bivalente ou trivalente, tratando desse modo o indivíduo.

[0084] Em outro aspecto, a presente invenção proporciona métodos de tratamento de um indivíduo tendo um distúrbio associado ao vírus da hepatite B (HBV). Os métodos incluem a administração ao indivíduo de uma quantidade terapêuticamente eficaz de um agente de RNAi de fita dupla, em que o dito agente de RNAi de fita dupla compreende um filamento senso e um filamento antissenso, formando uma região de fita dupla, em que o dito filamento senso compreende 5'-UCGUGGUGGACUUCUCUCA -3' (SEQ ID NO:5) (ou uma sequência de nucleotídeos que é pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idêntica ao longo de todo o seu comprimento à

sequência de nucleotídeos precedentes) e o dito filamento antissenso compreende 5'- UGAGAGAAGUCCACCACGAUU -3' (SEQ ID NO:6) (ou uma sequência de nucleotídeos que é pelo menos 90% 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idêntica ao longo de todo o seu comprimento à sequência de nucleotídeos precedentes), em que substancialmente todos os nucleotídeos do dito filamento senso e substancialmente todos os nucleotídeos do dito filamento antissenso são nucleotídeos modificados, em que o dito filamento senso está conjugado com um ligante ligado ao terminal 3' e em que o ligante é um ou mais derivados de GalNAc ligados através de um ligante ramificado bivalente ou trivalente, tratando desse modo o indivíduo.

[0085] Em um aspecto, a presente invenção proporciona métodos de tratamento de um indivíduo tendo uma infecção pelo vírus da hepatite B (HBV). Os métodos incluem a administração ao indivíduo de uma quantidade terapeuticamente eficaz de um agente de RNAi de fita dupla, em que o dito agente de RNAi de fita dupla compreende um filamento senso e um filamento antissenso, formando uma região de fita dupla, em que o dito filamento senso compreende 5'- GUGCACUUCGCUUCACCUCUA -3' (SEQ ID NO:7) (ou uma sequência de nucleotídeos que é pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idêntica ao longo de todo o seu comprimento à sequência de nucleotídeos precedentes) e o dito filamento antissenso compreende 5'- UAGAGGUGAAGCGAAGUGCACUU -3' (SEQ ID NO:8) (ou uma sequência de nucleotídeos que é pelo menos 90% 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idêntica ao longo de todo o seu comprimento à sequência de nucleotídeos precedentes), em que substancialmente todos os nucleotídeos do dito filamento senso e substancialmente todos os nucleotídeos do dito filamento antissenso são nucleotídeos modificados, em que o dito filamento senso está

conjugado com um ligante ligado ao terminal 3' e em que o ligante é um ou mais derivados de GalNAc ligados através de um ligante ramificado bivalente ou trivalente, tratando desse modo o indivíduo.

[0086] Em outro aspecto, a presente invenção proporciona métodos de tratamento de um indivíduo tendo um distúrbio associado ao vírus da hepatite B (HBV). Os métodos incluem a administração ao indivíduo de uma quantidade terapêuticamente eficaz de um agente de RNAi de fita dupla, em que o dito agente de RNAi de fita dupla compreende um filamento senso e um filamento antissenso, formando uma região de fita dupla,

em que o dito filamento senso compreende 5'-GUGCACUUCGCUUCACCUCUA -3' (SEQ ID NO:7) (ou uma sequência de nucleotídeos que é pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idêntica ao longo de todo o seu comprimento à sequência de nucleotídeos precedentes) e o dito filamento antissenso compreende 5'-UAGAGGUGAAGCGAAGUGCACUU -3' (SEQ ID NO:8) (ou uma sequência de nucleotídeos que é pelo menos 90% 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idêntica ao longo de todo o seu comprimento à sequência de nucleotídeos precedentes), em que substancialmente todos os nucleotídeos do dito filamento senso e substancialmente todos os nucleotídeos do dito filamento antissenso são nucleotídeos modificados, em que o dito filamento senso está conjugado com um ligante ligado ao terminal 3' e em que o ligante é um ou mais derivados de GalNAc ligados através de um ligante ramificado bivalente ou trivalente, tratando desse modo o indivíduo.

[0087] Em um aspecto, a presente invenção proporciona métodos de tratamento de um indivíduo tendo uma infecção pelo vírus da hepatite B (HBV). Os métodos incluem a administração ao indivíduo de uma quantidade terapêuticamente eficaz de um agente de RNAi de fita dupla,

em que o dito agente de RNAi de fita dupla compreende um filamento senso e um filamento antissenso, formando uma região de fita dupla, em que o dito filamento senso compreende 5'-CGUGGUGGACUUCUCUCAAUU -3' (SEQ ID NO:9) (ou uma sequência de nucleotídeos que é pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idêntica ao longo de todo o seu comprimento à sequência de nucleotídeos precedentes) e o dito filamento antissenso compreende 5'-AAUUGAGAGAAGUCCACCAGCAG -3' (SEQ ID NO:10) (ou uma sequência de nucleotídeos que é pelo menos 90% 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idêntica ao longo de todo o seu comprimento à sequência de nucleotídeos precedentes), em que substancialmente todos os nucleotídeos do dito filamento senso e substancialmente todos os nucleotídeos do dito filamento antissenso são nucleotídeos modificados, em que o dito filamento senso está conjugado com um ligante ligado ao terminal 3' e em que o ligante é um ou mais derivados de GalNAc ligados através de um ligante ramificado bivalente ou trivalente, tratando desse modo o indivíduo.

[0088] Em outro aspecto, a presente invenção proporciona métodos de tratamento de um indivíduo tendo um distúrbio associado ao vírus da hepatite B (HBV). Os métodos incluem a administração ao indivíduo de uma quantidade terapêuticamente eficaz de um agente de RNAi de fita dupla, em que o dito agente de RNAi de fita dupla compreende um filamento senso e um filamento antissenso, formando uma região de fita dupla,

em que o dito filamento senso compreende 5'-CGUGGUGGACUUCUCUCAAUU -3' (SEQ ID NO:9) (ou uma sequência de nucleotídeos que é pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idêntica ao longo de todo o seu comprimento à sequência de nucleotídeos precedentes) e o dito

filamento antissenso compreende 5'-AAUUGAGAGAAGUCCACCAGCAG -3' (SEQ ID NO:10) (ou uma sequência de nucleotídeos que é pelo menos 90% 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idêntica ao longo de todo o seu comprimento à sequência de nucleotídeos precedentes), em que substancialmente todos os nucleotídeos do dito filamento senso e substancialmente todos os nucleotídeos do dito filamento antissenso são nucleotídeos modificados, em que o dito filamento senso está conjugado com um ligante ligado ao terminal 3' e em que o ligante é um ou mais derivados de GalNAc ligados através de um ligante ramificado bivalente ou trivalente, tratando desse modo o indivíduo.

[0089] Em um aspecto, a presente invenção proporciona métodos de tratamento de um indivíduo tendo uma infecção pelo vírus da hepatite B (HBV). Os métodos incluem a administração ao indivíduo de uma quantidade terapeuticamente eficaz de um agente de RNAi de fita dupla, em que o dito agente de RNAi de fita dupla compreende um filamento senso e um filamento antissenso, formando uma região de fita dupla, em que o filamento senso compreende 5'-CGUGGUGGUCUUCUCUAAAUU -3' (SEQ ID NO:37) (ou uma sequência de nucleotídeos que é pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idêntica ao longo de todo o seu comprimento à sequência de nucleotídeos precedentes) e o filamento antissenso compreende 5'-AAUUGAGAGAAGUCCACCAGCUU -3' (SEQ ID NO:38) (ou uma sequência de nucleotídeos que é pelo menos 90% 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idêntica ao longo de todo o seu comprimento à sequência de nucleotídeos precedentes), em que substancialmente todos os nucleotídeos do dito filamento senso e substancialmente todos os nucleotídeos do dito filamento antissenso são nucleotídeos modificados, em que o dito filamento senso está conjugado com um ligante ligado ao terminal 3' e

em que o ligante é um ou mais derivados de GalNAc ligados através de um ligante ramificado bivalente ou trivalente, tratando desse modo o indivíduo.

[0090] Em outro aspecto, a presente invenção proporciona métodos de tratamento de um indivíduo tendo um distúrbio associado ao vírus da hepatite B (HBV). Os métodos incluem administrar ao indivíduo uma quantidade terapêuticamente eficaz de um agente de RNAi de fita dupla, em que o agente de RNAi de fita dupla compreende um filamento senso e um filamento antissenso formando uma região de fita dupla, em que o filamento senso compreende 5'-CGUGGUGGUCUUCUCUAAAUU -3' (SEQ ID NO:37) (ou uma sequência de nucleotídeos que é pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idêntica ao longo de todo o seu comprimento à sequência de nucleotídeos precedentes) e o filamento antissenso compreende 5'-AAUUGAGAGAAGUCCACCAGCUU -3' (SEQ ID NO:38) (ou uma sequência de nucleotídeos que é pelo menos 90% 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idêntica ao longo de todo o seu comprimento à sequência de nucleotídeos precedentes), em que substancialmente todos os nucleotídeos do filamento senso e substancialmente todos os nucleotídeos do filamento antissenso são nucleotídeos modificados, em que o dito filamento senso está conjugado com um ligante ligado ao terminal 3' e em que o ligante é um ou mais derivados de GalNAc ligados através de um ligante ramificado bivalente ou trivalente, tratando desse modo o indivíduo.

[0091] Em um aspecto, a presente invenção proporciona métodos de tratamento de um indivíduo tendo uma infecção pelo vírus da hepatite B (HBV). Os métodos incluem a administração ao indivíduo de uma quantidade terapêuticamente eficaz de um agente de RNAi de fita dupla, em que o dito agente de RNAi de fita dupla compreende um filamento senso e um filamento antissenso, formando uma região de fita dupla,

em que o dito filamento senso compreende 5'-GGUGGACUUCUCUCAAUUUUA -3' (SEQ ID NO:11) (ou uma sequência de nucleotídeos que é pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idêntica ao longo de todo o seu comprimento à sequência de nucleotídeos precedentes) e o dito filamento antissenso compreende 5'-UAAAAUUGAGAGAAGUCCACCAC -3' (SEQ ID NO:12) (ou uma sequência de nucleotídeos que é pelo menos 90% 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idêntica ao longo de todo o seu comprimento à sequência de nucleotídeos precedentes), em que substancialmente todos os nucleotídeos do dito filamento senso e substancialmente todos os nucleotídeos do dito filamento antissenso são nucleotídeos modificados, em que o dito filamento senso está conjugado com um ligante ligado ao terminal 3' e em que o ligante é um ou mais derivados de GalNAc ligados através de um ligante ramificado bivalente ou trivalente, tratando desse modo o indivíduo.

[0092] Em outro aspecto, a presente invenção proporciona métodos de tratamento de um indivíduo tendo um distúrbio associado ao vírus da hepatite B (HBV). Os métodos incluem a administração ao indivíduo de uma quantidade terapeuticamente eficaz de um agente de RNAi de fita dupla, em que o dito agente de RNAi de fita dupla compreende um filamento senso e um filamento antissenso, formando uma região de fita dupla,

em que o dito filamento senso compreende 5'-GGUGGACUUCUCUCAAUUUUA -3' (SEQ ID NO:11) (ou uma sequência de nucleotídeos que é pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idêntica ao longo de todo o seu comprimento à sequência de nucleotídeos precedentes) e o dito filamento antissenso compreende 5'-UAAAAUUGAGAGAAGUCCACCAC -3' (SEQ ID NO:12) (ou uma

sequência de nucleotídeos que é pelo menos 90% 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idêntica ao longo de todo o seu comprimento à sequência de nucleotídeos precedentes), em que substancialmente todos os nucleotídeos do dito filamento senso e substancialmente todos os nucleotídeos do dito filamento antissenso são nucleotídeos modificados, em que o dito filamento senso está conjugado com um ligante ligado ao terminal 3' e em que o ligante é um ou mais derivados de GalNAc ligados através de um ligante ramificado bivalente ou trivalente, tratando desse modo o indivíduo.

[0093] Em um aspecto, a presente invenção proporciona métodos de tratamento de um indivíduo tendo uma infecção pelo vírus da hepatite B (HBV). Os métodos incluem a administração ao indivíduo de uma quantidade terapeuticamente eficaz de um agente de RNAi de fita dupla, em que o dito agente de RNAi de fita dupla compreende um filamento senso e um filamento antissenso, formando uma região de fita dupla, em que o dito filamento senso compreende 5'- GUGUGCACUUCGCUUCACA -3' (SEQ ID NO:39) (ou uma sequência de nucleotídeos que é pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idêntica ao longo de todo o seu comprimento à sequência de nucleotídeos precedentes) e o dito filamento antissenso compreende 5'- GUGUGCACUUCGCUUCACA -3' (SEQ ID NO:40) (ou uma sequência de nucleotídeos que é pelo menos 90% 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idêntica ao longo de todo o seu comprimento à sequência de nucleotídeos precedentes), em que substancialmente todos os nucleotídeos do dito filamento senso e substancialmente todos os nucleotídeos do dito filamento antissenso são nucleotídeos modificados, em que o dito filamento senso está conjugado com um ligante ligado ao terminal 3' e em que o ligante é um ou mais derivados de GalNAc ligados através de um ligante ramificado bivalente ou trivalente, tratando desse modo o indivíduo.

[0094] Em outro aspecto, a presente invenção proporciona métodos de tratamento de um indivíduo tendo um distúrbio associado ao vírus da hepatite B (HBV). Os métodos incluem a administração ao indivíduo de uma quantidade terapeuticamente eficaz de um agente de RNAi de fita dupla, em que o dito agente de RNAi de fita dupla compreende um filamento senso e um filamento antissenso, formando uma região de fita dupla,

em que o dito filamento senso compreende 5'-GUGUGCACUUCGCUUCACA -3' (SEQ ID NO:39) (ou uma sequência de nucleotídeos que é pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idêntica ao longo de todo o seu comprimento à sequência de nucleotídeos precedentes) e o dito filamento antissenso compreende 5'-GUGUGCACUUCGCUUCACA -3' (SEQ ID NO:40) (ou uma sequência de nucleotídeos que é pelo menos 90% 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idêntica ao longo de todo o seu comprimento à sequência de nucleotídeos precedentes), em que substancialmente todos os nucleotídeos do dito filamento senso e substancialmente todos os nucleotídeos do dito filamento antissenso são nucleotídeos modificados, em que o dito filamento senso está conjugado com um ligante ligado ao terminal 3' e em que o ligante é um ou mais derivados de GalNAc ligados através de um ligante ramificado bivalente ou trivalente, tratando desse modo o indivíduo.

[0095] Em uma modalidade, todos os nucleotídeos do dito filamento senso e todos os nucleotídeos do dito filamento antissenso compreendem uma modificação.

[0096] Em uma modalidade, o pelo menos um dos ditos nucleotídeos modificados é selecionado de um desóxi-nucleotídeo, um nucleotídeo de desóxi-timina (dT) 3' terminal, um nucleotídeo modificado por 2'-O-metila, um nucleotídeo modificado por 2'-flúor, um nucleotídeo modificado por 2'-desóxi, um nucleotídeo bloqueado, um

nucleotídeo desbloqueado, um nucleotídeo restrito de forma adaptável, um nucleotídeo de etila constricto, um nucleotídeo abásico, um nucleotídeo modificado por 2'-amino, um nucleotídeo modificado por 2'-O-alila, um nucleotídeo modificado por 2'-C-alquila, um nucleotídeo modificado por 2'-hidroxila, um nucleotídeo modificado por 2'-metoxietila, um nucleotídeo modificado por 2'-O-alquila, um nucleotídeo de morfolino, um fosforamidato, um nucleotídeo compreendendo base não natural, um nucleotídeo modificado por tetra-hidropirano, um nucleotídeo modificado por 1,5-anidroexitol, um nucleotídeo modificado por ciclo-hexenila, um nucleotídeo compreendendo um grupo fosforotioato, um nucleotídeo compreendendo um grupo metilfosfonato, um nucleotídeo compreendendo um 5'-fosfato, e um nucleotídeo compreendendo um imitador de 5'-fosfato.

[0097] Em uma modalidade, o imitador de 5'-fosfato é um 5'-vinil fosfato (5'-VP).

[0098] Em uma modalidade, o filamento senso compreende 5'-uscsguGfgUfGfGfacuucucuca – 3' (SEQ ID NO:13) e o filamento antissenso compreende 5'-usGfsagaGfaAfGfuccaCfcAfcgasusu – 3' (SEQ ID NO:14), em que A, C, G e U são ribose, A, C, G ou U; a, g, c e u são 2'-O-metil (2'-OMe), A, U, C ou G; Af, Cf, Gf ou Uf são 2'-flúor A, G, C ou U; e s é uma ligação de fosforotioato.

[0099] Em outra modalidade, o filamento senso compreende 5'-uscsguGfgUfGfGfacuucucuca – 3' (SEQ ID NO:15) e o filamento antissenso compreende 5'-PusGfsagaGfaAfGfuccaCfcAfcgasusu – 3' (SEQ ID NO:16), em que A, C, G e U são ribose, A, C, G ou U; a, g, c e u são 2'-O-metil (2'-OMe), A, U, C ou G; Af, Cf, Gf ou Uf são 2'-flúor A, G, C ou U; e s é uma ligação de fosforotioato; e P é um 5'-fosfato ou imitador de 5'-fosfato.

[00100] Em uma modalidade, o filamento senso compreende 5'-gsusgcacUfuCfGfCfuuccucucua – 3' (SEQ ID NO:17) e o filamento

antissenso compreende 5'-usAfsgagGfugaagcgAfaGfugcacsusu – 3' (SEQ ID NO:18), em que A, C, G e U são ribose, A, C, G ou U; a, g, c e u são 2'-O-metil (2'-OMe), A, U, C ou G; Af, Cf, Gf ou Uf são 2'-flúor A, G, C ou U; e s é uma ligação de fosforotioato.

[00101] Em outra modalidade, o filamento senso compreende 5'-gsusgcacUfuCfGfCfuucaccucua – 3' (SEQ ID NO:19) e o filamento antissenso compreende 5'-PusAfsgagGfugaagcgAfaGfugcacsusu – 3' (SEQ ID NO:20), em que A, C, G e U são ribose, A, C, G ou U; a, g, c e u são 2'-O-metil (2'-OMe), A, U, C ou G; Af, Cf, Gf ou Uf são 2'-flúor A, G, C ou U; e s é uma ligação de fosforotioato; e P é um 5'-fosfato ou imitador de 5'-fosfato.

[00102] Em uma modalidade, o filamento senso compreende 5'-csgsugguGfgAfCfUfucucUfCfaauu – 3' (SEQ ID NO:21) e o filamento antissenso compreende 5'-asAfsuugAfgAfgAfaguCfcAfccagcsasg – 3' (SEQ ID NO:22), em que A, C, G e U são ribose, A, C, G ou U; a, g, c e u são 2'-O-metil (2'-OMe), A, U, C ou G; Af, Cf, Gf ou Uf são 2'-flúor A, G, C ou U; e s é uma ligação de fosforotioato.

[00103] Em outra modalidade, o filamento senso compreende 5'-csgsugguGfgAfCfUfucucUfCfaauu – 3' (SEQ ID NO:23) e o filamento antissenso compreende 5'-PasAfsuugAfgAfgAfaguCfcAfccagcsasg – 3' (SEQ ID NO:24), em que A, C, G e U são ribose, A, C, G ou U; a, g, c e u são 2'-O-metil (2'-OMe), A, U, C ou G; Af, Cf, Gf ou Uf são 2'-flúor A, G, C ou U; e s é uma ligação de fosforotioato; e P é um 5'-fosfato ou imitador de 5'-fosfato.

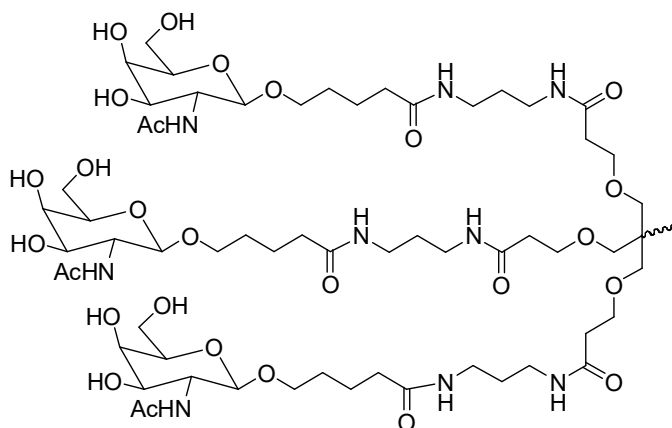
[00104] Em outra modalidade, o filamento senso compreende 5'-csgsuggudGgucdTucucuaaaauu – 3' (SEQ ID NO:35) e o filamento antissenso compreende 5'-asdAsuugagagdAagudCcaccagcsusu – 3' (SEQ ID NO:36), em que A, C, G e U são ribose, A, C, G ou U; a, g, c e u são 2'-O-metil (2'-OMe), A, U, C, ou G; dA, dC, dG e dT são desoxirribose A, C, G e T; e s é uma ligação de fosforotioato.

[00105] Em uma modalidade, o filamento senso compreende 5'-gsgsuggaCfuUfCfUfcucaAfUfuuua – 3' (SEQ ID NO:25) e o filamento antissenso compreende 5'-usAfsaaaUfuGfAfgagaAfgUfccaccsasc – 3' (SEQ ID NO:26), em que A, C, G e U são ribose, A, C, G ou U; a, g, c e u são 2'-O-metil (2'-OMe), A, U, C ou G; Af, Cf, Gf ou Uf são 2'-flúor A, G, C ou U; e s é uma ligação de fosforotioato.

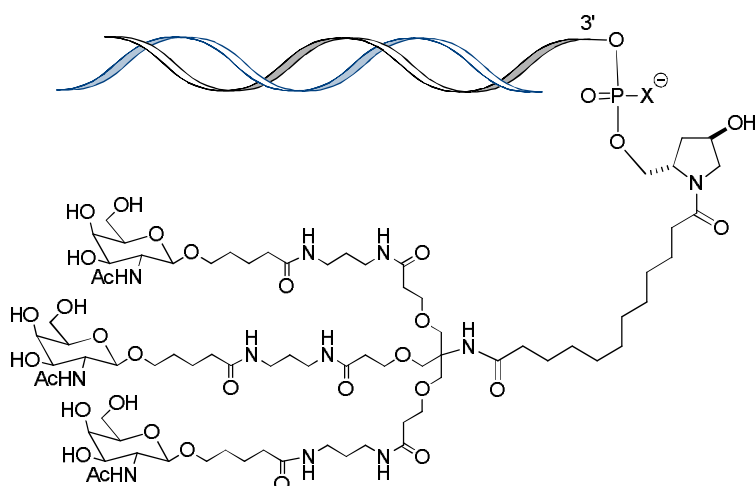
[00106] Em outra modalidade, o filamento senso compreende 5'-gsgsuggaCfuUfCfUfcucaAfUfuuua – 3' (SEQ ID NO:27) e o filamento antissenso compreende 5'-PusAfsaaaUfuGfAfgagaAfgUfccaccsasc – 3' (SEQ ID NO:28), em que A, C, G e U são ribose, A, C, G ou U; a, g, c e u são 2'-O-metil (2'-OMe), A, U, C ou G; Af, Cf, Gf ou Uf são 2'-flúor A, G, C ou U; e s é uma ligação de fosforotioato; e P é um 5'-fosfato ou imitador de 5'-fosfato.

[00107] Em outra modalidade, o filamento senso compreende 5'-gsusguGfcAfCfUfucgcuucaca -3' (SEQ ID NO:41) e o filamento antissenso compreende 5'-usGfsugaAfgCfGfaaguGfcAfcacsusu -3' (SEQ ID NO:42), em que A, C, G e U são ribose, A, C, G ou U; a, g, c e u são 2'-O-metil (2'-OMe), A, U, C ou G; Af, Cf, Gf ou Uf são 2'-flúor A, G, C ou U; e s é uma ligação de fosforotioato.

[00108] Em uma modalidade, o ligante é



[00109] Em uma modalidade, o agente de RNAi está conjugado com o ligante como mostrado no seguinte esquema



em que X é O ou S.

[00110] Em uma modalidade, o distúrbio associado a HBV é selecionado do grupo constituído por infecção pelo vírus da hepatite D, delta hepatite, hepatite B aguda; hepatite B aguda fulminante; hepatite B crônica; fibrose hepática; doença hepática de estágio final; carcinoma hepatocelular.

[00111] Em uma modalidade, o distúrbio associado a HBV é hepatite crônica e o indivíduo é HBeAg positivo. Em outra modalidade, o distúrbio associado a HBV é hepatite crônica e o indivíduo é HBeAg negativo.

[00112] Em um aspecto, a presente invenção proporciona métodos de tratamento de um indivíduo tendo uma infecção pelo vírus da hepatite B (HBV). Os métodos incluem a administração ao indivíduo de uma quantidade terapeuticamente eficaz de uma composição para inibir a expressão do vírus da hepatite B (HBV) em uma célula. A composição inclui: (a) um primeiro agente de RNAi de fita dupla compreendendo um primeiro filamento senso e um primeiro filamento antissenso formando uma região de fita dupla,

em que substancialmente todos os nucleotídeos do dito primeiro filamento senso e substancialmente todos os nucleotídeos do dito primeiro filamento antissenso são nucleotídeos modificados, em que o dito primeiro filamento senso é conjugado com um ligante ligado ao terminal 3' e em que o ligante é um ou mais derivados de GalNAc

ligados através de um ligante ramificado bivalente ou trivalente; e (b) um segundo agente de RNAi de fita dupla compreendendo um segundo filamento senso e um segundo filamento antissenso formando uma região de fita dupla, em que substancialmente todos os nucleotídeos do dito segundo filamento de senso e substancialmente todos os nucleotídeos do dito segundo filamento antissenso são nucleotídeos modificados, em que o dito segundo filamento senso é conjugado com um ligante ligado ao terminal 3', e em que o ligante é um ou mais derivados de GalNAc ligados através de um ligante ramificado bivalente ou trivalente; em que os primeiro e segundo filamentos senso compreendem cada uma independentemente uma sequência selecionada do grupo que consiste em

5'- UCGUGGUGGACUUCUCUCA -3' (SEQ IDNO:5),
 5'- GUGCACUUCGCUUCACCUCUA -3' (SEQ IDNO:7),
 5'- CGUGGUGGACUUCUCUCAAUU -3' (SEQ IDNO:9),
 5'- CGUGGUGGUCUUCUCUAAAUU -3' (SEQ IDNO:37),
 5'- GGUGGACUUCUCUCAAUUUUA -3' (SEQ IDNO:11), e
 5'- GUGUGCACUUCGCUUCACA -3' (SEQ IDNO:39) (ou uma sequência de nucleotídeos que é pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idêntica ao longo de todo seu comprimento a qualquer uma das sequências de nucleotídeos precedentes), e em que os primeiro e segundo filamentos antissenso compreendem cada uma independentemente uma sequência selecionada do grupo que consiste em

5'- UGAGAGAAGUCCACCACGAUU -3' (SEQ ID NO:6);
 5'- UAGAGGUGAAGCGAAGUGCACUU -3' (SEQ ID NO:8);
 5'- AAUUGAGAGAAGUCCACCAGCAG -3' (SEQ ID NO:10);
 5'- AAUUGAGAGAAGUCCACCAGCUU -3' (SEQ ID NO:38),
 5'- UAAAAUUGAGAGAAGUCCACCAC -3' (SEQ ID NO:12), e

5'- UGUGAAGCGAAGUGCACACUU -3' (SEQ ID NO:40) (ou uma sequência de nucleotídeos que é pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idêntica ao longo de todo o seu comprimento a qualquer uma das sequências de nucleotídeos precedentes), tratando desse modo o indivíduo.

[00113] Em outro aspecto, a presente invenção proporciona métodos de tratamento de um indivíduo tendo um distúrbio associado ao vírus da hepatite B (HBV). Os métodos incluem a administração ao indivíduo de uma quantidade terapeuticamente eficaz de uma composição para inibir a expressão do vírus da hepatite B (HBV) em uma célula. A composição inclui: (a) um primeiro agente de RNAi de fita dupla compreendendo um primeiro filamento senso e um primeiro filamento antissenso formando uma região de fita dupla, em que substancialmente todos os nucleotídeos do dito primeiro filamento senso e substancialmente todos os nucleotídeos do dito primeiro filamento antissenso são nucleotídeos modificados, em que o dito primeiro filamento senso é conjugado com um ligante ligado ao terminal 3' e em que o ligante é um ou mais derivados de GalNAc ligados através de um ligante ramificado bivalente ou trivalente; e (b) um segundo agente de RNAi de fita dupla compreendendo um segundo filamento senso e um segundo filamento antissenso formando uma região de fita dupla, em que substancialmente todos os nucleotídeos do dito segundo filamento de senso e substancialmente todos os nucleotídeos do dito segundo filamento antissenso são nucleotídeos modificados, em que o dito segundo filamento senso é conjugado com um ligante ligado ao terminal 3', e em que o ligante é um ou mais derivados de GalNAc ligados através de um ligante ramificado bivalente ou trivalente; em que os primeiro e segundo filamentos senso compreendem cada uma independentemente uma sequência selecionada do grupo que

consiste em

5'- UCGUGGUGGACUUCUCUCA -3' (SEQ IDNO:5),
 5'- GUGCACUUCGCUUCACCUCUA -3' (SEQ IDNO:7),
 5'- CGUGGUGGACUUCUCUCAAUU -3' (SEQ IDNO:9),
 5'- CGUGGUGGUCUUCUCUAAAUU -3' (SEQ IDNO:37),
 5'- GGUGGACUUCUCUCAAUUUUA -3' (SEQ IDNO:11), e
 5'- GUGUGCACUUCGCUUCACA -3' (SEQ IDNO:39) (ou uma sequência de nucleotídeos que é pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idêntica ao longo de todo seu comprimento a qualquer uma das sequências de nucleotídeos precedentes), e em que os primeiro e segundo filamentos antissenso compreendem cada uma independentemente uma sequência selecionada do grupo que consiste em
 5'- UGAGAGAAGUCCACCACGAUU -3' (SEQ ID NO:6);
 5'- UAGAGGUGAAGCGAAGUGCACUU -3' (SEQ ID NO:8);
 5'- AAUUGAGAGAAGUCCACCAGCAG -3' (SEQ ID NO:10);
 5'- AAUUGAGAGAAGUCCACCAGCUU -3' (SEQ ID NO:38),
 5'- UAAAAUUGAGAGAAGUCCACCAC -3' (SEQ ID NO:12), e
 5'- UGUGAAGCGAAGUGCACACUU -3' (SEQ ID NO:40) (ou uma sequência de nucleotídeos que é pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idêntica ao longo de todo o seu comprimento a qualquer uma das sequências de nucleotídeos precedentes), tratando desse modo o indivíduo.

[00114] Em uma modalidade, todos os nucleotídeos do primeiro e segundo filamento senso e todos os nucleotídeos do primeiro e segundo filamento antissenso compreendem uma modificação.

[00115] Em uma modalidade, o pelo menos um dos ditos nucleotídeos modificados é selecionado de um desóxi-nucleotídeo, um nucleotídeo de desóxi-timina (dT) 3' terminal, um nucleotídeo modificado por 2'-O-metila, um nucleotídeo modificado por 2'-flúor,

um nucleotídeo modificado por 2'-desóxi, um nucleotídeo bloqueado, um nucleotídeo desbloqueado, um nucleotídeo restrito de forma adaptável, um nucleotídeo de etila constricto, um nucleotídeo abásico, um nucleotídeo modificado por 2'-amino, um nucleotídeo modificado por 2'-O-alila, um nucleotídeo modificado por 2'-C-alquila, um nucleotídeo modificado por 2'-hidroxila, um nucleotídeo modificado por 2'-metoxietila, um nucleotídeo modificado por 2'-O-alquila, um nucleotídeo de morfolino, um fosforamidoato, um nucleotídeo compreendendo base não natural, um nucleotídeo modificado por tetra-hidropirano, um nucleotídeo modificado por 1,5-anidroexitol, um nucleotídeo modificado por ciclo-hexenila, um nucleotídeo compreendendo um grupo fosforotioato, um nucleotídeo compreendendo um grupo metilfosfonato, um nucleotídeo compreendendo um 5'-fosfato, e um nucleotídeo compreendendo um imitador de 5'-fosfato.

[00116] Em uma modalidade, os primeiro e segundo agentes RNAi são selecionados do grupo que consiste em:

5'-uscsguGfgUfGfGfacuucucuca – 3' (SEQ ID NO:13)

5'-usGfsagaGfaAfGfuccaCfcAfcgasusu – 3' (SEQ ID NO:14);

5'-uscsguGfgUfGfGfacuucucuca – 3' (SEQ ID NO:15)

5'-PusGfsagaGfaAfGfuccaCfcAfcgasusu – 3' (SEQ ID NO:16);

5'-gsusgcacUfuCfGfCfuucaccucua – 3' (SEQ ID NO:17)

5'-usAfsgagGfugaagcgAfaGfugcacsusu – 3' (SEQ ID NO:18);

5'-gsusgcacUfuCfGfCfuucaccucua – 3' (SEQ ID NO:19)

5'-PusAfsgagGfugaagcgAfaGfugcacsusu – 3' (SEQ ID NO:20);

5'-csgsugguGfgAfCfUfucucUfCfaauu – 3' (SEQ ID NO:21)

5'-asAfsuugAfgAfgAfaguCfcAfccagcsasg – 3' (SEQ ID NO:22);

5'- csgsugguGfgAfCfUfucucUfCfaauu – 3' (SEQ ID NO:23)

5'-PasAfsuugAfgAfgAfaguCfcAfccagcsasg – 3' (SEQ ID NO:24);

5'-csgsuggudGgucdTucucuaaaauu – 3' (SEQ ID NO:35)

5'- asdAsuugagagdAagudCcaccagcsusu – 3' (SEQ ID NO:36);
 5'- gsgsuggaCfuUfCfUfcucaAfUfuuuu – 3' (SEQ ID NO:25)
 5'- usAfsaaaUfuGfAfgagaAfgUfccacccsasc – 3' (SEQ ID NO:26);
 5'- gsgsuggaCfuUfCfUfcucaAfUfuuuu – 3' (SEQ ID NO:27)
 5'- PusAfsaaaUfuGfAfgagaAfgUfccacccsasc – 3' (SEQ ID NO:28); e
 5'- gsusguGfcAfCfUfucgcuucaca -3' (SEQ ID NO:41)
 5'- usGfsugaAfgCfGfaaguGfcAfcacsusu -3' (SEQ ID NO:42), em que A, C, G e U são ribose A, C, G ou U; a, g, c e u são 2'-O-metila (2'-OMe) A, U, C ou G; Af, Cf, Gf ou Uf são 2'-flúor A, G, C ou U; dA, dC, dG e dT são desoxirribose A, C, G e T; s é uma ligação fosforotioato; e P é um 5'-fosfato ou imitador de 5'-fosfato.

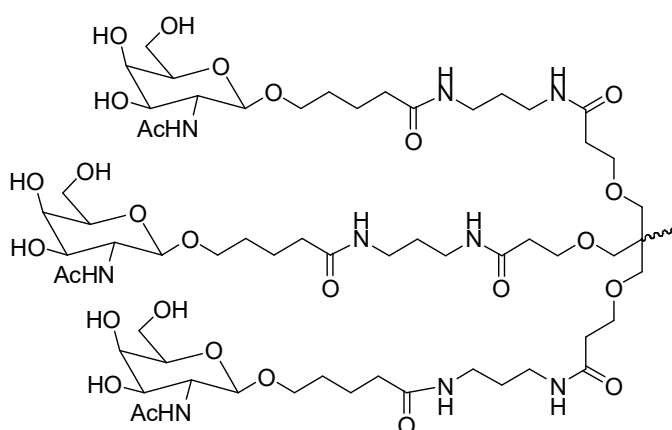
[00117] Em uma modalidade, o primeiro e segundo agentes de RNAi são

5'-uscsnguGfgUfGfGfacuucucuca – 3' (SEQ ID NO:15)
 5'-PusGfsagaGfaAfGfuccaCfcAfcgasusu – 3' (SEQ ID NO:16); e
 5'-csgsugguGfgAfCfUfucucUfCfaauu – 3' (SEQ ID NO:21)
 5'-asAfsuugAfgAfgAfaguCfcAfccagcsasg – 3' (SEQ ID NO:22), em que A, C, G e U são ribose A, C, G ou U; a, g, c e u são 2'-O-metila (2'-OMe) A, U, C ou G; Af, Cf, Gf ou Uf são 2'-flúor A, G, C ou U; s é uma ligação fosforotioato; e P é um 5'-fosfato ou imitador de 5'-fosfato.

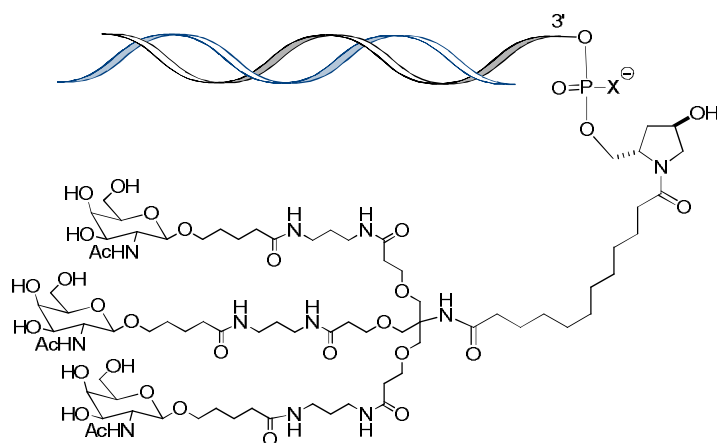
[00118] Em outra modalidade, o primeiro e segundo agentes de RNAi são

5'- gsgsuggaCfuUfCfUfcucaAfUfuuuu – 3' (SEQ ID NO:25)
 5'- usAfsaaaUfuGfAfgagaAfgUfccacccsasc – 3' (SEQ ID NO:26); e
 5'- gsusguGfcAfCfUfucgcuucaca -3' (SEQ ID NO:41)
 5'- usGfsugaAfgCfGfaaguGfcAfcacsusu -3' (SEQ ID NO:42), em que A, C, G e U são ribose A, C, G ou U; a, g, c e u são 2'-O-metila (2'-OMe) A, U, C ou G; Af, Cf, Gf ou Uf são 2'-flúor A, G, C ou U; s é uma ligação fosforotioato; e P é um 5'-fosfato ou imitador de 5'-fosfato.

[00119] Em uma modalidade, o ligante é



[00120] Em uma modalidade, o agente de RNAi está conjugado com o ligante como mostrado no seguinte esquema



em que X é O ou S.

[00121] Em uma modalidade, o indivíduo é um ser humano.

[00122] Em uma modalidade, o distúrbio associado a HBV é selecionado do grupo constituído por infecção pelo vírus da hepatite D, delta hepatite, hepatite B aguda; hepatite B aguda fulminante; hepatite B crônica; fibrose hepática; doença hepática de estágio final; carcinoma hepatocelular.

[00123] Em uma modalidade, o distúrbio associado a HBV é hepatite crônica e o indivíduo é HBeAg positivo. Em outra modalidade, o distúrbio associado a HBV é hepatite crônica e o indivíduo é HBeAg negativo.

[00124] Em uma modalidade, o agente de RNAi de fita dupla é administrado em uma dose ao redor de 0,01 mg/kg a cerca de 10 mg/kg ou cerca de 0,5 mg/kg a cerca de 50 mg/kg.

[00125] Em uma modalidade, o agente RNAi de fita dupla é administrado em uma dose ao redor de 10 mg/kg a cerca de 30 mg/kg. Em outra modalidade, o agente RNAi de fita dupla é administrado em uma dose ao redor de 3 mg/kg. Em uma modalidade, o agente RNAi de fita dupla é administrado em uma dose ao redor de 10 mg/kg.

[00126] Em uma modalidade, o agente RNAi de fita dupla é administrado em uma dose ao redor de 0,5 mg/kg duas vezes por semana.

[00127] Em uma modalidade, o agente RNAi de fita dupla é administrado em uma dose fixa ao redor de 50 mg a 200 mg.

[00128] Em uma modalidade, o agente de RNAi de fita dupla é administrado por via subcutânea. Em outra modalidade, o agente de RNAi de fita dupla é administrado por via intravenosa.

[00129] Em uma modalidade, o agente de RNAi é administrado em duas ou mais doses.

[00130] Em uma modalidade, o agente de RNAi é administrado a intervalos selecionados do grupo que consiste em uma vez a cada cerca de 12 horas, uma vez a cada cerca de 24 horas, uma vez a cada cerca de 48 horas, uma vez a cada cerca de 72 horas, e uma vez a cada cerca de 96 horas.

[00131] Em uma modalidade, o agente de RNAi é administrado duas vezes por semana. Em outra modalidade, o agente de RNAi é administrado a cada duas semanas.

[00132] Em uma modalidade, os métodos da invenção incluem adicionalmente administrar ao indivíduo um agente terapêutico adicional.

[00133] Em uma modalidade, o agente terapêutico adicional é selecionado do grupo constituído por um agente antiviral, um inibidor da transcriptase reversa, um estimulador imune, uma vacina terapêutica, um inibidor da entrada viral, um oligonucleotídeo que inibe a secreção

ou liberação de HbsAg, um inibidor de capsídeo, um inibidor de cccDNA e uma combinação de qualquer um dos anteriores.

[00134] Em outra modalidade, os métodos da invenção incluem adicionalmente administrar ao indivíduo um inibidor da transcriptase reversa. Em ainda outra modalidade, os métodos da invenção incluem adicionalmente administrar ao indivíduo um inibidor da transcriptase reversa e um estimulador imune.

[00135] Em uma modalidade, o inibidor da transcriptase reversa é escolhido do grupo que consiste em Tenofovir disoproxil fumarato (TDF), Tenofovir alafenamida, Lamivudina, Adefovir dipivoxila, Entecavir (ETV), Telbivudine e AGX-1009.

[00136] Em algumas modalidades, os métodos da invenção compreendem ainda o tratamento do vírus da hepatite D (HDV) no indivíduo. Métodos de tratamento podem incluir quaisquer métodos de tratamento conhecidos na arte. Em certas modalidades, o HDV é tratado no indivíduo usando um ou mais dos agentes de RNAi que visam HBV conforme descrito neste documento.

[00137] Em algumas modalidades, os métodos da invenção incluem ainda métodos para modular, por exemplo, diminuir, a expressão de PD-L1. São fornecidas composições e métodos para reduzir a expressão de PD-L1, por exemplo, na publicação de PCT nº WO2011/127180, cuja totalidade do conteúdo é incorporada neste documento por referência.

[00138] Em uma modalidade, o estimulador imune é selecionado do grupo constituído por interferon alfa 2a submetido a PEG (PEG-IFN- α 2a), Interferon alfa-2b, uma interleucina-7 humana recombinante e um agonista do receptor 7 semelhante a Toll (TLR7).

[00139] Em um outro aspecto, a presente invenção fornece um método de tratamento de um indivíduo com um distúrbio associado ao vírus da hepatite B (HBV), compreendendo a administração ao indivíduo de uma quantidade terapeuticamente eficaz de um agente de RNAi de

fita dupla,

em que o agente de RNAi de fita dupla compreende um filamento senso e um filamento antissenso formando uma região de fita dupla,

em que o filamento senso compreende pelo menos 15 nucleotídeos contíguos diferindo por não mais do que 3 nucleotídeos em relação à sequência de nucleotídeos de SEQ ID NO:29 e o dito filamento antissenso compreende pelo menos 15 nucleotídeos contíguos diferindo por não mais do que 3 nucleotídeos em relação à sequência de nucleotídeos de SEQ ID NO:30,

em que substancialmente todos os nucleotídeos do filamento senso e substancialmente todos os nucleotídeos do filamento antissenso são nucleotídeos modificados,

em que o filamento senso está conjugado com um ligante ligado ao terminal 3', e

em que o ligante é um ou mais derivados de GalNAc ligados através de um ligante ramificado bivalente ou trivalente, tratando desse modo o indivíduo.

[00140] Em outro aspecto, a presente invenção também fornece um método de tratar um indivíduo com uma infecção pelo vírus da hepatite B (HBV), compreendendo a administração ao indivíduo de uma quantidade terapeuticamente eficaz de uma composição para inibir a expressão do vírus da hepatite B (VHB) em uma célula, a dita composição compreendendo

(a) um primeiro agente de RNAi de fita dupla compreendendo um primeiro filamento e um primeiro filamento antissenso formando uma região de fita dupla,

em que substancialmente todos os nucleotídeos do primeiro filamento senso e substancialmente todos os nucleotídeos do primeiro filamento antissenso são nucleotídeos modificados,

em que o dito primeiro filamento senso está conjugado com um ligante ligado ao terminal 3', e em que o ligante é um ou mais derivados de GalNAc ligados através de um ligante ramificado bivalente ou trivalente; e

(b) um segundo agente de RNAi de fita dupla compreendendo um segundo filamento senso e um segundo filamento antissenso formando uma região de fita dupla,

em que substancialmente todos os nucleotídeos do segundo filamento senso e substancialmente todos os nucleotídeos do segundo filamento antissenso são nucleotídeos modificados,

em que o dito segundo filamento senso está conjugado com um ligante ligado ao terminal 3', e

em que o ligante é um ou mais derivados de GalNAc ligados através de um ligante ramificado bivalente ou trivalente;

em que o primeiro filamento senso compreende pelo menos 15 nucleotídeos contíguos diferindo por não mais do que 3 nucleotídeos em relação à sequência de nucleotídeos de SEQ ID NO:1 e o dito primeiro filamento antissenso compreende pelo menos 15 nucleotídeos contíguos diferindo por não mais do que 3 nucleotídeos em relação à sequência de nucleotídeos de SEQ ID NO:2,

em que o segundo filamento senso compreende pelo menos 15 nucleotídeos contíguos diferindo por não mais do que 3 nucleotídeos em relação à sequência de nucleotídeos de SEQ ID NO:29 e o segundo filamento antissenso compreende pelo menos 15 nucleotídeos contíguos diferindo por não mais do que 3 nucleotídeos em relação à sequência de nucleotídeos de SEQ ID NO:30, tratando desse modo o indivíduo.

[00141] Em algumas modalidades, o primeiro filamento senso compreende uma sequência selecionada do grupo que consiste em 5'- UCGUGGUGGACUUCUCUCA -3' (SEQ IDNO:5),

5'- GUGCACUUCGCUUCACCUCUA -3' (SEQ IDNO:7),
 5'- CGUGGUGGACUUCUCUCAAUU -3' (SEQ IDNO:9),
 5'- CGUGGUGGUCUUCUCUAAAUU -3' (SEQ IDNO:37)
 5'- GGUGGACUUCUCUCAAUUUUA -3' (SEQ IDNO:11), e
 5'- GUGUGCACUUCGCUUCACA -3' (SEQ IDNO:39), (ou uma sequência de nucleotídeos que é pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idêntica ao longo de todo seu comprimento às sequência de nucleotídeos precedentes), e o segundo filamento antissenso compreende uma sequência selecionada do grupo que consiste em

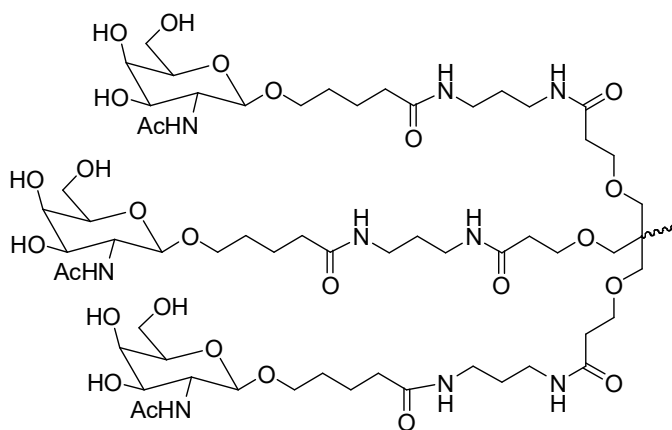
5'- UGAGAGAAGUCCACCACGAUU -3' (SEQ ID NO:6);
 5'- UAGAGGUGAAGCGAAGUGCACUU -3' (SEQ ID NO:8);
 5'- AAUUGAGAGAAGUCCACCAGCAG -3' (SEQ ID NO:10);
 5'- AAUUGAGAGAAGUCCACCAGCUU -3' (SEQ ID NO:38);
 5'- UAAAAUUGAGAGAAGUCCACCAC -3' (SEQ ID NO:12); e
 5'- UGUGAAGCGAAGUGCACACUU -3' (SEQ ID NO:40) (ou uma sequência de nucleotídeos que é pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idêntica ao longo de todo o seu comprimento às sequências de nucleotídeos precedentes).

[00142] Em alguns aspectos, todos os nucleotídeos do filamento senso e todos os nucleotídeos do filamento antissenso compreendem uma modificação.

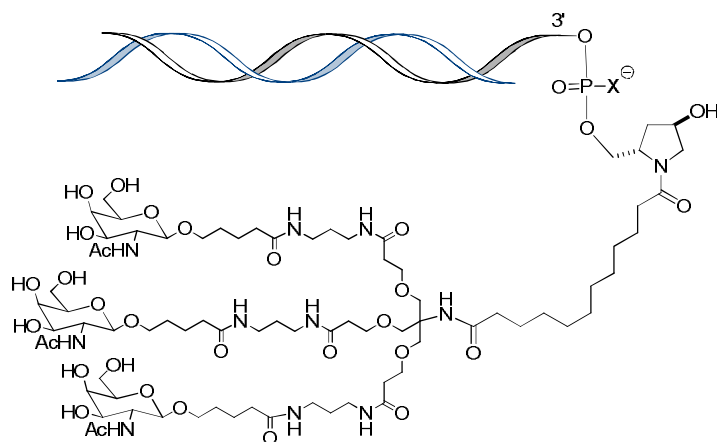
[00143] Em certas modalidades, o pelo menos um dos ditos nucleotídeos modificados é selecionado de um desóxi-nucleotídeo, um nucleotídeo de desóxi-timina (dT) 3' terminal, um nucleotídeo modificado por 2'-O-metila, um nucleotídeo modificado por 2'-flúor, um nucleotídeo modificado por 2'-desóxi, um nucleotídeo bloqueado, um nucleotídeo desbloqueado, um nucleotídeo restrito de forma adaptável, um nucleotídeo de etila constrito, um nucleotídeo abásico, um nucleotídeo modificado por 2'-amino, um nucleotídeo modificado por 2'-

O-alila, um nucleotídeo modificado por 2'-C-alquila, um nucleotídeo modificado por 2'-hidroxila, um nucleotídeo modificado por 2'-metoxietila, um nucleotídeo modificado por 2'-O-alquila, um nucleotídeo de morfolino, um fosforamidato, um nucleotídeo compreendendo base não natural, um nucleotídeo modificado por tetra-hidropirano, um nucleotídeo modificado por 1,5-anidroexitol, um nucleotídeo modificado por ciclo-hexenila, um nucleotídeo compreendendo um grupo fosforotioato, um nucleotídeo compreendendo um grupo metilfosfonato, um nucleotídeo compreendendo um 5'-fosfato, e um nucleotídeo compreendendo um imitador de 5'-fosfato.

[00144] Em algumas modalidades, o ligante é



[00145] Em uma modalidade específica, o agente de RNAi está conjugado com o ligante como mostrado no seguinte esquema



em que X é O ou S.

[00146] Em certas modalidades, os agentes de RNAi de fita dupla e

composições aqui fornecidos são usados para o tratamento de uma infecção de HDV e/ou um distúrbio associado a HDV.

[00147] Em conformidade, a presente invenção proporciona métodos de inibição da replicação de um vírus da hepatite D (HDV) em uma célula. Os métodos incluem (a) contatar a célula com um agente de RNAi de fita dupla, composição, vetor ou a composição farmacêutica aqui providenciados; e (b) manter a célula produzida na etapa (a) por um período de tempo suficiente para se obter degradação do transcrito de mRNA de um gene HBV, desse modo inibindo a replicação do HDV na célula.

[00148] Em certas modalidades, a célula está dentro de um indivíduo. Em certas modalidades, o indivíduo é um ser humano.

[00149] A invenção proporciona ainda métodos de reduzir o nível de um antígeno de vírus da hepatite D (HDV) em um indivíduo infectado com HDV. Os métodos incluem administrar ao indivíduo uma quantidade terapeuticamente eficaz de um agente de RNAi de fita dupla, composição, vetor ou a composição farmacêutica aqui apresentada, reduzindo assim o nível de antígeno HDV, por exemplo, S-HDAg ou L-HDAg, no indivíduo.

[00150] A invenção proporciona também métodos de reduzir a carga viral de vírus da hepatite D (HDV) em um indivíduo infectado com HDV. Os métodos incluem administrar ao indivíduo uma quantidade terapeuticamente eficaz de um agente de RNAi de fita dupla, composição, vetor ou composição farmacêutica aqui apresentados, reduzindo assim a carga viral de HDV no indivíduo.

[00151] A invenção também fornece métodos de tratar um indivíduo com uma infecção por vírus da hepatite D (HDV), compreendendo a administração ao indivíduo de uma quantidade terapeuticamente eficaz de um agente de RNAi de fita dupla, composição, vetor ou composição farmacêutica aqui providenciados, tratando desse modo o indivíduo.

[00152] Em certas modalidades, o agente de RNAi de fita dupla compreende um filamento senso e um filamento antissenso formando uma região de fita dupla. Filamentos senso e filamentos antissenso podem ser selecionados de entre os seguintes agentes de RNAi, em que o filamento senso compreende 5'- UCGUGGUGGACUUCUCUCA -3' (SEQ ID NO:5), e o filamento antissenso compreende 5'- UGAGAGAAGUCCACCACGAUU -3' (SEQ ID NO:6); o filamento senso compreende 5'- GUGCACUUCGCUUCACCUCUA -3' (SEQ ID NO:7), e o filamento antissenso compreende 5'- UAGAGGUGAAGCGAAGUGCACUU -3' (SEQ ID NO:8); o filamento senso compreende 5'- CGUGGUGGACUUCUCUCAAUU -3' (SEQ ID NO:9), e o filamento antissenso compreende 5'- AAUUGAGAGAAGUCCACCAGCAG -3' (SEQ ID NO:10); o filamento senso compreende 5'- CGUGGUGGUCUUCUCUAAAUU -3' (SEQ ID NO:37), e o filamento antissenso compreende 5'-AAUUGAGAGAAGUCCACCAGCUU-3 ' (SEQ ID NO:38); o filamento senso compreende 5'- GGUGGACUUCUCUCAAUUUUA-3 ' SEQ ID NO:11, e o filamento antissenso compreende 5'-UAAAAUUGAGAGAAGUCCACCAC-3 ' SEQ ID NO:12; ou filamento senso compreende 5'-GUGUGCACUUCGCUUCACA-3 ' (SEQ ID NO:39), e o filamento antissenso compreende 5'- UGUGAAGCGAAGUGCACACUU-3 ' (SEQ ID NO:40), em que substancialmente todos os nucleotídeos do filamento senso e substancialmente todos os nucleotídeos do filamento antissenso são nucleotídeos modificados, em que o filamento senso é conjugado com um ligante ligado ao terminal 3' e em que o ligante é um ou mais derivados de GalNAc ligados através de um ligante ramificado bivalente ou trivalente, tratando desse modo o indivíduo.

[00153] Em certas modalidades, todos os nucleotídeos do filamento senso e todos os nucleotídeos do filamento antissenso compreendem uma modificação. Em uma modalidade, o pelo menos um dos ditos

nucleotídeos modificados é selecionado de um desóxi-nucleotídeo, um nucleotídeo de desóxi-timina (dT) 3' terminal, um nucleotídeo modificado por 2'-O-metila, um nucleotídeo modificado por 2'-flúor, um nucleotídeo modificado por 2'-desóxi, um nucleotídeo bloqueado, um nucleotídeo desbloqueado, um nucleotídeo restrito de forma adaptável, um nucleotídeo de etila constrito, um nucleotídeo abásico, um nucleotídeo modificado por 2'-amino, um nucleotídeo modificado por 2'-O-alila, um nucleotídeo modificado por 2'-C-alquila, um nucleotídeo modificado por 2'-hidroxila, um nucleotídeo modificado por 2'-metoxietila, um nucleotídeo modificado por 2'-O-alquila, um nucleotídeo de morfolino, um fosforamidato, um nucleotídeo compreendendo base não natural, um nucleotídeo modificado por tetra-hidropirano, um nucleotídeo modificado por 1,5-anidroexitol, um nucleotídeo modificado por ciclo-hexenila, um nucleotídeo compreendendo um grupo fosforotioato, um nucleotídeo compreendendo um grupo metilfosfonato, um nucleotídeo compreendendo um 5'-fosfato, e um nucleotídeo compreendendo um imitador de 5'-fosfato. Em certas modalidades, o imitador de 5'-fosfato é um 5'-vinil fosfato (5'-VP).

[00154] Em certas modalidades, o filamento senso compreende 5'-uscsguGfgUfGfGfacuucucuca – 3' (SEQ ID NO:13) e o filamento antissenso compreende 5'-usGfsagaGfaAfGfuccaCfcAfcgasusu – 3' (SEQ ID NO:14), em que A, C, G e U são ribose, A, C, G ou U; a, g, c e u são 2'-O-metil (2'-OMe), A, U, C ou G; Af, Cf, Gf ou Uf são 2'-flúor A, G, C ou U; e s é uma ligação de fosforotioato.

[00155] Em certas modalidades, o filamento senso compreende 5'-uscsguGfgUfGfGfacuucucuca – 3' (SEQ ID NO:15) e o filamento antissenso compreende 5'-PusGfsagaGfaAfGfuccaCfcAfcgasusu – 3' (SEQ ID NO:16), em que A, C, G e U são ribose, A, C, G ou U; a, g, c e u são 2'-O-metil (2'-OMe), A, U, C ou G; Af, Cf, Gf ou Uf são 2'-flúor A, G, C ou U; e s é uma ligação de fosforotioato; e P é um 5'-fosfato ou

imitador de 5'-fosfato.

[00156] Em certas modalidades, o filamento senso compreende 5'-uscsguGfgUfGfGfacuucucuca – 3' (SEQ ID NO:17) e o filamento antissenso compreende 5'-usGfsagaGfaAfGfuccaCfcAfcgasusu – 3' (SEQ ID NO:18), em que A, C, G e U são ribose, A, C, G ou U; a, g, c e u são 2'-O-metil (2'-OMe), A, U, C ou G; Af, Cf, Gf ou Uf são 2'-flúor A, G, C ou U; e s é uma ligação de fosforotioato.

[00157] Em certas modalidades, o filamento senso compreende 5'-gsusgcacUfuCfGfCfuuccucua – 3' (SEQ ID NO:19) e o filamento antissenso compreende 5'-PusAfsagGfugaagcgAfaGfugcacsusu – 3' (SEQ ID NO:20), em que A, C, G e U são ribose, A, C, G ou U; a, g, c e u são 2'-O-metil (2'-OMe), A, U, C ou G; Af, Cf, Gf ou Uf são 2'-flúor A, G, C ou U; e s é uma ligação de fosforotioato; e P é um 5'-fosfato ou imitador de 5'-fosfato.

[00158] Em certas modalidades, o filamento senso compreende 5'-csgsugguGfgAfCfUfucucUfCfaauu – 3' (SEQ ID NO:21) e o filamento antissenso compreende 5'-AfsuugAfgAfgAfaguCfcAfccagcsasg – 3' (SEQ ID NO:22), em que A, C, G e U são ribose, A, C, G ou U; a, g, c e u são 2'-O-metil (2'-OMe), A, U, C ou G; Af, Cf, Gf ou Uf são 2'-flúor A, G, C ou U; e s é uma ligação de fosforotioato.

[00159] Em certas modalidades, o filamento senso compreende 5'-csgsugguGfgAfCfUfucucUfCfaauu – 3' (SEQ ID NO:23) e o filamento antissenso compreende 5'-PasAfsuugAfgAfgAfaguCfcAfccagcsasg – 3' (SEQ ID NO:24), em que A, C, G e U são ribose, A, C, G ou U; a, g, c e u são 2'-O-metil (2'-OMe), A, U, C ou G; Af, Cf, Gf ou Uf são 2'-flúor A, G, C ou U; e s é uma ligação de fosforotioato; e P é um 5'-fosfato ou imitador de 5'-fosfato.

[00160] Em certas modalidades, o filamento senso compreende 5'-csgsuggudGguacdTucucuaaaauu – 3' (SEQ ID NO:35) e o filamento antissenso compreende 5'-asdAsuugagagdAagudCcaccagcsusu – 3'

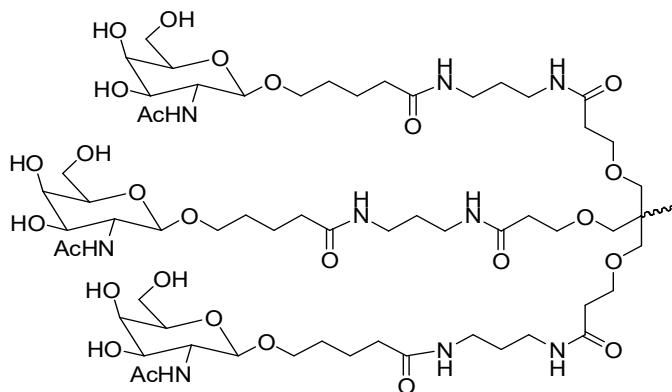
(SEQ ID NO:36), em que A, C, G e U são ribose, A, C, G ou U; a, g, c e u são 2'-O-metil (2'-OMe), A, U, C, ou G; dA, dC, dG e dT são desoxirribose A, C, G e T; e s é uma ligação de fosforotioato.

[00161] Em certas modalidades, o filamento senso compreende 5'- gsgsuggaCfuUfCfUfcucaAfUfuuuu – 3' (SEQ ID NO:25) e o filamento antissenso compreende 5'- usAfsaaaUfuGfAfgagaAfgUfccaccsasc – 3' (SEQ ID NO:26), em que A, C, G e U são ribose, A, C, G ou U; a, g, c e u são 2'-O-metil (2'-OMe), A, U, C ou G; Af, Cf, Gf ou Uf são 2'-flúor A, G, C ou U; e s é uma ligação de fosforotioato.

[00162] Em certas modalidades, o filamento senso compreende 5'- gsgsuggaCfuUfCfUfcucaAfUfuuuu – 3' (SEQ ID NO:27) e o filamento antissenso compreende 5'- PusAfsaaaUfuGfAfgagaAfgUfccaccsasc – 3' (SEQ ID NO:28), em que A, C, G e U são ribose, A, C, G ou U; a, g, c e u são 2'-O-metil (2'-OMe), A, U, C ou G; Af, Cf, Gf ou Uf são 2'-flúor A, G, C ou U; e s é uma ligação de fosforotioato; e P é um 5'-fosfato ou imitador de 5'-fosfato.

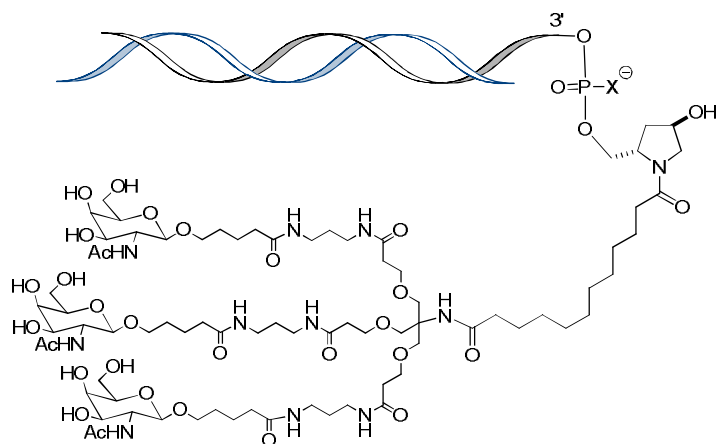
[00163] Em certas modalidades, o filamento senso compreende 5'- gsusguGfcAfCfUfucgcuucaca -3' (SEQ ID NO:41) e o filamento antissenso compreende 5'- usGfsugaAfgCfGfaaguGfcAfcacsusu -3' (SEQ ID NO:42), em que A, C, G e U são ribose, A, C, G ou U; a, g, c e u são 2'-O-metil (2'-OMe), A, U, C ou G; Af, Cf, Gf ou Uf são 2'-flúor A, G, C ou U; e s é uma ligação de fosforotioato.

[00164] Em certas modalidades, o ligante é



[00165] Em certas modalidades, o agente de RNAi está conjugado

com o ligante como mostrado no seguinte esquema



, em que X é O ou S.

[00166] A invenção proporciona métodos de tratamento de um indivíduo tendo uma infecção pelo vírus da hepatite D (HDV). Os métodos incluem administrar ao indivíduo uma quantidade terapêuticamente eficaz de uma composição para inibir a expressão do vírus da hepatite B (HBV) em uma célula, a composição compreendendo (a) um primeiro agente de RNAi de fita dupla compreendendo um primeiro filamento senso e um primeiro filamento antissenso formando uma região de fita dupla, em que substancialmente todos os nucleotídeos do primeiro filamento senso e substancialmente todos os nucleotídeos do primeiro filamento antissenso são nucleotídeos modificados, em que o primeiro filamento senso é conjugado com um ligante ligado ao terminal 3' e em que o ligante é um ou mais derivados de GalNAc ligados através de um ligante ramificado bivalente ou trivalente; e (b) um segundo agente de RNAi de fita dupla compreendendo um segundo filamento senso e um segundo filamento antissenso formando uma região de fita dupla, em que substancialmente todos os nucleotídeos do segundo filamento de senso e substancialmente todos os nucleotídeos do segundo filamento antissenso são nucleotídeos modificados, em que o dito segundo filamento senso é conjugado com um ligante ligado ao terminal 3', e em que o ligante é um ou mais derivados de GalNAc ligados através de um ligante ramificado bivalente ou trivalente; em que os primeiro e segundo

filamentos senso compreendem cada uma independentemente uma sequência selecionada do grupo que consiste em

5'- UCGUGGUGGACUUCUCUCA -3' (SEQ ID NO:5),
 5'- GUGCACUUCGCUUCACCUCUA -3' (SEQ ID NO:7),
 5'- CGUGGUGGACUUCUCUCAAUU -3' (SEQ ID NO:9),
 5'- CGUGGUGGUCUUCUCUAAAUU -3' (SEQ ID NO:37),
 5'- GGUGGACUUCUCUCAAUUUUA -3' (SEQ ID NO:11), e
 5'- GUGUGCACUUCGCUUCACA -3' (SEQ ID NO:39), e em que os primeiro e segundo filamentos antissenso cada um independentemente compreende uma sequência selecionada do grupo que consiste em
 5'- UGAGAGAAGUCCACCACGAUU -3' (SEQ ID NO:6);
 5'- UAGAGGUGAAGCGAAGUGCACUU -3' (SEQ ID NO:8);
 5'- AAUUGAGAGAAGUCCACCAGCAG -3' (SEQ ID NO:10);
 5'- AAUUGAGAGAAGUCCACCAGCUU -3' (SEQ ID NO:38),
 5'- UAAAAUUGAGAGAAGUCCACCAC -3' (SEQ ID NO:12), e
 5'- UGUGAAGCGAAGUGCACACUU -3' (SEQ ID NO:40), tratando desse modo o indivíduo.

[00167] Em certas modalidades, todos os nucleotídeos do primeiro e segundo filamento senso e todos os nucleotídeos do primeiro e segundo filamento antissenso compreendem uma modificação. Em uma modalidade, o pelo menos um dos ditos nucleotídeos modificados é selecionado de um desóxi-nucleotídeo, um nucleotídeo de desóxi-timina (dT) 3' terminal, um nucleotídeo modificado por 2'-O-metila, um nucleotídeo modificado por 2'-flúor, um nucleotídeo modificado por 2'-desóxi, um nucleotídeo bloqueado, um nucleotídeo desbloqueado, um nucleotídeo restrito de forma adaptável, um nucleotídeo de etila constrito, um nucleotídeo abásico, um nucleotídeo modificado por 2'-amino, um nucleotídeo modificado por 2'-O-alila, um nucleotídeo modificado por 2'-C-alquila, um nucleotídeo modificado por 2'-hidroxila, um nucleotídeo modificado por 2'-metoxietila, um nucleotídeo

modificado por 2'-O-alquila, um nucleotídeo de morfolino, um fosforamidoato, um nucleotídeo compreendendo base não natural, um nucleotídeo modificado por tetra-hidropirano, um nucleotídeo modificado por 1,5-anidroexitol, um nucleotídeo modificado por ciclohexenila, um nucleotídeo compreendendo um grupo fosforotioato, um nucleotídeo compreendendo um grupo metilfosfonato, um nucleotídeo compreendendo um 5'-fosfato, e um nucleotídeo compreendendo um imitador de 5'-fosfato.

[00168] Em certas modalidades, os primeiro e segundo agentes de RNAi são selecionados do grupo:

5'-uscsuguGfgUfGfGfacuucucuca – 3' (SEQ ID NO:13)

5'-usGfsagaGfaAfGfuccaCfcAfcgasusu – 3' (SEQ ID NO:14);

5'-uscsuguGfgUfGfGfacuucucuca – 3' (SEQ ID NO:15)

5'-PusGfsagaGfaAfGfuccaCfcAfcgasusu – 3' (SEQ ID NO:16);

5'-gsusgcacUfuCfGfCfuucaccucua – 3' (SEQ ID NO:17)

5'-usAfsgagGfugaagcgAfaGfugcacsusu – 3' (SEQ ID NO:18);

5'-gsusgcacUfuCfGfCfuucaccucua – 3' (SEQ ID NO:19)

5'-PusAfsgagGfugaagcgAfaGfugcacsusu – 3' (SEQ ID NO:20);

5'-csgsugguGfgAfCfUfucucUfCfaauu – 3' (SEQ ID NO:21)

5'-asAfsuugAfgAfgAfaguCfcAfccagcsasg – 3' (SEQ ID NO:22);

5'- csgsugguGfgAfCfUfucucUfCfaauu – 3' (SEQ ID NO:23)

5'-PasAfsuugAfgAfgAfaguCfcAfccagcsasg – 3' (SEQ ID NO:24);

5'-csgsuggudGgucdTucucuaauu – 3' (SEQ ID NO:35)

5'- asdAsuugagagdAagudCcaccagcsusu – 3' (SEQ ID NO:36);

5'- gsgsuggaCfuUfCfUfcucaAfUfuuuu – 3' (SEQ ID NO:25)

5'- usAfsaaaUfuGfAfgagaAfgUfccaccsasc – 3' (SEQ ID NO:26);

5'- gsgsuggaCfuUfCfUfcucaAfUfuuuu – 3' (SEQ ID NO:27)

5'- PusAfsaaaUfuGfAfgagaAfgUfccaccsasc – 3' (SEQ ID NO:28); e

5'- gsusguGfcAfCfUfucgcuucaca -3' (SEQ ID NO:41)

5'- usGfsugaAfgCfGfaaguGfcAfcacsusu -3' (SEQ ID NO:42), em que A,

C, G e U são ribose A, C, G ou U; a, g, c e u são 2'-O-metila (2'-OMe) A, U, C ou G; Af, Cf, Gf ou Uf são 2'-flúor A, G, C ou U; dA, dC, dG e dT são desoxirribose A, C, G e T; s é uma ligação fosforotioato; e P é um 5'-fosfato ou imitador 5'fosfato.

[00169] Em certas modalidades, o primeiro e segundo agentes de RNAi são

5'-uscsnguGfgUfGfGfacuucucuca – 3' (SEQ ID NO:15)

5'-PusGfsagaGfaAfGfuccaCfcAfcgasusu – 3' (SEQ ID NO:16); e

5'-csgsugguGfgAfCfUfucucUfCfaauu – 3' (SEQ ID NO:21)

5'-asAfsuugAfgAfgAfaguCfcAfccagcsasg – 3' (SEQ ID NO:22), , em que A, C, G e U são ribose A, C, G ou U; a, g, c e u são 2'-O-metila (2'-OMe) A, U, C ou G; Af, Cf, Gf ou Uf são 2'-flúor A, G, C ou U; s é uma ligação fosforotioato; e P é um 5'-fosfato ou imitador de 5'-fosfato.

[00170] Em certas modalidades, o primeiro e segundo agentes de RNAi são

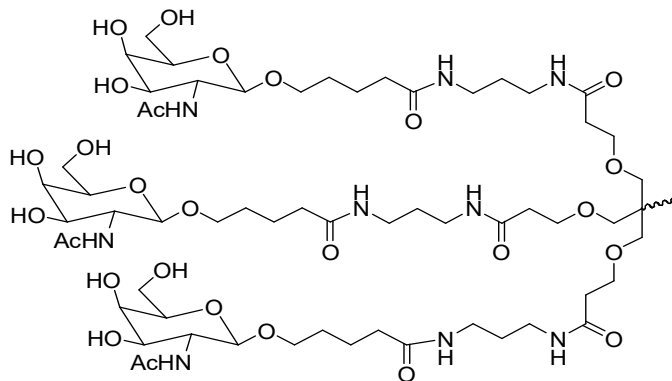
5'- gsgsuggaCfuUfCfUfcucaAfUfuuuu – 3' (SEQ ID NO:25)

5'- usAfsaaaUfuGfAfgagaAfgUfccaccsasc – 3' (SEQ ID NO:26); e

5'- gsusguGfcAfCfUfucgcuucaca -3' (SEQ ID NO:41)

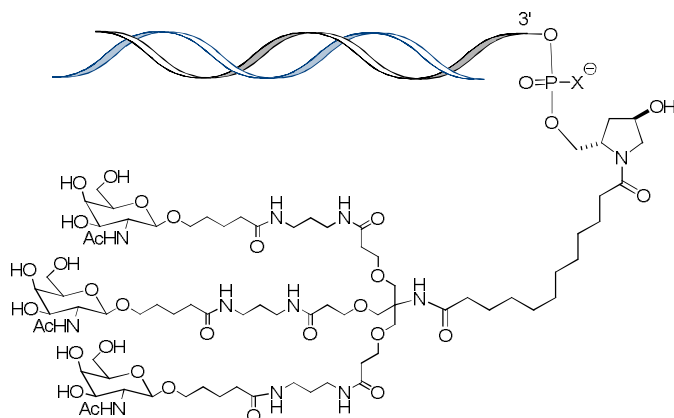
5'- usGfsugaAfgCfGfaaguGfcAfcacsusu -3' (SEQ ID NO:42), , em que A, C, G e U são ribose A, C, G ou U; a, g, c e u são 2'-O-metila (2'-OMe) A, U, C ou G; Af, Cf, Gf ou Uf são 2'-flúor A, G, C ou U; s é uma ligação fosforotioato; e P é um 5'-fosfato ou imitador de 5'-fosfato.

[00171] Em certas modalidades, o ligante é



[00172] Em certas modalidades, o agente de RNAi está conjugado

com o ligante como mostrado no seguinte esquema



, em que X é O ou S.

[00173] Em certas modalidades, o indivíduo é um ser humano.

[00174] Em certas modalidades, o agente de RNAi de fita dupla é administrado em uma dose ao redor de 0,01 mg/kg a cerca de 10 mg/kg ou cerca de 0,5 mg/kg a cerca de 50 mg/kg. Em certas modalidades, o agente de RNAi de fita dupla é administrado em uma dose ao redor de 10 mg/kg a cerca de 30 mg/kg. Em certas modalidades, o agente de RNAi de fita dupla é administrado em uma dose ao redor de 3 mg/kg. Em certas modalidades, o agente de RNAi de fita dupla é administrado em uma dose ao redor de 10 mg/kg. Em certas modalidades, o agente de RNAi de fita dupla é administrado em uma dose ao redor de 0,5 mg/kg duas vezes por semana. Em certas modalidades, o agente de RNAi de fita dupla é administrado em uma dose fixa ao redor de 50 mg a 200 mg.

[00175] Em certas modalidades, o agente de RNAi de fita dupla é administrado por via subcutânea.

[00176] Em certas modalidades, o agente de RNAi de fita dupla é administrado por via intravenosa.

[00177] Em certas modalidades, o agente de RNAi é administrado em duas ou mais doses. Em certas modalidades, o agente de RNAi é administrado a intervalos selecionados do grupo que consiste em uma vez a cada cerca de 12 horas, uma vez a cada cerca de 24 horas, uma vez a cada cerca de 48 horas, uma vez a cada cerca de 72 horas, e uma

vez a cada cerca de 96 horas. Em certas modalidades, o agente de RNAi é administrado duas vezes por semana. Em certas modalidades, o agente de RNAi é administrado a cada duas semanas. Em certas modalidades, o agente de RNAi é administrado uma vez por mês. Em certas modalidades, o agente de RNAi é administrado a cada dois meses. Em certas modalidades, o agente de RNAi é administrado a cada três meses.

[00178] Em certas modalidades, o agente de RNAi é administrado ao indivíduo com um agente terapêutico adicional. Agentes terapêuticos adicionais incluem, por exemplo, um agente antiviral, um inibidor da transcriptase reversa, um estimulador imune, uma vacina terapêutica, um inibidor da entrada viral, um oligonucleotídeo que inibe a secreção ou liberação de HbsAg, um inibidor de capsídeo, um inibidor de DNA do HBV circular covalentemente fechado (ccc) e uma combinação de qualquer um dos anteriores.

[00179] Em certas modalidades, o agente adicional é um inibidor de transcriptase reversa. Em certas modalidades, o agente adicional é um inibidor de transcriptase reversa e um estimulador imune. Inibidores da transcriptase reversa exemplares incluem Tenofovir disoproxil fumarato (TDF), Tenofovir alafenamida, Lamivudina, Adefovir dipivoxila, Entecavir (ETV), Telbivudine e AGX-1009. estimulador imunes exemplares incluem interferon alfa 2a submetido a PEG (PEG-IFN- α 2a), Interferon alfa-2b, uma interleucina-7 humana recombinante e um agonista do receptor 7 semelhante a Toll (TLR7).

[00180] A invenção providencia ainda métodos de tratar um indivíduo com infecção pelo vírus da hepatite D (HDV), compreendendo administrar ao indivíduo uma quantidade terapêuticamente eficaz de uma composição para inibir a expressão do vírus da hepatite B (HBV) em uma célula, a composição compreendendo (a) um primeiro agente de RNAi de fita dupla compreendendo um primeiro filamento e um

primeiro filamento antissenso formando uma região de fita dupla, em que substancialmente todos os nucleotídeos do primeiro filamento senso e substancialmente todos os nucleotídeos do primeiro filamento antissenso são nucleotídeos modificados, em que o primeiro filamento senso é conjugado com um ligante ligado ao terminal 3' e em que o ligante é um ou mais derivados de GalNAc ligados através de um ligante ramificado bivalente ou trivalente; e (b) um segundo agente de RNAi de fita dupla compreendendo um segundo filamento senso e um segundo filamento antissenso formando uma região de fita dupla, em que substancialmente todos os nucleotídeos do segundo filamento de senso e substancialmente todos os nucleotídeos do segundo filamento antissenso são nucleotídeos modificados, em que o dito segundo filamento senso é conjugado com um ligante ligado ao terminal 3', e em que o ligante é um ou mais derivados de GalNAc ligados através de um ligante ramificado bivalente ou trivalente; em que o primeiro filamento senso compreende pelo menos 15 nucleotídeos contíguos diferindo por não mais do que 3 nucleotídeos em relação à sequência de nucleotídeos de SEQ ID NO:1 e o primeiro filamento antissenso compreende pelo menos 15 nucleotídeos contíguos diferindo por não mais do que 3 nucleotídeos em relação à sequência de nucleotídeos de SEQ ID NO:2, em que o segundo filamento senso compreende pelo menos 15 nucleotídeos contíguos diferindo por não mais do que 3 nucleotídeos em relação à sequência de nucleotídeos de SEQ ID NO:29 e o segundo filamento antissenso compreende pelo menos 15 nucleotídeos contíguos diferindo por não mais do que 3 nucleotídeos em relação à sequência de nucleotídeos de SEQ ID NO:30, tratando desse modo o indivíduo.

[00181] Em certas modalidades, o primeiro filamento senso compreende uma sequência selecionada do grupo que consiste em 5'- UCGUGGUGGACUUCUCUCA -3' (SEQ IDNO:5),

5'- GUGCACUUCGCUUCACCUCUA -3' (SEQ ID NO:7),
 5'- CGUGGUGGACUUCUCUCAAUU -3' (SEQ ID NO:9),
 5'- CGUGGUGGUCUUCUCUAAAUU -3' (SEQ ID NO:37),
 5'- GGUGGACUUCUCUCAAUUUUA -3' (SEQ ID NO:11), e
 5'- GUGUGCACUUCGCUUCACA -3' (SEQ IDNO:39), e

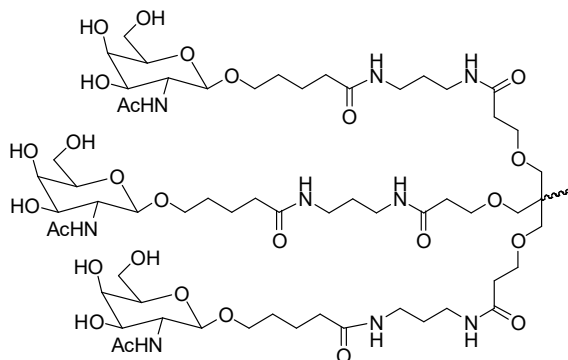
o segundo filamento senso compreende uma sequência selecionada do grupo que consiste em

5'- UGAGAGAAGUCCACCACGAUU -3' (SEQ ID NO:6);
 5'- UAGAGGUGAAGCGAAGUGCACUU -3' (SEQ ID NO:8);
 5'- AAUUGAGAGAAGUCCACCAGCAG -3' (SEQ ID NO:10);
 5'- AAUUGAGAGAAGUCCACCAGCUU -3' (SEQ ID NO:38),
 5'- UAAAAUUGAGAGAAGUCCACCAC -3' (SEQ ID NO:12), e
 5'- UGUGAAGCGAAGUGCACACUU -3' (SEQ ID NO:40).

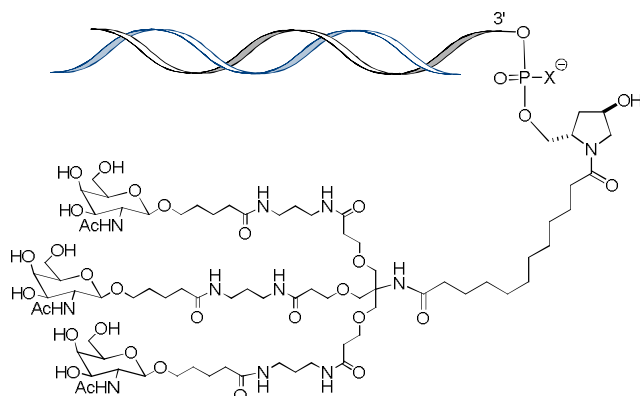
[00182] Em certas modalidades, todos os nucleotídeos do filamento senso e todos os nucleotídeos do filamento antissenso compreendem uma modificação. Em certas modalidades, o agente adicional é pelo menos um dos nucleotídeos modificados, que é selecionado de um desóxi-nucleotídeo, um nucleotídeo de desóxi-timina (dT) 3' terminal, um nucleotídeo modificado por 2'-O-metila, um nucleotídeo modificado por 2'-flúor, um nucleotídeo modificado por 2'-desóxi, um nucleotídeo bloqueado, um nucleotídeo desbloqueado, um nucleotídeo restrito de forma adaptável, um nucleotídeo de etila constricto, um nucleotídeo abásico, um nucleotídeo modificado por 2'-amino, um nucleotídeo modificado por 2'-O-alila, um nucleotídeo modificado por 2'-C-alquila, um nucleotídeo modificado por 2'-hidroxila, um nucleotídeo modificado por 2'-metoxietila, um nucleotídeo modificado por 2'-O-alquila, um nucleotídeo de morfolino, um fosforamidato, um nucleotídeo compreendendo base não natural, um nucleotídeo modificado por tetra-hidropirano, um nucleotídeo modificado por 1,5-anidroexitol, um nucleotídeo modificado por ciclo-hexenila, um nucleotídeo

compreendendo um grupo fosforotioato, um nucleotídeo compreendendo um grupo metilfosfonato, um nucleotídeo compreendendo um 5'-fosfato, e um nucleotídeo compreendendo um imitador de 5'-fosfato.

[00183] Em certas modalidades, o ligante é



[00184] Em certas modalidades, o agente de RNAi está conjugado com o ligante como mostrado no seguinte esquema



, em que X é O ou S.

[00185] A presente invenção é adicionalmente ilustrada pela seguinte descrição detalhada e desenhos.

Breve Descrição das Figuras

[00186] A Figura 1 mostra esquematicamente a estrutura do genoma de HBV de fita dupla de aproximadamente 3,2 kb. A replicação do genoma de HBV ocorre através de um intermediário de RNA e produz 4 transcritos virais sobrepostos (um transcrito de cerca de 3,5 kb, um transcrito de cerca de 2,4 kb, um transcrito de cerca de 2,1 kb e um transcrito de cerca de 0,7 kb) codificando sete proteínas virais (pre-S1, pre-S2, S, P, X, pre-C e C) traduzidos em três grelhas de leitura.

[00187] A Figura 2 é um gráfico mostrando a diminuição de registro dos níveis séricos de HBsAg normalizados para níveis séricos de HBsAg pré-dosagem após a administração de uma dose única de 3 mg/kg dos agentes de RNAi indicados.

[00188] A Figura 3 é um gráfico mostrando a diminuição de registro dos níveis séricos de HBsAg normalizados para níveis séricos de HBsAg pré-dosagem após a administração de uma dose única de 3 mg/kg dos agentes de RNAi indicados.

[00189] A Figura 4 é um gráfico mostrando a porcentagem de HBsAg pré-dosagem remanescente nos dias 5 e 10 após a administração de uma dose única de 3 mg/kg dos agentes de RNAi indicados. Figura 4 mostra também a porcentagem de HBsAG remanescente no dia 10 pós-dosagem em relação à porcentagem de HBsAG remanescente no dia 10 pós-dosagem em um animal ao qual foram administrados 3 mg/kg de um dsRNA de controle visando transtiretina de camundongo/rato (mrTTR).

[00190] A Figura 5 é um gráfico mostrando a diminuição no *log* dos níveis séricos HBsAg normalizados para níveis séricos de HBsAg pré-dosagem após a administração de uma dose única de 3 mg/kg de AD-65403.

[00191] A Figura 6A é um gráfico mostrando a diminuição dos níveis séricos HBsAg normalizados para níveis séricos de HBsAg pré-dosagem em uma escala linear padrão após a administração de uma dose única subcutânea de 0,3 mg/kg, 1 mg/kg, 3 mg/kg ou 9 mg/kg de AD-66810.

[00192] A Figura 6B é um gráfico mostrando a diminuição dos níveis séricos de HBsAg normalizados para níveis séricos de HBsAg pré-dosagem em uma escala \log_{10} após a administração de uma dose única subcutânea de 0,3 mg/kg, 1 mg/kg, 3 mg/kg ou 9 mg/kg de AD-66810.

[00193] A Figura 7 é um gráfico mostrando a diminuição dos níveis

plasmáticos de HBsAg normalizados para níveis plasmáticos de HBsAg pré-dosagem em uma escala \log_{10} após a administração de três doses semanais subcutâneas de 3 mg/kg de AD-66810.

Descrição Detalhada da Invenção

[00194] A presente invenção proporciona composições de RNAi que efetuam a clivagem mediada pelo complexo silenciador induzido por RNA (RISC) de transcritos RNA de um gene do vírus da hepatite B (HBV). O gene pode estar dentro de uma célula, por exemplo, uma célula dentro de um indivíduo, tal como um ser humano. O uso destes RNAi permite a degradação dirigida de mRNAs do gene correspondente (gene HBV) em mamíferos.

[00195] Os agentes de RNAi da invenção foram concebidos para regiões-alvo no genoma HBV que são conservadas em todos os 8 sorotipos do HBV. Além disso, os agentes de RNAi da invenção foram concebidos para inibir todas as etapas do ciclo de vida do HBV, por exemplo, replicação, montagem, secreção de vírus e secreção de antígenos sub-virais, por inibição da expressão de mais de um gene HBV. Em particular, uma vez que a transcrição do genoma do HBV resulta em RNAs policistrônicos sobrepostos, um agente de RNAi da invenção tendo como alvo um único gene HBV resulta em inibição significativa da expressão da maioria ou de todos os transcritos de HBV. Por exemplo, uma vez que o genoma do HBV é transcrito em um único mRNA, um agente de RNAi da invenção tendo como alvo o gene S resultará na inibição não apenas da expressão do gene S, mas também da expressão do gene "a jusante" da polimerase. Além disso, os agentes de RNAi da invenção foram concebidos para inibir a replicação viral do HBV visando genes estruturais de HBV e o gene X de HBV, permitindo assim que o sistema imunitário de um indivíduo detecte e responda à presença de HBsAg para produzir anticorpos anti-HBV para eliminar uma infecção pelo HBV. Sem a intenção de ser limitada pela

teoria, acredita-se que uma combinação ou subcombinação das propriedades precedentes e os locais alvo específicos e/ou as modificações específicas destes agentes de RNAi conferem aos agentes de RNAi da invenção melhor eficácia, estabilidade, segurança, potência e durabilidade.

[00196] Usando ensaios *in vitro* e *in vivo*, os presentes inventores demonstraram que RNAis tendo como alvo um gene HBV podem potencialmente mediar RNAi, resultando em inibição significativa da expressão de mais do que um gene HBV. Os presentes inventores também demonstraram que os agentes de RNAi da invenção são excepcionalmente estáveis no citoplasma e lisossoma. Assim, métodos e composições incluindo estes RNAis são úteis para tratar um indivíduo com uma infecção pelo HBV e/ou uma doença associada a HBV, tal como hepatite B crônica (CHB).

[00197] Em conformidade, a presente invenção proporciona também métodos para tratamento de um indivíduo tendo um distúrbio que beneficiaria de inibição ou redução da expressão de um gene HBV, por exemplo, uma doença associada a HBV, tal como infecção pelo vírus da hepatite B crônica (CHB), usando composições de RNAi que efetuam a clivagem mediada pelo complexo silenciador induzido por RNA (RISC) de transcritos de RNA de um gene HBV.

[00198] Dosagens muito baixas dos RNAi da invenção, em particular, podem específica e eficazmente mediar a interferência de RNA (RNAi), resultando na inibição significativa da expressão do gene correspondente (gene HBV).

[00199] Os RNAis da invenção incluem um filamento de RNA (o filamento antissenso) tendo uma região que tem cerca de 30 nucleotídeos ou menos em comprimento, por exemplo, 15-30, 15-29, 15-28, 15-27, 15-26, 15-25, 15-24, 15-23, 15-22, 15-21, 15-20, 15-19, 15-18, 15-17, 18-30, 18-29, 18-28, 18-27, 18-26, 18-25, 18-24, 18-23,

18-22, 18-21, 18-20, 19-30, 19-29, 19-28, 19-27, 19-26, 19-25, 19-24, 19-23, 19-22, 19-21, 19-20, 20-30, 20-29, 20-28, 20-27, 20-26, 20-25, 20-24, 20-23, 20-22, 20-21, 21-30, 21-29, 21-28, 21-27, 21-26, 21-25, 21-24, 21-23 ou 21-22 nucleotídeos em comprimento, cuja região é substancialmente complementar com pelo menos parte de um transcrito de mRNA de um gene HBV.

[00200] A seguinte descrição detalhada divulga como preparar e usar composições contendo RNAs para inibir a expressão de um gene HBV, bem como composições, usos, e métodos para tratamento de indivíduos tendo doenças e distúrbios que beneficiariam da inibição e/ou redução da expressão de um gene HBV.

I. Definições

[00201] De modo a que a presente invenção possa ser mais prontamente entendida, certos termos são primeiramente definidos. Adicionalmente deve ser notado que sempre que um valor ou gama de valores de um parâmetro for recitado é pretendido que valores e gamas intermédios dos valores recitados sejam parte desta invenção.

[00202] Os artigos "um" e "uma" são usados aqui para se referirem a um ou a mais do que um (*isto é*, a pelo menos um) do objeto gramatical do artigo. A título de exemplo, "um elemento" significa um elemento ou mais do que um elemento, por exemplo, uma pluralidade de elementos.

[00203] O termo "incluindo" é usado aqui para significar, e é usado indistintamente com, a frase "incluindo mas não se limitando a".

[00204] O termo "ou" é usado aqui para significar, e é usado indistintamente com, o termo "e/ou", a não ser que o contexto indique claramente de outro modo.

[00205] Como usado aqui, "vírus da hepatite B," usado indistintamente com o termo "HBV" se refere ao bem conhecido vírus de DNA não citopático e fígado-trópico pertencente à família Hepadnaviridae.

[00206] O genoma de HBV é DNA circular, parcialmente de fita dupla com grelhas de leitura sobrepostas (ver, por exemplo, a Figura 1).

[00207] Existem quatro genes conhecidos codificados pelo genoma HBC, chamados C, X, P e S. A proteína nuclear é codificada pelo gene C (HBcAg). O antígeno da hepatite B (HBeAg) é produzido pelo processamento proteolítico da proteína pré-nuclear (pre-C). A DNA polimerase é codificada pelo gene P. O gene S é o gene que codifica o antígeno de superfície (HBsAg). O gene HBsAg é uma grelha de leitura aberta longa, mas contém três códons de "início" na grelha (ATG) que dividem o gene em três seções, pre-S1, pre-S2 e S. Devido aos vários códons de início, são produzidos polipeptídeos de três diferentes tamanhos designados grande, médio e pequeno (pre-S1 + pre-S2 + S, pre-S2 + S ou S). A função da proteína não-estrutural codificada pelo gene X não é totalmente compreendida, mas é associada ao desenvolvimento de câncer de fígado e codifica uma proteína "isca" (decoy) que permite ao HBsAg no sangue sequestrar os anticorpos anti-HBsAg, permitindo que partículas virais infecciosas escapem à detecção imunológica.

[00208] As proteínas codificadas pelo genoma HBV incluem: proteínas de envelope - i) pequenas - antígeno de superfície de hepatite B (HBsAg); II) médias - preS2 mais HBsAg; III) grandes - preS1 mais preS2 mais HBsAg; proteína do nucleocapsídeo, antígeno nuclear de hepatite B (HBcAg). O antígeno e de hepatite B (HBeAg) é uma proteína não estrutural produzida durante a replicação de HBV que compartilha 90% aminoácidos com o nucleocapsídeo HBcAg; e a proteína X é uma proteína não estrutural (HBx) que funciona no citoplasma para ativar várias vias de sinalização, muitas das quais são controladas pela modulação de cálcio citosólico e no núcleo para regular a transcrição através de uma interação direta com fatores diferentes de transcrição e, em alguns casos, reforçar a sua ligação a elementos de transcrição

específicos.

[00209] HBV é um dos poucos vírus DNA que utilizam transcriptase reversa no processo de replicação que envolve várias fases, incluindo entrada, abertura e dispersão (uncoating) e transporte do genoma do vírus para o núcleo. Inicialmente, a replicação do genoma do HBV envolve a geração de um intermediário de RNA que é então reversamente transcrito para produzir o genoma viral de DNA.

[00210] Após infecção de uma célula com HBV, o DNA circular relaxado viral genômico (rcDNA) é transportado para o núcleo da célula e convertido em DNA circular covalentemente fechado episomal (cccDNA), que serve como o modelo de transcrição para os mRNAs virais. Após transcrição e exportação nuclear, o RNA pregenômico viral citoplasmático (pgRNA) é montado com polimerase do HBV e proteínas de capsídeos para formar o nucleocapsídeo, no interior do qual a transcrição reversa catalizada por polimerase produz DNA filamento menos, que é posteriormente copiado para DNA filamento mais para formar o genoma de rcDNA de progênie. Os nucleocapsídeos maduros são então embalados com proteínas de envelope virais para saírem como partículas do vírion ou transportados para o núcleo para amplificar o reservatório de cccDNA através da via de amplificação cccDNA intracelular. O cccDNA é um componente essencial do ciclo de replicação do HBV e é responsável pelo estabelecimento da infecção e persistência viral.

[00211] A infecção pelo HBV resulta na produção de duas partículas diferentes: 1) o vírus HBV em si (ou partícula de Dane) que inclui um capsídeo viral montado a partir do HBcAg e é coberto pelo HBsAg e é capaz de reinfectar células e 2) partículas sub-virais (ou SVPs) que são partículas tipo lipoproteína de alta densidade compostas de lipídios, colesterol, ésteres de colesterol e as formas pequenas e médias do antígeno de superfície da hepatite B HBsAg que são não-infecciosas.

Para cada partícula viral produzida, são liberadas para o sangue 1.000 a 10.000 SVPs. Como tal, as SVPs (e a proteína HBsAg que transportam) representam a esmagadora maioria da proteína viral no sangue. As células infectadas com HBV também segregam um produto proteolítico solúvel da proteína pré-núcleo chamada antígeno e do HBV (HBeAg).

[00212] Foram determinados oito genótipos de HBV, designados de A a H, cada um deles possuindo uma distribuição geográfica distinta. O vírus é não-citopático, com a imunidade celular específica do vírus sendo o principal determinante para o resultado da exposição a infecção aguda de HBV com resolução de doenças hepáticas com 6 meses, ou infecção crônica por HBV frequentemente associada a lesão hepática progressiva.

[00213] O termo "HBV" inclui qualquer um dos oito genótipos de HBV (A a H). O aminoácido e sequência completa de codificação da sequência de referência do genoma de HBV podem ser encontrados nos, por exemplo, números de acesso no Genbank GI:21326584 (SEQ ID NO:1) e GI:3582357 (SEQ ID NO:3).

[00214] Exemplos adicionais de sequências de mRNA de HBV estão prontamente disponíveis usando bases de dados publicamente disponíveis, por exemplo, GenBank, UniProt e OMIM.

[00215] O termo "HBV", tal como aqui utilizado, se refere também a variações de sequências de DNA de ocorrência natural do genoma HBV.

[00216] Como usado aqui, "vírus da hepatite D," usado indistintamente com o termo "HDV" se refere ao bem conhecido vírus de DNA não citopático e fígado-trópico pertencente à família Hepadnaviridae. Ver, por exemplo, Ciancio e Rizzetto, Nat. Rev. 11:68-71, 2014; Le Gal et al., Emerg. Infect. Dis. 12:1447-1450, 2006; e Abbas e Afzal, World J. Hep., 5:666-675, 2013, todos eles incorporados por

referência. Salvo indicação em contrário, HDV se refere a todos os clados e variantes de HDV.

[00217] HDV produz uma proteína, nomeadamente HDAg. Vem em duas formas; um HDAg grande de 27kDa (também dito neste documento como IHD, L-HDAg e antígeno HDV grande) e um HDAg pequeno de 24kDa (também dito neste documento como sHD, S-HDAg e antígeno HDV pequeno). Os terminais N das duas formas são idênticos, diferindo por 19 aminoácidos no terminal C do HDAg grande. Ambas as isoformas são produzidas a partir da mesma grelha de leitura que contém um códon de parada UAG no códon 196, que normalmente produz apenas o HDAg pequeno. No entanto, a edição pela enzima adenosina deaminase-1 celular altera o códon de parada para UCG, permitindo que seja produzido o HDAg grande. Apesar de terem 90% de sequências idênticas, estas duas proteínas desempenham papéis divergentes no decurso de uma infecção. HDAg-S é produzida nas fases iniciais de uma infecção e entra no núcleo e oferece suporte à replicação viral. HDAg-L, por outro lado, é produzida durante as fases posteriores de uma infecção, atua como um inibidor da replicação viral e é necessária para a montagem das partículas virais.

[00218] Exemplos adicionais de sequências de mRNA de HDV estão prontamente disponíveis usando bases de dados publicamente disponíveis, por exemplo, GenBank, UniProt e OMIM.

[00219] O termo "HDV", tal como aqui utilizado, se refere também a variações de sequências de DNA de ocorrência natural do genoma HDV.

[00220] Como usado aqui, "sequência alvo" se refere a uma porção contígua da sequência de nucleotídeos de uma molécula de mRNA formada durante a transcrição de um gene HBV, incluindo mRNA que é um produto do processamento de RNA de um produto de transcrição primária. Em uma modalidade, a porção alvo da sequência será pelo

menos longa o suficiente para servir como um substrato para clivagem dirigida por RNAi nessa ou perto dessa porção da sequência de nucleotídeos de uma molécula de mRNA formada durante a transcrição de um gene HBV.

[00221] A sequência alvo pode ter cerca de 9-36 nucleotídeos em comprimento, por exemplo, cerca de 15-30 nucleotídeos em comprimento. Por exemplo, a sequência alvo pode ter cerca de 15-30 nucleotídeos, 15-29, 15-28, 15-27, 15-26, 15-25, 15-24, 15-23, 15-22, 15-21, 15-20, 15-19, 15-18, 15-17, 18-30, 18-29, 18-28, 18-27, 18-26, 18-25, 18-24, 18-23, 18-22, 18-21, 18-20, 19-30, 19-29, 19-28, 19-27, 19-26, 19-25, 19-24, 19-23, 19-22, 19-21, 19-20, 20-30, 20-29, 20-28, 20-27, 20-26, 20-25, 20-24, 20-23, 20-22, 20-21, 21-30, 21-29, 21-28, 21-27, 21-26, 21-25, 21-24, 21-23 ou 21-22 nucleotídeos de comprimento. Também é contemplado que intervalos e comprimentos intermédios dos intervalos e comprimentos listados acima façam parte da invenção.

[00222] Como usado aqui, o termo "filamento compreendendo uma sequência" se refere a um oligonucleotídeo compreendendo uma cadeia de nucleotídeos que é descrita pela sequência dita usando a nomenclatura de nucleotídeos padrão.

[00223] "G," "C," "A," "T" e "U" designam cada um geralmente um nucleotídeo que contém guanina, citosina, adenina, timidina e uracila como uma base, respectivamente. No entanto será entendido que o termo "ribonucleotídeo" ou "nucleotídeo" pode também se referir a um nucleotídeo modificado, como detalhado adicionalmente em baixo, ou uma fração de substituição suplente (ver, por exemplo, Tabela 2). O perito na técnica está bem ciente de que guanina, citosina, adenina, e uracila podem ser substituídas por outras frações sem alterar substancialmente as propriedades de emparelhamento de bases de um oligonucleotídeo compreendendo um nucleotídeo contendo tal fração de

substituição. Por exemplo, sem limitação, um nucleotídeo compreendendo inosina como sua base pode sofrer emparelhamento de bases com nucleotídeos contendo adenina, citosina ou uracila. Assim, nucleotídeos contendo uracila, guanina, ou adenina podem ser substituídos, nas sequências de nucleotídeos de dsRNA apresentadas na invenção, por um nucleotídeo contendo, por exemplo, inosina. Em outro exemplo, adenina e citosina em qualquer parte do oligonucleotídeo podem ser substituídas por guanina e uracila, respectivamente, para formar emparelhamento de bases Wobble G-U com o mRNA alvo. Sequências contendo tais frações de substituição são adequadas para as composições e métodos apresentados na invenção.

[00224] Os termos "RNAi", "agente de RNAi", "agente de RNAi", "agente de interferência de RNA" como usados indistintamente aqui se referem a um agente que contém RNA como tal termo é definido aqui, e que medeia a clivagem dirigida de um transcrito de RNA através de um complexo silenciador induzido por RNA (RISC). O RNAi dirige a degradação específica quanto à sequência de mRNA através de um processo conhecido como interferência de RNA (RNAi). O RNAi modula, por exemplo, inibe, a expressão de um gene HBV (por exemplo, um ou mais genes HBV) em uma célula, por exemplo uma célula dentro de um indivíduo, tal como um indivíduo mamífero.

[00225] Em uma modalidade, um agente de RNAi da invenção inclui um RNA de filamento único que interage com uma sequência de RNA alvo, por exemplo, uma sequência de mRNA alvo de HBV, para dirigir a clivagem do RNA alvo. Sem desejar estar limitado pela teoria se acredita que o RNA de fita dupla longo introduzido nas células é degradado em sRNAi por uma endonuclease do Tipo III conhecida como Dicer (Sharp *et al.* (2001) *Genes Dev.* 15:485). Dicer, uma enzima do tipo ribonuclease III, processa o dsRNA em curtos RNAs de interferência

com 19-23 pares de bases com projeções 3' de duas bases características (Bernstein, *et al.*, (2001) *Nature* 409:363). Os sRNAi são depois incorporados em um complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC) onde uma ou mais helicases desenrolam o dúplex de sRNAi, permitindo que o filamento antissenso complementar oriente o reconhecimento do alvo (Nykanen, *et al.*, (2001) *Cell* 107:309). Após ligação ao mRNA alvo apropriado, uma ou mais endonucleases dentro do RISC clivam o alvo para induzir silenciamento (Elbashir, *et al.*, (2001) *Genes Dev.* 15:188). Assim, em um aspecto, a invenção refere-se a um sRNAi de filamento único (ssRNA) gerado dentro de uma célula e que promove a formação de um complexo RISC para efetivar o silenciamento do gene alvo, isto é, um gene HBV. Conformemente, o termo "sRNAi" é também usado aqui para se referir a um RNAi como descrito acima.

[00226] Em outra modalidade, o agente de RNAi pode ser um sRNAi de filamento único que é introduzido em uma célula ou organismo para inibir um mRNA alvo. O agente de RNAi de filamento único se liga à endonuclease do RISC, Argonata 2, que cliva depois o mRNA alvo. Os sRNAi de filamento único têm geralmente 15-30 nucleotídeos e estão quimicamente modificados. A concepção e teste de sRNAi de filamento único são descritos na Patente dos E.U.A. Nº 8,101,348 e em Lima *et al.*, (2012) *Cell* 150:883-894 os conteúdos inteiros de cada um dos quais são deste modo incorporados aqui por referência. Qualquer uma das sequências de nucleotídeos antissenso descritas aqui pode ser usada como um sRNAi de filamento único como descrito aqui ou como quimicamente modificado pelos métodos descritos em Lima *et al.*, (2012) *Cell* 150:883-894.

[00227] Em outra modalidade, um "RNAi" para uso nas composições, usos, e métodos da invenção é um RNA de fita dupla e é dito aqui como um "agente de RNAi de fita dupla", "molécula de RNA de fita dupla

(dsRNA)", "agente de dsRNA", ou "dsRNA". O termo "dsRNA" se refere a um complexo de moléculas de ácidos ribonucleicos, tendo uma estrutura de dúplex compreendendo dois filamentos de ácidos nucleicos antiparalelos e substancialmente complementares, ditas como tendo orientações "senso" e "antissenso" no que diz respeito a um RNA alvo, *isto é*, um gene HBV. Em algumas modalidades da invenção, um RNA de fita dupla (dsRNA) desencadeia a degradação de um RNA alvo, por exemplo, um mRNA, através de um mecanismo de silenciamento de genes pós-transcricional dito aqui como interferência de RNA ou RNAi.

[00228] Em geral, a maioria dos nucleotídeos de cada filamento de uma molécula de dsRNA são ribonucleotídeos, mas, como descrito em detalhe aqui, cada uma das ou ambos os filamentos podem também incluir um ou mais não ribonucleotídeos, por exemplo, um desoxirribonucleotídeo e/ou um nucleotídeo modificado. Adicionalmente, como usado em esta especificação, um "agente de RNAi" pode incluir ribonucleotídeos com modificações químicas; um agente de RNAi pode incluir modificações substanciais em múltiplos nucleotídeos. Tal como aqui utilizado, o termo "nucleotídeo modificado" se refere a um nucleotídeo tendo, de forma independente, uma fração de açúcar modificada, uma ligação internucleotídeos modificada, e/ou nucleobase modificada. Assim, o termo nucleotídeo modificado engloba substituições, adições ou remoção de, por exemplo, um grupo funcional ou átomo, para ligações internucleosídicas, frações de açúcar, ou nucleobases. As modificações adequadas para utilização nos agentes da invenção incluem todos os tipos de modificações aqui divulgadas ou conhecidas na técnica. Quaisquer tais modificações, como usadas em uma molécula do tipo sRNAi, estão englobadas por "agente de RNAi" para os propósitos desta especificação e reivindicações.

[00229] A região de dúplex pode ter qualquer comprimento que permita degradação específica de um RNA alvo desejado através de

uma via de RISC, e pode variar de cerca de 9 a 36 pares de bases em comprimento, por exemplo, cerca de 15-30 pares de bases em comprimento, por exemplo, cerca de 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 pares de bases em comprimento, tal como cerca de 15-30, 15-29, 15-28, 15-27, 15-26, 15-25, 15-24, 15-23, 15-22, 15-21, 15-20, 15-19, 15-18, 15-17, 18-30, 18-29, 18-28, 18-27, 18-26, 18-25, 18-24, 18-23, 18-22, 18-21, 18-20, 19-30, 19-29, 19-28, 19-27, 19-26, 19-25, 19-24, 19-23, 19-22, 19-21, 19-20, 20-30, 20-29, 20-28, 20-27, 20-26, 20-25, 20-24, 20-23, 20-22, 20-21, 21-30, 21-29, 21-28, 21-27, 21-26, 21-25, 21-24, 21-23, ou 21-22 pares de bases em comprimento. Também é contemplado que intervalos e comprimentos intermédios dos intervalos e comprimentos listados acima façam parte da invenção.

[00230] Os dois filamentos formando a estrutura de dúplex podem ser porções diferentes de uma molécula de RNA maior, ou podem ser moléculas de RNA separadas. Onde os dois filamentos são parte de uma molécula maior, e portanto estão conectadas por uma cadeia ininterrupta de nucleotídeos entre a extremidade 3' de um filamento e a extremidade 5' do outro filamento respectiva formando a estrutura de dúplex, a cadeia de RNA conectante é dita como uma "alça em grampo". Uma alça em grampo pode compreender pelo menos um nucleotídeo desemparelhado. Em algumas modalidades, a alça em grampo pode compreender pelo menos 2, 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 desemparelhados.

[00231] Onde os dois filamentos substancialmente complementares de um dsRNA são compreendidos por moléculas de RNA separadas, essas moléculas não necessitam de, mas podem estar covalentemente conectadas. Onde os dois filamentos estão covalentemente conectados

por meios sem ser uma cadeia ininterrupta de nucleotídeos entre a extremidade 3' de um filamento e a extremidade 5' do outro filamento respectivo formando a estrutura de dúplex, a estrutura conectante é dita como um "ligante". Os filamentos de RNA podem ter um número igual ou diferente de nucleotídeos. O número máximo de pares de bases é o número de nucleotídeos no filamento mais curto de dsRNA menos quaisquer projeções que estejam presentes no dúplex. Para além da estrutura de duplex, um RNAi pode compreender uma ou mais protuberâncias nucleotídicas.

[00232] Em uma modalidade, um agente de RNAi da invenção é um dsRNA, cada filamento do qual compreende 24-30 nucleotídeos, que interage com uma sequência de RNA alvo, por exemplo, uma sequência de mRNA alvo de HBV, para dirigir a clivagem do RNA alvo. Sem desejar estar limitado pela teoria, o RNA de fita dupla longo introduzido nas células é degradado em sRNAi por uma endonuclease do Tipo III conhecida como Dicer (Sharp *et al.* (2001) *Genes Dev.* 15:485). Dicer, uma enzima do tipo ribonuclease III, processa o dsRNA em curtos RNAs de interferência com 19-23 pares de bases com projeções 3' de duas bases características (Bernstein, *et al.*, (2001) *Nature* 409:363). Os sRNAi são depois incorporados em um complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC) onde uma ou mais helicases desenrolam o dúplex de sRNAi, permitindo que o filamento antissenso complementar oriente o reconhecimento do alvo (Nykanen, *et al.*, (2001) *Cell* 107:309). Após ligação ao mRNA alvo apropriado, uma ou mais endonucleases dentro do RISC clivam o alvo para induzir silenciamento (Elbashir, *et al.*, (2001) *Genes Dev.* 15:188).

[00233] Como usado aqui, o termo "projeção de nucleotídeos" se refere a pelo menos um nucleotídeo não emparelhado que sobressai da estrutura de dúplex de um RNAi, por exemplo, um dsRNA. Por exemplo, quando uma extremidade 3' de um filamento de um dsRNA se estende

para além da extremidade 5' do outro filamento, ou vice-versa, existe uma projeção de nucleotídeos. Um dsRNA pode compreender uma projeção de pelo menos um nucleotídeo; alternativamente, a projeção pode compreender pelo menos dois nucleotídeos, pelo menos três nucleotídeos, pelo menos quatro nucleotídeos, pelo menos cinco nucleotídeos ou mais. Uma projeção de nucleotídeo pode compreender ou consistir em um análogo de nucleotídeo/nucleosídeo, incluindo um desóxinucleotídeo/nucleosídeo. A(s) protuberância(s) pode(m) estar no filamento senso, no filamento antissenso ou qualquer combinação dos mesmos. Além disso, o(s) nucleotídeo(s) de uma protuberância pode(m) estar presente(s) na extremidade 5', extremidade 3' ou ambas as extremidades de um filamento antissenso ou senso de um dsRNA.

[00234] Em uma modalidade, o filamento antissenso de um dsRNA tem uma projeção de 1-10 nucleotídeos, por exemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, ou 10 nucleotídeos, na extremidade 3' e/ou na extremidade 5'. Em uma modalidade, o filamento senso de um dsRNA tem uma projeção de 1-10 nucleotídeos, por exemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, ou 10 nucleotídeos, na extremidade 3' e/ou na extremidade 5'. Em outra modalidade, um ou mais dos nucleotídeos na projeção estão substituídos por um nucleosídeo tiofosfato.

[00235] "Cega" ou "extremidade cega" significa que não existem nenhuns nucleotídeos não emparelhados em essa extremidade do agente de RNAi de fita dupla, isto é, nenhuma projeção de nucleotídeos. Um agente de RNAi "de extremidades cegas" é um dsRNA que tem fita dupla ao longo do seu comprimento inteiro, isto é, nenhuma projeção de nucleotídeos em qualquer uma das extremidades da molécula. Os agentes de RNAi da invenção incluem agentes de RNAi com projeções de nucleotídeos em uma extremidade (isto é, agentes com uma projeção e uma extremidade cega) ou com projeções de nucleotídeos em ambas as extremidades.

[00236] O termo "filamento antissenso" ou "filamento guia" se refere ao filamento de um RNAi, por exemplo, um dsRNA, que inclui uma região que é substancialmente complementar com uma sequência alvo, por exemplo, um mRNA de HBV. Como usado aqui, o termo "região de complementaridade" se refere à região do filamento antissenso que é substancialmente complementar com uma sequência, por exemplo uma sequência alvo, por exemplo, uma sequência de nucleotídeos de HBV, como definido aqui. Quando a região de complementaridade não é totalmente complementar à sequência alvo, os emparelhamentos defeituosos podem ocorrer nas regiões internas ou terminais da molécula. Geralmente, as incompatibilidades mais toleradas estão nas regiões terminais, por exemplo, em 5, 4, 3, 2 ou 1 nucleotídeos do terminal 5' e/ou 3' do RNAi. Em uma modalidade, um agente de RNAi de fita dupla da invenção inclui uma incompatibilidade de nucleotídeo no filamento antissenso. Em uma modalidade, um agente de RNAi de fita dupla da invenção inclui uma incompatibilidade de nucleotídeo no filamento senso. Em uma modalidade, a incompatibilidade de nucleotídeos fica, por exemplo, dentro de 5, 4, 3, 2, ou 1 nucleotídeos do terminal 3' de RNAi. Em outra modalidade, a incompatibilidade de nucleotídeo fica, por exemplo, no nucleotídeo de terminal 3' de RNAi.

[00237] O termo "filamento senso", ou "filamento passageiro", como usado aqui, se refere ao filamento de um RNAi que inclui uma região que é substancialmente complementar com uma região do filamento antissenso tal como esse termo é definido aqui.

[00238] Como usado aqui, o termo "região de clivagem" se refere a uma região que está localizada imediatamente adjacente ao local de clivagem. O local de clivagem é o local no alvo no qual ocorre clivagem. Em algumas modalidades, a região de clivagem compreende três bases em qualquer uma das extremidades do, e imediatamente adjacente ao, local de clivagem. Em algumas modalidades, a região de clivagem

compreende duas bases em qualquer uma das extremidades do, e imediatamente adjacente ao, local de clivagem. Em algumas modalidades, o local de clivagem ocorre especificamente no local ligado pelos nucleotídeos 10 e 11 do filamento antissenso, e a região de clivagem compreende os nucleotídeos 11, 12 e 13.

[00239] Como usado aqui, e a não ser que indicado de outro modo, 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 compreendendo a primeira sequência de nucleotídeos de hibridar e formar uma estrutura de dúplex sob certas condições com um oligonucleotídeo ou polinucleotídeo compreendendo a segunda sequência de nucleotídeos, como será entendido pela pessoa perita. Tais condições podem, por exemplo, ser condições estridentes, em que condições estridentes podem incluir: NaCl a 400 mM, PIPES a 40 mM pH 6,4, EDTA a 1 mM, 50°C ou 70°C durante 12-16 horas seguido de lavagem (ver, por exemplo, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrook, *et al.* (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press). Podem ser aplicadas outras condições, como condições fisiologicamente relevantes, como as que podem ser encontradas dentro de um organismo. A pessoa perita será capaz de determinar o conjunto de condições mais apropriadas para um teste de complementaridade de duas sequências de acordo com a aplicação final dos nucleotídeos hibridados.

[00240] As sequências complementares dentro de um RNAi, por exemplo, dentro de um dsRNA como descrito aqui, incluem emparelhamento de bases do oligonucleotídeo ou polinucleotídeo compreendendo uma primeira sequência de nucleotídeos com um oligonucleotídeo ou polinucleotídeo compreendendo uma segunda sequência de nucleotídeos ao longo do comprimento inteiro de uma das

ou ambas as sequências de nucleotídeos. Tais sequências podem ser ditas como "totalmente complementares" no que diz respeito uma à outra aqui. No entanto, onde uma primeira sequência é dita aqui como "substancialmente complementar" no que diz respeito a uma segunda sequência aqui, as duas sequências podem ser totalmente complementares, ou podem formar um ou mais, mas geralmente não mais do que 5, 4, 3 ou 2 pares de bases desemparelhadas por hibridação para um dúplex de até 30 pares de bases, enquanto retém a capacidade de hibridar sob as condições mais relevantes para a sua aplicação final, por exemplo, inibição da expressão de genes através de uma via de RISC. No entanto, onde dois oligonucleotídeos são desenhados para formar, após hibridação, uma ou mais projeções de filamento único, tais projeções não devem ser consideradas como incompatibilidades no que diz respeito à determinação da complementaridade. Por exemplo, um dsRNA compreendendo um oligonucleotídeo com 21 nucleotídeos em comprimento e outro oligonucleotídeo com 23 nucleotídeos em comprimento, em que o oligonucleotídeo maior compreende uma sequência de 21 nucleotídeos que é totalmente complementar com o oligonucleotídeo mais curto, pode ainda ser dito como "totalmente complementar" para os propósitos descritos aqui.

[00241] Sequências "complementares", como usado aqui, também podem incluir, ou ser inteiramente formadas de pares de bases não de Watson-Crick e/ou pares de bases formados a partir de nucleotídeos não naturais e modificados, desde que sejam cumpridos os requisitos acima relativamente à sua capacidade de hibridização. Tais pares de bases não de Watson-Crick incluem mas não estão limitados aos emparelhamentos de bases Wobble G:U ou de Hoogstein.

[00242] Os termos "complementar", "totalmente complementar" e "substancialmente complementar" podem ser usados aqui no que diz

respeito à correspondência de bases entre o filamento senso e o filamento antissenso de um dsRNA, ou entre o filamento antissenso de um agente de RNAi e uma sequência alvo, como será entendido a partir do contexto do seu uso.

[00243] Como usado aqui, um polinucleotídeo que é "substancialmente complementar com pelo menos parte de" um RNA mensageiro (mRNA) se refere a um polinucleotídeo que é substancialmente complementar com uma porção contígua do mRNA de interesse (por exemplo, um mRNA codificando gene HBV). Por exemplo, um polinucleotídeo é complementar com pelo menos uma parte de um mRNA de HBV se a sequência for substancialmente complementar com uma porção ininterrupta de um mRNA codificando um gene HBV.

[00244] Em conformidade, em algumas modalidades, os polinucleotídeos de filamento antissenso divulgados neste documento são totalmente complementares à sequência HBV alvo. Em outras modalidades, os polinucleotídeos de filamento antissenso divulgados neste documento são substancialmente complementares à sequência HBV alvo e compreendem uma sequência de nucleotídeos contíguos que é pelo menos cerca de 80% complementar ao longo de todo o seu comprimento à região equivalente da sequência de nucleotídeos de SEQ ID NO:1, ou um fragmento de SEQ ID NO:1, tal como cerca de 85%, cerca de 86%, cerca de 87%, cerca de 88%, cerca de 89%, cerca de 90%, com 91%, cerca de 92%, cerca de 93%, cerca de 94%, cerca de 95%, cerca de 96%, cerca de 97%, cerca de 98%, ou cerca de 99% complementar.

[00245] Em uma modalidade, um agente de RNAi da invenção inclui um filamento senso que é substancialmente complementar a um polinucleotídeo antissenso que, por seu lado, é complementar a uma sequência HBV alvo, e em que o polinucleotídeo de filamento senso

compreende uma sequência de nucleotídeos contíguos que é pelo menos cerca de 80% complementar ao longo de todo o seu comprimento à região equivalente da sequência de nucleotídeos de qualquer uma das SEQ ID NOs: 6, 8, 10, 12, 38 e 40, ou um fragmento de qualquer umas das SEQ ID NOs: 6, 8, 10, 12, 38, e 40, tal como cerca de 85%, cerca de 86%, cerca de 87%, cerca de 88%, cerca de 89%, cerca de 90%, com 91%, cerca de 92%, cerca de 93%, cerca de 94%, cerca de 95%, cerca de 96%, cerca de 97%, cerca de 98%, ou cerca de 99% complementar. Em outra modalidade, um agente de RNAi da invenção inclui um filamento antissenso que é substancialmente complementar a uma sequência HBV alvo e compreende uma sequência de nucleotídeos contíguos que é pelo menos cerca de 80% complementar ao longo de todo o seu comprimento à região equivalente da sequência de nucleotídeos de qualquer uma das SEQ ID Nos: 5, 7, 9, 11, 37 e 39, ou um fragmento de qualquer umas das SEQ ID Nos: 5, 7, 9, 11, 37, e 39, tal como cerca de 85%, cerca de 86%, cerca de 87%, cerca de 88%, cerca de 89%, cerca de 90%, com 91%, cerca de 92%, cerca de 93%, cerca de 94%, cerca de 95%, cerca de 96%, cerca de 97%, cerca de 98%, ou cerca de 99% complementar.

[00246] Em algumas modalidades, a maior parte dos nucleotídeos de cada filamento são ribonucleotídeos mas, como descrito em detalhe aqui, cada uma ou ambos os filamentos também podem incluir um ou mais não ribonucleotídeos, por exemplo, um desoxirribonucleotídeo e/ou um nucleotídeo modificado. Adicionalmente, um "RNAi" pode incluir ribonucleotídeos com modificações químicas. Tais modificações podem incluir todos os tipos de modificações divulgadas aqui ou conhecidas na técnica. Quaisquer tais modificações, como usadas em uma molécula de RNAi, estão englobadas por "RNAi" para os propósitos desta especificação e reivindicações.

[00247] Em um aspecto da invenção, um agente para uso nos

métodos e composições da invenção é uma molécula de ácido nucleico antissenso de filamento único que inibe um mRNA alvo através de um mecanismo de inibição antissenso. A molécula de RNA antissenso de filamento único é complementar com uma sequência dentro do mRNA alvo. Os oligonucleotídeos antissenso de filamento único podem inibir a tradução de um modo estequiométrico por emparelhamento de bases com o mRNA e obstrução física da maquinaria de tradução, ver Dias, N. *et al.*, (2002) *Mol Cancer Ther* 1:347-355. A molécula de RNA antissenso de filamento único pode ter cerca de 15 a cerca de 30 nucleotídeos em comprimento e ter uma sequência que é complementar com uma sequência alvo. Por exemplo, a molécula de RNA antissenso de filamento único pode compreender uma sequência que tem pelo menos cerca de 15, 16, 17, 18, 19, 20, ou mais nucleotídeos contíguos de qualquer uma das sequências antissenso descritas aqui.

[00248] Como usado aqui, um "indivíduo" é um animal, tal como um mamífero, incluindo um primata (tal como um ser humano, um primata não humano, por exemplo, um macaco, e um chimpanzé), um não primata (tal como uma vaca, um porco, um camelo, um lama, um cavalo, uma cabra, um coelho, uma ovelha, um *hamster*, um porquinho-da-índia, um gato, um cão, um rato, um camundongo, um cavalo, e uma baleia), ou um pássaro (por exemplo, um pato ou um ganso). Em uma modalidade, o indivíduo é um ser humano, tal como um ser humano sendo tratado ou avaliado quanto a uma doença, distúrbio ou condição que beneficiaria de redução na expressão e/ou replicação do gene HBV; um ser humano em risco de uma doença, distúrbio ou condição que beneficiaria de redução na expressão de/ou replicação do gene HBV; um ser humano tendo uma doença, distúrbio ou condição que beneficiaria de redução na expressão e/ou replicação do gene HBV; e/ou ser humano sendo tratado quanto a uma doença, distúrbio ou condição que beneficiaria de redução na expressão e/ou replicação do

gene HBV, como descrito aqui. Em outra modalidade, o indivíduo tem uma infecção pelo vírus da hepatite B (HBV). Em outra modalidade, o indivíduo tem uma infecção pelo vírus da hepatite B (HBV) e uma infecção pelo vírus da hepatite D (HDV).

[00249] Como usado aqui, os termos "tratar" ou "tratamento" referem-se a um resultado desejado ou benéfico, incluindo, mas não limitado a, alívio ou melhora de um ou mais sintomas associados à expressão de gene HBV indesejada e/ou replicação de HBV, por exemplo, a presença de ccc DNA de HBV sérico e/ou hepático, a presença de antígeno HBV sérico e/ou hepático, por exemplo, HBsAg e/ou HBeAg, ALT elevado, AST elevado, a ausência ou o baixo nível de anticorpos anti-HBV, lesão hepática; cirrose; delta hepatite, hepatite B aguda; hepatite B fulminante; hepatite B crônica; fibrose hepática; doença hepática de estágio final; carcinoma hepatocelular; síndrome tipo doença do soro; anorexia; náusea; vômito, febre baixa; mialgia; cansaço; distúrbios da acuidade gustativa e das sensações olfativas (aversão a comida e cigarros); e/ou no quadrante superior direito e dor epigástrica (intermitente, leve a moderada); encefalopatia hepática; sonolência; distúrbios no padrão de sono; confusão mental; coma; ascite; hemorragia gastrointestinal; coagulopatia; icterícia; hepatomegalia (ligeiramente ampliado, fígado macio); esplenomegalia; eritema palmar; nevos arâneos; atrofia muscular; aranhas vasculares; vasculite; hemorragia varicosa; edema periférico; ginecomastia; atrofia testicular; veias colaterais abdominais (cabeça de medusa); altos níveis de alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST), dentro de um intervalo de 1000 - 2000 UI/mL, embora valores 100 vezes acima do limite superior do normal (ULN) possam ser também identificados; níveis de ALT mais elevados do que níveis de AST; níveis elevados de gama-glutamila transpeptidase (GGT) e fosfatase alcalina (ALP) (por exemplo, não mais do que 3 vezes o ULN); níveis de

albumina ligeiramente baixos; níveis de ferro sérico elevados; leucopenia (ou seja, granulocitopenia); linfocitose; taxa de sedimentação de eritrócitos aumentada (ESR); sobrevivência de glóbulos vermelhos reduzida; hemólise; trombocitopenia; um prolongamento da relação normalizada internacional (INR); a presença de imunoglobulina M (IgM) de anticorpos nucleares de hepatite B (anti-HBc), HBsAg, HBeAg sérico e/ou hepático; anticorpo de superfície da hepatite B (anti-HBs), anticorpo e de hepatite B (anti-HBe), e/ou DNA de HBV; elevação das aminotransferases (≤ 5 vezes o ULN); níveis de ALT mais elevados do que os níveis de AST; níveis de bilirrubina aumentados, tempo de protrombina (PT) prolongado; hiperglobulinemia; a presença de anticorpos não específicos de tecido, tais como anticorpos anti-músculo liso (ASMAs) ou anticorpos antinucleares (ANAs) (10-20%); a presença de anticorpos específicos do tecido, tais como anticorpos contra a glândula tiroide (10-20%); níveis elevados de fator reumatoide (RF); hiperbilirrubinemia, PT prolongado, baixa contagem de plaquetas e glóbulos brancos, níveis de AST mais elevados do que os níveis de ALT; níveis elevados de fosfatase alcalina (ALP) e GGT; lobular, com alterações hepatocelulares degenerativas e regenerativas e inflamação acompanhante; predominantemente necrose centrolobular detectável ou indetectável. "Tratamento" também pode significar prolongar a sobrevivência em comparação com a sobrevivência esperada na ausência de tratamento.

[00250] O termo "inferior" no contexto do nível de uma expressão de gene de HBV e/ou replicação de HBV em um indivíduo ou um marcador ou sintoma de doença se refere a uma diminuição estatisticamente significativa em tal nível. A diminuição pode ser, por exemplo, pelo menos 10%, pelo menos 15%, pelo menos 20%, pelo menos 25%, pelo menos 30%, pelo menos 35%, pelo menos 40%, pelo menos 45%, pelo menos 50%, pelo menos 55%, pelo menos 60%, pelo menos 65%, pelo

menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, ou mais e é preferencialmente até um nível aceite como dentro da gama do normal para um indivíduo sem tal distúrbio. Em certas modalidades, a expressão do alvo é normalizada, *i. e.*, reduzida para um nível aceitado como dentro do intervalo de normal para um indivíduo sem tal transtorno, por exemplo, o nível de um marcador de doença, tal como, ALT ou AST, é reduzido para um nível aceitado como dentro do intervalo do normal para um indivíduo sem tal distúrbio.

[00251] Como usado aqui, "prevenção" ou "prevenir", quando usado em referência a uma doença, distúrbio ou sua condição, que beneficiaria de uma redução na expressão de um gene e/ou replicação de HBV, se refere a uma redução na probabilidade que um indivíduo desenvolva um sintoma associado a uma tal doença, distúrbio ou condição, por exemplo um sintoma de infecção por HBV indesejada, tal como a presença de ccc DNA de HBV sérico e/ou hepático, a presença de antígeno HBV sérico e/ou hepático, por exemplo, HBsAg e/ou HBeAg, ALT elevado, AST elevado, a ausência ou o baixo nível de anticorpos anti-HBV, lesão hepática; cirrose; delta hepatite, hepatite B aguda; hepatite B fulminante; hepatite B crônica; fibrose hepática; doença hepática de estágio final; carcinoma hepatocelular; síndrome tipo doença do soro; anorexia; náusea; vômito, febre baixa; mialgia; cansaço; distúrbios da acuidade gustativa e das sensações olfativas (aversão a comida e cigarros); e/ou no quadrante superior direito e dor epigástrica (intermitente, leve a moderada); encefalopatia hepática; sonolência; distúrbios no padrão de sono; confusão mental; coma; ascite; hemorragia gastrointestinal; coagulopatia; icterícia; hepatomegalia (ligeiramente ampliado, fígado macio); esplenomegalia; eritema palmar; nevos arâneos; atrofia muscular; aranhas vasculares; vasculite; hemorragia varicosa; edema periférico; ginecomastia; atrofia testicular; veias colaterais abdominais

(cabeça de medusa); altos níveis de alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST), dentro de um intervalo de 1000 - 2000 UI/mL, embora valores 100 vezes acima do limite superior do normal (ULN) possam ser também identificados; níveis de ALT mais elevados do que níveis de AST; níveis elevados de gama-glutamila transpeptidase (GGT) e fosfatase alcalina (ALP) (por exemplo, não mais do que 3 vezes o ULN); níveis de albumina ligeiramente baixos; níveis de ferro sérico elevados; leucopenia (ou seja, granulocitopenia); linfocitose; taxa de sedimentação de eritrócitos aumentada (ESR); sobrevivência de glóbulos vermelhos reduzida; hemólise; trombocitopenia; um prolongamento da relação normalizada internacional (INR); a presença de imunoglobulina M (IgM) de anticorpos nucleares de hepatite B (anti-HBc), HBsAg, HBeAg sérico e/ou hepático; anticorpo de superfície da hepatite B (anti-HBs), anticorpo e de hepatite B (anti-HBe), e/ou DNA de HBV; elevação das aminotransferases (≤ 5 vezes o ULN); níveis de ALT mais elevados do que os níveis de AST; níveis de bilirrubina aumentados, tempo de protrombina (PT) prolongado; hiperglobulinemia; a presença de anticorpos não específicos de tecido, tais como anticorpos anti-músculo liso (ASMA) ou anticorpos antinucleares (ANAs) (10-20%); a presença de anticorpos específicos do tecido, tais como anticorpos contra a glândula tiroide (10-20%); níveis elevados de fator reumatoide (RF); hiperbilirrubinemia, PT prolongado, baixa contagem de plaquetas e glóbulos brancos, níveis de AST mais elevados do que os níveis de ALT; níveis elevados de fosfatase alcalina (ALP) e GGT; lobular, com alterações hepatocelulares degenerativas e regenerativas e inflamação acompanhante; predominantemente necrose centrolobular detectável ou indetectável. A probabilidade de desenvolver, por exemplo, fibrose hepática, é reduzida, por exemplo, quando um indivíduo tendo um ou mais fatores de risco para fibrose hepática, por exemplo infecção por hepatite B

crônica, falha em desenvolver fibrose hepática ou desenvolve fibrose hepática com menos gravidade em relação a uma população tendo os mesmos fatores de risco e não recebendo tratamento como descrito aqui. A falha em não desenvolver uma doença, distúrbio ou condição, ou a redução no desenvolvimento de um sintoma associado a uma tal doença, distúrbio ou condição (por exemplo, em pelo menos cerca de 10% em uma escala clinicamente aceite para essa doença ou distúrbio), ou a exibição de sintomas retardados (por exemplo, por dias, semanas, meses ou anos) é considerada prevenção efetiva.

[00252] Como usado aqui, o termo "doença associada ao vírus da hepatite B" ou "doença associada a HBV" é uma doença ou distúrbio que é causado por, ou associado a, infecção e/ou replicação de HBV. O termo "doença associada a HBV" inclui uma doença, distúrbio ou condição que beneficiariam com a redução da expressão e/ou replicação do gene HBV. Exemplos não limitativos de doenças associadas a HBV incluem, por exemplo, infecção pelo vírus da hepatite D, delta hepatite, hepatite B aguda; hepatite B aguda fulminante; hepatite B crônica; fibrose hepática; doença hepática de estágio final; carcinoma hepatocelular.

[00253] Em uma modalidade, uma doença associada a HBV é infecção pelo vírus da hepatite D. Vírus da hepatite D ou vírus de delta hepatite (HDV) é um patógeno humano. No entanto, o vírus é defeituoso e depende de funções auxiliares obrigatórias fornecidas pelo vírus da hepatite B (HBV) para transmissão; na verdade, o HDV requer uma infecção associada ou pré-existente pelo HBV para se tornar infeccioso e prosperar, em especial, o envelope viral contendo o antígeno de superfície da hepatite B. O HDV pode levar a formas agudas e crônicas graves de doença hepática em associação com HBV. A infecção por hepatite D e/ou delta hepatite é altamente endêmica em vários países africanos, na região amazônica e no Oriente Médio, enquanto a sua

prevalência é baixa em países industrializados, exceto no Mediterrâneo.

[00254] A transmissão de HDV pode ocorrer via infecção simultânea com o HBV (co-infecção) ou sobreposta na hepatite B crônica ou estado de portador de hepatite B (superinfecção). Tanto a superinfecção como a co-infecção com HDV resulta em complicações mais graves em comparação com a infecção com HBV sozinho. Estas complicações incluem uma maior probabilidade de sofrer insuficiência hepática em infecções agudas e uma rápida progressão para cirrose hepática, com uma chance maior de desenvolver câncer de fígado em infecções crônicas. Em combinação com o vírus da hepatite B, a hepatite D tem a maior taxa de fatalidade de todas as infecções de hepatite, de 20%.

[00255] Em uma modalidade, uma doença associada a HBV é hepatite B aguda. A hepatite B aguda inclui inflamação do fígado que dura menos de seis meses. Os sintomas típicos de hepatite B aguda são fadiga, anorexia, náusea e vômito. São frequentemente observados valores muito elevados de aminotransferase (> 1000 U/L) e hiperbilirrubinemia. Casos graves de hepatite B aguda podem progredir rapidamente para insuficiência hepática aguda, marcada por fraca função sintética hepática. Isto é muitas vezes definido como um tempo de protrombina (PT) de 16 segundos ou uma relação normatizada internacional (INR) de 1,5 na ausência de doença hepática anterior. A hepatite B aguda pode evoluir para hepatite B crônica.

[00256] Em uma modalidade, uma doença associada a HBV é hepatite crônica. A hepatite B crônica (CHB) inclui inflamação do fígado que dura mais de seis meses. Indivíduos com doença de hepatite B crônica podem ser imunotolerantes ou ter uma infecção crônica inativa sem qualquer evidência de doença ativa, sendo também assintomáticos. Pacientes com hepatite crônica ativa, especialmente durante o estado replicativo, podem ter sintomas semelhantes aos da hepatite aguda. A persistência da infecção pelo HBV em indivíduos com

CHB é o resultado de ccc DNA de HBV. Em uma modalidade, um indivíduo tendo CHB é HBeAg positivo. Em outra modalidade, um indivíduo tendo CHB é HBeAg negativo. Indivíduos com CHB têm um nível de DNA de HBV sérico de menos de cerca de 10^5 e uma elevação persistente de transaminases, por exemplo ALT, AST e gama-glutamil transferase. Um indivíduo com CHB pode ter uma pontuação de biópsia hepática de menos de cerca de 4 (por exemplo, uma pontuação necroinflamatória). Além disso, um indivíduo com CHB pode ter

[00257] Em uma modalidade, uma doença associada a HBV é hepatite B aguda fulminante. Um indivíduo com hepatite B aguda fulminante tem os sintomas da hepatite aguda e os sintomas adicionais de confusão ou coma (devido à insuficiência hepática para desintoxicar substâncias químicas) e hematomas ou hemorragias (devido à falta de fatores de coagulação do sangue).

[00258] Indivíduos com infecção pelo HBV, por exemplo, CHB, podem desenvolver fibrose hepática. Em conformidade, em uma modalidade, uma doença associada a HBV é fibrose hepática. A fibrose hepática, ou cirrose, é definida histologicamente como um processo hepático difuso caracterizado por fibrose (excesso de tecido conjuntivo fibroso) e a conversão da arquitetura hepática normal em nódulos estruturalmente anormais.

[00259] Indivíduos com infecção pelo HBV, por exemplo, CHB, podem desenvolver doença hepática de estágio final. Em conformidade, em uma modalidade, uma doença associada a HBV é doença hepática de estágio final. Por exemplo, a fibrose hepática pode progredir até um ponto em que o corpo pode já não ser capaz de compensar, por exemplo, uma função hepática reduzida, como resultado de fibrose hepática e resultar em, por exemplo, sintomas mentais e neurológicos e insuficiência hepática.

[00260] Indivíduos com infecção pelo HBV, por exemplo, CHB,

podem desenvolver carcinoma hepatocelular (HCC), também conhecido como hepatoma maligno. Em conformidade, em uma modalidade, uma doença associada a HBV é HCC. HCC comumente se desenvolve em indivíduos com CHB e pode ser fibrolamelar, pseudoglandular (adenoide), pleomórfico (células gigantes) ou de células claras.

[00261] Um "distúrbio associado a HDV" ou um "distúrbio associado ao vírus da hepatite D" é uma doença ou distúrbio associado à expressão de uma HDV. Exemplos de distúrbios associados a HDV incluem infecção pelo vírus da hepatite B, hepatite B aguda, hepatite D aguda; hepatite D aguda fulminante; hepatite D crônica; fibrose hepática; doença hepática de estágio final; e carcinoma hepatocelular.

[00262] É pretendido que "quantidade terapeuticamente eficaz", como usado aqui, inclua a quantidade de um agente de RNAi que, quando administrada a um paciente para tratamento de um indivíduo com infecção pelo HBV e/ou doença associada a HBV, é suficiente para efetivar o tratamento da doença (por exemplo, por diminuição, melhoria ou manutenção da doença existente ou um ou mais sintomas de doença). A "quantidade terapeuticamente eficaz" pode variar dependendo do agente de RNAi, como o agente é administrado, da doença e sua gravidade e do historial, idade, peso, historial familiar, constituição genética, etapa de processos patológicos mediados por expressão de gene HBV, dos tipos de tratamentos precedentes ou concomitantes, se alguns, e outras características individuais do paciente a ser tratado.

[00263] É pretendido que "quantidade profilaticamente eficaz", como usado aqui, inclua a quantidade de um agente de RNAi que, quando administrada a um indivíduo que não experiencia ou exibe ainda sintomas de uma infecção pelo HBV e/ou doença associada a HBV, mas que possa estar predisposto a tal, é suficiente para prevenir ou melhorar a doença ou um ou mais sintomas da doença. Melhoria da doença inclui

abrandamento da progressão da doença ou redução da gravidade da doença com desenvolvimento posterior. A "quantidade profilaticamente eficaz" pode variar dependendo do agente de RNAi, como o agente é administrado, do grau de risco da doença, e do historial, idade, peso, historial familiar, constituição genética, dos tipos de tratamentos precedentes ou concomitantes, se alguns, e outras características individuais do paciente a ser tratado.

[00264] Uma "quantidade terapeuticamente eficaz" ou "quantidade profilaticamente eficaz" inclui também uma quantidade de um agente de RNAi que produz algum efeito local ou sistêmico desejado a uma razão benefício/risco razoável aplicável a qualquer tratamento. Os agentes de RNAi empregues nos métodos da presente invenção podem ser administrados em uma quantidade suficiente para produzir uma razão benefício/risco razoável aplicável a qualquer tratamento.

[00265] O termo "amostra", como usado aqui, inclui uma coleção de fluidos, células, ou tecidos similares isolados de um indivíduo, bem como fluidos, células, ou tecidos presentes dentro de um indivíduo. Exemplos de fluidos biológicos incluem sangue, soro e fluidos serosos, plasma, líquido cefalorraquidiano, fluidos oculares, linfa, urina, saliva, e similares. Amostras de tecidos podem incluir amostras de tecidos, órgãos ou regiões localizadas. Por exemplo podem ser derivadas amostras de órgãos particulares, partes de órgãos, ou fluidos ou células dentro desses órgãos. Em certas modalidades, as amostras podem ser derivadas do fígado (por exemplo, de todo o fígado ou de determinados segmentos do fígado ou certos tipos de células do fígado, tais como, por exemplo, hepatócitos), da retina ou partes da retina (por exemplo, epitélio pigmentar da retina), do sistema nervoso central ou de partes do sistema nervoso central (por exemplo, ventrículos ou plexo coroide), ou do pâncreas ou determinadas células ou partes do pâncreas. Em algumas modalidades, uma "amostra derivada de um indivíduo" se

refere a líquido cefalorraquidiano obtido do indivíduo. Em modalidades preferenciais, uma "amostra derivada de um indivíduo" se refere a sangue ou plasma retirado do indivíduo. Em modalidades adicionais, uma "amostra derivada de um indivíduo" se refere a tecido do fígado (ou seus subcomponentes) ou tecido retinal (ou seus subcomponentes) derivado do indivíduo.

II. RNAs da Invenção

[00266] A presente invenção proporciona RNAs que inibem a expressão de um ou mais genes HBV. Em uma modalidade, o agente de RNAi inclui moléculas de ácido ribonucleico de fita dupla (dsRNA) para inibir a expressão de um gene HBV em uma célula, tal como uma célula dentro de um indivíduo, por exemplo, um mamífero, tal como um ser humano com uma doença associada a HBV, por exemplo, hepatite B crônica. O dsRNA inclui um filamento antissenso tendo uma região de complementaridade que é complementar a pelo menos uma parte de um mRNA formado na expressão de um gene HBV. A região de complementaridade tem cerca de 30 nucleotídeos ou menos em comprimento (por exemplo, cerca de 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, ou 18 nucleotídeos ou menos em comprimento). Após contato com uma célula expressando o gene HBV, o RNAi inibe a expressão do gene HBV em pelo menos cerca de 10 % como avaliado por, por exemplo, um método à base de PCR ou DNA ramificado (bDNA), ou por um método à base de proteínas, tal como por análise de imunofluorescência, usando, por exemplo, transferência de western ou técnicas de citometria de fluxo.

[00267] Um dsRNA inclui dois filamentos de RNA que são complementares e hibridam para formar uma estrutura de dúplice sob condições nas quais o dsRNA será usado. Um filamento de um dsRNA (o filamento antissenso) inclui uma região de complementaridade que é substancialmente complementar, e geralmente totalmente

complementar, a uma sequência alvo. **A sequência alvo pode ser** derivada da sequência de um mRNA formado durante a expressão de um gene HBV. O outro filamento (o filamento senso) inclui uma região que é complementar com o filamento antissenso, tal que as dois filamentos hibridem e formem uma estrutura de dúplex quando combinadas sob condições adequadas. **Como descrito em outro lugar aqui e como conhecido na técnica, as sequências complementares de um dsRNA podem também estar contidas como regiões autocomplementares de uma única molécula de ácido nucleico, em oposição a estarem em oligonucleotídeos separados.**

[00268] Geralmente, a estrutura de dúplex tem entre 15 e 30 pares de bases em comprimento, por exemplo, entre, 15-29, 15-28, 15-27, 15-26, 15-25, 15-24, 15-23, 15-22, 15-21, 15-20, 15-19, 15-18, 15-17, 18-30, 18-29, 18-28, 18-27, 18-26, 18-25, 18-24, 18-23, 18-22, 18-21, 18-20, 19-30, 19-29, 19-28, 19-27, 19-26, 19-25, 19-24, 19-23, 19-22, 19-21, 19-20, 20-30, 20-29, 20-28, 20-27, 20-26, 20-25, 20-24, 20-23, 20-22, 20-21, 21-30, 21-29, 21-28, 21-27, 21-26, 21-25, 21-24, 21-23 ou 21-22 pares de bases em comprimento. Também é contemplado que intervalos e comprimentos intermédios dos intervalos e comprimentos listados acima façam parte da invenção.

[00269] Similarmente, a região de complementaridade **com a sequência alvo** tem entre 15 e 30 nucleotídeos em comprimento, por exemplo, entre 15-29, 15-28, 15-27, 15-26, 15-25, 15-24, 15-23, 15-22, 15-21, 15-20, 15-19, 15-18, 15-17, 18-30, 18-29, 18-28, 18-27, 18-26, 18-25, 18-24, 18-23, 18-22, 18-21, 18-20, 19-30, 19-29, 19-28, 19-27, 19-26, 19-25, 19-24, 19-23, 19-22, 19-21, 19-20, 20-30, 20-29, 20-28, 20-27, 20-26, 20-25, 20-24, 20-23, 20-22, 20-21, 21-30, 21-29, 21-28, 21-27, 21-26, 21-25, 21-24, 21-23, ou 21-22 nucleotídeos em comprimento. Também é contemplado que intervalos e comprimentos intermédios dos intervalos e comprimentos listados acima façam parte

da invenção.

[00270] Em algumas modalidades, o dsRNA tem entre cerca de 15 e cerca de 20 nucleotídeos de comprimento, ou entre cerca de 25 e cerca de 30 nucleotídeos de comprimento. Em geral, o dsRNA é suficientemente longo para servir de substrato para a enzima Dicer. Por exemplo é bem conhecido na técnica que dsRNAs mais longos do que cerca de 21-23 nucleotídeos em comprimento podem servir como substratos para Dicer. Como será reconhecido pelo perito na técnica, a região de um RNA que é alvo de clivagem será muitas vezes parte de uma molécula de RNA maior, muitas vezes uma molécula de mRNA. Onde relevante, uma "parte" de um mRNA alvo é uma sequência contígua de um mRNA alvo de comprimento suficiente para permitir que seja um substrato para clivagem dirigida por RNAi (*isto é*, clivagem através de uma via de RISC).

[00271] Um com perícia na técnica reconhecerá também que a região de dúplex é uma porção funcional primária de um dsRNA, por exemplo, uma região de dúplex de 9 a 36 pares de bases, por exemplo, cerca de 10-36, 11-36, 12-36, 13-36, 14-36, 15-36, 9-35, 10-35, 11-35, 12-35, 13-35, 14-35, 15-35, 9-34, 10-34, 11-34, 12-34, 13-34, 14-34, 15-34, 9-33, 10-33, 11-33, 12-33, 13-33, 14-33, 15-33, 9-32, 10-32, 11-32, 12-32, 13-32, 14-32, 15-32, 9-31, 10-31, 11-31, 12-31, 13-32, 14-31, 15-31, 15-30, 15-29, 15-28, 15-27, 15-26, 15-25, 15-24, 15-23, 15-22, 15-21, 15-20, 15-19, 15-18, 15-17, 18-30, 18-29, 18-28, 18-27, 18-26, 18-25, 18-24, 18-23, 18-22, 18-21, 18-20, 19-30, 19-29, 19-28, 19-27, 19-26, 19-25, 19-24, 19-23, 19-22, 19-21, 19-20, 20-30, 20-29, 20-28, 20-27, 20-26, 20-25, 20-24, 20-23, 20-22, 20-21, 21-30, 21-29, 21-28, 21-27, 21-26, 21-25, 21-24, 21-23 ou 21-22 pares de bases. Assim, em uma modalidade, tanto quanto é processada em um dúplex funcional, por exemplo, de 15-30 pares de bases, que tem como alvo um RNA desejado para clivagem, uma molécula de RNA ou complexo de

moléculas de RNA com uma região de dúplex maior do que 30 pares de bases é um dsRNA. Assim, um perito na técnica reconhecerá que, em uma modalidade, um mRNAi é um dsRNA. Em outra modalidade, um dsRNA não é um mRNAi ocorrendo naturalmente. Em outra modalidade, um agente de RNAi útil para se dirigir à expressão de HBV não é gerado na célula alvo por clivagem de um dsRNA maior.

[00272] Um dsRNA como descrito aqui também pode incluir uma ou mais protuberâncias nucleotídicas de filamento único, por exemplo, 1, 2, 3, ou 4 nucleotídeos. dsRNAs possuindo pelo menos uma protuberância nucleotídica podem ter propriedades inibidoras inesperadamente superiores relativamente aos seus correspondentes de extremidades coesivas. Uma projeção de nucleotídeo pode compreender ou consistir em um análogo de nucleotídeo/nucleosídeo, incluindo um desóxinucleotídeo/nucleosídeo. A(s) protuberância(s) pode(m) estar no filamento senso, no filamento antissenso ou qualquer combinação dos mesmos. Além disso, o(s) nucleotídeo(s) de uma protuberância pode(m) estar presente(s) na extremidade 5', extremidade 3' ou ambas as extremidades de um filamento antissenso ou senso de um dsRNA.

[00273] Um dsRNA pode ser sintetizado por métodos comuns conhecidos na área como adicionalmente discutido em baixo, por exemplo, usando um sintetizador de DNA automatizado, como os disponibilizados comercialmente, por exemplo, pela Biosearch, Applied Biosystems, Inc.

[00274] Compostos de RNAi da invenção podem ser preparados usando um procedimento em duas etapas. Em primeiro lugar, os filamentos individuais da molécula de RNA de fita dupla são preparadas separadamente. Em seguida, os filamentos componentes são hibridizadas. Os filamentos individuais do composto sRNAi podem ser preparadas usando síntese orgânica em fase de solução ou fase sólida

ou ambas. A síntese orgânica oferece a vantagem de os filamentos oligonucleotídicas compreendendo nucleotídeos não naturais ou modificados poderem ser facilmente preparados. Oligonucleotídeos de filamento único da invenção podem ser preparados usando síntese orgânica em fase de solução ou fase sólida ou ambas.

[00275] Em um aspecto, um dsRNA da invenção inclui pelo menos duas sequências de nucleotídeos, uma sequência senso e uma sequência antissenso. O filamento senso é selecionado do grupo de sequências proporcionadas em qualquer uma das Tabelas 3, 4, 6, 7, 12, 13, 22, 23, 25 e 26, e a correspondente filamento antissenso do filamento senso é selecionado do grupo de sequências de qualquer uma das Tabelas 3, 4, 6, 7, 12, 13, 22, 23, 25 e 26. Neste aspecto, uma das duas sequências é complementar com a outra das duas sequências, com uma das sequências sendo substancialmente complementar com uma sequência de um mRNA gerado na expressão de um gene HBV. Como tal, neste aspecto, um dsRNA incluirá dois oligonucleotídeos, onde um oligonucleotídeo é descrito como o filamento senso em qualquer uma das Tabelas 3, 4, 6, 7, 12, 13, 22, 23, 25 e 26, e o segundo oligonucleotídeo é descrito como o correspondente filamento antissenso do filamento senso em qualquer uma das Tabelas 3, 4, 6, 7, 12, 13, 22, 23, 25 e 26. Em uma modalidade, as sequências substancialmente complementares do dsRNA estão contidas em oligonucleotídeos separados. Em outra modalidade, as sequências substancialmente complementares do dsRNA estão contidas em um único oligonucleotídeo.

[00276] Será entendido que, embora algumas das sequências nas Tabelas 3, 4, 6, 7, 12, 13, 22, 23, 25 e 26 sejam descritas como sequências modificadas e/ou conjugadas, o RNA do RNAi da invenção, por exemplo, um dsRNA da invenção, pode compreender qualquer uma das sequências apresentadas nas Tabelas 3, 4, 6, 7, 12, 13, 22, 23, 25

e 26 que seja não modificada, não conjugada, e/ou modificada e/ou conjugada diferentemente do que descrito aí.

[00277] A pessoa perita está bem ciente de que dsRNAs tendo uma estrutura de dúplex de entre 20 e 23 pares de bases, por exemplo, 21 pares de bases, têm sido aclamados como particularmente eficazes na indução da interferência de RNA (Elbashir *et al.*, *EMBO* 2001, 20:6877-6888). No entanto, outros descobriram que estruturas de dúplex de RNA mais curtas ou mais longas podem ser também eficazes (Chu and Rana (2007) *RNA* 14:1714-1719; Kim *et al.* (2005) *Nat Biotech* 23:222-226). Nas modalidades descritas acima, em virtude da natureza das sequências de oligonucleotídeos proporcionadas em qualquer uma das Tabelas 3, 4, 6, 7, 12, 13, 22, 23, 25 e 26, os dsRNAs descritos aqui podem incluir pelo menos um filamento com um comprimento mínimo de 21 nucleotídeos. Pode ser razoavelmente esperado que dúplexes mais curtos tendo uma das sequências de qualquer uma das Tabelas 3, 4, 6, 7, 12, 13, 22, 23, 25 e 26 menos apenas alguns nucleotídeos em uma das ou ambas as extremidades possam ser similarmente eficazes em comparação com os dsRNAs descritos acima. Consequentemente, os dsRNAs tendo uma sequência com pelo menos 15, 16, 17, 18, 19, 20, ou mais nucleotídeos contíguos derivados de uma das sequências de de qualquer uma das Tabelas 3, 4, 6, 7, 12, 13, 22, 23, 25 e 26, e diferindo na sua capacidade de inibir a expressão de um gene HBV por não mais do que cerca de 5, 10, 15, 20, 25, ou 30% de inibição de um dsRNA compreendendo a sequência completa, estão contemplados para estarem dentro do escopo da presente invenção.

[00278] Adicionalmente, os RNAs proporcionados em qualquer uma das Tabelas 3, 4, 6, 7, 12, 13, 22, 23, 25 e 26 identificam um local(ais) em um transcrito de HBV que é (são) suscetível(eis) a clivagem mediada por RISC. Como tal, a presente invenção apresenta adicionalmente RNAs que têm como alvo um desses sítios. Como usado aqui, se diz

que um RNAi se dirige a um sítio particular de um transcrito de RNA se o RNAi promover a clivagem do transcrito em qualquer parte dentro desse sítio particular. Um tal RNAi incluirá geralmente pelo menos cerca de 15 nucleotídeos contíguos de uma das sequências proporcionadas em **qualquer uma das Tabelas 3, 4, 6, 7, 12, 13, 22, 23, 25 e 26** acoplados a sequências de nucleotídeos adicionais tomadas da região contígua à sequência selecionada em um gene HBV.

[00279] Apesar de uma sequência alvo ter geralmente cerca de 15-30 nucleotídeos de comprimento, há uma grande variação na conveniência de sequências particulares em essa gama para dirigir a clivagem de qualquer RNA alvo determinado. Vários pacotes de *software* e as linhas de orientação apresentados aqui proporcionam orientação para a identificação de sequências alvo ótimas para qualquer alvo de genes dado, mas pode ser também tomada uma abordagem empírica na qual uma "janela" ou "máscara" de um dado tamanho (como um exemplo não limitante, 21 nucleotídeos) é literal ou figurativamente (incluindo, por exemplo, *in silico*) colocada na sequência de RNA alvo para identificar sequências na gama de tamanhos que possam servir como sequências alvo. Ao se mover a "janela" da sequência progressivamente um nucleotídeo a montante ou a jusante de uma localização inicial da sequência alvo, a próxima sequência alvo potencial pode ser identificada, até ser identificado o conjunto completo de sequências possíveis para qualquer tamanho alvo selecionado dado. Este processo, acoplado a síntese sistemática e teste das sequências identificadas (usando ensaios como descrito aqui ou como conhecido na técnica) para identificar aquelas sequências que têm um desempenho ótimo, pode identificar aquelas sequências de RNA que, quando são dirigidas por um agente de RNAi, medeiam a melhor inibição da expressão do gene alvo. Assim, enquanto as sequências identificadas, por exemplo, em **em qualquer uma das Tabelas 3, 4, 6,**

7, 12, 13, 22, 23, 25 e 26 representam sequências alvo efetivas, é contemplado que pode ser alcançada otimização adicional da eficácia da inibição ao progressivamente "caminhar na janela" um nucleotídeo a montante ou a jusante das sequências dadas para identificar sequências com características de inibição iguais ou melhores.

[00280] Adicionalmente é contemplado que, para qualquer sequência identificada, por exemplo, em em qualquer uma das Tabelas 3, 4, 6, 7, 12, 13, 22, 23, 25 e 26, poderia ser alcançada otimização adicional por adição ou remoção sistemática de nucleotídeos para gerar sequências mais longas ou mais curtas e teste dessas sequências geradas ao caminhar em uma janela do tamanho maior ou menor para cima ou para baixo do RNA alvo a partir desse ponto. Mais uma vez, acoplar essa abordagem de geração de novos alvos candidatos ao teste de eficácia de RNAs com base naquelas sequências alvo em um ensaio de inibição conhecido na área e/ou descrito aqui pode conduzir a aperfeiçoamentos adicionais da eficiência da inibição. Ainda adicionalmente, tais sequências otimizadas podem ser ajustadas, por exemplo, pela introdução de nucleotídeos modificados como descrito aqui ou conhecido na área, adição ou alterações em protuberâncias, ou outras modificações conhecidas na área e/ou discutidas aqui para otimizar adicionalmente a molécula (por exemplo, aumentando a estabilidade no soro ou semivida em circulação, aumentando a estabilidade térmica, intensificando a distribuição transmembranar, dirigindo para uma localização ou tipo de célula particular, aumentando a interação com enzimas da via de silenciamento, aumentando a liberação a partir de endossomos) como inibidor da expressão.

[00281] Um RNAi como descrito aqui pode conter uma ou mais incompatibilidades com a sequência alvo. Em uma modalidade, um RNAi como descrito aqui contém não mais do que 3

incompatibilidades. Se o filamento antissenso do RNAi
contiver incompatibilidades com uma sequência alvo, é preferível
que a área dos emparelhamentos defeituosos não esteja localizada
no centro da região de complementaridade. Se o filamento
antissenso do RNAi contiver incompatibilidades com a sequência
alvo é preferencial que a incompatibilidade esteja restrita aos
últimos 5 nucleotídeos a partir da extremidade 5' ou 3' da região de
complementaridade. Por exemplo, para um agente de RNAi de 23
nucleotídeos, o filamento que é complementar com uma região de
um gene HBV não contém geralmente qualquer incompatibilidade
dentro dos 13 nucleotídeos centrais. Os métodos descritos aqui ou
métodos conhecidos na técnica podem ser usados para determinar
se um RNAi contendo uma incompatibilidade com uma sequência
alvo é eficaz na inibição da expressão de um gene HBV. A
consideração da eficácia de RNAs com incompatibilidades na
inibição da expressão de um gene HBV é importante,
especialmente se se souber que a região de complementaridade
particular em um gene HBV tem variação de sequências
polimórficas dentro da população.

III. RNAs Modificados da Invenção

[00282] Em uma modalidade, o RNA do RNAi da invenção, por exemplo, um dsRNA, não é modificado, e não compreende, por exemplo, modificações e/ou conjugações químicas conhecidas na técnica e descritas aqui. Em outra modalidade, o RNA de um RNAi da invenção, por exemplo, um dsRNA, é quimicamente modificado para intensificar a estabilidade ou outras características benéficas. Em certas modalidades da invenção, substancialmente todos os nucleotídeos de um RNAi da invenção são modificados. Em outras modalidades da invenção, substancialmente todos os nucleotídeos de um RNAi da invenção são modificados. Os RNAs da invenção nos quais

"substancialmente todos os nucleotídeos são modificados" são grandemente mas não inteiramente modificados e podem incluir não mais do que 5, 4, 3, 2, ou 1 nucleotídeos não modificados.

[00283] Os ácidos nucleicos apresentados na invenção podem ser sintetizados e/ou modificados por métodos bem estabelecidos na técnica, tais como aqueles descritos em "Current protocols in nucleic acid chemistry," Beaucage, S.L. *et al.* (Edrs.), John Wiley & Sons, Inc., New York, NY, USA que é deste modo incorporado aqui por referência. As modificações incluem, por exemplo, modificações nas extremidades, por exemplo, modificações da extremidade 5' (fosforilação, conjugação, ligações invertidas) ou modificações da extremidade 3' (conjugação, nucleotídeos de DNA, ligações invertidas, *etc.*); modificações de bases, por exemplo, substituição com bases estabilizadoras, bases desestabilizadoras, ou bases que formam pares de bases com um repertório expandido de parceiros, remoção de bases (nucleotídeos abásicos), ou bases conjugadas; modificações de açúcares (por exemplo, na posição 2' ou posição 4') ou substituição do açúcar; e/ou modificações da estrutura principal, incluindo modificação ou substituição das ligações fosfodiéster. Exemplos específicos de compostos de RNAi úteis nas modalidades descritas aqui incluem mas não estão limitados a RNAs contendo estruturas principais modificadas ou sem ligações internucleosídicas naturais. RNAs tendo estruturas principais modificadas incluem, entre outros, aqueles que não têm um átomo de fósforo na estrutura principal. Para os propósitos desta especificação, e como por vezes dito na técnica, RNAs modificados que não têm um átomo de fósforo em sua estrutura principal internucleosídica podem ser também considerados como sendo oligonucleosídeos. Em algumas modalidades, um RNAi modificado terá um átomo de fósforo na sua estrutura principal internucleosídica.

[00284] Estruturas principais de RNA modificado incluem, por

exemplo, fosforotioatos, fosforotioatos quirais, fosforoditioatos, fosfotriésteres, aminoalquilfosfotriésteres, metil e outros alquil fosfonatos, incluindo 3'-alquilenos fosfonatos e fosfonatos quirais, fosfinatos, fosforamidatos, incluindo 3'-amino fosforamidato e aminoalquilfosforamidatos, tionofosforamidatos, tionoalquilfosfonatos, tionoalquilfosfotriésteres, e boranofosfatos com ligações normais 3'-5', análogos 2'-5'-ligados destes, e aqueles com polaridade invertida em que os pares adjacentes de unidades nucleosídicas estão ligados 3'-5' para 5'-3' ou 2'-5' para 5'-2'. Vários sais, sais mistos e formas de ácido livre estão também incluídos.

[00285] Patentes dos E.U.A. representativas que ensinam a preparação das ligações contendo fósforo acima incluem, mas não estão limitadas às Patentes dos E.U.A. N^{os}. 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 dos E.U.A. RE39464, em que a totalidade do conteúdo de cada uma é desse modo incorporada aqui a título de referência.

[00286] Estruturas principais de RNA modificado que não incluem um átomo de fósforo são estruturas principais que são formadas por ligações internucleosídicas de alquila ou cicloalquila de cadeia curta, heteroátomos mistos e ligações internucleosídicas de alquila ou cicloalquila, ou uma ou mais ligações internucleosídicas heteroatômicas ou heterocíclicas de cadeia curta. Estas incluem aquelas tendo ligações morfolino (formadas em parte a partir da porção de açúcar de um

nucleosídeo); estruturas principais de siloxano; estruturas principais de sulfureto, sulfóxido e sulfona; estruturas principais de formacetila e tioformacetila; estruturas principais de metileno formacetila e tioformacetila; estruturas principais contendo alqueno; estruturas principais de sulfamato; estruturas principais de metilenoimino e metilenohidrazino; estruturas principais de sulfonato e sulfonamida; estruturas principais de amida; e outras tendo partes mistas dos componentes N, O, S e CH₂.

[00287] Patentes dos E.U.A. representativas que ensinam a preparação dos oligonucleosídeos acima incluem mas não estão limitadas às Patentes dos E.U.A. N^os. 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, em que a totalidade do conteúdo de cada uma é desse modo incorporada aqui a título de referência.

[00288] Em outras modalidades, miméticos de RNA adequados são contemplados para utilização em RNAs, em que tanto o açúcar como a ligação internucleosídica, isto é, a estrutura principal, das unidades nucleotídicas são substituídos por grupos novos. As unidades de base são mantidas para hibridação com um composto alvo de ácido nucleico apropriado. Um tal composto oligomérico, um mimético de RNA que se mostrou que tem excelentes propriedades de hibridação, é dito como ácido nucleico de peptídeo (PNA). Em compostos de PNA, a estrutura principal de açúcar de um RNA está substituída por uma estrutura principal contendo amida, em particular uma estrutura principal de aminoetilglicina. As nucleobases são retidas e são ligadas diretamente ou indiretamente a átomos de nitrogênio aza da porção amida da estrutura principal. Patentes dos E.U.A. representativas que ensinam a

preparação de compostos de PNA incluem as, mas não estão limitadas às, Patentes dos E.U.A. N^{os} 5.539.082; 5.714.331; e 5.719.262, os conteúdos inteiros de cada uma das quais são deste modo incorporados aqui por referência. Compostos de PNA adicionais adequados para uso nos RNAs da invenção são descritos em, por exemplo, Nielsen *et al.*, *Science*, 1991, 254, 1497-1500.

[00289] Algumas modalidades apresentadas na invenção incluem RNAs com estruturas principais fosforotioato e oligonucleosídeos com estruturas principais heteroatômicas, e em particular --CH₂--NH--CH₂-, -CH₂--N(CH₃)--O--CH₂--[chamada de estrutura 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 estrutura principal fosfodiéster nativa é representada por --O--P--O--CH₂--] da Patente dos E.U.A. N^o 5,489,677 acima dita, e as estruturas principais de amida da Patente dos E.U.A. N^o 5,602,240 acima dita. Em algumas modalidades, os RNAs apresentados aqui têm estruturas da estrutura principal de morfolino da Patente dos E.U.A. N^o 5,034,506 acima referenciada.

[00290] RNAs modificados também podem conter uma ou mais frações de açúcar substituídas. Os RNAs, por exemplo, dsRNAs, apresentados aqui podem incluir um dos seguintes 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, alquenila e alquinila podem ser alquila C₁ a C₁₀ ou alquenila e alquinila C₂ a C₁₀ substituídas ou não substituídas. Modificações adequadas exemplificativas incluem O[(CH₂)_nO]_mCH₃, O(CH₂)_nOCH₃, O(CH₂)_nNH₂, O(CH₂)_nCH₃, O(CH₂)_nONH₂, e O(CH₂)_nON[(CH₂)_nCH₃]₂, onde n e m são de 1 a cerca de 10. Em outras modalidades, os dsRNAs incluem um dos seguintes 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 melhoria das propriedades farmacocinéticas de um RNAi, ou um grupo para melhoria das propriedades farmacodinâmicas de um RNAi, e outros substituintes tendo propriedades similares. Em algumas modalidades, a modificação inclui um 2'-metoxietóxi (2'-O--CH₂CH₂OCH₃, também conhecido como 2'-O-(2-metoxietil) ou 2'-MOE) (Martin *et al.*, *Helv. Chim. Acta*, 1995, 78:486-504) isto é, um grupo alcóxi-alcóxi. Outra modificação exemplificativa é 2'-dimetilaminoxietóxi, isto é, um grupo O(CH₂)₂ON(CH₃)₂, também conhecido como 2'-DMAOE, como descrito aqui nos exemplos em baixo, e 2'-dimetilaminoetoxietóxi (também conhecido na técnica como 2'-O-dimetilaminoetoxietila ou 2'-DMAEOE), isto é, 2'-O--CH₂--O--CH₂--N(CH₂)₂.

[00291] Outras modificações incluem 2'-metóxi (2'-OCH₃), 2'-aminopropóxi (2'-OCH₂CH₂CH₂NH₂) e 2'-flúor (2'-F). Modificações similares podem ser também feitas em outras posições do RNA de um RNAi, em particular na posição 3' do açúcar no nucleotídeo 3' terminal ou em dsRNAs ligados em 2'-5' e na posição 5' do nucleotídeo 5' terminal. Os RNAis podem ter também miméticos de açúcar tais como frações de ciclobutila em lugar do açúcar de pentofuranosila. Patentes dos E.U.A. representativas que ensinam a preparação de tais estruturas de açúcares modificadas incluem as mas não estão limitadas às, Patentes dos E.U.A. N^{os}. 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, em que algumas são propriedade comum com o presente pedido. Os conteúdos inteiros de cada uma das anteriores são deste modo incorporados aqui por referência.

[00292] Um RNAi pode também incluir modificações ou substituições de nucleobases (frequentemente ditas na técnica simplesmente como "base"). Como usado aqui, nucleobases "não modificadas" ou "naturais" incluem as bases de purina adenina (A) e guanina (G), e as bases de pirimidina timina (T), citosina (C) e uracila (U). Nucleobases modificadas incluem outras nucleobases sintéticas e naturais tais como desóxi-timina (dT), 5-metilcitosina (5-me-C), citosina de 5-hidroximetila, xantina, hipoxantina, 2-aminoadenina, derivados de 6-metila e outros de alquila de adenina e guanina, derivados de 2-propila e outros de alquila de adenina e guanina, 2-tiouracila, 2-tiotimina e 2-tiocitosina, 5-halouracila e citosina, uracila e citosina de 5-propinila, uracila de 6-azo, citosina e timina, 5-uracila (pseudouracila), 4-tiouracila, adeninas e guaninas substituídas por 8-halo, 8-amino, 8-tiol, 8-tioalquila, 8-hidroxila e outras em 8, uracilas e citosinas substituídas por 5-halo, particularmente 5-bromo, 5-trifluorometila e outras em 5, 7-metilguanina e 7-metiladenina, 8-azaguanina e 8-azaadenina, 7-desazaguanina e 7-desazaadenina e 3-desazaguanina e 3-desazaadenina. Nucleobases adicionais incluem aquelas divulgadas na Patente dos E.U.A. Nº 3,687,808, aquela divulgadas em Modified Nucleosides in Biochemistry, Biotechnology and Medicine, Herdewijn, P. ed. Wiley-VCH, 2008; aquela divulgadas em The Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering, páginas 858-859, Kroschwitz, J. L, ed. John Wiley & Sons, 1990, aquela divulgadas por Englisch *et al.*, Angewandte Chemie, International Edition, 1991, 30, 613, aquela divulgadas por Sanghvi, Y S., capítulo 15, dsRNA Research and Applications, páginas 289-302, Crooke, S. T. e Lebleu, B., Ed., CRC Press, 1993. Certas destas nucleobases são particularmente úteis para aumento da afinidade de ligação dos compostos oligoméricos apresentados na invenção. Estas incluem pirimidinas substituídas em 5, 6-azapirimidinas e purinas substituídas em N-2, N-6 e O-6, incluindo 2-aminopropiladenina, 5-

propiniluracila e 5-propinilcitosina. Se mostrou que as substituições de 5-metilcitosina aumentam a estabilidade de dúplexes de ácidos nucleicos em 0,6-1,2 °C (Sanghvi, Y. S., Crooke, S. T. e Lebleu, B., Eds., dsRNA Research and Applications, CRC Press, Boca Raton, 1993, págs. 276-278) e são substituições de bases exemplificativas, ainda mais particularmente quando combinadas com modificações de açúcar de 2'-O-metoxietila.

[00293] Patentes dos E.U.A. representativas que ensinam a preparação de algumas das nucleobases modificadas acima notadas, bem como de outras nucleobases modificadas, incluem mas não estão limitadas às Patentes dos E.U.A. acima notadas N^os. 3.687.808, 4.845.205; 5.130.30; 5.134.066; 5.175.273; 5.367.066; 5.432.272; 5.457.187; 5.459.255; 5.484.908; 5.502.177; 5.525.711; 5.552.540; 5.587.469; 5.594.121, 5.596.091; 5.614.617; 5.681.941; 5.750.692; 6.015.886; 6.147.200; 6.166.197; 6.222.025; 6.235.887; 6.380.368; 6.528.640; 6.639.062; 6.617.438; 7.045.610; 7.427.672; e 7.495.088, em que a totalidade do conteúdo de cada uma é desse modo incorporada aqui a título de referência.

[00294] O RNA de um RNAi pode ser também modificado para incluir uma ou mais frações de açúcar bicíclicas. Um "açúcar bicíclico" é um anel furanosil modificado pela ligação de dois átomos. Um "nucleosídeo bicíclico" ("BNA") é um nucleosídeo possuindo uma fração de açúcar compreendendo uma ponte que liga dois átomos de carbono do anel de açúcar, formando assim um sistema de anel bicíclico. Em certas modalidades, a ponte liga o carbono 4' e o carbono 2' do anel de açúcar. Assim, em algumas modalidades um agente da invenção pode incluir um ou mais ácidos nucleicos trancados (LNA). Um ácido nucleico trancado é um nucleotídeo tendo uma fração de ribose modificada na qual a fração de ribose compreende uma ponte extra conectando os carbonos 2' e 4'. Em outras palavras, um LNA é um nucleotídeo que

compreende uma fração de açúcar bicíclica compreendendo uma ponte 4'-CH₂-O-2'. Esta estrutura "tranca" efetivamente a ribose na conformação estrutural 3'-endo. Se mostrou que a adição de ácidos nucleicos trancados a sRNAi aumenta a estabilidade de sRNAi no soro, e reduz os efeitos fora do alvo (Elmen, J. *et al.*, (2005) *Nucleic Acids Research* 33(1):439-447; Mook, OR. *et al.*, (2007) *Mol Canc Ther* 6(3):833-843; Grunweller, A. *et al.*, (2003) *Nucleic Acids Research* 31(12):3185-3193). Exemplos de nucleosídeos bicíclicos para utilização nos polinucleotídeos da invenção incluem, sem limitação, nucleosídeos compreendendo uma ponte entre os átomos 4' e o 2' no anel ribosil. Em certas modalidades, os agentes de polinucleotídeos antissenso da invenção incluem um ou mais nucleosídeos bicíclicos compreendendo uma ponte 4' para 2'. Exemplos de tais nucleosídeos bicíclicos ligados 4' para 2', incluem mas não estão limitados a 4'-(CH₂)—O-2' (LNA); 4'-(CH₂)—S-2'; 4'-(CH₂)₂—O-2' (ENA); 4'-CH(CH₃)—O-2' (também dito como "etila limitada" ou "cEt") e 4'-CH(CH₂OCH₃)—O-2' (e seus análogos; ver, por exemplo, Patente dos E.U.A. Nº 7,399,845); 4'-C(CH₃)(CH₃)—O-2' (e seus análogos, ver por exemplo, Patente dos E.U.A. Nº 8,278,283); 4'-CH₂—N(OCH₃)-2' (e seus análogos, ver por exemplo, Patente dos E.U.A. Nº 8,278,425); 4'-CH₂—O—N(CH₃)-2' (ver, por exemplo, Publicação de Patente dos E.U.A. Nº 2004/0171570); 4'-CH₂—N(R)—O-2', em que R é H, alquila C1-C12, ou um grupo protetor (ver, por exemplo, Patente dos E.U.A. Nº 7,427,672); 4'-CH₂—C(H)(CH₃)-2' (ver, por exemplo, Chattopadhyaya *et al.*, *J. Org. Chem.*, 2009, 74, 118-134); e 4'-CH₂—C(=CH₂)-2' (e seus análogos; ver, por exemplo, a Patente dos E.U.A. Nº 8,278,426). Os conteúdos inteiros de cada uma das anteriores são deste modo incorporados aqui por referência.

[00295] Patentes dos E.U.A. e Publicações de Patente dos E.U.A. representativas adicionais que ensinam a preparação de

nucleotídeos de ácidos nucleicos trancados incluem as, mas não estão limitadas às, seguintes: Patentes dos E.U.A. N^{os} 6.268.490; 6.525.191; 6.670.461; 6.770.748; 6.794.499; 6.998.484; 7.053.207; 7.034.133; 7.084.125; 7.399.845; 7.427.672; 7.569.686; 7.741.457; 8.022.193; 8.030.467; 8.278.425; 8.278.426; 8.278.283; E.U.A. 2008/0039618; e E.U.A. 2009/0012281, os conteúdos de cada uma das quais estão deste modo incorporados aqui por referência.

[00296] Qualquer um dos nucleosídeos bicíclicos anteriores podem ser preparados tendo uma ou mais configurações estereoquímicas de açúcar incluindo, por exemplo, α -L-ribofuranose e β -D-ribofuranose (ver WO 99/14226).

[00297] O RNA de um RNAi pode ser também modificado para incluir um ou mais nucleotídeos de etila constritos. Tal como aqui utilizado, um "nucleotídeo de etila constrito" ou "cEt" é um ácido nucleico trancado compreendendo uma fração de açúcar bicíclico compreendendo uma ponte 4'-CH(CH₃)-O-2'. Em uma modalidade, um nucleotídeo de etila constrito está na conformação S aqui dito como "S-cEt".

[00298] Um RNAi da invenção também pode incluir um ou mais "nucleotídeos restrito de forma adaptáveis" ("CRN"). Os CRN são análogos de nucleotídeos com um ligante fazendo a ligação dos carbonos C2' e C4' da ribose ou os carbonos C3 e C5' da ribose. Os CRN trancam o anel de ribose em uma conformação estável e aumentam a afinidade de hibridação com o mRNA. O ligante é de comprimento suficiente para colocar o oxigênio em uma posição ótima para a estabilidade e afinidade, resultando em menos pregueamento do anel de ribose.

[00299] Publicações representativas que ensinam a preparação de certos CRN acima notados incluem as, mas não estão limitadas às, Patentes dos E.U.A. N^o 2013/0190383; e publicação PCT WO 2013/036868, os conteúdos de cada uma das quais estão deste modo

incorporados aqui por referência.

[00300] Um ou mais dos nucleotídeos de um RNAi da invenção podem também incluir um nucleotídeo substituído por hidroximetila. Um "nucleotídeo substituído por hidroximetila" é um nucleotídeo acíclico 2'-3'-seco, também dito como uma modificação de "ácido nucleico desbloqueado" ("UNA").

[00301] Publicações dos E.U.A. representativas que ensinam a preparação de UNA incluem, mas não estão limitadas às, Patente dos E.U.A. Nº 8,314,227; e Publicação de Patente dos E.U.A. Nºs. 2013/0096289; 2013/0011922; e 2011/0313020, os conteúdos de cada uma das quais estão deste modo incorporados aqui por referência.

[00302] Modificações potencialmente estabilizantes às extremidades de moléculas de RNA podem incluir N-(acetilaminocaproíl)-4-hidroxirolinol (Hyp-C6-NHAc), N-(caproíl)-4-hidroxirolinol (Hyp-C6), N-(acetil)-4-hidroxirolinol (Hyp-NHAc), timidina-2'-O-desoxitimidina (éter), N-(aminocaproíl)-4-hidroxirolinol (Hyp-C6-amino), 2-docosanoil-uridino-3"-fosfato, dT de base invertida (idT) e outras. A divulgação desta modificação pode ser encontrada na Publicação PCT Nº WO 2011/005861.

[00303] Outras modificações dos nucleotídeos de um RNAi da invenção incluem um 5' fosfato ou imitador de 5' fosfato, por exemplo, um fosfato de terminal 5' ou imitador de fosfato no filamento antissenso de um agente de RNAi. Mímicos de fosfato adequados são divulgados em, por exemplo Publicação de Patente dos E.U.A. Nº 2012/0157511, cuja totalidade do conteúdo é aqui incorporada por referência.

A. RNAis Modificados Compreendendo Motivos da Invenção

[00304] Em certos aspectos da invenção, os agentes de RNAi de fita dupla da invenção incluem agentes com modificações químicas como divulgado, por exemplo, na WO 2013/075035 depositada em 16 de novembro de 2012, cuja totalidade do conteúdo é aqui incorporada por

referência. Como mostrado aqui e na Publicação PCT N° WO 2013/075035 pode ser obtido um resultado superior por introdução de um ou mais motivos de três modificações idênticas em três nucleotídeos consecutivos em um filamento senso e/ou filamento antissenso de um agente de RNAi, particularmente no ou próximo do local de clivagem. Em algumas modalidades, o filamento senso e o filamento antissenso do agente de RNAi podem estar de outro modo completamente modificadas. A introdução destes motivos interrompe o padrão de modificação, se presente, do filamento senso e/ou antissenso. O agente de RNAi pode estar opcionalmente conjugado com um ligante derivado de GalNAc, por exemplo no filamento senso. Os agentes de RNAi resultantes apresentam atividade de silenciamento de gene superior.

[00305] Mais especificamente foi surpreendentemente descoberto que, quando o filamento senso e filamento antissenso do agente de RNAi de fita dupla estão completamente modificados para terem um ou mais motivos de três modificações idênticas em três nucleotídeos consecutivos no ou próximo do local de clivagem de pelo menos um filamento de um agente de RNAi, a atividade de silenciamento de gene do agente de RNAi era superiormente intensificada.

[00306] Em conformidade, a invenção fornece agentes de RNAi de fita dupla capazes de inibirem a expressão de um gene alvo (isto é, um gene HBV) *in vivo*. O agente de RNAi compreende um filamento senso e um filamento antissenso. Cada filamento do agente de RNAi pode variar de 12-30 nucleotídeos em comprimento. Por exemplo, cada filamento pode ter entre 14-30 nucleotídeos em comprimento, 17-30 nucleotídeos em comprimento, 25-30 nucleotídeos em comprimento, 27-30 nucleotídeos em comprimento, 17-23 nucleotídeos em comprimento, 17-21 nucleotídeos em comprimento, 17-19 nucleotídeos em comprimento, 19-25 nucleotídeos em comprimento, 19-23 nucleotídeos em comprimento, 19-21 nucleotídeos em comprimento,

21-25 nucleotídeos em comprimento, ou 21-23 nucleotídeos em comprimento.

[00307] O filamento senso e filamento antissenso formam tipicamente um RNA de fita dupla em dúplex ("dsRNA"), também dito aqui como um "agente de RNAi". A região de dúplex de um agente de RNAi pode ter 12-30 pares de nucleotídeos em comprimento. Por exemplo, a região de dúplex pode ter entre 14-30 pares de nucleotídeos em comprimento, 17-30 pares de nucleotídeos em comprimento, 27-30 pares de nucleotídeos em comprimento, 17-23 pares de nucleotídeos em comprimento, 17-21 pares de nucleotídeos em comprimento, 17-19 pares de nucleotídeos em comprimento, 19-25 pares de nucleotídeos em comprimento, 19-23 pares nucleotídeos em comprimento, 19-21 pares de nucleotídeos em comprimento, 21-25 pares de nucleotídeos em comprimento, ou 21-23 pares de nucleotídeos em comprimento. Em outro exemplo, a região de dúplex é selecionada de 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, e 27 nucleotídeos em comprimento.

[00308] Em uma modalidade, o agente de RNAi pode conter uma ou mais regiões de projeção e/ou grupos *capping* na extremidade 3', extremidade 5', ou ambas as extremidades de um dos ou ambos os filamentos. A projeção pode ter 1-6 nucleotídeos em comprimento, 2-6 nucleotídeos em comprimento, 1-5 nucleotídeos em comprimento, 2-5 nucleotídeos em comprimento, 1-4 nucleotídeos em comprimento, 2-4 nucleotídeos em comprimento, 1-3 nucleotídeos em comprimento, 2-3 nucleotídeos em comprimento, ou 1-2 nucleotídeos em comprimento. As projeções podem ser o resultado de um filamento sendo mais longo do que o outro, ou o resultado de dois filamentos do mesmo comprimento estando escalonados. A projeção pode formar uma incompatibilidade com o mRNA alvo ou pode ser complementar com as sequências de gene sendo dirigidas ou pode ser outra sequência. Os primeiro e segundo filamentos podem ser também unidos, por exemplo,

por bases adicionais para formar uma estrutura em grampo, ou por outros ligantes não de base.

[00309] Em uma modalidade, os nucleotídeos na região de projeção do agente de RNAi podem ser cada um independentemente um nucleotídeo modificado ou não modificado incluindo, mas não limitado a, modificado por açúcar em 2', tal como 2-F, 2'-Ometila, timidina (T), 2'-O-metoxietil-5-metiluridina (Teo), 2'-O-metoxietiladenosina (Aeo), 2'-O-metoxietil-5-metilcitidina (m5Ceo), e quaisquer suas combinações. Por exemplo, TT pode ser uma sequência de projeção para qualquer extremidade em qualquer filamento. A projeção pode formar uma incompatibilidade com o mRNA alvo ou pode ser complementar com as sequências de gene sendo dirigidas ou pode ser outra sequência.

[00310] As projeções 5' ou 3' no filamento senso, filamento antissenso ou ambos os filamentos do agente de RNAi podem estar fosforilados. Em algumas modalidades, a(s) região(ões) de projeção contém(êm) dois nucleotídeos tendo um fosforotioato entre os dois nucleotídeos, onde os dois nucleotídeos podem ser os mesmos ou diferentes. Em uma modalidade, a projeção está presente na extremidade 3' do filamento senso, filamento antissenso, ou ambos os filamentos. Em uma modalidade, esta projeção 3' está presente no filamento antissenso. Em uma modalidade, esta projeção 3' está presente no filamento senso.

[00311] O agente de RNAi pode conter apenas uma única projeção, que pode fortalecer a atividade de interferência do RNAi, sem afetar a sua estabilidade global. Por exemplo, a projeção de filamento único pode estar localizada na extremidade 3'-terminal do filamento senso ou, alternativamente, na extremidade 3'-terminal do filamento antissenso. O RNAi pode ter também uma extremidade cega, localizada na extremidade 5' do filamento antissenso (ou da extremidade 3' do filamento senso) ou *vice-versa*. Geralmente, o filamento antissenso do

RNAi tem uma projeção de nucleotídeos na extremidade 3', e a extremidade 5' é cega. Embora não desejando estar limitado pela teoria, a extremidade cega assimétrica na extremidade 5' do filamento antissenso e projeção na extremidade 3' do filamento antissenso favorece a carga do filamento guia no processo de RISC.

[00312] Em uma modalidade, o agente de RNAi é um bluntmer de extremidade dupla de 19 nucleotídeos em comprimento, em que o filamento senso contém pelo menos um motivo de três modificações de 2'-F em três nucleotídeos consecutivos nas posições 7, 8, 9 a partir da extremidade 5'. O filamento antissenso contém pelo menos um motivo de três modificações de 2'-O-metila em três nucleotídeos consecutivos nas posições 11, 12, 13 a partir da extremidade 5'.

[00313] Em uma modalidade, o agente de RNAi é um bluntmer de extremidade dupla de 20 nucleotídeos em comprimento, em que o filamento senso contém pelo menos um motivo de três modificações de 2'-F em três nucleotídeos consecutivos nas posições 8, 9, 10 a partir da extremidade 5'. O filamento antissenso contém pelo menos um motivo de três modificações de 2'-O-metila em três nucleotídeos consecutivos nas posições 11, 12, 13 a partir da extremidade 5'.

[00314] Em uma modalidade, o agente de RNAi é um bluntmer de extremidade dupla de 21 nucleotídeos em comprimento, em que o filamento senso contém pelo menos um motivo de três modificações de 2'-F em três nucleotídeos consecutivos nas posições 9, 10, 11 a partir da extremidade 5'. O filamento antissenso contém pelo menos um motivo de três modificações de 2'-O-metila em três nucleotídeos consecutivos nas posições 11, 12, 13 a partir da extremidade 5'.

[00315] Em uma modalidade, o agente de RNAi compreende um filamento senso de 21 nucleotídeos e um filamento antissenso de 23 nucleotídeos, em que o filamento senso contém pelo menos um motivo de três modificações de 2'-F em três nucleotídeos consecutivos nas

posições 9, 10, 11 a partir da extremidade 5'; o filamento antissenso contém pelo menos um motivo de três modificações de 2'-O-metila em três nucleotídeos consecutivos nas posições 11, 12, 13 a partir da extremidade 5', em que uma extremidade do agente de RNAi é cega, enquanto a outra extremidade compreende uma projeção de 2 nucleotídeos. Preferencialmente, a projeção de 2 nucleotídeos está na extremidade 3' do filamento antissenso.

[00316] Quando a projeção de 2 nucleotídeos está na extremidade 3' do filamento antissenso podem existir duas ligações de internucleotídeos de fosforotioato entre os três nucleotídeos terminais, em que dois dos três nucleotídeos são os nucleotídeos da projeção, e o terceiro nucleotídeo é um nucleotídeo emparelhado próximo do nucleotídeo da projeção. Em uma modalidade, o agente de RNAi tem adicionalmente duas ligações internucleotídicas de fosforotioato entre os três nucleotídeos terminais tanto na extremidade 5' do filamento senso como na extremidade 5' do filamento antissenso. Em uma modalidade, todos os nucleotídeos no filamento senso e filamento antissenso do agente de RNAi, incluindo os nucleotídeos que são parte dos motivos, são nucleotídeos modificados. Em uma modalidade, cada resíduo está independentemente modificado por um 2'-O-metila ou 3'-flúor, por exemplo, em um motivo alternado. Opcionalmente, o agente de RNAi compreende adicionalmente um ligante (preferencialmente GalNAc₃).

[00317] Em uma modalidade, o agente de RNAi compreende um filamento senso e um antissenso, em que o filamento senso tem 25-30 resíduos de nucleotídeos em comprimento, em que começando a partir do nucleotídeo 5' terminal (posição 1) as posições 1 a 23 do primeiro filamento compreendem pelo menos 8 ribonucleotídeos; o filamento antissenso tem 36-66 resíduos de nucleotídeos em comprimento e, começando a partir do nucleotídeo 3' terminal, compreende pelo menos

8 ribonucleotídeos nas posições emparelhadas com as posições 1-23 do filamento senso para formar um dúplex; em que pelo menos o nucleotídeo 3' terminal do filamento antissenso não está emparelhado com o filamento senso, e até 6 nucleotídeos 3' terminais consecutivos não estão emparelhados com o filamento senso, formando deste modo uma projeção de filamento único 3' de 1-6 nucleotídeos; em que o terminal 5' do filamento antissenso compreende de 10-30 nucleotídeos consecutivos que não estão emparelhados com o filamento senso, formando deste modo uma projeção 5' de fita dupla de 10-30 nucleotídeos; em que pelo menos os nucleotídeos 5' terminal e 3' terminal do filamento senso estão emparelhados em termos de bases com nucleotídeos do filamento antissenso quando os filamentos senso e antissenso são alinhadas para complementaridade máxima, formando deste modo uma região substancialmente em dúplex entre os filamentos senso e antissenso; e o filamento antissenso é suficientemente complementar com um RNA alvo ao longo de 19 ribonucleotídeos de comprimento do filamento antissenso para reduzir a expressão de genes alvo quando o ácido nucleico de fita dupla é introduzido em uma célula de mamífero; e em que o filamento senso contém pelo menos um motivo de três modificações de 2'-F em três nucleotídeos consecutivos, onde pelo menos um dos motivos ocorre no ou próximo do local de clivagem. O filamento antissenso contém pelo menos um motivo de três modificações de 2'-O-metila em três nucleotídeos consecutivos no ou próximo do local de clivagem.

[00318] Em uma modalidade, o agente de RNAi compreende filamentos senso e antissenso, em que o agente de RNAi compreende um primeiro filamento tendo um comprimento que tem pelo menos 25 e no máximo 29 nucleotídeos e um segundo filamento tendo um comprimento que tem no máximo 30 nucleotídeos com pelo menos um motivo de três modificações de 2'-O-metila em três nucleotídeos

consecutivos nas posições 11, 12, 13 a partir da extremidade 5'; em que a extremidade 3' do primeiro filamento e a extremidade 5' do segundo filamento formam uma extremidade cega e o segundo filamento tem mais 1-4 nucleotídeos na sua extremidade 3' do que o primeiro filamento, em que a região de dúplex que tem pelo menos 25 nucleotídeos em comprimento, e o segundo filamento é suficientemente complementar com um mRNA alvo ao longo de pelo menos 19 nucleotídeos do comprimento do segundo filamento para reduzir a expressão do gene alvo quando o agente de RNAi é introduzido em uma célula de mamífero, e em que a clivagem por dicer do agente de RNAi resulta preferencialmente em um sRNAi compreendendo a extremidade 3' do segundo filamento, reduzindo deste modo a expressão do gene alvo no mamífero. Opcionalmente, o agente de RNAi compreende adicionalmente um ligante.

[00319] Em uma modalidade, o filamento senso do agente de RNAi contém pelo menos um motivo de três modificações idênticas em três nucleotídeos consecutivos, onde um dos motivos ocorre no local de clivagem no filamento senso.

[00320] Em uma modalidade, o filamento antissenso do agente de RNAi pode também conter pelo menos um motivo de três modificações idênticas em três nucleotídeos consecutivos, onde um dos motivos ocorre no ou próximo do local de clivagem no filamento antissenso.

[00321] Para um agente de RNAi tendo uma região de dúplex com 17-23 nucleotídeos em comprimento, o local de clivagem do filamento antissenso está tipicamente em torno das posições 10, 11 e 12 a partir da extremidade 5'. Assim, os motivos de três modificações idênticas podem ocorrer nas posições 9, 10, 11; posições 10, 11, 12; posições 11, 12, 13; posições 12, 13, 14; ou posições 13, 14, 15 do filamento antissenso, começando a contagem a partir do 1º nucleotídeo a partir da extremidade 5' do filamento antissenso, ou começando a contagem

a partir do 1º nucleotídeo emparelhado dentro da região de dúplex a partir da extremidade 5' do filamento antissenso. O local de clivagem no filamento antissenso pode também mudar de acordo com o comprimento da região de dúplex do RNAi a partir da extremidade 5'.

[00322] O filamento senso do agente de RNAi pode conter pelo menos um motivo de três modificações idênticas em três nucleotídeos consecutivos no local de clivagem do filamento; e o filamento antissenso pode ter pelo menos um motivo de três modificações idênticas em três nucleotídeos consecutivos no ou próximo do local de clivagem do filamento. Quando o filamento senso e o filamento antissenso formam um dúplex de dsRNA, o filamento senso e o filamento antissenso podem estar tão alinhados que um motivo dos três nucleotídeos o filamento senso e um motivo dos três nucleotídeos no filamento antissenso têm pelo menos uma sobreposição de nucleotídeo, *isto é*, pelo menos um dos três nucleotídeos do motivo no filamento senso forma um par de bases com pelo menos um dos três nucleotídeos do motivo no filamento antissenso. Alternativamente, pelo menos dois nucleotídeos podem se sobrepor, ou todos os três nucleotídeos podem se sobrepor.

[00323] Em uma modalidade, o filamento senso do agente de RNAi pode conter mais do que um motivo de três modificações idênticas em três nucleotídeos consecutivos. O primeiro motivo pode ocorrer no ou próximo do local de clivagem do filamento e os outros motivos podem ser uma modificação em asa. O termo "modificação em asa" aqui se refere a um motivo ocorrendo em outra porção do filamento que está separada do motivo no ou próximo do local de clivagem do mesmo filamento. A modificação em asa é adjacente ao primeiro motivo ou está separada por pelo menos um ou mais nucleotídeos. Quando os motivos estão imediatamente adjacentes uns aos outros, então a química dos motivos é distinta uma da outra e, quando os motivos estão separados por um ou mais nucleotídeos, então as químicas podem ser as mesmas

ou diferentes. Podem estar presentes duas ou mais modificações em asa. Por exemplo, quando estão presentes duas modificações em asa, cada modificação em asa pode ocorrer em uma extremidade em relação ao primeiro motivo que está no ou próximo do local de clivagem ou em qualquer um dos lados do motivo líder.

[00324] Como o filamento senso, o filamento antissenso do agente de RNAi pode conter mais do que um motivo de três modificações idênticas em três nucleotídeos consecutivos, com pelo menos um dos motivos ocorrendo no ou próximo do local de clivagem do filamento. O filamento antissenso pode também conter uma ou mais modificações em asa em um alinhamento similar às modificações em asa que possam estar presentes no filamento senso.

[00325] Em uma modalidade, a modificação em asa no filamento senso ou filamento antissenso do agente de RNAi não inclui tipicamente o primeiro um ou dois nucleotídeos terminais na extremidade 3', extremidade 5' ou ambas as extremidades do filamento.

[00326] Em outra modalidade, a modificação em asa no filamento senso ou filamento antissenso do agente de RNAi não inclui tipicamente o primeiro um ou dois nucleotídeos emparelhados dentro da região de dúplice na extremidade 3', extremidade 5' ou ambas as extremidades do filamento.

[00327] Quando o filamento senso e o filamento antissenso do agente de RNAi contêm cada um pelo menos uma modificação em asa, as modificações em asa podem estar na mesma extremidade da região de dúplice, e têm uma sobreposição de um, dois ou três nucleotídeos.

[00328] Quando o filamento senso e o filamento antissenso do agente de RNAi contêm cada um pelo menos duas modificações em asa, o filamento senso e o filamento antissenso podem estar tão alinhados que duas modificações cada um de um filamento estão em uma extremidade da região de dúplice, tendo uma sobreposição de um,

dois ou três nucleotídeos; duas modificações cada um de um filamento estão na outra extremidade da região de dúplex, tendo uma sobreposição de um, dois ou três nucleotídeos; duas modificações um filamento estão em cada lado do motivo líder, tendo uma sobreposição de um, dois ou três nucleotídeos na região de dúplex.

[00329] Em uma modalidade, todos os nucleotídeos no filamento senso e filamento antissenso do agente de RNAi, incluindo os nucleotídeos que são parte dos motivos, podem estar modificados. Cada nucleotídeo pode estar modificado com a mesma ou diferente modificação que pode incluir uma ou mais alterações de um dos ou ambos os oxigênios de fosfato não ligantes e/ou de um ou mais dos oxigênios de fosfato ligantes; alteração de um constituinte do açúcar de ribose, por exemplo, da 2' hidroxila no açúcar de ribose; substituição completa da fração fosfato com ligantes "defosfo"; modificação ou substituição de uma base ocorrendo naturalmente; e substituição ou modificação da estrutura principal do fosfato de ribose.

[00330] Como os ácidos nucleicos são polímeros de subunidades, muitas das modificações ocorrem em uma posição que está repetida dentro de um ácido nucleico, por exemplo, uma modificação de uma base, ou uma fração fosfato, ou um O não ligante de uma fração fosfato. Em alguns casos, a modificação ocorrerá em todas as presentes posições no ácido nucleico mas em muitos casos não. A título de exemplo, uma modificação pode apenas ocorrer em uma posição terminal 3' ou 5', pode apenas ocorrer em uma região terminal, por exemplo, em uma posição em um nucleotídeo terminal ou nos últimos 2, 3, 4, 5, ou 10 nucleotídeos de um filamento. Uma modificação pode ocorrer em uma região de fita dupla, uma região de filamento único, ou em ambas. Uma modificação pode ocorrer apenas na região de fita dupla de um RNA ou pode apenas ocorrer em uma região de filamento único de um RNA. Por exemplo, uma modificação de fosforotioato em

uma posição de O não ligante pode apenas ocorrer em um dos ou ambos os terminais, pode apenas ocorrer em uma região terminal, por exemplo, em uma posição em um nucleotídeo terminal ou nos últimos 2, 3, 4, 5, ou 10 nucleotídeos de um filamento, ou pode ocorrer em regiões de fita dupla e filamento único, particularmente nos terminais. A extremidade ou extremidades 5' podem estar fosforiladas.

[00331] Pode ser possível, por exemplo, intensificar a estabilidade, incluir bases particulares em projeções, ou incluir nucleotídeos modificados ou suplentes de nucleotídeos, em projeções de filamento único, por exemplo, em uma projeção 3' ou 5', ou em ambas. Por exemplo, pode ser desejável incluir nucleotídeos de purina em projeções. Em algumas modalidades, todas as ou algumas das bases em uma projeção 3' ou 5' podem estar modificadas, por exemplo, com uma modificação descrita aqui. As modificações podem incluir, por exemplo, o uso de modificações na posição 2' do açúcar de ribose com modificações que são conhecidas na técnica, por exemplo, o uso de desoxirribonucleotídeos, 2'-desóxi-2'-flúor (2'-F) ou 2'-O-metila modificada em vez do açúcar de ribose da nucleobase, e modificações no grupo fosfato, por exemplo, modificações de fosforotioato. As projeções não necessitam de ser homólogas com a sequência alvo.

[00332] Em uma modalidade, cada resíduo do filamento senso e filamento antissenso está independentemente modificado com LNA, CRN, cET, UNA, HNA, CeNA, 2'-metoxietila, 2'-O-metila, 2'-O-alila, 2'-C-alila, 2'-desóxi, 2'-hidroxila, ou 2'-flúor. Os filamentos podem conter mais do que uma modificação. Em uma modalidade, cada resíduo do filamento senso e filamento antissenso está independentemente modificado com 2'-O-metila ou 2'-flúor.

[00333] Pelo menos duas modificações diferentes estão tipicamente presentes no filamento senso e filamento antissenso. Essas duas modificações podem ser as modificações de 2'-O-metila ou 2'-flúor, ou

outras.

[00334] Em uma modalidade, o N_a e/ou N_b compreendem modificações de um padrão alternado. O termo "motivo alternado" como usado aqui se refere a um motivo tendo uma ou mais modificações, ocorrendo cada modificação em nucleotídeos alternados de um filamento. O nucleotídeo alternado pode se referir a um por cada todos os outros nucleotídeos ou um por cada três nucleotídeos, ou um padrão similar. Por exemplo, se A, B e C representarem cada um um tipo de modificação ao nucleotídeo, o motivo alternado pode ser "ABABABABABAB...", "AABBAABBAABB...", "AABAABAABAAB...", "AAABAAABAAB...", "AAABBBAAABBB...", ou "ABCABCABCABC...", etc.

[00335] O tipo de modificações contido no motivo alternado pode ser o mesmo ou diferente. Por exemplo, se A, B, C, D representarem cada um um tipo de modificação no nucleotídeo, o padrão alternado, isto é, modificações em todos os outros nucleotídeos, pode ser o mesmo, mas cada um do filamento senso ou filamento antissenso pode ser selecionado de várias possibilidades de modificações dentro do motivo alternado tal como "ABABAB...", "ACACAC...", "BDBDBD..." ou "CDCDCD...", etc.

[00336] Em uma modalidade, o agente de RNAi da invenção compreende o padrão de modificação para o motivo alternado no filamento senso em relação ao padrão de modificação para o motivo alternado no filamento antissenso é trocado. A troca pode ser tal que o grupo modificado de nucleotídeos do filamento senso corresponda a um grupo de nucleotídeos diferentemente modificado do filamento antissenso e *vice-versa*. Por exemplo, o filamento senso, quando emparelhado com o filamento antissenso no dúplex de dsRNA, o motivo alternado no filamento senso pode começar com "ABABAB" a partir de 5'-3' do filamento e o motivo alternado no filamento antissenso pode

começar com "BABABA" a partir de 5'-3' do filamento dentro da região de dúplex. Como outro exemplo, o motivo alternado no filamento senso pode começar com "AABBAABB" a partir de 5'-3' do filamento e o motivo alternado no filamento antissenso pode começar com "BBAABBAA" a partir de 5'-3' do filamento dentro da região de dúplex, tal que exista uma troca completa ou parcial dos padrões de modificação entre o filamento senso e o filamento antissenso.

[00337] Em uma modalidade, o agente de RNAi compreende o padrão do motivo alternado de modificação de 2'-O-metila e modificação de 2'-F no filamento senso tem uma troca em relação ao padrão do motivo alternado de modificação de 2'-O-metila e modificação de 2'-F no filamento antissenso inicialmente, *isto é*, o nucleotídeo modificado com 2'-O-metila no filamento senso emparelha em termos de base com um nucleotídeo modificado com 2'-F no filamento antissenso e *vice versa*. A posição 1 do filamento senso pode começar com a modificação de 2'-F, e a posição 1 do filamento antissenso pode começar com a modificação de 2'-O-metila.

[00338] A introdução de um ou mais motivos de três modificações idênticas em três nucleotídeos consecutivos no filamento senso e/ou filamento antissenso interrompe o padrão de modificação inicial presente no filamento senso e/ou filamento antissenso. Esta interrupção do padrão de modificação dos filamentos senso e/ou antissenso por introdução de um ou mais motivos de três modificações idênticas em três nucleotídeos consecutivos nos filamentos senso e/ou antissenso intensifica surpreendentemente a atividade de silenciamento de gene do gene alvo.

[00339] Em uma modalidade, quando o motivo de três modificações idênticas em três nucleotídeos consecutivos é introduzido em qualquer um dos filamentos, a modificação do nucleotídeo próximo do motivo é uma modificação diferente do que a modificação do motivo. Por

exemplo, a porção da sequência contendo o motivo é "...N_aYYYN_b...", onde "Y" representa a modificação do motivo de três modificações idênticas em três nucleotídeos consecutivos, e "N_a" e "N_b" representam uma modificação ao nucleotídeo próximo do motivo "YYY" que é diferente da modificação de Y, e onde N_a e N_b podem ser as mesmas ou diferentes modificações. Alternativamente, N_a e/ou N_b podem estar presentes ou ausentes quando está presente uma modificação em asa.

[00340] O agente de RNAi pode adicionalmente compreender pelo menos uma ligação internucleotídeos de fosforotioato ou metilfosfonato. A modificação de ligação internucleotídeos de fosforotioato ou metilfosfonato pode ocorrer em qualquer nucleotídeo do filamento senso ou filamento antissenso ou ambos os filamentos em qualquer posição do filamento. Por exemplo, a modificação de ligação internucleotídeos pode ocorrer em todos os nucleotídeos do filamento senso e/ou filamento antissenso; cada modificação de ligação internucleotídeos pode ocorrer em um padrão alternado no filamento senso e/ou filamento antissenso; ou o filamento senso ou filamento antissenso pode conter ambas as modificações de ligação internucleotídeos em um padrão alternado. O padrão alternado da modificação de ligação internucleotídeos no filamento senso pode ser o mesmo ou diferente do filamento antissenso, e o padrão alternado da modificação de ligação internucleotídeos no filamento senso pode ter uma troca em relação ao padrão alternado da modificação de ligação internucleotídeos no filamento antissenso. Em uma modalidade, um agente de RNAi de fita dupla compreende ligações internucleotídeos fosforotioato 6-8. Em uma modalidade, o filamento antissenso compreende duas ligações internucleotídeos de fosforotioato no terminal 5' e duas ligações internucleotídeos de fosforotioato no terminal 3', e o filamento senso compreende pelo menos duas ligações internucleotídeos de fosforotioato no terminal 5' ou no terminal 3'.

[00341] Em uma modalidade, o RNAi compreende uma modificação de ligação internucleotídeos de fosforotioato ou metilfosfonato na região de projeção. Por exemplo, a região de projeção pode conter dois nucleotídeos tendo uma ligação internucleotídeos de fosforotioato ou metilfosfonato entre os dois nucleotídeos. As modificações de ligação internucleotídeos podem ser também feitas para ligar os nucleotídeos da projeção aos nucleotídeos emparelhados terminais dentro da região de dúplex. Por exemplo, pelo menos 2, 3, 4, ou todos os nucleotídeos da projeção podem estar ligados através de ligação internucleotídeos de fosforotioato ou metilfosfonato, e, opcionalmente, podem existir ligações de internucleotídeos de fosforotioato ou metilfosfonato adicionais ligando o nucleotídeo da projeção a um nucleotídeo emparelhado que esteja próximo do nucleotídeo da projeção. Por exemplo podem existir pelo menos duas ligações de internucleotídeos de fosforotioato entre os três nucleotídeos terminais, nas quais dois dos três nucleotídeos são nucleotídeos da projeção, e o terceiro é um nucleotídeo emparelhado próximo do nucleotídeo da projeção. Estes três nucleotídeos terminais podem estar na extremidade 3' do filamento antissenso, na extremidade 3' do filamento senso, da extremidade 5' do filamento antissenso, e/ou na extremidade 5' do filamento antissenso.

[00342] Em uma modalidade, a projeção de 2 nucleotídeos está na extremidade 3' do filamento antissenso, e existem duas ligações de internucleotídeos de fosforotioato entre os três nucleotídeos terminais, em que dois dos três nucleotídeos são os nucleotídeos da projeção, e o terceiro nucleotídeo é um nucleotídeo emparelhado próximo do nucleotídeo da projeção. Opcionalmente, o agente de RNAi pode adicionalmente ter duas ligações internucleotídicas de fosforotioato entre os três nucleotídeos terminais tanto na extremidade 5' do filamento senso como na extremidade 5' do filamento antissenso.

[00343] Em uma modalidade, o agente de RNAi compreende

incompatibilidade(s) com o alvo, dentro do dúplex, ou suas combinações. A incompatibilidade pode ocorrer na região de projeção ou na região de dúplex. O emparelhamento de bases pode ser classificado com base na sua propensão para promover dissociação ou fusão (por exemplo, na energia livre de associação ou dissociação de um emparelhamento particular, a abordagem mais simples é examinar os pares em uma base de pares individuais, embora possa ser também usada análise do vizinho próximo ou similar). Em termos de promoção da dissociação: A:U é preferencial em relação a G:C; G:U é preferencial em relação a G:C; e I:C é preferencial em relação a G:C (I=inosina). As incompatibilidades, por exemplo, emparelhamentos não canônicos ou sem ser canônicos (como descrito em outro lugar aqui) são preferenciais em relação a emparelhamentos canônicos (A:T, A:U, G:C); e emparelhamentos que incluem uma base universal são preferenciais em relação a emparelhamentos canônicos.

[00344] Em uma modalidade, o agente de RNAi compreende pelo menos um dos primeiros 1, 2, 3, 4, ou 5 pares de bases dentro das regiões de dúplex a partir da extremidade 5' do filamento antissenso independentemente selecionados do grupo de: A:U, G:U, I:C, e pares não correspondidos, por exemplo, emparelhamentos não canônicos ou sem ser canônicos ou emparelhamentos que incluem uma base universal, para promover a dissociação do filamento antissenso na extremidade 5' do dúplex.

[00345] Em uma modalidade, o nucleotídeo na posição 1 dentro da região de dúplex a partir da extremidade 5' no filamento antissenso é selecionado do grupo que consiste em A, dA, dU, U, e dT. Alternativamente, pelo menos um dos primeiros 1, 2 ou 3 pares de bases dentro da região de dúplex a partir da extremidade 5' do filamento antissenso é um par de bases AU. Por exemplo, o primeiro par de bases dentro da região de dúplex a partir da extremidade 5' do filamento

antissenso é um par de bases AU.

[00346] Em outra modalidade, o nucleotídeo na extremidade 3' do filamento senso é desóxi-timina (dT). Em outra modalidade, o nucleotídeo na extremidade 3' do filamento antissenso é desóxi-timina (dT). Em uma modalidade existe uma sequência curta de nucleotídeos de desóxi-timina, por exemplo, dois nucleotídeos dT na extremidade 3' do filamento senso e/ou antissenso.

[00347] Em uma modalidade, a sequência do filamento senso pode ser representada pela fórmula (I):

$$5' n_p-N_a-(X X X)_i-N_b-Y Y Y-N_b-(Z Z Z)_j-N_a-n_q 3' \quad (I)$$

em que:

i e j são cada um independentemente 0 ou 1;

p e q são cada um independentemente 0-6;

cada N_a representa independentemente uma sequência de oligonucleotídeos compreendendo 0-25 nucleotídeos modificados, compreendendo cada sequência pelo menos dois nucleotídeos diferentemente modificados;

cada N_b representa independentemente uma sequência de oligonucleotídeos compreendendo 0-10 nucleotídeos modificados;

cada n_p e n_q representa independentemente um nucleotídeo da projeção;

em que N_b e Y não têm a mesma modificação; e

XXX, YYY e ZZZ representam cada um independentemente um motivo de três modificações idênticas em três nucleotídeos consecutivos. Preferencialmente, YYY é nucleotídeos todos modificados por 2'-F.

[00348] Em uma modalidade, o N_a e/ou N_b compreendem modificações de padrão alternado.

[00349] Em uma modalidade, o motivo YYY ocorre no ou próximo do local de clivagem do filamento senso. Por exemplo, quando o agente de

RNAi tem uma região de dúplex com 17-23 nucleotídeos em comprimento, o motivo YYY pode ocorrer no ou na vizinhança do local de clivagem (por exemplo: pode ocorrer nas posições 6, 7, 8; 7, 8, 9; 8, 9, 10; 9, 10, 11; 10, 11, 12 ou 11, 12, 13) do filamento senso, começando a contagem a partir do 1º nucleotídeo, a partir da extremidade 5'; ou opcionalmente, começando a contagem a partir do 1º nucleotídeo emparelhado dentro da região de dúplex, a partir da extremidade 5'.

[00350] Em uma modalidade, i é 1 e j é 0, ou i é 0 e j é 1, ou ambos i e j são 1. o filamento senso pode ser portanto representado pelas seguintes fórmulas:

5' n_p - N_a -YYY- N_b -ZZZ- N_a - n_q 3' (Ib);

5' n_p - N_a -XXX- N_b -YYY- N_a - n_q 3' (Ic); ou

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

[00351] Quando o filamento senso é representado pela fórmula (Ib), N_b representa uma sequência de oligonucleotídeos compreendendo 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 ou 0 nucleotídeos modificados. Cada N_a pode representar independentemente uma sequência de oligonucleotídeos compreendendo 2-20, 2-15, ou 2-10 nucleotídeos modificados.

[00352] Quando o filamento senso é representado como fórmula (Ic), N_b representa uma sequência de oligonucleotídeos compreendendo 0-10, 0-7, 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 ou 0 nucleotídeos modificados. Cada N_a pode representar independentemente uma sequência de oligonucleotídeos compreendendo 2-20, 2-15, ou 2-10 nucleotídeos modificados.

[00353] Quando o filamento senso é representado pela fórmula (Id), N_b representa uma sequência de oligonucleotídeos compreendendo 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 ou 0 nucleotídeos modificados. Preferencialmente, N_b é 0, 1, 2, 3, 4, 5 ou 6. Cada N_a pode representar independentemente uma sequência de oligonucleotídeos compreendendo 2-20, 2-15, ou 2-10 nucleotídeos modificados.

[00354] Cada um de X, Y e Z pode ser o mesmo ou diferente uns dos outros.

[00355] Em outras modalidades, i é 0 e j é 0, e o filamento senso pode ser representado pela fórmula:

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

[00356] Quando o filamento senso é representado pela fórmula (Ia), cada N_a pode representar independentemente uma sequência de oligonucleotídeos compreendendo 2-20, 2-15, ou 2-10 nucleotídeos modificados.

[00357] Em uma modalidade, a sequência do filamento antissenso do RNAi pode ser representada pela fórmula (II):

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

em que:

k e l são cada um independentemente 0 ou 1;

p' e q' são cada um independentemente 0-6;

cada N_a' representa independentemente uma sequência de oligonucleotídeos compreendendo 0-25 nucleotídeos modificados, compreendendo cada sequência pelo menos dois nucleotídeos diferentemente modificados;

cada N_b' representa independentemente uma sequência de oligonucleotídeos compreendendo 0-10 nucleotídeos modificados;

cada n_p' e n_q' representa independentemente um nucleotídeo da projeção;

em que N_b' e Y' não têm a mesma modificação; e

X'X'X', Y'Y'Y' e Z'Z'Z' representam cada um independentemente um motivo de três modificações idênticas em três nucleotídeos consecutivos.

[00358] Em uma modalidade, o N_a' e/ou N_b' compreendem modificações de padrão alternado.

[00359] O motivo Y'Y'Y' ocorre no ou próximo do local de clivagem

do filamento antissenso. Por exemplo, quando o agente de RNAi tem uma região de dúplex com 17-23 nucleotídeos em comprimento, o motivo Y'Y'Y' pode ocorrer nas posições 9, 10, 11; 10, 11, 12; 11, 12, 13; 12, 13, 14; ou 13, 14, 15 do filamento antissenso, começando a contagem a partir do 1º nucleotídeo, a partir da extremidade 5'; ou, opcionalmente, começando a contagem a partir do 1º nucleotídeo emparelhado dentro da região de dúplex, a partir da extremidade 5'. Preferencialmente, o motivo Y'Y'Y' ocorre nas posições 11, 12, 13.

[00360] Em uma modalidade, o motivo Y'Y'Y' é nucleotídeos todos modificados com 2'-OMe.

[00361] Em uma modalidade, k é 1 e l é 0, ou k é 0 e l é 1, ou ambos k e l são 1.

[00362] O filamento antissenso pode ser portanto representado pelas seguintes fórmulas:

5' n_q-N_a'-Z'Z'Z'-N_b'-Y'Y'Y'-N_a'-n_p' 3' (IIb);

5' n_q-N_a'-Y'Y'Y'-N_b'-X'X'X'-n_p' 3' (IIc); ou

5' n_q-N_a'-Z'Z'Z'-N_b'-Y'Y'Y'-N_b'-X'X'X'-N_a'-n_p' 3' (IId).

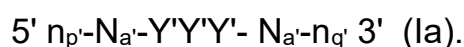
[00363] Quando o filamento antissenso é representado pela fórmula (IIb), N_b' representa uma sequência de oligonucleotídeos compreendendo 0-10, 0-7, 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 ou 0 nucleotídeos modificados. Cada N_a' representa independentemente uma sequência de oligonucleotídeos compreendendo 2-20, 2-15, ou 2-10 nucleotídeos modificados.

[00364] Quando o filamento antissenso é representado como fórmula (IIc), N_b' representa uma sequência de oligonucleotídeos compreendendo 0-10, 0-7, 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 ou 0 nucleotídeos modificados. Cada N_a' representa independentemente uma sequência de oligonucleotídeos compreendendo 2-20, 2-15 ou 2-10 nucleotídeos modificados.

[00365] Quando o filamento antissenso é representado como fórmula

(IId), cada N_b' representa independentemente uma sequência de oligonucleotídeos compreendendo 0-10, 0-7, 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 ou 0 nucleotídeos modificados. Cada N_a' representa independentemente uma sequência de oligonucleotídeos compreendendo 2-20, 2-15 ou 2-10 nucleotídeos modificados. Preferencialmente, N_b é 0, 1, 2, 3, 4, 5 ou 6.

[00366] Em outras modalidades, k é 0 e l é 0 e o filamento antissenso pode ser representado pela fórmula:



[00367] Quando o filamento antissenso é representado como fórmula (IIa), cada N_a' representa independentemente uma sequência de oligonucleotídeos compreendendo 2-20, 2-15, ou 2-10 nucleotídeos modificados.

[00368] Cada um de X' , Y' e Z' pode ser o mesmo ou diferente uns dos outros.

[00369] Cada nucleotídeo do filamento senso e filamento antissenso pode estar independentemente modificado com LNA, CRN, UNA, cEt, HNA, CeNA, 2'-metoxietila, 2'-O-metila, 2'-O-alila, 2'-C-alila, 2'-hidroxila ou 2'-flúor. Por exemplo, cada nucleotídeo do filamento senso e filamento de antissenso está independentemente modificado com 2'-O-metila ou 2'-flúor. Cada X , Y , Z , X' , Y' e Z' , em particular, pode representar uma modificação de 2'-O-metila ou uma modificação de 2'-flúor.

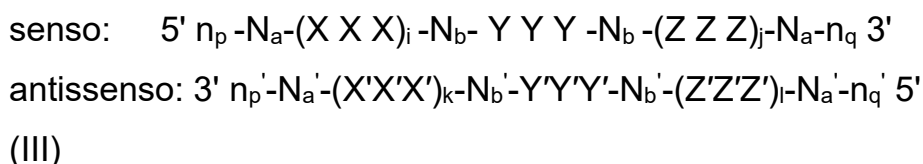
[00370] Em uma modalidade, o filamento senso do agente de RNAi pode conter o motivo YYY ocorrendo nas posições 9, 10 e 11 do filamento quando a região de dúplex tem 21 nt, começando a contagem a partir do 1º nucleotídeo a partir da extremidade 5', ou, opcionalmente, começando a contagem a partir do 1º nucleotídeo emparelhado dentro da região de dúplex, a partir da extremidade 5'; e Y representa modificação de 2'-F. O filamento senso pode adicionalmente conter o

motivo XXX ou motivos ZZZ como modificações em asa na extremidade oposta da região de dúplex; e XXX e ZZZ representam independentemente cada um uma modificação de 2'-OMe ou uma modificação de 2'-F.

[00371] Em uma modalidade, o filamento antissenso pode conter o motivo Y'Y'Y' ocorrendo nas posições 11, 12, 13 do filamento, começando a contagem a partir do 1º nucleotídeo a partir da extremidade 5', ou, opcionalmente, começando a contagem a partir do 1º nucleotídeo emparelhado dentro da região de dúplex, a partir da extremidade 5'; e Y' representa modificação de 2'-O-metila. O filamento antissenso pode adicionalmente conter o motivo X'X'X' ou motivos Z'Z'Z' como modificações em asa na extremidade oposta da região de dúplex; e X'X'X' e Z'Z'Z' representam independentemente cada um uma modificação de 2'-OMe ou uma modificação de 2'-F.

[00372] O filamento senso represento por qualquer uma das fórmulas (Ia), (Ib), (Ic), e (Id) acima forma um dúplex com um filamento antissenso sendo representado por qualquer uma das fórmulas (IIa), (IIb), (IIc), e (IId), respectivamente.

[00373] Conformemente, os agentes de RNAi para uso nos métodos da invenção podem compreender um filamento senso e um filamento antissenso, tendo cada filamento 14 a 30 nucleotídeos, o dúplex de RNAi representado pela fórmula (III):



em que:

i, j, k, e l são cada um independentemente 0 ou 1;

p, p', q, e q' são cada um independentemente 0-6;

cada N_a e N_a' representa independentemente uma sequência de oligonucleotídeos compreendendo 0-25 nucleotídeos modificados,

compreendendo cada sequência pelo menos dois nucleotídeos diferentemente modificados;

cada N_b e N_b' representa independentemente uma sequência de oligonucleotídeos compreendendo 0-10 nucleotídeos modificados;

cada n_p' , n_p , n_q' , e n_q , cada um dos quais pode ou não estar presente, representa independentemente um nucleotídeo da projeção; e

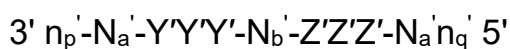
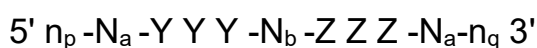
XXX , YYY , ZZZ , $X'X'X'$, $Y'Y'Y'$, e $Z'Z'Z'$ representam cada um independentemente um motivo de três modificações idênticas em três nucleotídeos consecutivos.

[00374] Em uma modalidade, i é 0 e j é 0; ou i é 1 e j é 0; ou i é 0 e j é 1; ou ambos i e j são 0; ou ambos i e j são 1. Em outra modalidade, k é 0 e l é 0; ou k é 1 e l é 0; k é 0 e l é 1; ou ambos k e l são 0; ou ambos k e l são 1.

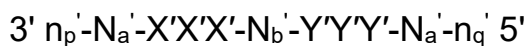
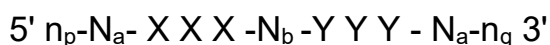
[00375] Combinações exemplares do filamento senso e filamento antissenso formando um dúplex de RNAi incluem as fórmulas em baixo:



(IIIa)



(IIIb)



(IIIc)



(IIId)

[00376] Quando o agente de RNAi é representado pela fórmula (IIIa), cada N_a representa independentemente uma sequência de

oligonucleotídeos compreendendo 2-20, 2-15, ou 2-10 nucleotídeos modificados.

[00377] Quando o agente de RNAi é representado pela fórmula (IIIb), cada N_b representa independentemente uma sequência de oligonucleotídeos compreendendo 1-10, 1-7, 1-5 ou 1-4 nucleotídeos modificados. Cada N_a representa independentemente uma sequência de oligonucleotídeos compreendendo 2-20, 2-15 ou 2-10 nucleotídeos modificados.

[00378] Quando o agente de RNAi é representado como fórmula (IIIc), cada N_b , N_b' representa independentemente uma sequência de oligonucleotídeos compreendendo 0-10, 0-7, 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 ou 0 nucleotídeos modificados. Cada N_a representa independentemente uma sequência de oligonucleotídeos compreendendo 2-20, 2-15 ou 2-10 nucleotídeos modificados.

[00379] Quando o agente de RNAi é representado como fórmula (IIId), cada N_b , N_b' representa independentemente uma sequência de oligonucleotídeos compreendendo 0-10, 0-7, 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 ou 0 nucleotídeos modificados. Cada N_a , N_a' representa independentemente uma sequência de oligonucleotídeos compreendendo 2-20, 2-15, ou 2-10 nucleotídeos modificados. Cada um de N_a , N_a' , N_b e N_b' representa independentemente modificações de padrão alternado.

[00380] Cada um de X, Y e Z nas fórmulas (III), (IIIa), (IIIb), (IIIc), e (IIId) pode ser o mesmo ou diferentes uns dos outros.

[00381] Quando o agente de RNAi é representado pelas fórmulas (III), (IIIa), (IIIb), (IIIc), e (IIId), pelo menos um dos nucleotídeos Y pode formar um par de bases com um dos nucleotídeos Y'. Alternativamente, pelo menos dois dos nucleotídeos Y formam pares de bases com os correspondentes nucleotídeos Y'; ou todos os três nucleotídeos Y formam pares de bases com os correspondentes nucleotídeos Y'.

[00382] Quando o agente de RNAi é representado pela fórmula (IIIb) ou (IIId), pelo menos um dos nucleotídeos Z pode formar um par de bases com um dos nucleotídeos Z'. Alternativamente, pelo menos dois dos nucleotídeos Z formam pares de bases com os correspondentes nucleotídeos Z'; ou todos os três nucleotídeos Z formam pares de bases com os correspondentes nucleotídeos Z'.

[00383] Quando o agente de RNAi é representado como fórmula (IIIc) ou (IIId), pelo menos um dos nucleotídeos X pode formar um par de bases com um dos nucleotídeos X'. Alternativamente, pelo menos dois dos nucleotídeos X formam pares de bases com os correspondentes nucleotídeos X'; ou todos os três nucleotídeos X formam pares de bases com os correspondentes nucleotídeos X'.

[00384] Em uma modalidade, a modificação no nucleotídeo Y é diferente da modificação no nucleotídeo Y', a modificação no nucleotídeo Z é diferente da modificação no nucleotídeo Z', e/ou a modificação no nucleotídeo X é diferente da modificação no nucleotídeo X'.

[00385] Em uma modalidade, quando o agente de RNAi é representado pela fórmula (IIId), as modificações de N_a são modificações de 2'-O-metila ou 2'-flúor. Em outra modalidade, quando o agente de RNAi é representado pela fórmula (IIId), as modificações de N_a são modificações de 2'-O-metila ou 2'-flúor e $n_p' > 0$ e pelo menos um n_p' está ligado a um nucleotídeo da vizinhança através de uma ligação de fosforotioato. Ainda em outra modalidade, quando o agente de RNAi é representado pela fórmula (IIId), as modificações de N_a são modificações de 2'-O-metila ou 2'-flúor, $n_p' > 0$ e pelo menos um n_p' está ligado a um nucleotídeo da vizinhança através de ligação de fosforotioato, e o filamento senso está conjugado com um ou mais derivados de GalNAc anexados através de um ligante ramificado bivalente ou trivalente (descrito em baixo). Em outra modalidade,

quando o agente de RNAi é representado pela fórmula (IIId), as modificações de N_a são modificações de 2'-O-metila ou 2'-flúor, $n_p' > 0$ e pelo menos um n_p' está ligado a um nucleotídeo da vizinhança através de ligação de fosforotioato, o filamento senso compreende pelo menos uma ligação de fosforotioato, e o filamento senso está conjugado com um ou mais derivados de GalNAc anexados através de um ligante ramificado bivalente ou trivalente.

[00386] Em uma modalidade, quando o agente de RNAi é representado pela fórmula (IIIa), as modificações de N_a são modificações de 2'-O-metila ou 2'-flúor, $n_p' > 0$ e pelo menos um n_p' está ligado a um nucleotídeo da vizinhança através de ligação de fosforotioato, o filamento senso compreende pelo menos uma ligação de fosforotioato, e o filamento senso está conjugado com um ou mais derivados de GalNAc anexados através de um ligante ramificado bivalente ou trivalente.

[00387] Em uma modalidade, o agente de RNAi é um multímero contendo pelo menos dois dúplexes representados pela fórmula (III), (IIIa), (IIIb), (IIIc), e (IIId), em que os dúplexes estão conectados por um ligante. O ligante pode ser clivável ou não clivável. Opcionalmente, o multímero compreende adicionalmente um ligante. Cada um dos dúplexes pode visar o mesmo gene ou dois genes diferentes; ou cada um dos dúplexes pode visar o mesmo gene em dois locais alvo diferentes.

[00388] Em uma modalidade, o agente de RNAi é um multímero contendo três, quatro, cinco, seis ou mais dúplexes representados pelas fórmulas (III), (IIIa), (IIIb), (IIIc), e (IIId), em que os dúplexes estão conectados por um ligante. O ligante pode ser clivável ou não clivável. Opcionalmente, o multímero compreende adicionalmente um ligante. Cada um dos dúplexes pode visar o mesmo gene ou dois genes diferentes; ou cada um dos dúplexes pode visar o mesmo gene em dois

locais alvo diferentes.

[00389] Em uma modalidade, dois agentes de RNAi representados pelas fórmulas (III), (IIIa), (IIIb), (IIIc), e (IIId) estão ligados um ao outro na extremidade 5', e uma das ou ambas as extremidades 3' e estão opcionalmente conjugados com um ligante. Cada um dos agentes pode se dirigir ao mesmo gene ou dois genes diferentes; ou cada um dos agentes pode se dirigir ao mesmo gene em dois locais alvo diferentes.

[00390] Várias publicações descrevem agentes de RNAi multiméricos que podem ser usados nos métodos da invenção. Tais publicações incluem WO2007/091269, Patente dos EUA No. 7858769, WO2010/141511, WO2007/117686, WO2009/014887 e WO2011/031520, os conteúdos inteiros da quais são deste modo incorporadas aqui por referência.

[00391] Como descrito em mais detalhe em baixo, o agente de RNAi que contém conjugações de uma ou mais frações carboidrato com um agente de RNAi pode otimizar uma ou mais propriedades do agente de RNAi. Em muitos casos, a fração de carboidrato estará anexada a uma subunidade modificada do agente de RNAi. Por exemplo, o açúcar de ribose de uma ou mais subunidades de nucleotídeos de um agente de dsRNA pode estar substituído por outra fração, por exemplo, um transportador não de carboidrato (preferencialmente cíclico) à qual está anexado um ligante de carboidrato. Uma subunidade de ribonucleotídeos na qual o açúcar de ribose da subunidade foi assim substituída é dita aqui como uma subunidade de modificação de substituição de ribose (RRMS). Um transportador cíclico pode ser um sistema em anel carbocíclico, *isto é*, todos os átomos no anel são átomos de carbono, ou um sistema em anel heterocíclico, *isto é*, um ou mais átomos no anel podem ser um heteroátomo, por exemplo, nitrogênio, oxigênio, enxofre. O transportador cíclico pode ser um sistema em anel monocíclico, ou pode conter dois ou mais anéis, por

exemplo, anéis fundidos. O transportador cíclico pode ser um sistema em anel completamente saturado, ou pode conter uma ou mais ligações duplas.

[00392] O ligante pode estar anexado ao polinucleotídeo através de um transportador. Os transportadores incluem (i) pelo menos um "ponto de anexação à estrutura principal", preferencialmente dois "pontos de anexação à estrutura principal" e (ii) pelo menos um "ponto de anexação de corrente". Um "ponto de anexação à estrutura principal" como usado aqui se refere a um grupo funcional, por exemplo, um grupo hidroxila, ou, geralmente, uma ligação disponível para, ou que é adequada para, incorporação do transportador na estrutura principal, por exemplo, estrutura principal contendo fosfato, ou fosfato modificado, por exemplo, enxofre, de um ácido ribonucleico. Um "ponto de anexação preso" (TAP) em algumas modalidades se refere a um átomo no anel constituinte do transportador cíclico, por exemplo, um átomo de carbono ou um heteroátomo (distinto de um átomo que proporciona um ponto de anexação à estrutura principal), que conecta uma fração selecionada. A fração pode ser, por exemplo, um carboidrato, por exemplo, monossacarídeo, dissacarídeo, trissacarídeo, tetrassacarídeo, oligossacarídeo e polissacarídeo. Opcionalmente, a fração selecionada está conectada por uma corrente interveniente ao transportador cíclico. Assim, o transportador cíclico incluirá frequentemente um grupo funcional, por exemplo, um grupo amino, ou, geralmente, proporcionará uma ligação, que é adequada para incorporação ou aprisionamento de outra entidade química, por exemplo, um ligante ao anel constituinte.

[00393] Os agentes de RNAi podem estar conjugados com um ligante através de um transportador, em que o transportador pode ser grupo cíclico ou grupo acíclico; preferencialmente, o grupo cíclico é selecionado de pirrolidinila, pirazolinila, pirazolidinila, imidazolinila, imidazolidinila, piperidinila, piperazinila, [1,3]dioxolano, oxazolidinila,

isoxazolidinila, morfolinila, tiazolidinila, isotiazolidinila, quinoxalinila, piridazinonila, tetra-hidrofurila e decalina; preferencialmente, o grupo acíclico é selecionado de estrutura principal de serinol ou estrutura principal de dietanolamina.

[00394] Em certas modalidades específicas, o agente de RNAi para uso nos métodos da invenção é um agente selecionado do grupo de agentes listados em qualquer uma das **Tabelas 3, 4, 6, 7, 12, 13, 22, 23, 25 e 26**. Estes agentes podem adicionalmente compreender um ligante.

IV. RNAis Conjugados a Ligantes

[00395] Outra modificação do RNA de um RNAi da invenção envolve a ligação química ao RNA de um ou mais ligantes, frações ou conjugados que aumentam a atividade, distribuição celular ou captação celular do RNAi. Tais frações incluem, mas não estão limitadas a frações lipídicas como uma fração de colesterol (Letsinger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, 86: 6553-6556), ácido cólico (Manoharan *et al.*, *Biorg. Med. Chem. Lett.*, 1994, 4:1053-1060), um tioéter, por exemplo, beril-S-tritiltiol (Manoharan *et al.*, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1992, 660:306-309; Manoharan *et al.*, *Biorg. Med. Chem. Lett.*, 1993, 3:2765-2770), um tiocolesterol (Oberhauser *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 1992, 20:533-538), uma cadeia alifática, por exemplo, dodecandiol ou resíduos undecila (Saison-Behmoaras *et al.*, *EMBO J*, 1991, 10:1111-1118; Kabanov *et al.*, *FEBS Lett.*, 1990, 259:327-330; Svinarchuk *et al.*, *Biochimie*, 1993, 75:49-54), um fosfolípídeo, por exemplo, di-hexadecil-rac-glicerol ou 1,2-di-O-hexadecil-rac-glicero-3-H-fosfonato de trietilamônio (Manoharan *et al.*, *Tetrahedron Lett.*, 1995, 36:3651-3654; Shea *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 1990, 18:3777-3783), uma poliamina ou uma cadeia de polietileno glicol (Manoharan *et al.*, *Nucleosides & Nucleotides*, 1995, 14:969-973), ou adamantano de ácido acético (Manoharan *et al.*, *Tetrahedron Lett.*, 1995, 36:3651-3654), uma

fração palmitila (Mishra *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta*, 1995, 1264:229-237), ou uma fração octadecilamina ou hexilamino-carboniloxicolesterol (Crooke *et al.*, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1996, 277:923-937).

[00396] Em uma modalidade, um ligante altera a distribuição, direcionamento ou tempo de vida de um agente de RNAi no qual é incorporado. Em modalidades preferenciais, um ligante proporciona uma afinidade intensificada para um alvo selecionado, por exemplo, molécula, célula ou tipo de célula, compartimento, por exemplo, um compartimento celular ou de órgão, tecido, órgão ou região do corpo, por exemplo, em comparação com uma espécie desprovida de um tal ligante. Ligantes pditos não farão parte do emparelhamento de dúplex em um ácido nucleico em dúplex.

[00397] Os ligantes podem incluir uma substância ocorrendo naturalmente, tal como uma proteína (por exemplo, albumina do soro humano (HSA), lipoproteína de baixa densidade (LDL), ou globulina); carboidrato (por exemplo, uma dextrana, pululana, quitina, quitosana, inulina, ciclodextrina, N-acetilgalactosamina, ou ácido hialurônico); ou um lipídeo. O ligante pode ser também uma molécula recombinante ou sintética, tal como um polímero sintético, por exemplo, um poliaminoácido sintético. Exemplos de poliaminoácidos incluem poliaminoácido é uma polilisina (PLL), poliácido L-aspártico, poliácido L-glutâmico, copolímero de estireno-anidrido do ácido maleico, copolímero poli(L-lactídeo-co-glicolídeo), copolímero de éter de divinila-anidrido maleico, copolímero de N-(2-hidroxipropil)metacrilamida (HMPA), polietileno glicol (PEG), álcool de polivinila (PVA), poliuretano, poli(ácido 2-etilacrílico), polímeros de N-isopropilacrilamida, ou polifosfazina. Exemplos de poliaminas incluem: polietilenimina, polilisina (PLL), espermina, espermidina, poliamina, pseudopeptídeo-poliamina, poliamina peptidomimética, poliamina de dendrímero, arginina, amidina, protamina, lipídeo catiônico, porfirina catiônica, sal quaternário de uma

poliamina, ou um peptídeo alfa helicoidal.

[00398] Ligantes também podem incluir grupos de direcionamento, por exemplo, um agente de direcionamento para células ou tecidos, por exemplo, uma lectina, glicoproteína, lipídeo ou proteína, por exemplo, um anticorpo, que se liga a um tipo especificado de células, como uma célula renal. Um grupo de direcionamento pode ser uma tiotropina, melanotropina, lectina, glicoproteína, proteína tensioativa A, carboidrato de mucina, lactose multivalente, galactose multivalente, N-acetil-galactosamina, N-acetil-glucosamina, manose multivalente, fucose multivalente, poliaminoácidos glicosilados, galactose multivalente, transferrina, bisfosfonato, poliglutamato, poliaspartato, um lipídeo, colesterol, um esteroide, ácido biliar, folato, vitamina B12, vitamina A, biotina, ou peptídeo RGD ou mimético de peptídeo RGD.

[00399] Outros exemplos de ligantes incluem corantes, agentes intercaladores (por exemplo, acridinas), reticulantes (por exemplo, psoraleno, mitomicina C), porfirinas (TPPC4, texafirina, Safirina), hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (por exemplo, fenazina, diidrofenzazina), endonucleases artificiais (por exemplo, EDTA), moléculas lipofílicas, por exemplo, colesterol, ácido cólico, adamantano de ácido 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)litocólico, ácido O3-(oleoil)colênico, dimetoxitritila, ou fenoxazina e conjugados de peptídeo (por exemplo, peptídeo de *antennapedia*, peptídeo Tat), agentes alquilantes, fosfato, amino, mercapto, PEG (por exemplo, PEG-40K), MPEG, [MPEG]₂, poliamino, alquila, alquila substituída, marcadores radiomarcados, enzimas, haptenos (por exemplo, biotina), facilitadores do transporte/absorção (por exemplo, aspirina, vitamina E, ácido fólico), ribonucleases sintéticas (por exemplo, imidazol, bisimidazol, histamina,

aglomerados de imidazol, conjugados de acridina-imidazol, complexos Eu^{3+} de tetraazamacrociclos), dinitrofenila, HRP, ou AP.

[00400] Ligantes podem ser proteínas, por exemplo, glicoproteínas, ou peptídeos, por exemplo, moléculas possuindo uma afinidade específica para um coligante, ou anticorpos, por exemplo, um anticorpo que se liga a um tipo especificado de células, como uma célula hepática. Ligantes também podem incluir hormônios e receptores de hormônios. Podem também incluir espécies não peptídicas, tais como lipídeos, lectinas, carboidratos, vitaminas, cofatores, lactose multivalente, galactose multivalente, N-acetil-galactosamina, N-acetil-gulucosamina, manose multivalente, ou fucose multivalente. O ligante pode ser, por exemplo, um lipopolissacarídeo, um ativador de p38 MAP cinase, ou um ativador de NF- κ B.

[00401] O ligante pode ser uma substância, por exemplo, um fármaco, que pode aumentar a captação do agente de RNAi para o interior da célula, por exemplo, ao fragmentar o citoesqueleto da célula, por exemplo, ao fragmentar os microtúbulos, microfilamentos, e/ou filamentos intermédios da célula. O fármaco pode ser, por exemplo, taxon, vincristina, vimblastina, citocalasina, nocodazol, japaquinolida, latrunculina A, faloidina, swinholida A, indanocina, ou mioservina.

[00402] Em algumas modalidades, um ligante anexado a um RNAi como descrito aqui atua como um modulador farmacocinético (modulador PK). Os moduladores PK incluem lipófilos, ácidos biliares, esteroides, análogos de fosfolípídeo, peptídeos, agentes de ligação de proteína, PEG, vitaminas, etc. Moduladores PK exemplares incluem, mas não estão limitados a, colesterol, ácidos graxos, ácido cólico, ácido litocólico, diaquilglicerídeos, diacilglicerídeos, fosfolípídeos, esfingolípídeos, naproxeno, ibuprofeno, vitamina E, biotina, etc. Se sabe também que oligonucleotídeos que compreendem um número de ligações de fosforotioato se ligam a proteína do soro, logo,

oligonucleotídeos curtos, por exemplo, oligonucleotídeos de cerca de 5 bases, 10 bases, 15 bases ou 20 bases, compreendendo múltiplas de ligações de fosforotioato na estrutura principal são também passíveis na presente invenção como ligantes (por exemplo, como ligantes de modulação PK). Adicionalmente, aptâmeros que se ligam a componentes do soro (por exemplo, proteínas do soro) são também adequados para uso como ligantes de modulação PK nas modalidades descritas aqui.

[00403] Oligonucleotídeos conjugados com ligantes da invenção podem ser sintetizados pelo uso de um oligonucleotídeo que transporta uma funcionalidade reativa pendente, tal como aquela derivada da anexação de uma molécula de ligação ao oligonucleotídeo (descrito em baixo). Este oligonucleotídeo reativo pode reagir diretamente com ligantes comercialmente disponíveis, ligantes que são sintetizados transportando qualquer um de uma variedade de grupos protetores, ou ligantes que têm uma fração de ligação anexada a eles.

[00404] Os oligonucleotídeos usados nos conjugados da presente invenção podem ser convenientemente e rotineiramente preparados através da técnica bem conhecida de síntese em fase sólida. Equipamento para tal síntese é vendido por vários vendedores, incluindo, por exemplo, Applied Biosystems (Foster City, Calif.). Quaisquer outros meios para tal síntese conhecidos na área podem ser adicionalmente ou alternativamente empregues. Também se sabe usar de técnicas similares para preparar outros oligonucleotídeos, tais como os fosforotioatos e derivados alquilados.

[00405] Nos oligonucleotídeos conjugados com ligantes e nucleosídeos ligados específicos quanto a sequências transportando moléculas de ligantes da presente invenção, os oligonucleotídeos e oligonucleosídeos podem ser montados em um sintetizador de DNA adequado utilizando precursores de nucleotídeos ou nucleosídeos

padrão, ou precursores de conjugados de nucleotídeos ou nucleosídeos que já transportam a fração de ligação, precursores de conjugados de ligante-nucleotídeo ou nucleosídeo que já transportam a molécula de ligante, ou blocos de construção não transportando nucleosídeo ligante.

[00406] Quando se usa precursores de conjugados de nucleotídeos que já transportam uma fração de ligação, a síntese dos nucleosídeos ligados específicos quanto a sequências é tipicamente completada, e a molécula de ligante é então reagida com a fração de ligação para formar o oligonucleotídeo conjugado com ligante. Em algumas modalidades, os oligonucleotídeos ou nucleosídeos ligados da presente invenção são sintetizados por um sintetizador automatizado usando fosforamiditas derivadas de conjugados de ligante-nucleosídeo adicionalmente fosforamiditas padrão e fosforamiditas não padrão que estão comercialmente disponíveis e são rotineiramente usados na síntese de oligonucleotídeos.

A. Conjugados de Lipídeos

[00407] Em uma modalidade, o ligante ou conjugado é um lipídeo ou molécula à base de lipídeo. Um tal lipídeo ou molécula à base de lipídeos se liga preferencialmente a uma proteína do soro, por exemplo, albumina do soro humano (HSA). Um ligante de ligação à HSA permite distribuição do conjugado em um tecido alvo, por exemplo, um tecido alvo do corpo sem ser rim. Por exemplo, o tecido alvo pode ser o fígado, incluindo células parenquimais do fígado. Outras moléculas que podem se ligar à HSA podem ser também usadas como ligantes. Por exemplo pode ser usada neproxina ou aspirina. Um ligante de lipídeo ou à base de lipídeos pode (a) aumentar a resistência à degradação do conjugado, (b) aumentar o direcionamento ou transporte para uma célula ou membrana da célula alvo, e/ou (c) ser usado para ajustar a ligação a uma proteína do soro, por exemplo, HSA.

[00408] Um ligante à base de lipídeos pode ser usado para inibir, por

exemplo, controlar, a ligação do conjugado a um tecido alvo. Por exemplo será menos provável que um ligante de lipídeo ou à base de lipídeos que se liga à HSA mais fortemente seja dirigido ao rim e portanto será menos provável que seja eliminado do corpo. Um ligante de lipídeo ou à base de lipídeos que se liga à HSA menos fortemente pode ser usado para dirigir o conjugado ao rim.

[00409] Em uma modalidade preferencial, o ligante à base de lipídeos se liga à HSA. Preferencialmente se liga à HSA com uma afinidade suficiente tal que o conjugado seja preferencialmente distribuído a um tecido sem ser rim. No entanto é preferencial que a afinidade não seja tão forte que a ligação HSA-ligante não possa ser revertida.

[00410] Em outra modalidade preferencial, o ligante à base de lipídeos se liga à HSA fracamente ou não de todo, tal que o conjugado será preferencialmente distribuído ao rim. Outras frações que se dirigem a células dos rins podem ser também usadas em lugar do ou adicionalmente ao ligante à base de lipídeos.

[00411] Em outro aspecto, o ligante é uma fração, por exemplo, uma vitamina, que é coletada por uma célula alvo, por exemplo, uma célula em proliferação. Estes são particularmente úteis para tratar distúrbios caracterizados por proliferação indesejada de células, por exemplo, do tipo maligno ou não maligno, por exemplo, células cancerosas. Vitaminas exemplares incluem vitamina A, E, e K. Outras vitaminas exemplares incluídas são vitamina B, por exemplo, ácido fólico, B12, riboflavina, biotina, piridoxal ou outras vitaminas ou nutrientes captados por células alvo tais como células do fígado. Também estão incluídos HSA e lipoproteína de baixa densidade (LDL).

B. Agentes de Permeação de Células

[00412] Em outro aspecto, o ligante é um agente de permeação de células, preferencialmente um agente de permeação de células

helicoidal. Preferencialmente, o agente é anfipático. Um agente exemplificativo é um peptídeo tal como tat ou *antennapedia*. Se o agente for um peptídeo pode estar modificado, incluindo um mimético de peptidila, invertômeros, ligações não de peptídeo ou de pseudopeptídeo, e uso de D-aminoácidos. O agente helicoidal é preferencialmente um agente alfa-helicoidal, que tem preferencialmente uma fase lipofílica e uma lipofóbica.

[00413] O ligante pode ser um peptídeo ou peptidomimético. Um peptidomimético (também dito aqui como oligopeptidomimético) é uma molécula capaz de se dobrar em uma estrutura tridimensional definida similar a um peptídeo natural. A ligação de peptídeos e peptidomiméticos a agentes de RNAi pode afetar a distribuição farmacocinética do RNAi, tal como por intensificação do reconhecimento e absorção celulares. A fração de peptídeo ou peptidomimética pode ter cerca de 5-50 aminoácidos de comprimento, por exemplo, cerca de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, ou 50 aminoácidos em comprimento.

[00414] Um peptídeo ou peptidomimético pode ser, por exemplo, um peptídeo de permeação de células, peptídeo catiônico, peptídeo anfipático, ou peptídeo hidrofóbico (por exemplo, consistindo maioritariamente de Tyr, Trp ou Phe). A fração de peptídeo pode ser um peptídeo de dendrímeros, peptídeo restringido ou peptídeo reticulado. Em outra alternativa, a fração de peptídeo pode incluir uma sequência de translocação membranar (MTS) hidrofóbica. Um peptídeo contendo MTS hidrofóbica exemplar é RFGF tendo a sequência de aminoácidos AAVALLPAVLLALLAP (SEQ ID NO: 43). Um análogo de RFGF (por exemplo, sequência de aminoácidos AALLPVLLAAP (SEQ ID NO: 44)) contendo uma MTS hidrofóbica pode ser também uma fração de direcionamento. A fração de peptídeo pode ser um peptídeo de "administração", que pode transportar grandes moléculas polares incluindo peptídeos, oligonucleotídeos, e proteína através de

membranas celulares. Por exemplo se descobriu que sequências da proteína Tat do HIV (GRKKRRQRRRPPQ (SEQ ID NO: 45)) e da proteína *Antennapedia* de *Drosophila* (RQIKIWFQNRRMKWKK (SEQ ID NO: 46)) são capazes de funcionar como peptídeos de administração. Um peptídeo ou peptidomimético pode ser codificado por uma sequência aleatória de DNA, tal como um peptídeo identificado a partir de uma biblioteca de exibição de fagos, ou biblioteca combinatorial de uma-esférula-um-composto (OBOC) (Lam *et al.*, Nature, 354:82-84, 1991). Exemplos de um peptídeo ou peptidomimético preso a um agente de dsRNA via uma unidade monomérica incorporada para finalidades de direcionamento para células é um peptídeo arginina-glicina-ácido aspártico (RGD), ou imitação de RGD. Uma fração de peptídeo pode variar em comprimento de cerca de 5 aminoácidos a cerca de 40 aminoácidos. As frações de peptídeo podem ter uma modificação estrutural, tal como para aumentar a estabilidade ou dirigir propriedades conformacionais. Podem ser usadas qualquer uma das modificações estruturais descritas em baixo.

[00415] Um peptídeo RGD para uso nas composições e métodos da invenção pode ser linear ou cíclico, e pode ser modificado, por exemplo, glicosilado ou metilado, para facilitar o direcionamento a tecido(s) específico(s). Peptídeos e peptidomiméticos contendo RGD podem incluir D-aminoácidos, bem como imitadores sintéticos de RGD. Adicionalmente a RGD, se podem usar outras frações que visam o ligante de integrina. Conjugados preferenciais deste ligante se dirigem a PECAM-1 ou VEGF.

[00416] Um "peptídeo de permeação de células" é capaz de permear uma célula, por exemplo, uma célula microbiana, como uma célula bacteriana ou fúngica, ou uma célula de mamífero, como uma célula humana. Um peptídeo de permeação de células microbianas pode ser, por exemplo, um peptídeo linear α -helicoidal (por exemplo, LL-37 ou

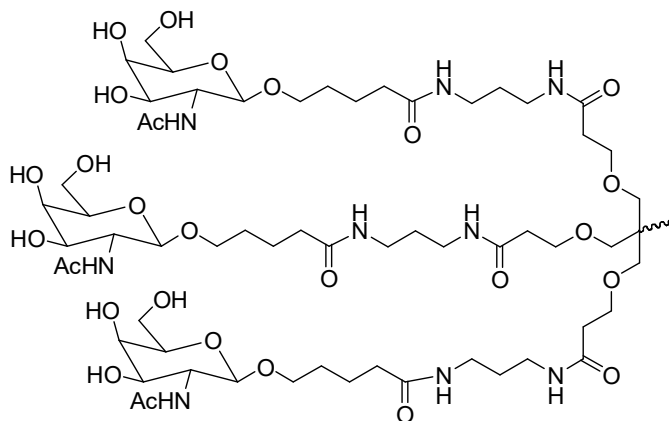
Ceropina P1), um peptídeo contendo ligações dissulfeto (por exemplo, α -defensina, β -defensina ou bactenecina), ou um peptídeo contendo somente um ou dois aminoácidos dominantes (por exemplo, PR-39 ou indolicidina). Um peptídeo de permeação de células pode também incluir um sinal de localização nuclear (NLS). Por exemplo, um peptídeo de permeação de células pode ser um peptídeo anfipático bipartido, tal como MPG, que é derivado do domínio do peptídeo de fusão de gp41 do HIV-1 e do NLS do antígeno T grande do SV40 (Simeoni *et al.*, Nucl. Acids Res. 31:2717-2724, 2003).

C. Conjugados de Carboidratos

[00417] Em algumas modalidades das composições e métodos da invenção, um oligonucleotídeo de RNAi compreende adicionalmente um carboidrato. Os RNAi conjugados com carboidratos são vantajosos para a administração *in vivo* de ácidos nucleicos, bem como composições adequadas para uso terapêutico *in vivo*, como descrito aqui. Como usado aqui, "carboidrato" se refere a um composto que é um carboidrato *per se* constituído por uma ou mais unidades de monossacarídeo tendo pelo menos 6 átomos de carbono (que podem ser lineares, ramificadas ou cíclicas) com um átomo de oxigênio, nitrogênio ou enxofre ligado a cada átomo de carbono; ou um composto tendo como uma sua parte uma fração carboidrato constituída por uma ou mais unidades de monossacarídeo tendo cada uma 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. Carboidratos representativos incluem os açúcares (mono-, di-, tri- e oligossacarídeos contendo de cerca de 4, 5, 6, 7, 8, ou 9 unidades de monossacarídeo), e polissacarídeos tais como amidos, glicogênio, celulose e gomas de polissacarídeos. Monossacarídeos específicos incluem açúcares HBV e superiores (por exemplo, HBV, C6, C7, ou C8); di- e trissacarídeos incluem açúcares tendo duas ou três unidades de monossacarídeo (por

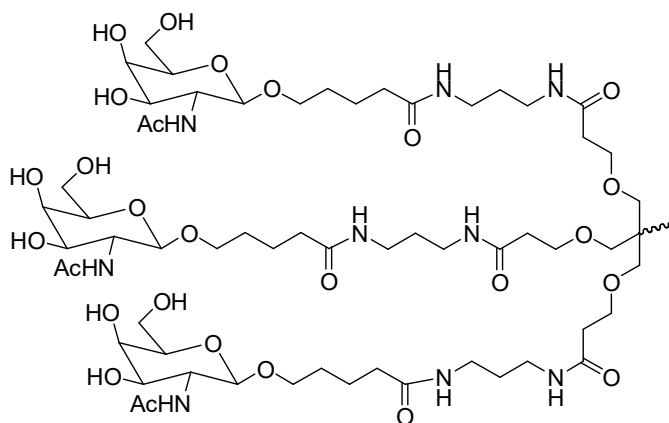
exemplo, HBV, C6, C7, ou C8).

[00418] Em uma modalidade, um conjugado de carboidrato para utilização nas composições e métodos da invenção é um monossacarídeo. Em uma modalidade, o monossacarídeo é uma N-acetilgalactosamina, como

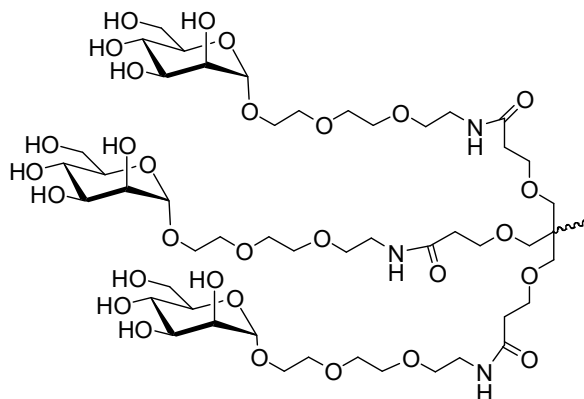


Fórmula II.

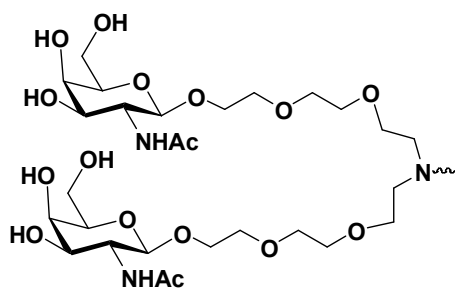
[00419] Em outra modalidade, um conjugado de carboidrato para utilização nas composições e métodos da invenção é selecionado do grupo que consiste em:



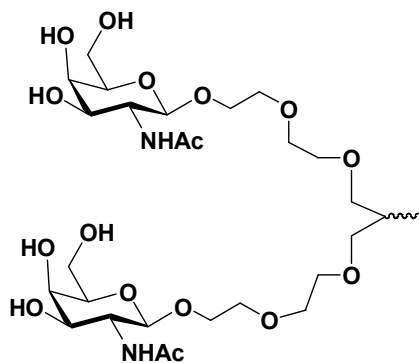
Fórmula II,



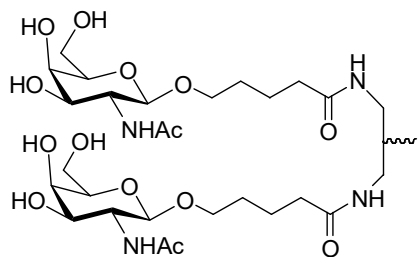
Fórmula III,



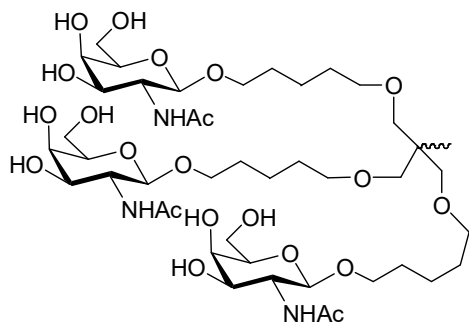
Fórmula IV,



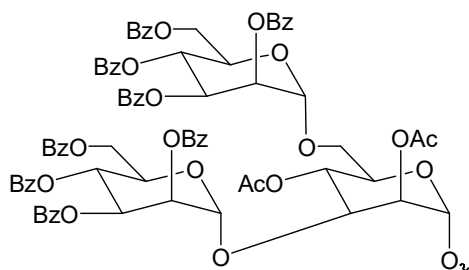
Fórmula V,



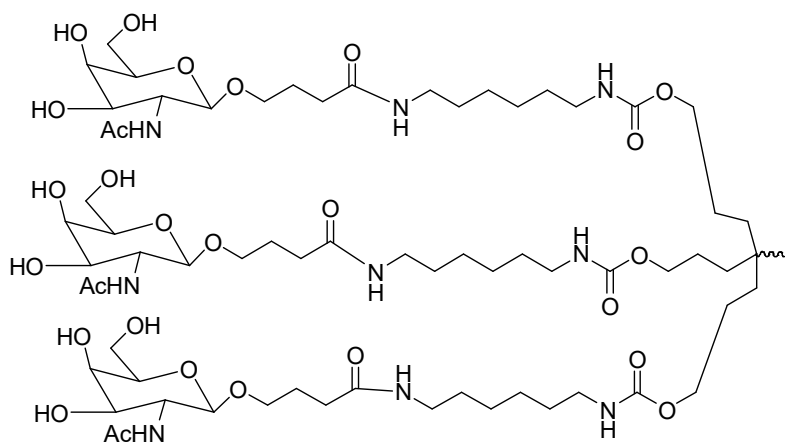
Fórmula VI,



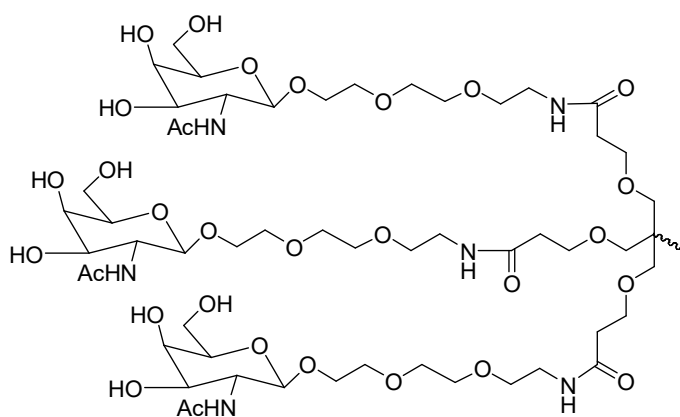
Fórmula VII,



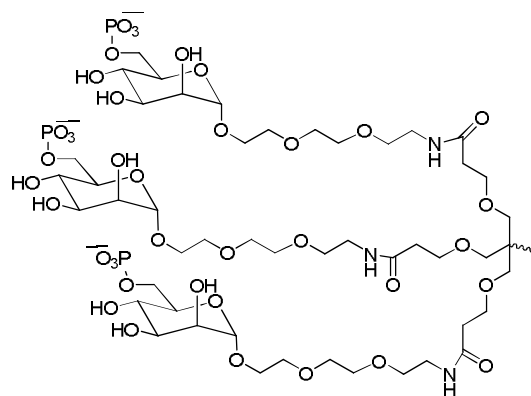
Fórmula VIII,



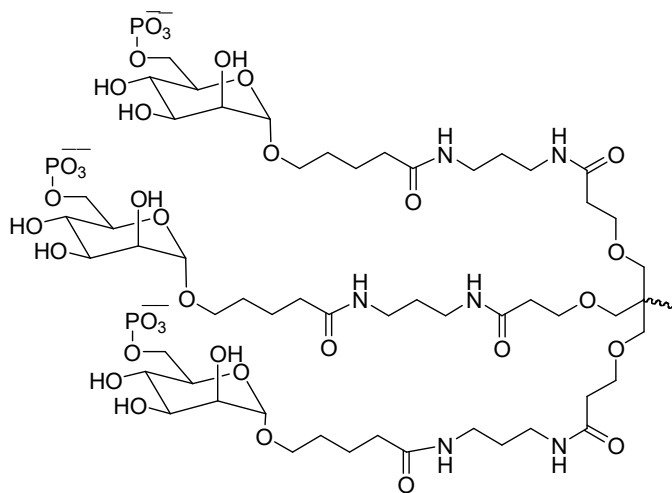
Fórmula IX,



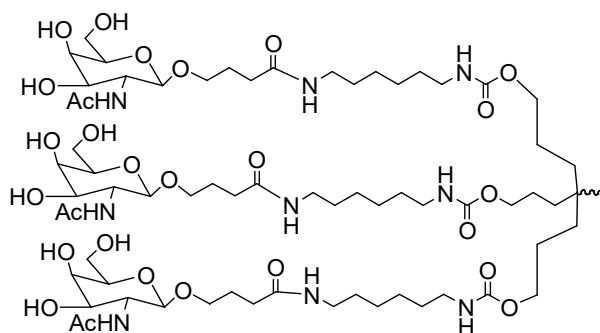
Fórmula X,



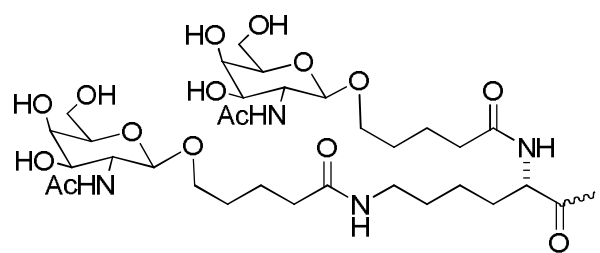
Fórmula XI,



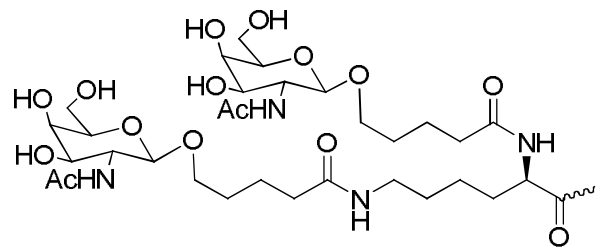
Fórmula XII,



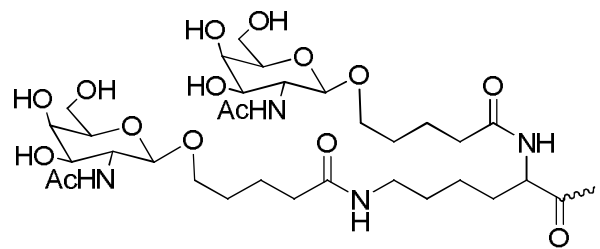
Fórmula XIII,



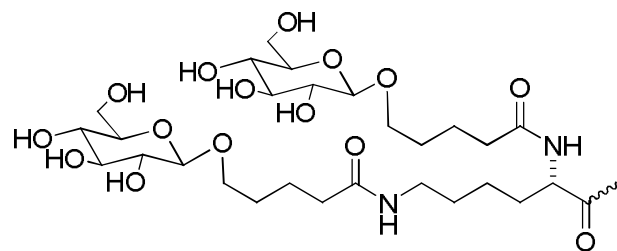
Fórmula XIV,



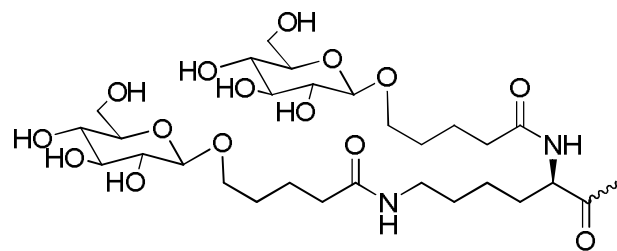
Fórmula XV,



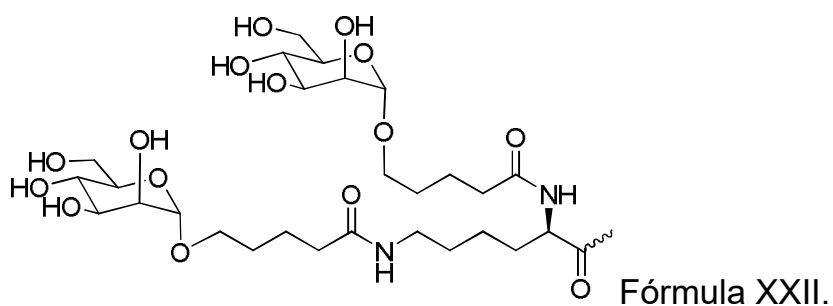
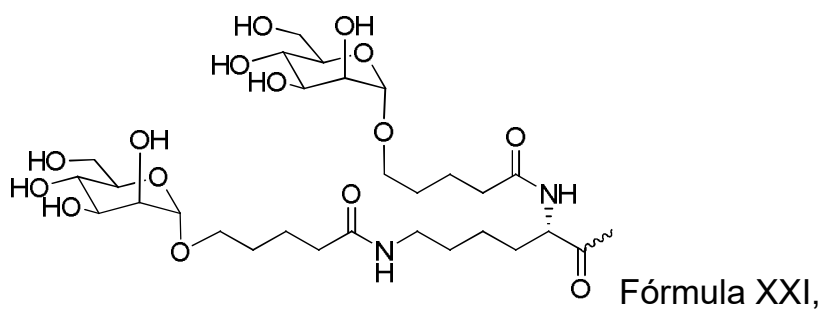
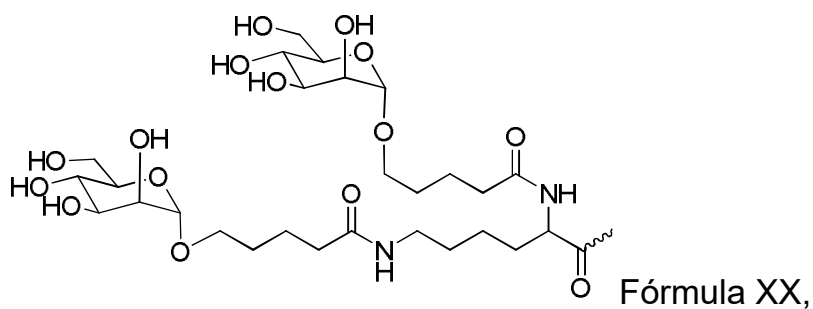
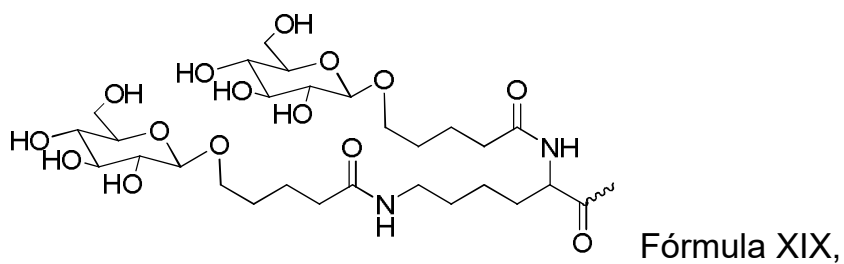
Fórmula XVI,



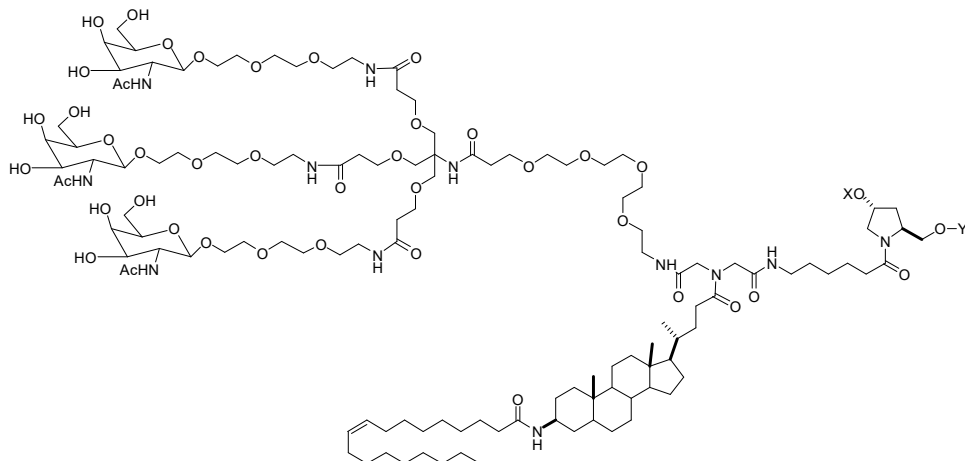
Fórmula XVII,



Fórmula XVIII,



[00420] Outro conjugado de carboidrato representativo para uso nas modalidades descritas aqui inclui, mas não está limitado a,



(Fórmula XXIII), quando um de X e Y é um oligonucleotídeo, o outro é um hidrogênio.

[00421] Em algumas modalidades, o conjugado de carboidrato compreende adicionalmente um ou mais ligantes adicionais como descrito acima, tais como, mas não se limitando a, um modulador PK e/ou um peptídeo de permeação de células.

[00422] Conjugados de carboidrato adicionais (e ligantes) adequados para uso na presente invenção incluem aquelas descritas na Publicação PCT N^os. WO 2014/179620 e WO 2014/179627, cuja totalidade do conteúdo é aqui incorporada por referência.

D. Ligantes

[00423] Em algumas modalidades, o conjugado ou ligante descrito aqui pode ser anexado a um oligonucleotídeo de RNAi com vários ligantes que podem ser cliváveis ou não cliváveis.

[00424] O termo "ligante" ou "grupo de ligação" significa uma fração orgânica que conecta duas partes de um composto, por exemplo, anexa covalentemente duas partes de um composto. Os ligantes compreendem tipicamente uma ligação direta ou um átomo tal como oxigênio ou enxofre, uma unidade tal como NR₈, C(O), C(O)NH, SO, SO₂, SO₂NH ou uma cadeia de átomos, tal como, mas não se limitando 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, alquilheteroarilalquila, alquilheteroarilalquenila, alquilheteroarilalquinila, alquenilheteroarilalquila, alquenilheteroarilalquenila,

alquenilheteroarilalquinila, alquinheterociclicilalquila,
 alquinheteroarilalquenila, alquinheteroarilalquinila,
 alquilheterociclicilalquila, alquilheterociclicilalquenila,
 alquilheterociclicilalquinila, alquenilheterociclicilalquila,
 alquenilheterociclicilalquenila, alquenilheterociclicilalquinila,
 alquinheterociclicilalquila, alquinheterociclicilalquenila,
 alquinheterociclicilalquinila, alquilarila, alquenilarila, alquinarila,
 alquilheteroarila, alquenilheteroarila, alquinheteroarila, cujos um ou
 mais metilenos podem estar interrompidos ou terminados por O, S,
 S(O), SO₂, N(R₈), C(O), arila substituída ou não substituída, heteroarila
 substituída ou não substituída, heterocíclico substituído ou não
 substituído; onde R₈ é hidrogênio, acila, alifático ou alifático substituído.
 Em uma modalidade, o ligante tem entre cerca de 1-24 átomos, 2-24, 3-
 24, 4-24, 5-24, 6-24, 6-18, 7-18, 8-18 átomos, 7-17, 8-17, 6-16, 7-16, ou
 8-16 átomos.

[00425] Um grupo de ligação clivável é um que seja suficientemente estável fora da célula, mas que, após entrada em uma célula alvo, seja clivado para liberar as duas partes que o ligante mantém juntas. Em uma modalidade preferencial, o grupo de ligação clivável é clivado pelo menos cerca de 10 vezes, 20 vezes, 30 vezes, 40 vezes, 50 vezes, 60 vezes, 70 vezes, 80 vezes, 90 vezes ou mais, ou pelo menos cerca de 100 vezes mais rapidamente em uma célula alvo ou sob uma primeira condição de referência (que pode, por exemplo, ser selecionada para mimetizar ou representar condições intracelulares) do que no sangue de um indivíduo, ou sob uma segunda condição de referência (que pode ser, por exemplo, selecionada para mimetizar ou representar condições encontradas no sangue ou soro).

[00426] Grupos de ligação cliváveis são suscetíveis a agentes de clivagem, por exemplo, pH, potencial redox ou a presença de moléculas de degradação. Geralmente, os agentes de clivagem são mais

prevalentes ou encontrados a níveis ou atividades mais elevados dentro de células do que no soro ou sangue. Exemplos de tais agentes de degradação incluem: agentes redox que são selecionados para substratos particulares ou que não têm especificidade para substratos, incluindo, por exemplo, enzimas oxidativas ou redutoras ou agentes redutores tais como mercaptanas, presentes em células, que podem degradar um grupo de ligação clivável por redox por redução; esterases; endossomas ou agentes que podem criar um ambiente ácido, por exemplo, aqueles que resultam em um pH de cinco ou menor; enzimas que podem hidrolisar ou degradar um grupo de ligação clivável por ácido por atuação como um ácido geral, peptidases (que podem ser específicas quanto a substratos), e fosfatases.

[00427] Um grupo de ligação clivável, tal como uma ligação dissulfeto, pode ser suscetível ao pH. O pH do soro humano é 7,4, enquanto o pH intracelular médio é ligeiramente menor, variando de cerca de 7,1-7,3. Os endossomos têm um pH mais ácido, na gama de 5,5-6,0, e os lisossomos têm um pH ainda mais ácido em torno de 5,0. Alguns ligantes terão um grupo de ligação clivável que é clivado a um pH preferencial, liberando desse modo um lipídeo catiônico do ligante dentro da célula, ou no compartimento desejado da célula.

[00428] Um ligante pode incluir um grupo de ligação clivável que é clivável por uma enzima particular. O tipo de grupo de ligação clivável incorporado em um ligante pode depender da célula alvo. Por exemplo, um ligante se dirigindo ao fígado pode ser ligado a um lipídeo catiônico através de um ligante que inclui um grupo éster. As células do fígado são ricas nesterase, e portanto o ligante será clivado mais eficazmente em células do fígado do que em tipos de células que não são ricas nesterases. Outros tipos de células ricas nesterases incluem células do pulmão, córtex renal, e testículos.

[00429] Ligantes que contêm ligações de peptídeo podem ser

usados quando se direcionam tipos de células ricas em peptidases, tais como células do fígado e sinoviócitos.

[00430] Em geral, a adequabilidade de um grupo de ligação clivável candidato pode ser avaliada por teste da capacidade de um agente (ou condição) de degradação para clivar o grupo de ligação candidato. Será também desejável testar o grupo de ligação clivável candidato quanto à capacidade para resistir à clivagem no sangue ou quando em contato com outro tecido não alvo. Assim é possível determinar a suscetibilidade relativa à clivagem entre uma primeira e uma segunda condição, onde a primeira é selecionada para ser indicativa de clivagem em uma célula alvo e a segunda é selecionada para ser indicativa de clivagem em outros tecidos ou fluidos biológicos, por exemplo, sangue ou soro. As avaliações podem ser levadas a cabo em sistemas isentos de células, em células, em cultura de células, em cultura de órgãos ou tecidos, ou em animais inteiros. Pode ser útil fazer avaliações iniciais em condições isentas de células ou de cultura e confirmar por avaliações adicionais em animais inteiros. Em modalidades preferenciais, compostos candidatos úteis são clivados pelo menos cerca de 2, 4, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, ou cerca de 100 vezes mais rapidamente na célula (ou sob condições *in vitro* selecionadas para mimetizarem condições intracelulares) em comparação com sangue ou soro (ou sob condições *in vitro* selecionadas para mimetizarem condições extracelulares).

i. Grupos de ligação cliváveis por redox

[00431] Em uma modalidade, um grupo de ligação clivável é um grupo de ligação clivável por redox que é clivado após redução ou oxidação. Um exemplo de um grupo de ligação redutoramente clivável é um grupo de ligação dissulfeto (-S-S-). Para determinar se um grupo de ligação clivável candidato é um "grupo de ligação redutoramente clivável" adequado, ou por exemplo é adequado para uso com uma fração de RNAi particular e agente de direcionamento particular, é

possível considerar métodos descritos aqui. Por exemplo, um candidato pode ser avaliado por incubação com ditiotreitol (DTT), ou outro agente redutor usando reagentes conhecidos na técnica, que mimetizam a taxa de clivagem que seria observada em uma célula, por exemplo, uma célula alvo. Os candidatos podem ser também avaliados sob condições que são selecionadas para mimetizar condições do sangue ou soro. Em uma, os compostos candidatos são clivados por no máximo cerca de 10% no sangue. Em outras modalidades, os compostos candidatos úteis são degradados pelo menos cerca de 2, 4, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, ou cerca de 100 vezes mais rapidamente na célula (ou sob condições *in vitro* selecionadas para mimetizarem condições intracelulares) em comparação com sangue (ou sob condições *in vitro* selecionadas para mimetizarem condições extracelulares). A taxa de clivagem de compostos candidatos pode ser determinada usando ensaios de cinética enzimática padrão sob condições escolhidas para mimetizarem meios intracelulares e comparando com condições escolhidas para mimetizarem meios extracelulares.

ii. Grupos de ligação cliváveis baseados em fosfato

[00432] Em outra modalidade, um ligante clivável compreende um grupo de ligação clivável baseado em fosfato. Um grupo de ligação clivável baseado em fosfato é clivado por agentes que degradam ou hidrolisam o grupo fosfato. Um exemplo de um agente que cliva grupos fosfato em células é enzimas tais como fosfatases em células. Exemplos de grupos de ligação de base 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-. Modalidades preferenciais 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-. Estes candidatos podem ser avaliados usando métodos análogos àqueles descritos acima.

iii. Grupos de ligação cliváveis por ácido

[00433] Em outra modalidade, um ligante clivável compreende um grupo de ligação clivável por ácido. Um grupo de ligação clivável por ácido é um grupo de ligação que é clivado sob condições ácidas. Em modalidades preferenciais, grupos de ligação cliváveis por ácido são clivados em um ambiente ácido com um pH de cerca de 6,5 ou menor (por exemplo, cerca de 6,0, 5,75, 5,5, 5,25, 5,0, ou menor), ou por agentes tais como enzimas que podem atuar como um ácido geral. Em uma célula, organelos específicos de pH baixo, tais como endossomos e lisossomos, podem proporcionar um ambiente de clivagem para grupos de ligação cliváveis por ácido. Exemplos de grupos de ligação cliváveis por ácido incluem mas não estão limitados a hidrazonas, ésteres, e ésteres de aminoácidos. Grupos cliváveis por ácido podem ter a fórmula geral -C=NN-, C(O)O, ou -OC(O). Uma modalidade preferencial é quando o carbono anexado 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. Estes candidatos podem ser avaliados usando métodos análogos àqueles descritos acima.

iv. Grupos de ligação à base de éster

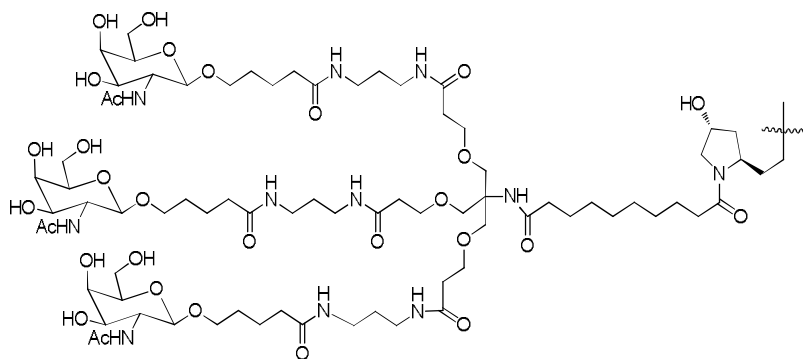
[00434] Em outra modalidade, um ligante clivável compreende um grupo de ligação clivável à base de éster. Um grupo de ligação clivável à base de éster é clivado por enzimas tais como esterases e amidases em células. Exemplos de grupos de ligação cliváveis à base de éster incluem mas não estão limitados a ésteres de grupos alquilenos, alquenileno e alquinileno. Grupos de ligação cliváveis com éster têm a fórmula geral -C(O)O-, ou -OC(O)-. Estes candidatos podem ser

avaliados usando métodos análogos àqueles descritos acima.

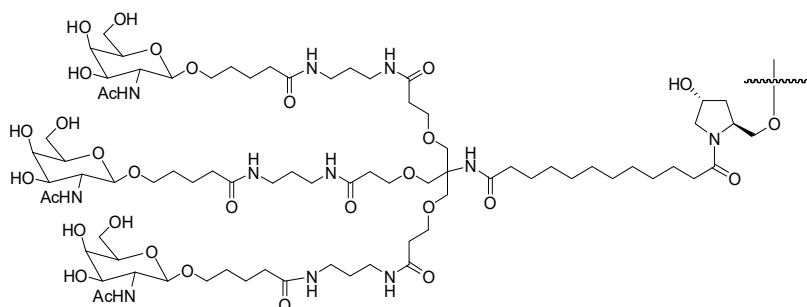
v. Grupos de clivagem à base de peptídeo

[00435] Ainda em outra modalidade, um ligante clivável compreende um grupo de ligação clivável baseado em peptídeo. Um grupo de ligação clivável baseado em peptídeo é clivado por enzimas tais como peptidases e proteases em células. Grupos de ligação cliváveis à base de peptídeo são ligações de peptídeo formadas entre aminoácidos para originar oligopeptídeos (por exemplo, dipeptídeos, tripeptídeos, etc.) e polipeptídeos. Grupos cliváveis baseados peptídeo não incluem o grupo amida (-C(O)NH-). O grupo amida pode ser formado entre qualquer alquilenos, alquênulos ou alquínulos. Uma ligação de peptídeo é um tipo especial de ligação amida formada entre aminoácidos para originar peptídeos e proteínas. O grupo de clivagem à base de peptídeo está geralmente limitado à ligação de peptídeo (isto é, a ligação amida) formada entre aminoácidos originando peptídeos e proteínas e não inclui o grupo funcional amida inteiro. Grupos de ligação cliváveis à base de peptídeo têm a fórmula geral – NHCHRAC(O)NHCHRBC(O)-, em que RA e RB são os grupos R dos dois aminoácidos adjacentes. Estes candidatos podem ser avaliados usando métodos análogos àqueles descritos acima.

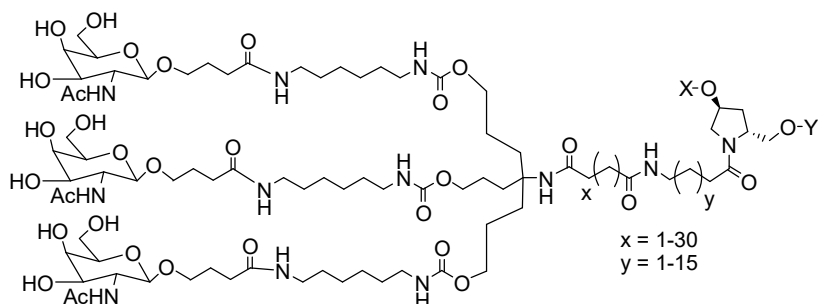
[00436] Em uma modalidade, um RNAi da invenção é conjugado com um carboidrato através de um ligante. Exemplos não limitantes de conjugados de carboidrato de RNAi com ligantes das composições e métodos da invenção incluem, mas não estão limitados a



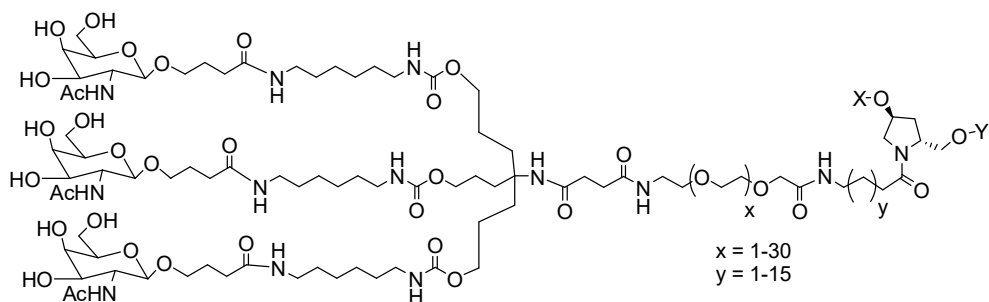
(Fórmula XXIV),



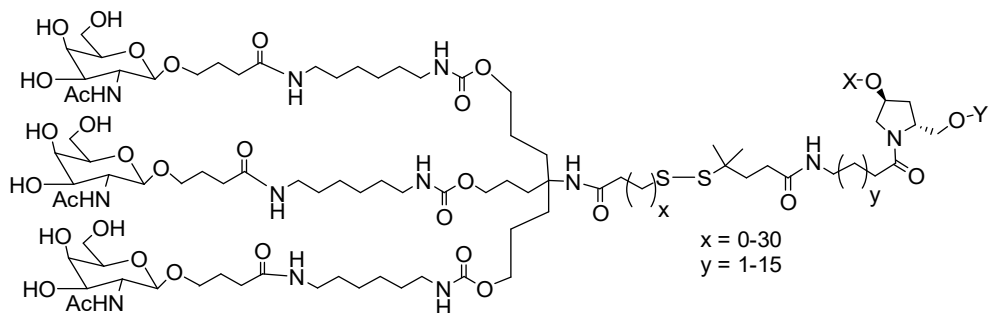
(Fórmula XXV),



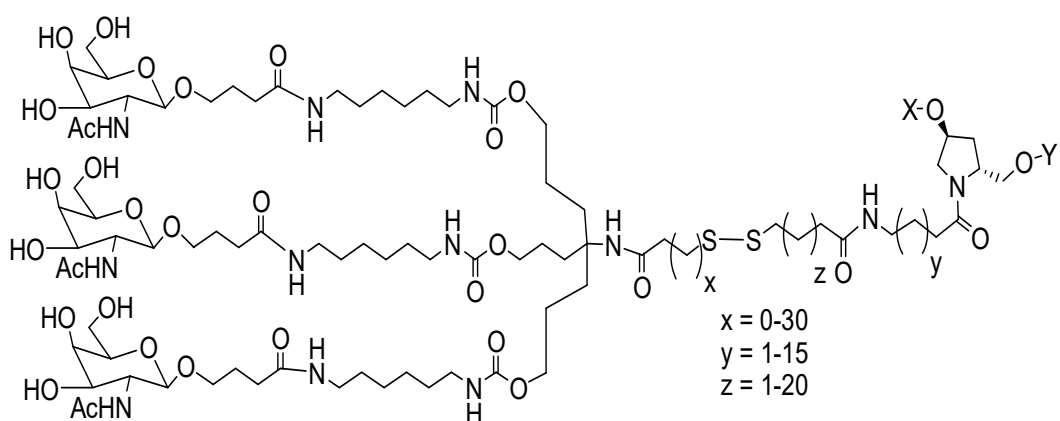
(Fórmula XXVI),



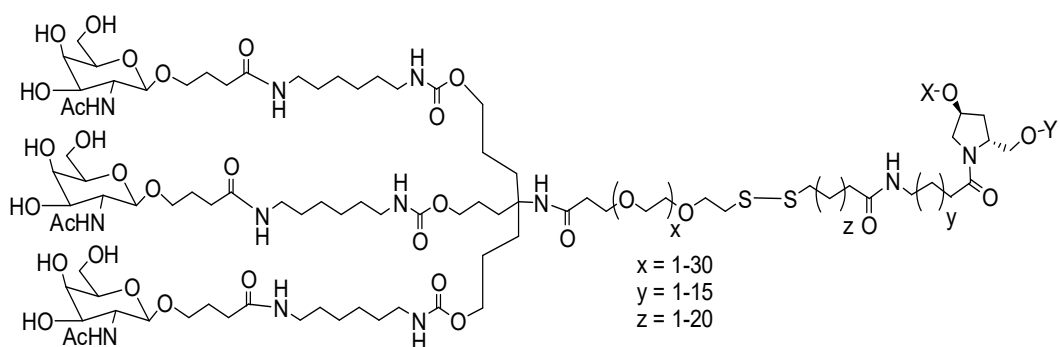
(Fórmula XXVII),



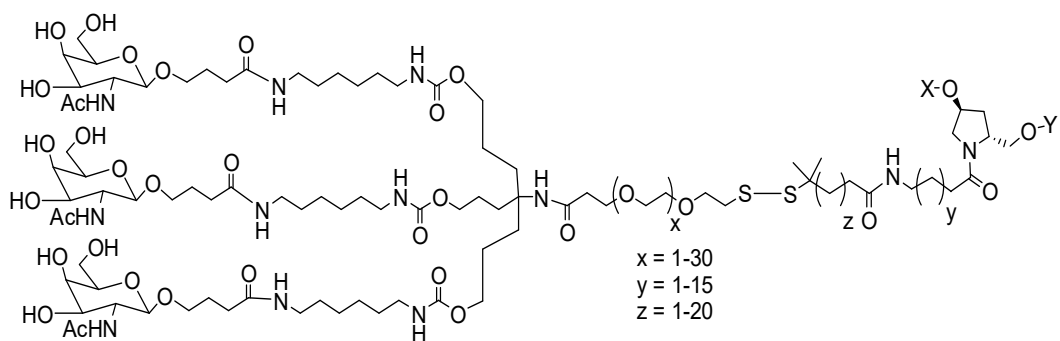
(Fórmula XXVIII),



(Fórmula XXIX),



(Fórmula XXX), e



(Fórmula XXXI),

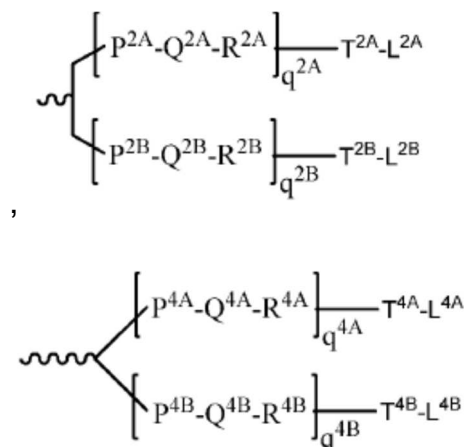
quando um de X ou Y é um oligonucleotídeo, o outro é um hidrogênio.

[00437] Em certas modalidades das composições e métodos da invenção, um ligante é um ou mais derivados de "GalNAc" (N-acetilgalactosamina) anexados através de um ligante ramificado bivalente ou trivalente.

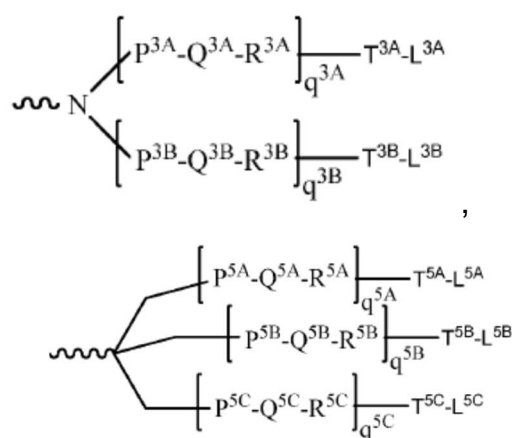
[00438] Em uma modalidade, um dsRNA da invenção é conjugado com um ligante ramificado bivalente ou trivalente selecionado do grupo de estruturas apresentadas em qualquer uma das fórmulas (XXXII) –

(XXXV):

Fórmula XXXII



Fórmula XXXIII



Fórmula XXXIV

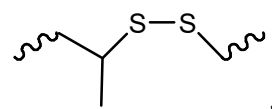
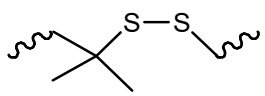
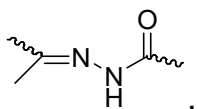
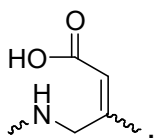
em que:

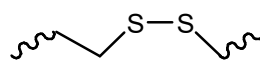
$\text{q}^{2\text{A}}$, $\text{q}^{2\text{B}}$, $\text{q}^{3\text{A}}$, $\text{q}^{3\text{B}}$, $\text{q}^{4\text{A}}$, $\text{q}^{4\text{B}}$, $\text{q}^{5\text{A}}$, $\text{q}^{5\text{B}}$ e $\text{q}^{5\text{C}}$ representam independentemente para cada ocorrência 0-20 e em que a unidade repetida pode ser a mesma ou diferente;

$\text{P}^{2\text{A}}$, $\text{P}^{2\text{B}}$, $\text{P}^{3\text{A}}$, $\text{P}^{3\text{B}}$, $\text{P}^{4\text{A}}$, $\text{P}^{4\text{B}}$, $\text{P}^{5\text{A}}$, $\text{P}^{5\text{B}}$, $\text{P}^{5\text{C}}$, $\text{T}^{2\text{A}}$, $\text{T}^{2\text{B}}$, $\text{T}^{3\text{A}}$, $\text{T}^{3\text{B}}$, $\text{T}^{4\text{A}}$, $\text{T}^{4\text{B}}$, $\text{T}^{5\text{A}}$, $\text{T}^{5\text{B}}$, $\text{T}^{5\text{C}}$ estão cada um independentemente para cada ocorrência ausentes, são CO, NH, O, S, OC(O), NHC(O), CH₂, CH₂NH ou CH₂O;

$\text{Q}^{2\text{A}}$, $\text{Q}^{2\text{B}}$, $\text{Q}^{3\text{A}}$, $\text{Q}^{3\text{B}}$, $\text{Q}^{4\text{A}}$, $\text{Q}^{4\text{B}}$, $\text{Q}^{5\text{A}}$, $\text{Q}^{5\text{B}}$, $\text{Q}^{5\text{C}}$ estão cada um independentemente para cada ocorrência ausentes, são alquilenos, alquilenos substituídos em que um ou mais metilenos podem estar interrompidos ou terminados por um ou mais de O, S, S(O), SO₂, N(R^N), C(R')=C(R''), C≡C ou C(O);

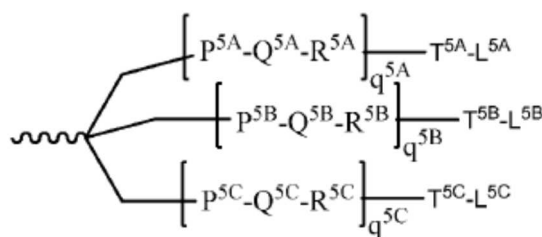
$\text{R}^{2\text{A}}$, $\text{R}^{2\text{B}}$, $\text{R}^{3\text{A}}$, $\text{R}^{3\text{B}}$, $\text{R}^{4\text{A}}$, $\text{R}^{4\text{B}}$, $\text{R}^{5\text{A}}$, $\text{R}^{5\text{B}}$, $\text{R}^{5\text{C}}$ estão cada um independentemente para cada ocorrência ausentes, são NH, O, S, CH₂, C(O)O, C(O)NH, NHCH(R^a)C(O), -C(O)-CH(R^a)-NH-, CO, CH=N-O,



 ou heterociclila;

L^{2A} , L^{2B} , L^{3A} , L^{3B} , L^{4A} , L^{4B} , L^{5A} , L^{5B} e L^{5C} representam o ligante; isto é, cada um independentemente, para cada ocorrência um monossacarídeo (tal como GalNAc), dissacarídeo, trissacarídeo, tetrassacarídeo, oligossacarídeo, ou polissacarídeo; e R^a é H ou cadeia lateral de um aminoácido. Derivados de GalNAc conjugantes trivalentes são particularmente úteis para uso com agentes de RNAi para inibição da expressão de um gene alvo, tal como aquelas da fórmula (XXXVI):

Fórmula XXXVI



em que L^{5A} , L^{5B} e L^{5C} representam um monossacarídeo, tal como um derivado de GalNAc.

[00439] Exemplos de derivados de GalNAc conjugantes com grupos ligantes ramificados bivalentes e trivalentes adequados incluem as, mas não estão limitados às, estruturas enumeradas acima como fórmulas II_VII, XI, X, e XIII.

[00440] Patentes dos E.U.A. representativas que ensinam a preparação de conjugados de RNA incluem as, mas não estão limitadas às, Pat. dos E.U.A. N^{os}. 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; 8.106.022, em que a totalidade do conteúdo de cada uma é desse modo incorporada aqui a título de referência.

[00441] Não é necessário que todas as posições de um dado composto sejam uniformemente modificadas, e, de fato, mais do que uma das modificações acima mencionadas podem ser incorporadas em um único composto ou mesmo em um único nucleosídeo em um RNAi. A presente invenção inclui também compostos de RNAi que são compostos quiméricos.

[00442] Compostos de RNAi "quiméricos" ou "quimeras", no contexto desta invenção, são compostos de RNAi, preferencialmente dsRNAs, que contêm duas ou mais regiões quimicamente distintas, cada uma constituída por pelo menos uma unidade monomérica, *isto é*, um nucleotídeo no caso de um composto de dsRNA. Estes RNAis contêm tipicamente pelo menos uma região em que o RNA é modificado de modo a conferir ao RNAi resistência aumentada a degradação por nucleases, captação celular aumentada, e/ou afinidade de ligação aumentada para o ácido nucleico alvo. Uma região adicional do RNAi pode servir de substrato para enzimas capazes de clivar híbridos RNA:DNA ou RNA:RNA. A título de exemplo, RNase H é uma endonuclease celular que cliva o filamento de RNA de um dúplex RNA:DNA. A ativação de RNase H, portanto, resulta em clivagem do alvo de RNA, intensificando desse modo grandemente a eficácia da inibição da expressão de genes pelo RNAi. Consequentemente, podem ser frequentemente obtidos resultados comparáveis com RNAis mais curtos quando são usados dsRNAs quiméricos, em comparação com desóxi dsRNAs de fosforotioato hibridando com a mesma região alvo. A clivagem do alvo de RNA pode ser rotineiramente detectada por eletroforese em gel e, se necessário, técnicas associadas de hibridação

de ácidos nucleicos conhecidas na técnica.

[00443] Em certos casos, o RNA de um RNAi pode ser modificado por um grupo não ligante. Um número de moléculas não ligantes foram conjugadas com RNAs de modo a intensificar a atividade, distribuição celular ou captação celular do RNAi, e procedimentos para realização de tais conjugações estão disponíveis na literatura científica. Tais frações não ligantes têm incluído frações lipídicas, tal como colesterol (Kubo, T. *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 2007, 365(1):54-61; Letsinger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, 86:6553), ácido cólico (Manoharan *et al.*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1994, 4:1053), um tioéter, por exemplo, hexil-S-tritilol (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), uma cadeia alifática, por exemplo, dodecandiol ou resíduos 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 fosfolípido, por exemplo, di-hexadecil-rac-glicerol ou 1,2-di-O-hexadecil-rac-glicero-3-H-fosfonato de trietilamônio (Manoharan *et al.*, *Tetrahedron Lett.*, 1995, 36:3651; Shea *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 1990, 18:3777), uma poliamina ou uma cadeia de polietileno glicol (Manoharan *et al.*, *Nucleosides & Nucleotides*, 1995, 14:969), ou adamantano de ácido acético (Manoharan *et al.*, *Tetrahedron Lett.*, 1995, 36:3651), uma fração palmitila (Mishra *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta*, 1995, 1264:229), ou uma fração octadecilamina ou hexilamino-carbonil-oxicolesterol (Crooke *et al.*, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1996, 277:923). Patentes dos Estados Unidos representativas que ensinam a preparação de tais conjugados de RNA foram listadas acima. Protocolos de conjugação típicos envolvem a síntese de um RNA transportando um ligante amino em uma ou mais posições da sequência. O grupo amino é depois reagido com a molécula sendo

conjugada usando reagentes apropriados de acoplamento ou ativação. A reação de conjugação pode ser realizada com o RNA ainda ligado ao suporte sólido ou após clivagem do RNA, em fase de solução. A purificação do conjugado de RNA por HPLC origina tipicamente o conjugado puro.

V. Distribuição de um RNAi da Invenção

[00444] A administração de um RNAi da invenção em uma célula, por exemplo, uma célula em um indivíduo, como um indivíduo humano (por exemplo, um indivíduo necessitado, como um indivíduo com uma doença, distúrbio ou condição associada a infecção pelo HBV) pode ser efetuada de alguns modos diferentes. Por exemplo, a administração pode ser realizada por contato de uma célula com um RNAi da invenção *in vitro* ou *in vivo*. A administração *in vivo* pode ser também realizada diretamente por administração de uma composição compreendendo um RNAi, por exemplo, um dsRNA, a um indivíduo. Alternativamente, a administração *in vivo* pode ser realizada indiretamente por administração de um ou mais vetores que codificam e dirigem a expressão do RNAi. Estas alternativas são adicionalmente discutidas em baixo.

[00445] Em geral, qualquer método de administração de uma molécula de ácido nucleico (*in vitro* ou *in vivo*) pode ser adaptado para uso com um RNAi da invenção (ver, por exemplo, Akhtar S. and Julian RL. (1992) *Trends Cell. Biol.* 2(5):139-144 e WO94/02595, que são incorporados aqui por referência na sua totalidade). Para administração *in vivo*, fatores a considerar para administrar uma molécula de RNAi incluem, por exemplo, estabilidade biológica da molécula administrada, prevenção de efeitos inespecíficos, e acúmulo da molécula administrada no tecido alvo. Os efeitos inespecíficos de um RNAi podem ser minimizados por administração local, por exemplo, por injeção ou implantação direta em um tecido ou administração tópica da

preparação. A administração local a um local de tratamento maximiza a concentração local do agente, limita a exposição do agente a tecidos sistêmicos que podem de outro modo ser danificados pelo agente ou que podem degradar o agente, e permite uma dose total mais baixa da molécula de RNAi a ser administrada. Vários estudos mostraram o silenciamento bem-sucedido de produtos de gene quando um RNAi é administrado localmente. Por exemplo se mostrou que a administração intraocular de um dsRNA de VEGF por injeção intravítrea em macacos-cinomolgos (Tolentino, MJ., *et al* (2004) *Retina* 24:132-138) e injeções subretinais em camundongos (Reich, SJ., *et al* (2003) *Mol. Vis.* 9:210-216) prevenia a neovascularização em um modelo experimental da degeneração macular relacionada com a idade. Adicionalmente, a injeção intratumoral direta de um dsRNA em camundongos reduz o volume tumoral (Pille, J., *et al* (2005) *Mol. Ther.* 11:267-274) e consegue prolongar a sobrevivência de camundongos transportando tumores (Kim, WJ., *et al* (2006) *Mol. Ther.* 14:343-350; Li, S., *et al* (2007) *Mol. Ther.* 15:515-523). A interferência de RNA mostrou também sucesso com administração local ao CNS por injeção direta (Dorn, G., *et al* (2004) *Nucleic Acids* 32:e49; Tan, PH., *et al* (2005) *Gene Ther.* 12:59-66; Makimura, H., *et al* (2002) *BMC Neurosci.* 3:18; Shishkina, GT., *et al* (2004) *Neuroscience* 129:521-528; Thakker, ER., *et al* (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101:17270-17275; Akaneya, Y., *et al* (2005) *J. Neurophysiol.* 93:594-602) e aos pulmões por administração intranasal (Howard, KA., *et al* (2006) *Mol. Ther.* 14:476-484; Zhang, X., *et al* (2004) *J. Biol. Chem.* 279:10677-10684; Bitko, V., *et al* (2005) *Nat. Med.* 11:50-55). Para administração de um RNAi sistemicamente para o tratamento de uma doença, o RNA pode ser modificado ou alternativamente administrado usando um sistema de administração de fármacos; ambos os métodos atuam para prevenir a degradação rápida do dsRNA por endo- e exonucleases *in vivo*. A modificação do RNA ou do

transportador farmacêutico também pode permitir o direcionar a composição de RNAi para o tecido alvo e evitar efeitos fora do alvo indesejáveis. Moléculas de RNAi podem ser modificadas por conjugação química a grupos lipofílicos, como colesterol, para aumentar a captação celular e prevenir a degradação. Por exemplo, um RNAi dirigido contra ApoB conjugado com uma fração de colesterol lipofílica foi injetado sistemicamente em camundongos e resultou em silenciamento de mRNA de apoB no fígado e jejuno (Soutschek, J., *et al* (2004) *Nature* 432:173-178). Foi mostrado que a conjugação de um RNAi a um aptâmero inibe o crescimento tumoral e medeia a regressão tumoral em um modelo de camundongo de câncer da próstata (McNamara, JO., *et al* (2006) *Nat. Biotechnol.* 24:1005-1015). Em uma modalidade alternativa, o RNAi pode ser administrado usando sistemas de administração de fármacos tais como uma nanopartícula, um dendrímero, um polímero, lipossomos, ou um sistema de administração catiônico. Sistemas de administração catiônicos positivamente carregados facilitam a ligação de uma molécula de RNAi (negativamente carregada) e intensificam também interações na membrana celular negativamente carregada para permitir captação eficaz de um RNAi pela célula. Lipídeos, dendrímeros, ou polímeros catiônicos podem ser ligados a um RNAi, ou induzidos a formar uma vesícula ou micélio (ver, por exemplo, Kim SH., *et al* (2008) *Journal of Controlled Release* 129(2):107-116) que encaixa um RNAi. A formação de vesículas ou micélios previne adicionalmente a degradação do RNAi quando administrado sistemicamente. Métodos de produzir e administrar complexos de RNAi catiônicos estão bem dentro das capacidades de um perito na técnica (ver, por exemplo, Sorensen, DR., *et al* (2003) *J. Mol. Biol* 327:761-766; Verma, UN., *et al* (2003) *Clin. Cancer Res.* 9:1291-1300; Arnold, AS *et al* (2007) *J. Hypertens.* 25:197-205, que são aqui incorporadas por referência na sua totalidade). Alguns

exemplos não limitativos dos sistemas de administração de fármacos úteis para administração sistêmicas de RNAs incluem DOTAP (Sorensen, Dr., *et al* (2003), *supra*; Verma, UN., *et al* (2003), *supra*), Oligofectamine, "solid nucleic acid lipid particles" (Zimmermann, TS., *et al* (2006) *Nature* 441:111-114), cardiolipina (Chien, PY., *et al* (2005) *Cancer Gene Ther.* 12:321-328; Pal, A., *et al* (2005) *Int J. Oncol.* 26:1087-1091), polietileneimina (Bonnet ME., *et al* (2008) *Pharm. Res.* 16 de agosto, publicado digitalmente antes de ser impresso; Aigner, A. (2006) *J. Biomed. Biotechnol.* 71659), peptídeos Arg-Gly-Asp (RGD) (Liu, S. (2006) *Mol. Pharm.* 3:472-487), e poliamidoaminas (Tomalia, DA., *et al* (2007) *Biochem. Soc. Trans.* 35:61-67; Yoo, H., *et al* (1999) *Pharm. Res.* 16:1799-1804). Em algumas modalidades, um RNAi forma um complexo com ciclodextrina para administração sistêmica. Métodos para administração e composições farmacêuticas de RNAs e ciclodextrinas podem ser encontrados na Patente dos E.U.A. Nº 7,427,605, que é aqui incorporada por referência na sua totalidade.

A. RNAs da Invenção codificados por Vetores

[00446] RNAi se dirigindo ao gene de HBV pode ser expresso a partir de unidades de transcrição inseridas em vetores de DNA ou RNA (ver, por exemplo, Couture, A, *et al.*, *TIG.* (1996), 12:5-10; Skillern, A., *et al.*, Publicação PCT Internacional No. WO 00/22113, Conrad, Publicação PCT Internacional No. WO 00/22114, e Conrad, Pat. dos E.U.A. No. 6,054,299). A expressão pode ser transiente (da ordem de horas a semanas) ou sustentada (semanas a meses ou mais), dependendo do construto específico usado e do tipo de tecido ou célula alvo. Estes 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 pode ser também construído para permitir que seja herdado como um plasmídeo extracromossômico (Gassmann, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1995) 92:1292).

[00447] O filamento individual ou filamentos de um RNAi podem ser transcritos a partir de um promotor em um vetor de expressão. Onde dois filamentos separados são para serem expressos 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 filamento individual de um dsRNA pode ser transcrito por promotores, ambos os quais estão localizados no mesmo plasmídeo de expressão. Em uma modalidade, um dsRNA é expresso como polinucleotídeos com repetições invertidas ligados por uma sequência de polinucleotídeos ligante tal que o dsRNA tenha uma estrutura de haste e alça.

[00448] Vetores de expressão de RNAi são geralmente plasmídeos de DNA ou vetores virais. Vetores de expressão compatíveis com células eucarióticas, preferencialmente aqueles compatíveis com células de vertebrado, podem ser usados para produzir construtos recombinantes para a expressão de um RNAi como descrito aqui. Vetores de expressão de células eucarióticas são bem conhecidos na técnica e estão disponíveis de um número de fontes comerciais. Tipicamente, tais vetores são proporcionados contendo locais de restrição convenientes para inserção do segmento de ácido nucleico desejado. A administração de vetores expressando RNAi pode ser sistêmica, tal como por administração intravenosa ou intramuscular, por administração a células alvo explantadas do paciente seguida de reintrodução no paciente, ou por qualquer outro meio que permita introdução em uma célula alvo desejada.

[00449] Plasmídeos de expressão de RNAi podem ser transfectados em células alvo como um complexo com transportadores de lipídeos catiônicos (por exemplo, Oligofectamina) ou transportadores à base de lipídeos não catiônicos (por exemplo, Transit-TKO™). Múltiplas transfecções de lipídeos para silenciamentos mediados por RNAi

visando diferentes regiões de um RNA alvo ao longo de um período de uma semana ou mais estão também contempladas pela invenção. A introdução bem-sucedida de vetores em células hospedeiras pode ser monitorizada usando vários métodos conhecidos. Por exemplo, a transfecção transiente pode ser sinalizada com um repórter, tal como um marcador fluorescente, tal como Proteína Verde Fluorescente (GFP). A transfecção estável de células *ex vivo* pode ser assegurada usando marcadores que proporcionam à célula transfectada resistência a fatores ambientais específicos (por exemplo, antibióticos e fármacos), tais como resistência a higromicina B.

[00450] Sistemas de vetores virais que podem ser utilizados com os métodos e composições descritos aqui incluem mas não estão limitados a (a) vetores de adenovírus; (b) vetores de retrovírus, incluindo mas não se limitando a vetores lentivirais, vírus da leucemia murina de Moloney, etc.; (c) vetores de vírus adeno-associados; (d) vetores de vírus herpes simplex; (e) vetores de SV 40; (f) vetores de vírus políoma; (g) vetores de vírus papiloma; (h) vetores de picornavírus; (i) vetores de pox vírus, como ortopox, por exemplo, vetores de vírus vacínia, ou avipox, por exemplo, varíola dos canários ou varíola das aves domésticas; e (j) um adenovírus dependente de auxiliares ou "gutless". Vírus deficientes quanto à replicação podem ser também vantajosos. Diferentes vetores serão ou não incorporados no genoma das células. Os construtos podem incluir sequências virais para transfecção, se desejado. Alternativamente, o construto pode ser incorporado em vetores capazes de replicação episomal, por exemplo, vetores de EPV e EBV. Construtos para a expressão recombinante de um RNAi irão geralmente requerer elementos reguladores, por exemplo, promotores, intensificadores, *etc.*, para assegurar a expressão do RNAi em células alvo. Outros aspectos a ter em consideração para vetores e construtos são adicionalmente descritos em baixo.

[00451] Vetores úteis para a distribuição de um RNAi incluirão elementos reguladores (promotor, intensificador, *etc.*) suficientes para expressão do RNAi na célula ou tecido alvo desejado. Os elementos reguladores podem ser escolhidos para proporcionarem expressão constitutiva ou regulada/induzível.

[00452] A expressão do RNAi pode ser precisamente regulada, por exemplo, por uso de uma sequência reguladora induzível que é sensível a certos reguladores fisiológicos, por exemplo, níveis de glucose em circulação, ou hormônios (Docherty *et al.*, 1994, *FASEB J.* 8:20-24). Tais sistemas de expressão induzível, adequados para o controle da expressão de dsRNA em células ou em mamíferos incluem, por exemplo, regulação por ecdisona, por estrogênio, progesterona, tetraciclina, indutores químicos da dimerização, e isopropil-beta-D1-tiogalactopiranosídeo (IPTG). Uma pessoa perita na técnica seria capaz de escolher a sequência reguladora/promotora apropriada com base no uso pretendido do transgene de RNAi.

[00453] Podem ser usados vetores virais que contêm sequências de ácidos nucleicos codificando um RNAi. Por exemplo pode ser usado um vetor retroviral Miller *et al.*, *Meth. Enzymol.* 217:581-599 (1993)). Estes vetores retrovirais contêm os componentes necessários para o empacotamento correto do genoma viral e integração no DNA da célula hospedeira. As sequências de ácidos nucleicos codificando um RNAi são clonadas em um ou mais vetores, o que facilita a administração do ácido nucleico em um paciente. Mais detalhes sobre vetores retrovirais podem ser encontrados, por exemplo, em Boesen *et al.*, *Biotherapy* 6:291-302 (1994), que descreve o uso de um vetor retroviral para administrar o gene *mdr1* a células-tronco hematopoiéticas de modo a tornar as células-tronco mais resistentes a quimioterapia. Outras referências ilustrando o uso de vetores retrovirais em terapia de genes são: Clowes *et al.*, *J. Clin. Invest.* 93:644-651 (1994); Kiem *et al.*, *Blood*

83:1467-1473 (1994); Salmons e Gunzberg, *Human Gene Therapy* 4:129-141 (1993); e Grossman e Wilson, *Curr. Opin. in Genetics and Devel.* 3:110-114 (1993). Vetores lentivirais contemplados para uso incluem, por exemplo, os vetores baseados em HIV descritos nas Patentes dos E.U.A. N^{os} 6,143,520; 5,665,557; e 5,981,276, que são aqui incorporadas por referência.

[00454] Adenovírus são também contemplados para uso na distribuição de RNAs da invenção. Adenovírus são veículos especialmente atrativos, por exemplo, para administração de genes a epitélios respiratórios. Os adenovírus infectam naturalmente epitélios respiratórios onde causam uma doença ligeira. Outros alvos de sistemas de administração baseados em adenovírus são fígado, o sistema nervoso central, células endoteliais, e músculo. Os adenovírus têm a vantagem de serem capazes de infectar células não em divisão. Kozarsky e Wilson, *Current Opinion in Genetics and Development* 3:499-503 (1993) apresentam uma revisão de terapia de genes à base de adenovírus. Bout *et al.*, *Human Gene Therapy* 5:3-10 (1994) demonstraram o uso de vetores de adenovírus para transferir genes para o epitélio respiratório de macacos rhesus. Outros exemplos do uso de adenovírus em terapia de genes podem ser encontrados em Rosenfeld *et al.*, *Science* 252:431-434 (1991); Rosenfeld *et al.*, *Cell* 68:143-155 (1992); Mastrangeli *et al.*, *J. Clin. Invest.* 91:225-234 (1993); Publicação PCT WO94/12649; e Wang, *et al.*, *Gene Therapy* 2:775-783 (1995). Um vetor AV adequado para expressão de um RNAi apresentado na invenção, um método para construção do vetor AV recombinante, e um método para administração do vetor a células alvo, são descritos em Xia H *et al.* (2002), *Nat. Biotech.* 20: 1006-1010.

[00455] Vetores de vírus adeno-associados (AAV) podem ser também usados para administrar um RNAi da invenção (Walsh *et al.*, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 204:289-300 (1993); Pat. Dos E.U.A. N^o

5,436,146). Em uma modalidade, o RNAi pode ser expresso como duas moléculas de RNA de filamento único complementares, separadas a partir de um vetor AAV recombinante tendo, por exemplo, o promotor de RNA U6 ou H1, ou o promotor do citomegalovírus (CMV). Vetores AAV adequados para expressão do dsRNA apresentado na invenção, métodos para construção do vetor AV recombinante, e métodos para administração dos vetores a células alvo são descritos em Samulski R *et al.* (1987), *J. Virol.* 61: 3096-3101; Fisher K J *et al.* (1996), *J. Virol.* 70: 520-532; Samulski R *et al.* (1989), *J. Virol.* 63: 3822-3826; Pat. dos E.U.A. Nº 5,252,479; Pat. dos E.U.A. Nº 5,139,941; Pedido de Patente Internacional Nº WO 94/13788; e Pedido de Patente Internacional Nº WO 93/24641, as divulgações inteiras dos quais são aqui incorporadas por referência.

[00456] Outro vetor viral adequado para distribuição de um RNAi da invenção é um vírus da varíola tal como um vírus vacínia, por exemplo uma vacínia atenuada tal como Vírus Ancara Modificado (MVA) ou NYVAC, um avipox tal como varíola das aves domésticas ou varíola dos canários.

[00457] O tropismo dos vetores virais pode ser modificado por pseudotipagem dos vetores com proteínas do envelope ou outros antígenos de superfície de outros vírus, ou por substituição de diferentes proteínas da cápside viral, como apropriado. Por exemplo, os vetores lentivirais podem ser pseudotipados com proteínas de superfície do vírus da estomatite vesicular (VSV), raiva, Ébola, Mokola, e similares. Os vetores AAV podem ser preparados para visarem células diferentes por manipulação dos vetores para expressarem diferentes serotipos de proteínas da cápside; ver, por exemplo, Rabinowitz J E *et al.* (2002), *J Virol* 76:791-801, a divulgação inteira do qual é aqui incorporada por referência.

[00458] A preparação farmacêutica de um vetor pode incluir o vetor

em um diluente aceitável, ou pode incluir uma matriz de liberação lenta na qual o veículo de distribuição de genes está embebido. Alternativamente, onde o vetor completo de administração de genes puder ser produzido intacto a partir de células recombinantes, por exemplo, vetores retrovirais, a preparação farmacêutica pode incluir uma ou mais células que produzem o sistema de administração de genes.

VI. Composições Farmacêuticas da Invenção

[00459] A presente invenção inclui também composições e formulações farmacêuticas que incluem os RNAs da invenção. Em uma modalidade são proporcionadas aqui composições farmacêuticas contendo um RNAi, como descrito aqui, e um transportador farmacêuticamente aceitável. As composições farmacêuticas contendo o RNAi são úteis para tratamento de uma doença ou distúrbio associado à expressão ou atividade de um gene HBV. Tais composições farmacêuticas são formuladas com base no modo de administração. Um exemplo é composições que são formuladas para administração sistêmica através de administração parenteral, por exemplo, por administração subcutânea (SC) ou intravenosa (IV). Outro exemplo é composições que são formuladas para administração direta no parênquima do cérebro, por exemplo, por infusão no cérebro, tal como por infusão contínua com bomba. As composições farmacêuticas da invenção podem ser administradas em dosagens suficientes para inibir a expressão de um gene HBV.

[00460] Em uma modalidade, um agente de RNAi da invenção é administrado a um indivíduo como uma dose baseada no peso. Uma "dose baseada no peso" (por exemplo, uma dose em mg/kg) é uma dose do agente RNAi que mudará dependendo do peso do indivíduo. Em outra modalidade, um agente de RNAi é administrado a um indivíduo como uma dose fixa. Uma "dose fixa" (por exemplo, uma dose em mg)

significa que uma dose de um agente de RNAi é usada para todos os indivíduos, independentemente de quaisquer fatores específicos relacionados com o indivíduo, tais como o peso. Em uma modalidade particular, uma dose fixa de um agente de RNAi da invenção baseia-se em um peso ou idade predeterminados.

[00461] Em geral, uma dose adequada de um RNAi da invenção estará na gama de cerca de 0,001 a cerca de 200,0 miligramas por quilograma de peso corporal do receptor por dia, geralmente na gama de cerca de 1 a 50 mg por quilograma de peso corporal por dia. Por exemplo, o dsRNA pode ser administrado a cerca de 0,01 mg/kg, cerca de 0,05 mg/kg, cerca de 0,5 mg/kg, cerca de 1 mg/kg, cerca de 1,5 mg/kg, cerca de 2 mg/kg, cerca de 3 mg/kg, cerca de 10 mg/kg, cerca de 20 mg/kg, cerca de 30 mg/kg, cerca de 40 mg/kg, ou cerca de 50 mg/kg por dose única.

[00462] Por exemplo, o dsRNA pode ser administrado em uma dose de cerca de 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9, ou de cerca de 10 mg/kg. É também pretendido que valores e gamas intermédios dos valores recitados sejam parte desta invenção.

[00463] Em outra modalidade, o dsRNA é administrado em uma dose ao redor de 0,1 a cerca de 50 mg/kg, cerca de 0,25 a cerca de 50 mg/kg, cerca de 0,5 a cerca de 50 mg/kg, cerca de 0,75 a cerca de 50 mg/kg, cerca de 1 a cerca de 50 mg/kg, cerca de 1,5 a cerca de 50 mg/kg, cerca de 2 a cerca de 50 mg/kg, cerca de 2,5 a cerca de 50 mg/kg, cerca de 3 a cerca de 50 mg/kg, cerca de 3,5 a cerca de 50 mg/kg, cerca de 4 a cerca de 50 mg/kg, cerca de 4,5 a cerca de 50 mg/kg, cerca de 5 a cerca

de 50 mg/kg, cerca de 7,5 a cerca de 50 mg/kg, cerca de 10 a cerca de 50 mg/kg, cerca de 15 a cerca de 50 mg/kg, cerca de 20 a cerca de 50 mg/kg, cerca de 20 a cerca de 50 mg/kg, cerca de 25 a cerca de 50 mg/kg, cerca de 25 a cerca de 50 mg/kg, cerca de 30 a cerca de 50 mg/kg, cerca de 35 a cerca de 50 mg/kg, cerca de 40 a cerca de 50 mg/kg, cerca de 45 a cerca de 50 mg/kg, cerca de 0,1 a cerca de 45 mg/kg, cerca de 0,25 a cerca de 45 mg/kg, cerca de 0,5 a cerca de 45 mg/kg, cerca de 0,75 a cerca de 45 mg/kg, cerca de 1 a cerca de 45 mg/kg, cerca de 1,5 a cerca de 45 mg/kg, cerca de 2 a cerca de 45 mg/kg, cerca de 2,5 a cerca de 45 mg/kg, cerca de 3 a cerca de 45 mg/kg, cerca de 3,5 a cerca de 45 mg/kg, cerca de 4 a cerca de 45 mg/kg, cerca de 4,5 a cerca de 45 mg/kg, cerca de 5 a cerca de 45 mg/kg, cerca de 7,5 a cerca de 45 mg/kg, cerca de 10 a cerca de 45 mg/kg, cerca de 15 a cerca de 45 mg/kg, cerca de 20 a cerca de 45 mg/kg, cerca de 20 a cerca de 45 mg/kg, cerca de 25 a cerca de 45 mg/kg, cerca de 25 a cerca de 45 mg/kg, cerca de 30 a cerca de 45 mg/kg, cerca de 35 a cerca de 45 mg/kg, cerca de 40 a cerca de 45 mg/kg, cerca de 0,1 a cerca de 40 mg/kg, cerca de 0,25 a cerca de 40 mg/kg, cerca de 0,5 a cerca de 40 mg/kg, cerca de 0,75 a cerca de 40 mg/kg, cerca de 1 a cerca de 40 mg/kg, cerca de 1,5 a cerca de 40 mg/kg, cerca de 2 a cerca de 40 mg/kg, cerca de 2,5 a cerca de 40 mg/kg, cerca de 3 a cerca de 40 mg/kg, cerca de 3,5 a cerca de 40 mg/kg, cerca de 4 a cerca de 40 mg/kg, cerca de 4,5 a cerca de 40 mg/kg, cerca de 5 a cerca de 40 mg/kg, cerca de 7,5 a cerca de 40 mg/kg, cerca de 10 a cerca de 40 mg/kg, cerca de 15 a cerca de 40 mg/kg, cerca de 20 a cerca de 40 mg/kg, cerca de 20 a cerca de 40 mg/kg, cerca de 25 a cerca de 40 mg/kg, cerca de 25 a cerca de 40 mg/kg, cerca de 30 a cerca de 40 mg/kg, cerca de 35 a cerca de 40 mg/kg, cerca de 0,1 a cerca de 30 mg/kg, cerca de 0,25 a cerca de 30 mg/kg, cerca de 0,5 a cerca de 30 mg/kg, cerca de 0,75 a cerca de 30

mg/kg, cerca de 1 a cerca de 30 mg/kg, cerca de 1,5 a cerca de 30 mg/kg, cerca de 2 a cerca de 30 mg/kg, cerca de 2,5 a cerca de 30 mg/kg, cerca de 3 a cerca de 30 mg/kg, cerca de 3,5 a cerca de 30 mg/kg, cerca de 4 a cerca de 30 mg/kg, cerca de 4,5 a cerca de 30 mg/kg, cerca de 5 a cerca de 30 mg/kg, cerca de 7,5 a cerca de 30 mg/kg, cerca de 10 a cerca de 30 mg/kg, cerca de 15 a cerca de 30 mg/kg, cerca de 20 a cerca de 30 mg/kg, cerca de 20 a cerca de 30 mg/kg, cerca de 25 a cerca de 30 mg/kg, cerca de 0,1 a cerca de 20 mg/kg, cerca de 0,25 a cerca de 20 mg/kg, cerca de 0,5 a cerca de 20 mg/kg, cerca de 0,75 a cerca de 20 mg/kg, cerca de 1 a cerca de 20 mg/kg, cerca de 1,5 a cerca de 20 mg/kg, cerca de 2 a cerca de 20 mg/kg, cerca de 2,5 a cerca de 20 mg/kg, cerca de 3 a cerca de 20 mg/kg, cerca de 3,5 to cerca de 20 mg/kg, cerca de 4 to cerca de 20 mg/kg, cerca de 4,5 to cerca de 20 mg/kg, cerca de 5 to cerca de 20 mg/kg, cerca de 7,5 to cerca de 20 mg/kg, cerca de 10 to cerca de 20 mg/kg, ou cerca de 15 a cerca de 20 mg/kg. É também pretendido que valores e gamas intermédios dos valores recitados sejam parte desta invenção.

[00464] Por exemplo, o dsRNA pode ser administrado em uma dose de cerca de 0,01, 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9, ou de cerca de 10 mg/kg. É também pretendido que valores e gamas intermédios dos valores recitados sejam parte desta invenção.

[00465] Em outra modalidade, o dsRNA é administrado em uma dose ao redor de 0,5 até cerca de 50 mg/kg, cerca de 0,75 até cerca de 50

mg/kg, cerca de 1 até cerca de 50 mg/kg, cerca de 1,5 até cerca de 50 mg/kg, cerca de 2 até cerca de 50 mg/kg, cerca de 2,5 até cerca de 50 mg/kg, cerca de 3 até cerca de 50 mg/kg, cerca de 3,5 até cerca de 50 mg/kg, cerca de 4 até cerca de 50 mg/kg, cerca de 4,5 até cerca de 50 mg/kg, cerca de 5 até cerca de 50 mg/kg, cerca de 7,5 até cerca de 50 mg/kg, cerca de 10 até cerca de 50 mg/kg, cerca de 15 até cerca de 50 mg/kg, cerca de 20 até cerca de 50 mg/kg, cerca de 20 até cerca de 50 mg/kg, cerca de 25 até cerca de 50 mg/kg, cerca de 25 até cerca de 50 mg/kg, cerca de 30 até cerca de 50 mg/kg, cerca de 35 até cerca de 50 mg/kg, cerca de 40 até cerca de 50 mg/kg, cerca de 45 até cerca de 50 mg/kg, cerca de 0,5 até cerca de 45 mg/kg, cerca de 0,75 até cerca de 45 mg/kg, cerca de 1 até cerca de 45 mg/kg, cerca de 1,5 até cerca de 45 mg/kg, cerca de 2 até cerca de 45 mg/kg, cerca de 2,5 até cerca de 45 mg/kg, cerca de 3 até cerca de 45 mg/kg, cerca de 3,5 até cerca de 45 mg/kg, cerca de 4 até cerca de 45 mg/kg, cerca de 4,5 até cerca de 45 mg/kg, cerca de 5 até cerca de 45 mg/kg, cerca de 7,5 até cerca de 45 mg/kg, cerca de 10 até cerca de 45 mg/kg, cerca de 15 até cerca de 45 mg/kg, cerca de 20 até cerca de 45 mg/kg, cerca de 20 até cerca de 45 mg/kg, cerca de 25 até cerca de 45 mg/kg, cerca de 25 até cerca de 45 mg/kg, cerca de 30 até cerca de 45 mg/kg, cerca de 35 até cerca de 45 mg/kg, cerca de 40 até cerca de 45 mg/kg, cerca de 0,5 até cerca de 40 mg/kg, cerca de 0,75 até cerca de 40 mg/kg, cerca de 1 até cerca de 40 mg/kg, cerca de 1,5 até cerca de 40 mg/kg, cerca de 2 até cerca de 40 mg/kg, cerca de 2,5 até cerca de 40 mg/kg, cerca de 3 até cerca de 40 mg/kg, cerca de 3,5 até cerca de 40 mg/kg, cerca de 4 até cerca de 40 mg/kg, cerca de 4,5 até cerca de 40 mg/kg, cerca de 5 até cerca de 40 mg/kg, cerca de 7,5 até cerca de 40 mg/kg, cerca de 10 até cerca de 40 mg/kg, cerca de 15 até cerca de 40 mg/kg, cerca de 20 até cerca de 40 mg/kg, cerca de 20 até cerca de 40 mg/kg, cerca de 25 até cerca de 40 mg/kg, cerca de 25 até cerca de 40 mg/kg, cerca de 30 até cerca de

40 mg/kg, cerca de 35 até cerca de 40 mg/kg, cerca de 0,5 até cerca de 30 mg/kg, cerca de 0,75 até cerca de 30 mg/kg, cerca de 1 até cerca de 30 mg/kg, cerca de 1,5 até cerca de 30 mg/kg, cerca de 2 até cerca de 30 mg/kg, cerca de 2,5 até cerca de 30 mg/kg, cerca de 3 até cerca de 30 mg/kg, cerca de 3,5 até cerca de 30 mg/kg, cerca de 4 até cerca de 30 mg/kg, cerca de 4,5 até cerca de 30 mg/kg, cerca de 5 até cerca de 30 mg/kg, cerca de 7,5 até cerca de 30 mg/kg, cerca de 10 até cerca de 30 mg/kg, cerca de 15 até cerca de 30 mg/kg, cerca de 20 até cerca de 30 mg/kg, cerca de 20 até cerca de 30 mg/kg, cerca de 25 até cerca de 30 mg/kg, cerca de 0,5 até cerca de 20 mg/kg, cerca de 0,75 até cerca de 20 mg/kg, cerca de 1 até cerca de 20 mg/kg, cerca de 1,5 até cerca de 20 mg/kg, cerca de 2 até cerca de 20 mg/kg, cerca de 2,5 até cerca de 20 mg/kg, cerca de 3 até cerca de 20 mg/kg, cerca de 3,5 até cerca de 20 mg/kg, cerca de 4 até cerca de 20 mg/kg, cerca de 4,5 até cerca de 20 mg/kg, cerca de 5 até cerca de 20 mg/kg, cerca de 7,5 até cerca de 20 mg/kg, cerca de 10 até cerca de 20 mg/kg, ou cerca de 15 até cerca de 20 mg/kg. Em uma modalidade, o dsRNA é administrado em uma dose ao redor de 10 mg/kg a cerca de 30 mg/kg. É também pretendido que valores e gamas intermédios dos valores recitados sejam parte desta invenção.

[00466] Por exemplo, aos indivíduos podem ser administrados, por exemplo, por via subcutânea ou por via intravenosa, uma quantidade terapêutica única de RNAi, tais como cerca de 0,1, 0,125, 0,15, 0,175, 0,2, 0,225, 0,25, 0,275, 0,3, 0,325, 0,35, 0,375, 0,4, 0,425, 0,45, 0,475, 0,5, 0,525, 0,55, 0,575, 0,6, 0,625, 0,65, 0,675, 0,7, 0,725, 0,75, 0,775, 0,8, 0,825, 0,85, 0,875, 0,9, 0,925, 0,95, 0,975, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8, 8,1, 8,2, 8,3,

8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9, 10, 10,5, 11, 11,5, 12, 12,5, 13, 13,5, 14, 14,5, 15, 15,5, 16, 16,5, 17, 17,5, 18, 18,5, 19, 19,5, 20, 20,5, 21, 21,5, 22, 22,5, 23, 23,5, 24, 24,5, 25, 25,5, 26, 26,5, 27, 27,5, 28, 28,5, 29, 29,5, 30, 31, 32, 33, 34, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, ou cerca de 50 mg/kg. É também pretendido que valores e gamas intermédios dos valores recitados sejam parte desta invenção.

[00467] Em algumas modalidades, são administradas aos indivíduos, por exemplo, por via subcutânea ou por via intravenosa, doses múltiplas de uma quantidade terapêutica de RNAi, tais como uma dose de cerca de 0,1, 0,125, 0,15, 0,175, 0,2, 0,225, 0,25, 0,275, 0,3, 0,325, 0,35, 0,375, 0,4, 0,425, 0,45, 0,475, 0,5, 0,525, 0,55, 0,575, 0,6, 0,625, 0,65, 0,675, 0,7, 0,725, 0,75, 0,775, 0,8, 0,825, 0,85, 0,875, 0,9, 0,925, 0,95, 0,975, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9, 10, 10,5, 11, 11,5, 12, 12,5, 13, 13,5, 14, 14,5, 15, 15,5, 16, 16,5, 17, 17,5, 18, 18,5, 19, 19,5, 20, 20,5, 21, 21,5, 22, 22,5, 23, 23,5, 24, 24,5, 25, 25,5, 26, 26,5, 27, 27,5, 28, 28,5, 29, 29,5, 30, 31, 32, 33, 34, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, ou cerca de 50 mg/kg. Um regime multidoses pode incluir administração de uma quantidade terapêutica de RNAi diariamente, tal como durante dois dias, três dias, quatro dias, cinco dias, seis dias, sete dias, ou mais longo.

[00468] Em outras modalidades, é administrada aos indivíduos, por exemplo, por via subcutânea ou por via intravenosa, uma dose repetida de uma quantidade terapêutica de RNAi, tal como uma dose de cerca de 0,1, 0,125, 0,15, 0,175, 0,2, 0,225, 0,25, 0,275, 0,3, 0,325, 0,35,

0,375, 0,4, 0,425, 0,45, 0,475, 0,5, 0,525, 0,55, 0,575, 0,6, 0,625, 0,65, 0,675, 0,7, 0,725, 0,75, 0,775, 0,8, 0,825, 0,85, 0,875, 0,9, 0,925, 0,95, 0,975, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9, 10, 10,5, 11, 11,5, 12, 12,5, 13, 13,5, 14, 14,5, 15, 15,5, 16, 16,5, 17, 17,5, 18, 18,5, 19, 19,5, 20, 20,5, 21, 21,5, 22, 22,5, 23, 23,5, 24, 24,5, 25, 25,5, 26, 26,5, 27, 27,5, 28, 28,5, 29, 29,5, 30, 31, 32, 33, 34, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, ou cerca de 50 mg/kg. Um regime de dose repetida pode incluir administração de uma quantidade terapêutica de RNAi em uma base regular, tal como a cada dois dias, a cada três dias, a cada quatro dias, a cada cinco dias, duas vezes por semana, uma vez por semana, a cada dois meses, ou uma vez por mês.

[00469] Em certas modalidades, por exemplo, quando uma composição da invenção compreende um dsRNA como descrito aqui e um lipídeo, pode ser administrada aos indivíduos uma quantidade terapêutica de RNAi, tal como cerca de 0,01 mg/kg a cerca de 5 mg/kg, cerca de 0,01 mg/kg a cerca de 10 mg/kg, cerca de 0,05 mg/kg a cerca de 5 mg/kg, cerca de 0,05 mg/kg a cerca de 10 mg/kg, cerca de 0,1 mg/kg a cerca de 5 mg/kg, cerca de 0,1 mg/kg a cerca de 10 mg/kg, cerca de 0,2 mg/kg a cerca de 5 mg/kg, cerca de 0,2 mg/kg a cerca de 10 mg/kg, cerca de 0,3 mg/kg a cerca de 5 mg/kg, cerca de 0,3 mg/kg a cerca de 10 mg/kg, cerca de 0,4 mg/kg a cerca de 5 mg/kg, cerca de 0,4 mg/kg a cerca de 10 mg/kg, cerca de 0,5 mg/kg a cerca de 5 mg/kg, cerca de 0,5 mg/kg a cerca de 10 mg/kg, cerca de 1 mg/kg a cerca de 5 mg/kg, cerca de 1 mg/kg a cerca de 10 mg/kg, cerca de 1,5 mg/kg a cerca de 5 mg/kg, cerca de 1,5 mg/kg a cerca de 10 mg/kg, cerca de 2

mg/kg a cerca de 2,5 mg/kg, cerca de 2 mg/kg a cerca de 10 mg/kg, cerca de 3 mg/kg a cerca de 5 mg/kg, cerca de 3 mg/kg a cerca de 10 mg/kg, cerca de 3,5 mg/kg a cerca de 5 mg/kg, cerca de 4 mg/kg a cerca de 5 mg/kg, cerca de 4,5 mg/kg a cerca de 5 mg/kg, cerca de 4 mg/kg a cerca de 10 mg/kg, cerca de 4,5 mg/kg a cerca de 10 mg/kg, cerca de 5 mg/kg a cerca de 10 mg/kg, cerca de 5,5 mg/kg a cerca de 10 mg/kg, cerca de 6 mg/kg a cerca de 10 mg/kg, cerca de 6,5 mg/kg a cerca de 10 mg/kg, cerca de 7 mg/kg a cerca de 10 mg/kg, cerca de 7,5 mg/kg a cerca de 10 mg/kg, cerca de 8 mg/kg a cerca de 10 mg/kg, cerca de 8,5 mg/kg a cerca de 10 mg/kg, cerca de 9 mg/kg a cerca de 10 mg/kg, ou cerca de 9,5 mg/kg a cerca de 10 mg/kg. É também pretendido que valores e gamas intermédios dos valores recitados sejam parte desta invenção.

[00470] Por exemplo, o dsRNA pode ser administrado em uma dose de cerca de 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9, ou de cerca de 10 mg/kg. É também pretendido que valores e gamas intermédios dos valores recitados sejam parte desta invenção.

[00471] Em certas modalidades da invenção, por exemplo, quando um agente de RNAi de fita dupla inclui uma modificação (por exemplo, um ou mais motivos de três modificações idênticas em três nucleotídeos consecutivos), incluindo um tal motivo no ou perto do local de clivagem do agente, seis ligações fosforotioato, e um ligante, tal agente é administrado em uma dose ao redor de 0,01 a cerca de 0,5 mg/kg, cerca de 0,01 a cerca de 0,4 mg/kg, cerca de 0,01 a cerca de 0,3 mg/kg, cerca de 0,01 a cerca de 0,2 mg/kg, cerca de 0,01 a cerca de 0,1 mg/kg, cerca

de 0,01 mg/kg a cerca de 0,09 mg/kg, cerca de 0,01 mg/kg a cerca de 0,08 mg/kg, cerca de 0,01 mg/kg a cerca de 0,07 mg/kg, sobre 0,01 mg/kg a cerca de 0,06 mg/kg, cerca de 0,01 mg/kg a cerca de 0,05 mg/kg, cerca de 0,02 a cerca de 0,5 mg/kg, cerca de 0,02 a cerca de 0,4 mg/kg, cerca de 0,02 a cerca de 0,3 mg/kg, cerca de 0,02 a cerca de 0,2 mg/kg, cerca de 0,02 a cerca de 0,1 mg/kg, cerca de 0,02 mg/kg a cerca de 0,09 mg/kg, cerca de 0,02 mg/kg a cerca de 0,08 mg/kg, cerca de 0,02 mg/kg a cerca de 0,07 mg/kg, cerca de 0,02 mg/kg a cerca de 0,06 mg/kg, cerca de 0,02 mg/kg a cerca de 0,05 mg/kg, cerca de 0,03 a cerca de 0,5 mg/kg, cerca de 0,03 a cerca de 0,4 mg/kg, cerca de 0,03 a cerca de 0,3 mg/kg, cerca de 0,03 a cerca de 0,2 mg/kg, cerca de 0,03 a cerca de 0,1 mg/kg, cerca de 0,03 mg/kg a cerca de 0,09 mg/kg, cerca de 0,03 mg/kg a cerca de 0,08 mg/kg, cerca de 0,03 mg/kg a cerca de 0,07 mg/kg, cerca de 0,03 mg/kg a cerca de 0,06 mg/kg, cerca de 0,03 mg/kg a cerca de 0,05 mg/kg, cerca de 0,04 a cerca de 0,5 mg/kg, cerca de 0,04 a cerca de 0,4 mg/kg, cerca de 0,04 a cerca de 0,3 mg/kg, cerca de 0,04 a cerca de 0,2 mg/kg, cerca de 0,04 a cerca de 0,1 mg/kg, cerca de 0,04 mg/kg a cerca de 0,09 mg/kg, cerca de 0,04 mg/kg a cerca de 0,08 mg/kg, cerca de 0,04 mg/kg a cerca de 0,07 mg/kg, cerca de 0,04 mg/kg a cerca de 0,06 mg/kg, cerca de 0,05 a cerca de 0,5 mg/kg, cerca de 0,05 a cerca de 0,4 mg/kg, cerca de 0,05 a cerca de 0,3 mg/kg, cerca de 0,05 a cerca de 0,2 mg/kg, cerca de 0,05 a cerca de 0,1 mg/kg, cerca de 0,05 mg/kg a cerca de 0,09 mg/kg, cerca de 0,05 mg/kg a cerca de 0,08 mg/kg, ou cerca de 0,05 mg/kg a cerca de 0,07 mg/kg. É também pretendido que valores e gamas intermédios dos valores recitados anteriores sejam parte desta invenção, por exemplo, o agente de RNAi pode ser administrado ao indivíduo em uma dose ao redor de 0,015 mg/kg a cerca de 0,45 mg/kg.

[00472] Por exemplo, o agente de RNAi, por exemplo o agente de RNAi em uma composição farmacêutica pode ser administrado em uma

dose ao redor de 0,01 mg/kg, 0,0125 mg/kg, 0,015 mg/kg, 0,0175 mg/kg, 0,02 mg/kg, 0,0225 mg/kg, 0,025 mg/kg, 0,0275 mg/kg, 0,03 mg/kg, 0,0325 mg/kg, 0,035 mg/kg, 0,0375 mg/kg, 0,04 mg/kg, 0,0425 mg/kg, 0,045 mg/kg, 0,0475 mg/kg, 0,05 mg/kg, 0,0525 mg/kg, 0,055 mg/kg, 0,0575 mg/kg, 0,06 mg/kg, 0,0625 mg/kg, 0,065 mg/kg, 0,0675 mg/kg, 0,07 mg/kg, 0,0725 mg/kg, 0,075 mg/kg, 0,0775 mg/kg, 0,08 mg/kg, 0,0825 mg/kg, 0,085 mg/kg, 0,0875 mg/kg, 0,09 mg/kg, 0,0925 mg/kg, 0,095 mg/kg, 0,0975 mg/kg, 0,1 mg/kg, 0,125 mg/kg, 0,15 mg/kg, 0,175 mg/kg, 0,2 mg/kg, 0,225 mg/kg, 0,25 mg/kg, 0,275 mg/kg, 0,3 mg/kg, 0,325 mg/kg, 0,35 mg/kg, 0,375 mg/kg, 0,4 mg/kg, 0,425 mg/kg, 0,45 mg/kg, 0,475 mg/kg, ou cerca de 0,5 mg/kg. É também pretendido que valores intermédios dos valores recitados anteriores sejam parte desta invenção.

[00473] Em algumas modalidades, o agente de RNAi é administrado como uma dose fixa de entre 100 mg a cerca de 900 mg, por exemplo entre cerca de 100 mg a cerca de 850 mg, entre cerca de 100 mg a cerca de 800 mg, entre cerca de 100 mg a cerca de 750 mg, entre cerca de 100 mg a cerca de 700 mg, entre cerca de 100 mg a cerca de 650 mg, entre cerca de 100 mg a cerca de 600 mg, entre cerca de 100 mg a cerca de 550 mg, entre cerca de 100 mg a cerca de 500 mg, entre cerca de 200 mg a cerca de 850 mg, entre cerca de 200 mg a cerca de 800 mg, entre cerca de 200 mg a cerca de 750 mg, entre cerca de 200 mg a cerca de 700 mg, entre cerca de 200 mg a cerca de 650 mg, entre cerca de 200 mg a cerca de 600 mg, entre cerca de 200 mg a 550 mg, entre cerca de 200 mg a cerca de 500 mg, entre cerca de 300 mg a cerca de 850 mg, entre cerca de 300 mg a cerca de 800 mg, entre cerca de 300 mg a cerca de 750 mg, entre cerca de 300 mg a cerca de 700 mg, entre cerca de 300 mg a cerca de 650 mg, entre cerca de 300 mg a cerca de 600 mg, entre cerca de 300 mg a cerca de 550 mg, entre cerca de 300 mg a cerca de 500 mg, entre cerca de 400 mg a cerca de 850 mg, entre

cerca de 400 mg a cerca de 800 mg, entre cerca de 400 mg a cerca de 750 mg, entre cerca de 400 mg a cerca de 700 mg, entre cerca de 400 mg a cerca de 650 mg, entre cerca de 400 mg a cerca de 600 mg, entre cerca de 400 mg a cerca de 550 mg ou entre cerca de 400 mg a cerca de 500 mg.

[00474] Em algumas modalidades, o agente de RNAi é administrado como uma dose fixa de cerca de 100 mg, cerca de 125 mg, cerca de 150 mg, cerca de 175 mg, 200 mg, cerca de 225 mg, cerca de 250 mg, cerca de 275 mg, cerca de 300 mg, cerca de 325 mg, cerca de 350 mg, cerca de 375 mg, cerca de 400 mg, cerca de 425 mg, cerca de 450 mg, cerca de 475 mg, cerca de 500 mg, cerca de 525 mg, cerca de 550 mg, cerca de 575 mg, cerca de 600 mg, cerca de 625 mg, cerca de 650 mg, cerca de 675 mg, cerca de 700 mg, cerca de 725 mg, cerca de 750 mg, cerca de 775 mg, cerca de 800 mg, cerca de 825 mg, cerca de 850 mg, cerca de 875 mg ou cerca de 900 mg.

[00475] A composição farmacêutica pode ser administrada por infusão intravenosa ao longo de um período de tempo, tal como ao longo de um período de 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, e 21, 22, 23, 24, ou cerca de 25 minutos. A administração pode ser repetida, por exemplo, em uma base regular, tal como bissemanalmente (*isto é*, a cada duas semanas) durante 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 administração semanal ou bissemanal durante três meses, a administração pode ser repetida uma vez por mês, durante seis meses ou um ano ou mais.

[00476] A composição farmacêutica pode ser administrada uma vez ao dia, ou o RNAi pode ser administrado na forma de duas, três, ou mais subdoses em intervalos apropriados ao longo do dia, ou mesmo usando infusão ou administração contínua mediante uma formulação de

liberação controlada. Em esse caso, o RNAi contido em cada subdose tem de ser correspondentemente menor de modo a se alcançar a dosagem diária total. A unidade de dosagem pode ser também composta para administração ao longo de vários dias, por exemplo, usando uma formulação convencional de liberação sustentada que proporciona liberação sustentada do RNAi ao longo de um período de vários dias. Formulações de liberação sustentada são bem conhecidas na técnica e são particularmente úteis para administração de agentes a um local particular, tal como poderia ser usado com os agentes da presente invenção. Em esta modalidade, a unidade de dosagem contém um múltiplo correspondente da dose diária.

[00477] Em outras modalidades, uma dose única das composições farmacêuticas pode ser duradoura, tal que doses subsequentes sejam administradas em intervalos de não mais do que 3, 4, ou 5 dias, ou em intervalos de não mais do que 1, 2, 3, ou 4 semanas. Em algumas modalidades da invenção, uma dose única das composições farmacêuticas da invenção é administrada uma vez por semana. Em outras modalidades da invenção, uma dose única das composições farmacêuticas da invenção é administrada bimensalmente. Em algumas modalidades da invenção, uma dose única das composições farmacêuticas da invenção é administrada uma vez por mês, uma vez a cada dois meses ou trimestralmente (ou seja, a cada três meses).

[00478] O especialista perito apreciará que certos fatores podem influenciar a dosagem e calendarização requeridas para tratar eficazmente um indivíduo, incluindo a mas não se limitando à gravidade da doença ou distúrbio, tratamentos prévios, o estado geral de saúde 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. Podem ser feitas estimativas de dosagens

eficazes e meias-vidas *in vivo* para os RNAs individuais englobados pela invenção usando metodologias convencionais ou com base em testes *in vivo* usando um modelo animal apropriado, como descrito em outro lugar aqui.

[00479] As composições farmacêuticas da presente invenção podem ser administradas de um número de maneiras dependendo de se é desejado tratamento local ou sistêmico e da área a ser tratada. A administração pode ser tópica (por exemplo, por um penso transdérmico), pulmonar, por exemplo, por inalação ou insuflação de pós ou aerossóis, incluindo por nebulizador; intratraqueal, intranasal, epidérmica e transdérmica, oral ou parenteral. A administração parenteral inclui injeção ou infusão intravenosa, intra-arterial, subcutânea, intraperitoneal ou intramuscular; subdérmica, por exemplo, através de um dispositivo implantado; ou intracraniana, por exemplo, por administração intraparenquimal, intratecal ou intraventricular.

[00480] O RNAi pode ser administrado de um modo tendo como alvo um tecido particular, como o fígado (por exemplo, os hepatócitos do fígado).

[00481] Composições e formulações farmacêuticas para administração tópica podem incluir pensos transdérmicos, pomadas, loções, cremes, géis, gotas, supositórios, pulverizações, líquidos e pós. Transportadores farmacêuticos convencionais, bases aquosas, em pó ou oleosas, espessantes e similares podem ser necessários ou desejáveis. Preservativos revestidos, luvas e similares podem ser também úteis. Formulações tópicas adequadas incluem aquelas nas quais os RNAs apresentados na invenção estão em mistura com um agente de administração tópica tal como lipídeos, lipossomos, ácidos graxos, ésteres de ácidos graxos, esteroides, agentes quelantes e tensoativos. Lipídeos e lipossomos adequados incluem neutros (por exemplo, dioleoilfosfatidil DOPE etanolamina, dimiristoilfosfatidil colina

DMPC, diestearoilfosfatidil colina), negativos (por exemplo, dimiristoilfosfatidil glicerol DMPG) e catiônicos (por exemplo, dioleoíltetrametilaminopropil DOTAP e dioleoilfosfatidil etanolamina DOTMA). Os RNAsi apresentados na invenção podem ser encapsulados dentro de lipossomos ou podem formar complexos com os mesmos, em particular com lipossomos catiônicos. Alternativamente, os RNAsi podem ser complexados com lipídeos, em particular com lipídeos catiônicos. Ácidos graxos e ésteres adequados incluem mas não estão limitados 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, 1-monocaprato de glicerila, 1-dodecilazacicloheptan-2-ona, uma acilcarnitina, uma acilcolina, ou um éster de alquila C₁₋₂₀ (por exemplo, miristato de isopropila IPM), monoglicerídeo, diglicerídeo ou seu sal farmaceuticamente aceitável. Formulações tópicas são descritas em detalhe na Patente dos E.U.A. Nº 6,747,014, que é incorporada aqui por referência.

A. Formulações de RNAi Compreendendo Montagens Moleculares Membranosas

[00482] Um RNAi para uso nas composições e métodos da invenção pode ser formulado para administração em uma montagem molecular membranosa, por exemplo, um lipossomo ou um micélio. Como usado aqui, o termo "lipossomo" se refere a uma vesícula composta por lipídeos anfifílicos dispostos em pelo menos uma bicamada, por exemplo, uma bicamada ou uma pluralidade de bicamadas. Os lipossomos incluem vesículas unilamelares e multilamelares que têm uma membrana formada de um material lipofílico e um interior aquoso. A porção aquosa contém a composição de RNAi. O material lipofílico isola o interior aquoso de um exterior aquoso, que tipicamente não inclui a composição de RNAi, embora, em alguns exemplos, o possa. Os

lipossomos são úteis para a transferência e administração de ingredientes ativos ao local de ação. Uma vez que a membrana lipossomal é estruturalmente similar a membranas biológicas, quando lipossomos são aplicados em um tecido, a bicamada lipossomal é fundida à bicamada das membranas celulares. À medida que a fusão do lipossomo e célula progride, os conteúdos aquosos internos que incluem o RNAi são administrados à célula onde o RNAi pode se ligar especificamente a um RNA alvo e pode mediar RNAi. Em alguns casos, os lipossomos são também especificamente visados, por exemplo, para dirigir o RNAi para tipos de células particulares.

[00483] Um lipossoma contendo um agente de RNAi pode ser preparado por uma variedade de métodos. Em um exemplo, o componente de lipídeo de um lipossomo é dissolvido em um detergente tal que sejam formados micélios com o componente de lipídeo. Por exemplo, o componente de lipídeo pode ser um lipídeo ou conjugado de lipídeo catiônico anfipático. O detergente pode ter uma elevada concentração crítica de micélios e pode ser não iônico. Detergentes exemplificativos incluem colato, CHAPS, octilglucosídeo, desoxicolato, e lauroíl sarcosina. A preparação do agente de RNAi é depois adicionada aos micélios que incluem o componente de lipídeo. Os grupos catiônicos no lipídeo interagem com o agente de RNAi e condensam em torno do agente de RNAi para formar um lipossomo. Após condensação, o detergente é removido, por exemplo, por diálise, para originar a uma preparação lipossomal de agente de RNAi.

[00484] Se necessário, um composto transportador que auxilia a condensação pode ser adicionado durante a reação de condensação, por exemplo, mediante adição controlada. Por exemplo, o composto transportador pode ser um polímero diferente de um ácido nucleico (por exemplo, espermina ou espermidina). O pH pode ser também ajustado para favorecer a condensação.

[00485] Métodos para produção de veículos de administração de polinucleotídeos estáveis, que incorporam um complexo polinucleotídeo/lipídeo catiônico como componentes estruturais do veículo de distribuição, são adicionalmente descritos em, por exemplo, WO 96/37194, os conteúdos inteiros da qual são incorporados aqui por referência. A formação de lipossomos pode também incluir um ou mais aspectos de métodos exemplares descritos em Felgner, P. L. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 8:7413-7417, 1987; Pat. dos E.U.A. Nº 4,897,355; Pat. dos E.U.A. Nº 5,171,678; Bangham, *et al. M. Mol. Biol.* 23:238, 1965; Olson, *et al. Biochim. Biophys. Acta* 557:9, 1979; Szoka, *et al. Proc. Natl. Acad. Sci.* 75: 4194, 1978; Mayhew, *et al. Biochim. Biophys. Acta* 775:169, 1984; Kim, *et al. Biochim. Biophys. Acta* 728:339, 1983; e Fukunaga, *et al. Endocrinol.* 115:757, 1984. Técnicas comumente usadas para preparação de agregados de lipídeos de tamanho apropriado para uso como veículos de distribuição incluem sonicação e congelamento-descongelamento mais extrusão (ver, por exemplo, Mayer, *et al. Biochim. Biophys. Acta* 858:161, 1986). Pode ser usada microfluidização quando forem desejados agregados consistentemente pequenos (50 a 200 nm) e relativamente uniformes (Mayhew, *et al. Biochim. Biophys. Acta* 775:169, 1984). Estes métodos são facilmente adaptados ao empacotamento de preparações do agente de RNAi em lipossomos.

[00486] Os lipossomos são classificados em duas amplas classes. Os lipossomos catiônicos são lipossomos positivamente carregados que interagem com as moléculas de ácidos nucleicos negativamente carregadas para formar um complexo estável. O complexo ácido nucleico/lipossomo positivamente carregado se liga à superfície celular negativamente carregada e é internalizado em um endossomo. Devido ao pH ácido dentro do endossomo, os lipossomos sofrem ruptura, liberando o seu conteúdo no citoplasma celular (Wang *et al.*, *Biochem.*

Biophys. Res. Commun., 1987, 147, 980-985).

[00487] Os lipossomas que são sensíveis ao pH ou negativamente carregados aprisionam ácidos nucleicos em vez de se complexarem com ele. Uma vez que tanto o ácido nucleico como o lipídeo estão similarmente carregados ocorre repulsão em vez de formação de complexo. Ainda assim, algum ácido nucleico fica aprisionado dentro do interior aquoso destes lipossomos. Lipossomos sensíveis ao pH têm sido usados para administrar ácidos nucleicos codificando o gene da timidina cinase em monocamadas de células em cultura. A expressão do gene exógeno foi detectada nas células alvo (Zhou *et al.*, *Journal of Controlled Release*, 1992, 19, 269-274).

[00488] Um grande tipo de composição lipossomal inclui fosfolipídeos sem ser fosfatidilcolina naturalmente derivada. Composições de lipossomos neutros, por exemplo, podem ser formadas a partir de dimiristoíl fosfatidilcolina (DMPC) ou dipalmitoíl fosfatidilcolina (DPPC). Composições de lipossomos aniônicos são geralmente formadas a partir de dimiristoíl fosfatidilglicerol, enquanto lipossomos fusogênicos aniônicos são formados principalmente a partir de dioleoíl fosfatidiletanolamina (DOPE). Outro tipo de composição lipossomal é formada a partir de fosfatidilcolina (PC) tal como, por exemplo, PC de soja, e PC de ovo. Outro tipo é formado a partir de misturas de fosfolipídeo e/ou fosfatidilcolina e/ou colesterol.

[00489] Exemplos de outros métodos para introduzir lipossomos em células *in vitro* e *in vivo* incluem a Patente dos E.U.A. Nº 5,283,185; Pat. dos E.U.A. Nº 5,171,678; WO 94/00569; WO 93/24640; WO 91/16024; Felgner, *J. Biol. Chem.* 269:2550, 1994; Nabel, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90:11307, 1993; Nabel, *Human Gene Ther.* 3:649, 1992; Gershon, *Biochem.* 32:7143, 1993; and Strauss *EMBO J.* 11:417, 1992.

[00490] Sistemas lipossomais não iônicos foram também examinados para se determinar a sua utilidade na distribuição de

fármacos à pele, em particular sistemas compreendendo tensoativo não iônico e colesterol. Formulações lipossomais não iônicas compreendendo Novasome™ I (dilaurato de glicerila/colesterol/éter de polioxietileno-10-estearila) e Novasome™ II (diestearato de glicerila/colesterol/éter de polioxietileno-10-estearila) foram usadas para administrar ciclosporina-A à derme de pele de camundongos. Os resultados indicaram que tais sistemas lipossomais 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).

[00491] Os lipossomos incluem também lipossomos "estericamente estabilizados", um termo que, como usado aqui, se refere a lipossomos compreendendo um ou mais lipídeos especializados que, quando incorporados em lipossomos, resultam em tempos de vida em circulação intensificados em relação a lipossomos não tendo tais lipídeos especializados. Exemplos de lipossomos estericamente estabilizados são aqueles nos quais parte da porção de lipídeo formadora de vesícula do lipossomo (A) compreende um ou mais glicolipídeos, tais como monossialogangliosídeo G_{M1} , ou (B) é derivatizada com um ou mais polímeros hidrofílicos, tais como uma fração de polietileno glicol (PEG). Embora não desejando estar limitado por qualquer teoria particular se pensa na técnica que, pelo menos para lipossomos estericamente estabilizados contendo gangliosídeos, esfingomielina, ou lipídeos derivatizados com PEG, a meia-vida em circulação intensificada destes lipossomos estericamente estabilizados deriva de uma captação reduzida em células do sistema reticuloendotelial (RES) (Allen *et al., FEBS Letters*, 1987, 223, 42; Wu *et al., Cancer Research*, 1993, 53, 3765).

[00492] Vários lipossomos compreendendo um ou mais glicolipídeos são conhecidos na técnica. Papahadjopoulos *et al. (Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1987, 507, 64) relataram a capacidade de monossialogangliosídeo

G_{M1}, sulfato de galactocerebroside e fosfatidilinositol de melhorar as meias-vidas no sangue de lipossomos. Estas descobertas foram expostas por Gabizon *et al.* (*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1988, 85, 6949). A Pat. dos E.U.A. Nº 4,837,028 e WO 88/04924, ambas em nome de Allen *et al.*, divulgam lipossomos compreendendo (1) esfingomielina e (2) o gangliosídeo G_{M1} ou um éster de sulfato de galactocerebroside. A Pat. dos E.U.A. Nº 5,543,152 (Webb *et al.*) divulga lipossomos compreendendo esfingomielina. Lipossomos compreendendo 1,2-sn-dimiristoilfosfatidilcolina são divulgados em WO 97/13499 (Lim *et al.*).

[00493] Em uma modalidade são usados lipossomos catiônicos. Os lipossomos catiônicos têm a vantagem de serem capazes de se fundir à membrana celular. Os lipossomos não catiônicos, apesar de não serem capazes de se fundir tão eficazmente à membrana plasmática, são absorvidos por macrófagos *in vivo* e podem ser usados para administrar agentes de RNAi em macrófagos.

[00494] Vantagens adicionais de lipossomos incluem: Os lipossomos obtidos de fosfolípidos naturais são biocompatíveis e biodegradáveis; os lipossomos podem incorporar uma ampla gama de água e fármacos solúveis em lípidos; os lipossomos podem proteger os agentes de RNAi encapsulados nos seus compartimentos internos do metabolismo e degradação (Rosoff, em "Pharmaceutical Dosage Forms," Lieberman, Rieger e Banker (Eds.), 1988, volume 1, p. 245). Considerações importantes na preparação de formulações de lipossomos são a carga superficial do lípido, tamanho da vesícula e o volume aquoso dos lipossomos.

[00495] Um lípido catiônico sintético positivamente carregado, cloreto de N-[1-(2,3-dioleilóxi)propil]-N,N,N-trimetilamônio (DOTMA), pode ser usado para formar lipossomas pequenos que interagem espontaneamente com ácido nucleico para formar complexos lípido-ácido nucleico que são capazes de se fundir aos lípidos negativamente

carregados das membranas celulares de células de cultura de tecidos, resultando na distribuição do agente de RNAi (ver, por exemplo, Felgner, P. L. et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA 8:7413-7417, 1987 e Pat. Dos E.U.A. Nº 4,897,355 quanto a uma descrição de DOTMA e seu uso com DNA).

[00496] Um análogo de DOTMA, 1,2-bis(oleoilóxi)-3-(trimetilamônia)propano (DOTAP), pode ser usado em combinação com um fosfolípídeo para formar vesículas que complexam com DNA. Lipofectin™ (Bethesda Research Laboratories, Gaithersburg, Md.) é um agente eficaz para a administração de ácidos nucleicos altamente aniônicos em células de cultura de tecidos vivos que compreendem lipossomos de DOTMA positivamente carregados que interagem espontaneamente com polinucleotídeos negativamente carregados para formar complexos. Quando são usados suficientes lipossomos positivamente carregados, a carga líquida dos complexos resultantes é também positiva. Complexos positivamente carregados preparados desta maneira se anexam espontaneamente a superfícies celulares negativamente carregadas, se fundem à membrana plasmática, e administram eficazmente ácidos nucleicos funcionais a, por exemplo, células de cultura de tecidos. Outro lipídeo catiônico comercialmente disponível, 1,2-bis(oleoilóxi)-3,3-(trimetilamônia)propano ("DOTAP") (Boehringer Mannheim, Indianapolis, Indiana) difere de DOTMA pelo fato de as frações de oleoilóxi estarem ligadas por ligações de éster, em vez de éter.

[00497] Outros compostos de lipídeos catiônicos relatados incluem aqueles que foram conjugados com uma variedade de frações, incluindo, por exemplo, carboxiespermina que foi conjugada com um de dois tipos de lipídeos e inclui compostos tais como dioctaoileóilamida de 5-carboxiespermilglicina ("DOGS") (Transfectam™, Promega, Madison, Wisconsin) e 5-carboxiespermil-amida de

dipalmitoilfosfatidiletanolamina ("DPPEs") (ver, por exemplo, Pat. dos E.U.A. Nº 5.171.678).

[00498] Outro conjugado de lipídeo catiônico inclui derivatização do lipídeo com colesterol ("DC-Chol") que foi formulado em lipossomas em combinação com DOPE (Ver Gao, X. e Huang, L., *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 179:280, 1991). Foi relatado que lipopolilisina, preparada por conjugação de polilisina com DOPE, é eficaz para transfecção na presença de soro (Zhou, X. et al., *Biochim. Biophys. Acta* 1065:8, 1991). Para certas linhagens celulares se diz que estes lipossomas contendo lipídeos catiônicos conjugados exibem toxicidade mais baixa e proporcionam transfecção mais eficaz do que as composições contendo DOTMA. Outros produtos de lipídeos catiônicos comercialmente disponíveis incluem DMRIE e DMRIE-HP (Vical, La Jolla, Califórnia) e Lipofectamina (DOSPA) (Life Technology, Inc., Gaithersburg, Maryland). Outros lipídeos catiônicos adequados para a administração de oligonucleotídeos são descritos em WO 98/39359 e WO 96/37194.

[00499] Formulações lipossomais são particularmente adequadas para administração tópica, os lipossomas apresentam várias vantagens em relação a outras formulações. Tais vantagens incluem efeitos secundários reduzidos relacionados com elevada absorção sistêmica do fármaco administrado, acúmulo aumentado do fármaco administrado no alvo desejado, e a capacidade de administrar um agente de RNAi na pele. Em algumas implementações são usados lipossomas para administrar um agente de RNAi a células epidérmicas e também para intensificar a penetração do agente de RNAi em tecidos da derme, por exemplo, na pele. Por exemplo, os lipossomas podem ser aplicados topicamente. A administração tópica de fármacos formulados como lipossomas à pele foi documentada (ver, por exemplo, Weiner *et al.*, *Journal of Drug Targeting*, 1992, vol. 2,405-410 e du Plessis *et al.*,

Antiviral Research, 18, 1992, 259-265; Mannino, R. J. e Fould-Fogerite, S., *Biotechniques* 6:682-690, 1988; Itani, T. *et al. Gene* 56:267-276, 1987; Nicolau, C. *et al. Meth. Enz.* 149:157-176, 1987; Straubinger, R. M. e Papahadjopoulos, D. *Meth. Enz.* 101:512-527, 1983; Wang, C. Y. e Huang, L., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:7851-7855, 1987).

[00500] Sistemas lipossomais não iônicos foram também examinados para se determinar a sua utilidade na distribuição de fármacos à pele, em particular sistemas compreendendo tensoativo não iônico e colesterol. Formulações lipossomais não iônicas compreendendo Novasome I (dilaurato de glicerila/colesterol/éter de polioxietileno-10-estearila) e Novasome II (diestearato de glicerila/colesterol/éter de polioxietileno-10-estearila) foram usadas para administrar um fármaco à derme da pele de camundongo. Tais formulações com agente de RNAi são úteis para tratamento de um distúrbio dermatológico.

[00501] Os lipossomos que incluem RNAi podem ser tornados altamente deformáveis. Essa deformabilidade pode permitir que os lipossomos penetrem através de poros menores do que o raio médio do lipossomo. Por exemplo, transferossomos são um tipo de lipossomos deformáveis. Os transferossomos podem ser preparados por adição de ativadores da borda de superfície, usualmente tensoativos, a uma composição lipossomal padrão. Os transferossomos que incluem um agente de RNAi podem ser distribuídos, por exemplo, por via subcutânea por infecção de modo a distribuir o agente de RNAi em queratinócitos da pele. De modo a atravessarem pele intacta de mamífero, as vesículas de lipídeos têm de passar através de uma série de poros finos, cada um com um diâmetro menor do que 50 nm, sob a influência de um gradiente transdérmico adequado. Adicionalmente, devido às propriedades dos lipídeos, estes transferossomos podem ser auto-otimizantes (adaptativos à forma dos poros, por exemplo, na pele),

autorreparantes, e conseguem frequentemente alcançar seus alvos sem fragmentação, e frequentemente autocarregantes.

[00502] Outras formulações receptivas a presente invenção são descritas, por exemplo, na Publicação PCT n. ° WO 2008/042973, cuja totalidade do conteúdo é incorporada neste documento por referência.

[00503] Transferossomos são ainda outro tipo de lipossomos, e são agregados de lipídeos altamente deformáveis que são candidatos atrativos para veículos de distribuição de fármacos. Os transferossomos podem ser descritos como gotículas de lipídeos que são tão altamente deformáveis que conseguem facilmente penetrar através de poros que são mais pequenos do que a gotícula. Os transferossomos são adaptáveis ao ambiente no qual são usados, por exemplo, são auto-otimizantes (adaptativos à forma dos poros na pele), autorreparantes, frequentemente alcançam seus alvos sem fragmentação, e frequentemente autocarregantes. Para preparar transferossomos é possível adicionar ativadores de borda de superfície, habitualmente tensoativos, a uma composição lipossomal padrão. Os transferossomos foram usados para distribuir albumina do soro na pele. Foi mostrado que a distribuição de albumina do soro mediada por transferossomos é tão eficaz como injeção subcutânea de uma solução contendo albumina do soro.

[00504] Os tensoativos encontram ampla aplicação em formulações tais como emulsões (incluindo microemulsões) e lipossomas. A maneira mais comum de classificar e ordenar as propriedades dos muitos tipos diferentes de tensoativos, tanto naturais como sintéticos, é pelo uso do equilíbrio hidrófilo/lipófilo (HLB). A natureza do grupo hidrofílico (também conhecido como a "cabeça") proporciona os meios mais adequados para categorização dos diferentes tensoativos usados em formulações (Rieger, em "Pharmaceutical Dosage Forms", Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 1988, p. 285).

[00505] Se a molécula de tensoativo não estiver ionizada é classificada como um tensoativo não iônico. Os tensoativos não iônicos encontram ampla aplicação em produtos farmacêuticos e cosméticos e são usáveis ao longo de uma ampla gama de valores de pH. Em geral, seus valores de HLB variam de 2 a cerca de 18 dependendo da sua estrutura. Tensoativos não iônicos incluem ésteres não iônicos tais como ésteres de etileno glicol, ésteres de propileno glicol, ésteres de glicerila, ésteres de poliglicerila, ésteres de sorbitana, ésteres de sacarose, e ésteres etoxilados. Alcanolamidas e éteres não iônicos tais como etoxilatos de álcoois graxos, álcoois propoxilados, e polímeros em bloco etoxilados/propoxilados estão também incluídos em esta classe. Os tensoativos de polioxietileno são os membros mais populares da classe dos tensoativos não iônicos.

[00506] Se a molécula de tensoativo transportar uma carga negativa quando é dissolvida ou dispersa em água, o tensoativo é classificado como aniônico. Tensoativos aniônicos incluem carboxilatos tais como sabões, lactilatos de acila, amidas de acila de aminoácidos, ésteres do ácido sulfúrico tais como sulfatos de alquila e sulfatos de alquila etoxilados, sulfonatos tais como benzenossulfonatos de alquila, isetionatos de acila, tauratos de acila e sulfossuccinatos, e fosfatos. Os membros mais importantes da classe dos tensoativos aniônicos são os sulfatos de alquila e os sabões.

[00507] Se a molécula de tensoativo transportar uma carga positiva quando é dissolvida ou dispersa em água, o tensoativo é classificado como catiônico. Tensoativos catiônicos incluem sais de amônio quaternário e aminas etoxiladas. Os sais de amônio quaternário são os membros mais usados desta classe.

[00508] Se a molécula de tensoativo tiver a capacidade de transportar uma carga positiva ou negativa, o tensoativo é classificado como anfotérico. Tensoativos anfotéricos incluem derivados do ácido

acrílico, alquilamidas substituídas, N-alquilbetaínas e fosfatídeos.

[00509] O uso de tensoativos em produtos de fármacos, formulações e em emulsões foi revisto (Rieger, em "Pharmaceutical Dosage Forms", Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 1988, p. 285).

[00510] O RNAi para uso nos métodos da invenção pode ser também proporcionado como formulações micelares. "Micélios" são definidos aqui como um tipo particular de montagem molecular na qual moléculas anfipáticas são dispostas em uma estrutura esférica tal que todas as porções hidrofóbicas das moléculas estão dirigidas para dentro, deixando as porções hidrofílicas em contato com a fase aquosa envolvente. Existe a disposição inversa se o ambiente for hidrofóbico.

[00511] Uma formulação micelar mista adequada para administração através de membranas transdérmicas pode ser preparada por mistura de uma solução aquosa da composição de sRNAi, um sulfato de alquila C₈ a C₂₂ de metal alcalino, e um composto formador de micélios. Compostos formadores de micélios exemplificativos incluem lecitina, ácido hialurônico, sais farmaceuticamente aceitáveis do ácido hialurônico, ácido glicólico, ácido láctico, extrato de camomila, extrato de pepino, ácido oleico, ácido linoleico, ácido linolênico, mono-oleína, mono-oleatos, monolauratos, óleo de borragem, óleo de círio-do-norte, mentol, tri-idróxi oxo colanil glicina e seus sais farmaceuticamente aceitáveis, glicerina, poliglicerina, lisina, polilisina, trioleína, éteres de polioxietileno e seus análogos, éteres de alquila de polidocanol e seus análogos, quenodesoxicolato, desoxicolato, e suas misturas. Os compostos formadores de micélios podem ser adicionados ao mesmo tempo que o ou após adição do sulfato de alquila de metal alcalino. Micélios mistos serão formados com substancialmente qualquer tipo de mistura dos ingredientes mas mistura vigorosa de modo a proporcionar micélios de tamanhos mais pequenos.

[00512] Em um método é preparada uma primeira composição

micelar que contém a composição de sRNAi e pelo menos o sulfato de alquila de metal alcalino. A primeira composição micelar é depois misturada com pelo menos três compostos formadores de micélios para formar uma composição micelar mista. Em outro método, a composição micelar é preparada por mistura da composição de sRNAi, do sulfato de alquila de metal alcalino e pelo menos um dos compostos formadores de micélios, seguido por adição dos restantes compostos formadores de micélios, com mistura vigorosa.

[00513] Fenol e/ou *m*-cresol podem ser adicionados à composição micelar mista para estabilizar a formulação e proteger contra crescimento bacteriano. Alternativamente, fenol e/ou *m*-cresol podem ser adicionados com os ingredientes formadores de micélios. Um agente isotônico tal como glicerina pode ser também adicionado após formação da composição micelar mista.

[00514] Para distribuição da formulação micelar como uma pulverização, a formulação pode ser colocada em um distribuidor de aerossol e o distribuidor é carregado com um propulsor. O propulsor, que está sob pressão, está em forma líquida no distribuidor. As razões dos ingredientes são ajustadas tal que as fases aquosa e propulsora se tornem uma, ou seja, existe uma fase. Se existirem duas fases é necessário agitar o distribuidor antes de administrar uma porção dos conteúdos, por exemplo, através de uma válvula calibrada. A dose distribuída do agente farmacêutico é propelida da válvula calibrada em uma pulverização fina.

[00515] Os propulsores podem incluir clorofluorocarbonetos contendo de hidrogênio, fluorocarbonetos contendo de hidrogênio, éter de dimetila e éter de dietila. Em certas modalidades pode ser usado HFA 134a (1,1,1,2-tetrafluoroetano).

[00516] As concentrações específicas dos ingredientes essenciais podem ser determinadas por experimentação relativamente simples.

Para absorção através das cavidades orais é frequentemente desejável aumentar, por exemplo, pelo menos duplicar ou triplicar, a dosagem para através de injeção ou administração através do trato gastrointestinal.

B. *Partículas de lipídeos*

[00517] Os RNAs, por exemplo, dsRNAs da invenção, podem ser totalmente encapsulados em uma formulação de lipídeos, por exemplo, uma LNP, ou outra partícula de ácido nucleico-lipídeo.

[00518] Como usado aqui, o termo "LNP" se refere a uma partícula estável de ácido nucleico-lipídeo. As LNPs contêm tipicamente um lipídeo catiônico, um lipídeo não catiônico, e um lipídeo que previne agregação da partícula (por exemplo, um conjugado PEG-lipídeo). As LNPs são extremamente úteis para aplicações sistêmicas, pois exibem tempos de vida em circulação prolongados após injeção intravenosa (i.v.) e se acumulam em locais distais (por exemplo, locais fisicamente separados do local de administração). As LNPs incluem "pSPLP", que incluem um complexo de agente de condensação-ácido nucleico encapsulado como apresentado na Publicação PCT N° 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, o mais tipicamente cerca de 70 nm a cerca de 90 nm, e são substancialmente não tóxicas. Adicionalmente, os ácidos nucleicos, quando presentes nas partículas ácido nucleico-lipídeo da presente invenção, são resistentes em solução aquosa à degradação com uma nuclease. Partículas de ácido nucleico-lipídeo e seu método de preparação são divulgados nas, por exemplo, Patentes dos E.U.A. N°s. 5.976.567; 5.981.501; 6.534.484; 6.586.410; 6.815.432; Publicação dos E.U.A. N° 2010/0324120 e Publicação PCT N° WO 96/40964.

[00519] Em uma modalidade, a razão de lipídeo em relação ao

fármaco (razão massa/massa) (por exemplo, razão de lipídeo em relação a dsRNA) estará na gama 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. Gamas intermédias das gamas recitadas acima são também contempladas como sendo parte da invenção.

[00520] O lipídeo catiônico pode ser, por exemplo, cloreto de N,N-dioleil-N,N-dimetilamônio (DODAC), brometo de N,N-diestearil-N,N-dimetilamônio (DDAB), cloreto de N-(1-(2,3-dioleoilóxi)propil)-N,N,N-trimetilamônio (DOTAP), cloreto de N-(1-(2,3-dioleilóxi)propil)-N,N,N-trimetilamônio (DOTMA), N,N-dimetil-(2,3-dioleilóxi)propilamina (DODMA), 1,2-DiLinoleilóxióxi-N,N-dimetilaminopropano (DLinDMA), 1,2-Dilinenilóxi-N,N-dimetilaminopropano (DLenDMA), 1,2-Dilinoilcarbamoilóxi-3-dimetilaminopropano (DLin-C-DAP), 1,2-Dilinoilóxi-3-(dimetilamino)acetoxipropano (DLin-DAC), 1,2-Dilinoilóxi-3-morfolinopropano (DLin-MA), 1,2-Dilinoil-3-dimetilaminopropano (DLinDAP), 1,2-Dilinoilítio-3-dimetilaminopropano (DLin-S-DMA), 1-Linoil-2-linoilóxióxi-3-dimetilaminopropano (DLin-2-DMA), sal de cloreto de 1,2-Dilinoilóxióxi-3-trimetilaminopropano (DLin-TMA.Cl), sal de cloreto de 1,2-Dilinoil-3-trimetilaminopropano (DLin-TAP.Cl), 1,2-Dilinoilóxióxi-3-(N-metilpiperazino)propano (DLin-MPZ), ou 3-(N,N-Dilinoilamino)-1,2-propanodiol (DLinAP), 3-(N,N-Dioilamino)-1,2-propanodio (DOAP), 1,2-Dilinoilóxi-3-(2-N,N-dimetilamino)etoxipropano (DLin-EG-DMA), 1,2-Dilinenilóxi-N,N-dimetilaminopropano (DLinDMA), 2,2-Dilinoil-4-dimetilaminometil-[1,3]-dioxolano (DLin-K-DMA) ou seus análogos, (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)etilazanodi-il)didodecan-2-ol (Tech G1), ou uma sua mistura. O lipídeo catiônico pode compreender de cerca de 20% por mol a cerca de 50% por mol ou cerca de 40% por mol do lipídeo total presente na partícula.

[00521] Em outra modalidade, o composto 2,2-Dilinoleil-4-dimetilaminoetil-[1,3]-dioxolano pode ser usado para preparar nanopartículas de lipídeo-sRNAi. A síntese de 2,2-Dilinoleil-4-dimetilaminoetil-[1,3]-dioxolano é descrita no pedido de patente provisória dos Estados Unidos número 61/107,998 depositada a 23 de outubro de 2008, que é aqui incorporada por referência.

[00522] Em uma modalidade, a partícula de lipídeo-sRNAi inclui 2,2-Dilinoleil-4-dimetilaminoetil-[1,3]-dioxolano a 40%: DSPC a 10%: Colesterol a 40%: PEG-C-DOMG a 10% (percentagem molar) com um tamanho das partículas de $63,0 \pm 20$ nm e uma Razão de sRNAi/Lipídeo de 0,027.

[00523] O lipídeo ionizável/não catiônico pode ser um lipídeo aniônico ou um lipídeo neutro, incluindo, mas não se limitando, a diestearoilfosfatidilcolina (DSPC), dioleoilfosfatidilcolina (DOPC), dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), dioleoilfosfatidilglicerol (DOPG), dipalmitoilfosfatidilglicerol (DPPG), dioleoil-fosfatidiletanolamina (DOPE), palmitoíleoilfosfatidilcolina (POPC), palmitoíleoilfosfatidiletanolamina (POPE), 4-(N-maleimidometil)-ciclohexano-1-carboxilato de dioleoil-fosfatidiletanolamina (DOPE-mal), dipalmitoíl fosfatidil etanolamina (DPPE), dimiristoilfosfoetanolamina (DMPE), diestearoil-fosfatidil-etanolamina (DSPE), 16-O-monometil PE, 16-O-dimetil PE, 18-1-*trans* PE, 1-estearoil-2-oleoil-fosfatidietanolamina (SOPE), colesterol, ou uma sua mistura. O lipídeo não catiônico pode compreender de cerca de 5% por mol a cerca de 90% por mol, cerca de 10% por mol, ou cerca de 58% por mol se colesterol estiver incluído, do

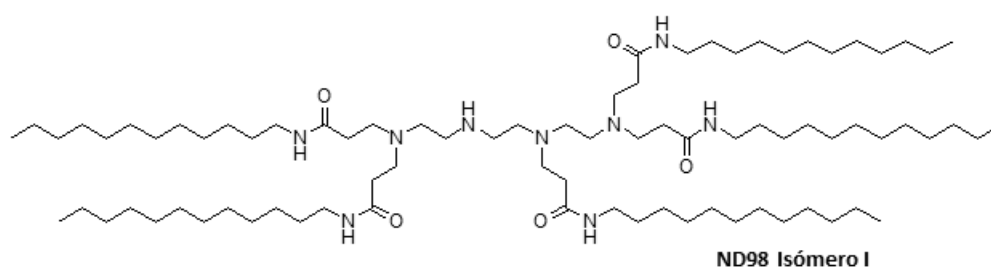
lipídeo total presente na partícula.

[00524] O lipídeo conjugado que inibe agregação de partículas pode ser, por exemplo, um polietilenoglicol (PEG)-lipídeo incluindo, sem limitação, um PEG-diacilglicerol (DAG), um PEG-dialquiloxipropila (DAA), um PEG-fosfolipídeo, um PEG-ceramida (Cer), ou uma sua mistura. O conjugado PEG-DAA pode ser, por exemplo, um PEG-dilauriloxipropila (Ci₂), um PEG-dimiristiloxipropila (Ci₄), um PEG-dipalmitiloxipropila (Ci₆), ou um PEG-diesteariloxipropila (Ci₈). O lipídeo conjugado que previne agregação de partículas pode ser de 0% por mol a cerca de 20% por mol ou cerca de 2% por mol do lipídeo total presente na partícula.

[00525] Em algumas modalidades, a partícula de ácido nucleico-lipídeo inclui adicionalmente colesterol a, por exemplo, cerca de 10% molar a cerca de 60% molar ou cerca de 48% molar do lipídeo total presente na partícula.

[00526] Em uma modalidade, o lipídeo ND98·4HCl (PM 1487) (ver Pedido de Patente dos E.U.A. Nº 12/056,230, depositada a 3/26/2008, que é incorporada aqui por referência), Colesterol (Sigma-Aldrich), e PEG-Ceramida C16 (Avanti Polar Lipids) podem ser usados para preparar nanopartículas de lipídeo-dsRNA (*isto é*, partículas LNP01). Soluções de estoque de cada em etanol podem ser preparadas como se segue: ND98, 133 mg/mL; Colesterol, 25 mg/mL, PEG-Ceramida C16, 100 mg/mL. As soluções de estoque de ND98, Colesterol, e PEG-Ceramida C16 podem ser depois combinadas em uma, por exemplo, razão molar 42:48:10. A solução de lipídeo combinada pode ser misturada com dsRNA aquoso (por exemplo, em acetato de sódio pH 5) tal que a concentração final de etanol seja cerca de 35-45% e a concentração final de acetato de sódio seja cerca de 100-300 mM. As nanopartículas de lipídeo-dsRNA são tipicamente formadas espontaneamente após mistura. Dependendo da distribuição do

tamanho das partículas desejada, a mistura de nanopartículas resultante pode ser extrudada através de uma membrana de polycarbonato (por exemplo, limite de exclusão de 100 nm) usando, por exemplo, uma extrusora *thermobarrel*, tal como Extrusora Lipex (Northern Lipids, Inc). Em alguns casos, o passo de extrusão pode ser omitido. A remoção de etanol e mudança de tampão simultânea podem ser alcançadas por, por exemplo, diálise ou filtração com fluxo tangencial. O tampão pode ser mudado com, por exemplo, salino tamponado com 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 1

[00527] Formulações de LNP01 são descritas, por exemplo, na Publicação do Pedido Internacional Nº WO 2008/042973, que é deste modo incorporada por referência.

[00528] Formulações de lipídeo-dsRNA exemplares adicionais são descritas na Tabela 1.

Tabela 1

	Lipídeo Ionizável/Catiônico	lipídeo catiônico/lipídeo não catiônico/colesterol/conjugado PEG-lipídeo Razão Lipídeo:sRNAi
SNALP-1	1,2-Dilinenilóxi-N,N-dimetilaminopropano (DLinDMA)	DLinDMA/DPPC/Colesterol/PEG-cDMA (57,1/7,1/34,4/1,4) lipídeo:sRNAi ~ 7:1

	Lipídeo Ionizável/Catiônico	lipídeo catiônico/lipídeo não catiônico/colesterol/conjugado PEG-lipídeo Razão Lipídeo:sRNAi
2-XTC	2,2-Dilinoleil-4-dimetilaminoetil-[1,3]-dioxolano (XTC)	XTC/DPPC/Colesterol/PEG-cDMA 57,1/7,1/34,4/1,4 lipídeo:sRNAi ~ 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:sRNAi ~ 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:sRNAi ~ 11:1
LNP07	2,2-Dilinoleil-4-dimetilaminoetil-[1,3]-dioxolano (XTC)	XTC/DSPC/Colesterol/PEG-DMG 60/7,5/31/1,5, lipídeo:sRNAi ~ 6:1
LNP08	2,2-Dilinoleil-4-dimetilaminoetil-[1,3]-dioxolano (XTC)	XTC/DSPC/Colesterol/PEG-DMG 60/7,5/31/1,5, lipídeo:sRNAi ~ 11:1
LNP09	2,2-Dilinoleil-4-dimetilaminoetil-[1,3]-dioxolano (XTC)	XTC/DSPC/Colesterol/PEG-DMG 50/10/38,5/1,5 Lipídeo:sRNAi 10:1
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:sRNAi 10:1

	Lípido Ionizável/Catiônico	lipídeo catiônico/lipídeo não catiônico/colesterol/conjugado PEG-lipídeo Razão Lipídeo:sRNAi
LNP11	4-(dimetilamino)butanoato de (6Z,9Z,28Z,31Z)-heptatriacont-6,9,28,31-tetraen-19-ila (MC3)	MC-3/DSPC/Colesterol/PEG-DMG 50/10/38,5/1,5 Lipídeo:sRNAi 10:1
LNP12	1,1'-(2-(4-(2-((2-(bis(2-hidroxidodecil)amino)etil)(2-hidroxidodecil)amino)etil)piperazin-1-il)etilazanodi-il)didodecan-2-ol (Tech G1)	Tech G1/DSPC/Colesterol/PEG-DMG 50/10/38,5/1,5 Lipídeo:sRNAi 10:1
LNP13	XTC	XTC/DSPC/Col/PEG-DMG 50/10/38,5/1,5 Lipídeo:sRNAi: 33:1
LNP14	MC3	MC3/DSPC/Col/PEG-DMG 40/15/40/5 Lipídeo:sRNAi: 11:1
LNP15	MC3	MC3/DSPC/Col/PEG-DSG/GalNAc-PEG-DSG 50/10/35/4,5/0,5 Lipídeo:sRNAi: 11:1
LNP16	MC3	MC3/DSPC/Col/PEG-DMG 50/10/38,5/1,5 Lipídeo:sRNAi: 7:1
LNP17	MC3	MC3/DSPC/Col/PEG-DSG 50/10/38,5/1,5 Lipídeo:sRNAi: 10:1
LNP18	MC3	MC3/DSPC/Col/PEG-DMG 50/10/38,5/1,5 Lipídeo:sRNAi: 12:1
LNP19	MC3	MC3/DSPC/Col/PEG-DMG 50/10/35/5 Lipídeo:sRNAi: 8:1

	Lipídeo Ionizável/Catiônico	lipídeo catiônico/lipídeo não catiônico/colesterol/conjugado PEG-lipídeo Razão Lipídeo:sRNAi
LNP20	MC3	MC3/DSPC/Col/PEG-DPG 50/10/38,5/1,5 Lipídeo:sRNAi: 10:1
LNP21	C12-200	C12-200/DSPC/Col/PEG-DSG 50/10/38,5/1,5 Lipídeo:sRNAi: 7:1
LNP22	XTC	XTC/DSPC/Col/PEG-DSG 50/10/38,5/1,5 Lipídeo:sRNAi: 10:1

DSPC: diestearoilfosfatidilcolina

DPPC: dipalmitoilfosfatidilcolina

PEG-DMG: PEG-didimiristóil glicerol (C14-PEG, ou PEG-C14) (PEG com peso molecular médio de 2000)

PEG-DSG: PEG-diestiril glicerol (C18-PEG, ou PEG-C18) (PEG com peso molecular médio de 2000)

PEG-cDMA: PEG-carbamoil-1,2-dimiristiloxipropilamina (PEG com peso molecular médio de 2000)

[00529] Formulações compreendendo SNALP (1,2-Dilinolenilóxi-N,N-dimetilaminopropano (DLinDMA)) são descritas na Publicação Internacional Nº WO2009/127060, depositada a 15 de abril, 2009, que é deste modo incorporada por referência.

[00530] Formulações compreendendo XTC são descritas, por exemplo, na Publicação PCT Nº WO 2010/088537, cuja totalidade do conteúdo é aqui incorporada a título de referência.

[00531] Formulações compreendendo MC3 são descritas, por exemplo, na Publicação dos E.U.A. Nº 2010/0324120, depositada em 10 de junho de 2010, cuja totalidade do conteúdo é aqui incorporada a título de referência.

[00532] Formulações compreendendo ALNY-100 são descritas, por exemplo, na Publicação PCT Nº WO 2010/054406, cuja totalidade do conteúdo é aqui incorporada a título de referência.

[00533] Formulações compreendendo C12-200 são descritas, por exemplo, na Publicação PCT Nº WO 2010/129709, cuja totalidade do conteúdo é aqui incorporada a título de referência.

[00534] Composições e formulações para administração oral incluem pós ou grânulos, microparticulados, nanoparticulados, suspensões ou soluções em água ou meios não aquosos, cápsulas, cápsulas de gel, saquetas, comprimidos ou minicomprimidos. Podem ser desejáveis espessantes, agentes aromatizantes, diluentes, emulsificantes, auxiliares de dispersão ou ligantes. Em algumas modalidades, formulações orais são aquelas nas quais dsRNAs apresentados na invenção são administrados em conjunto com um ou mais tensoativos intensificadores da penetração e quelantes. Tensoativos adequados incluem ácidos graxos e/ou seus ésteres ou sais, ácidos biliares e/ou seus sais. Ácidos biliares/sais adequados incluem ácido quenodesóxicólico (CDCA) e ácido ursodesóxiquenodesóxicólico (UDCA), ácido cólico, ácido desidrocólico, ácido desóxicólico, ácido glucocólico, ácido glicocólico, ácido glicodesóxicólico, ácido taurocólico, ácido taurodesóxicólico, tauro-24,25-di-idro-fusidato de sódio e glicodihidrofusidato de sódio. 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 seu sal farmaceuticamente aceitável (por exemplo, sódio). Em algumas modalidades são usadas combinações de intensificadores da penetração, por exemplo, ácidos graxos/sais em combinação com

ácidos biliares/sais. Uma combinação exemplificativa é o sal de sódio do ácido láurico, ácido cáprico e UDCA. Intensificadores da penetração adicionais incluem éter de polioxietileno-9-laurila, éter de polioxietileno-20-cetila. DsRNAs apresentados na invenção podem ser administrados oralmente, em forma granular incluindo partículas secas pulverizadas, ou complexados para formarem micro ou nanopartículas. Agentes de complexação de dsRNA incluem poliaminoácidos; poli-iminas; poliacrilatos; polialquilacrilatos, polioxetanos, polialquilcianoacrilatos; gelatinas cationizadas, albuminas, amidos, acrilatos, polietilenoglicóis (PEG) e amidos; polialquilcianoacrilatos; poli-iminas derivatizadas com DEAE, pululanas, celulosas e amidos. Agentes de complexação adequados incluem quitosana, N-trimetilquitosana, poli-L-lisina, polihistidina, poliornitina, poliesperminas, protamina, polivinilpiridina, politiodietilaminometiletileno P(TDAE), poliaminoestireno (por exemplo, *p*-amino), poli(metilcianoacrilato), poli(etilcianoacrilato), poli(butilcianoacrilato), poli(isobutilcianoacrilato), poli(isohexilcianoacrilato), DEAE-metacrilato, DEAE-hexilacrilato, DEAE-acrilamida, DEAE-albumina e DEAE-dextrana, polimetilacrilato, polihexilacrilato, poli(ácido D,L-láctico), poli(ácido DL-láctico-co-glicólico) (PLGA), alginato, e polietilenoglicol (PEG). Formulações orais para dsRNAs e sua preparação são descritas em detalhe na Patente dos E.U.A. 6.887.906, PubIn dos EUA Nº 20030027780, e Patente dos E.U.A. Nº 6.747.014, cada uma das quais é incorporada aqui por referência.

[00535] Composições e formulações para administração parenteral, intraparênquima (no cérebro), intratecal, intraventricular ou intrahepática podem incluir soluções aquosas estéreis que podem também conter tampões, diluentes e outros aditivos adequados tais como, mas não se limitando a, intensificadores da penetração, compostos transportadores e outros transportadores ou excipientes

farmaceuticamente aceitáveis.

[00536] As composições farmacêuticas da presente invenção incluem, mas não estão limitadas a, soluções, emulsões, e formulações contendo lipossomas. Estas composições podem ser geradas a partir de uma variedade de componentes que incluem, mas não estão limitados a, líquidos pré-formados, sólidos autoemulsificantes e semissólidos autoemulsificantes. São particularmente preferenciais formulações que se dirigem ao fígado quando se tratam distúrbios hepáticos tais como carcinoma hepático.

[00537] As formulações farmacêuticas da presente invenção, que podem ser convenientemente apresentadas em forma de dosagem unitária, podem ser preparadas de acordo com técnicas convencionais bem conhecidas na indústria farmacêutica. Tais técnicas incluem o passo de colocação em associação dos ingredientes ativos com o(s) transportador(es) ou excipiente(s) farmacêutico(s). Em geral, as formulações são preparadas por colocação em associação uniforme e íntima dos ingredientes ativos com transportadores líquidos ou transportadores sólidos finamente divididos ou ambos, e, depois, se necessário, moldagem do produto.

[00538] As composições da presente invenção podem ser formuladas em qualquer uma de muitas formas de dosagem possíveis, tais como, mas não se limitando a, comprimidos, cápsulas, cápsulas de gel, xaropes líquidos, géis moles, supositórios, e enemas. As composições da presente invenção podem ser também formuladas como suspensões em meios aquosos, não aquosos ou mistos. As suspensões aquosas podem adicionalmente conter substâncias que aumentam a viscosidade da suspensão, incluindo, por exemplo, carboximetilcelulose sódica, sorbitol e/ou dextrana. A suspensão pode também conter estabilizantes.

C. Formulações Adicionais

i. Emulsões

[00539] As composições da presente invenção podem ser preparadas e formuladas como emulsões. Emulsões são sistemas tipicamente heterogêneos de um líquido disperso em outro sob a forma de gotículas, geralmente excedendo 0,1µm de diâmetro (ver, por exemplo,, Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., e Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Idson, em Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger e Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 199; Rosoff, em Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger e Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., Volume 1, p. 245; Block em Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger e Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 2, p. 335; Higuchi et al., em Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1985, p. 301). As emulsões são frequentemente sistemas bifásicos compreendendo duas fases líquidas imiscíveis intimamente misturadas e dispersas entre si. Em geral, emulsões podem ser da variedade água-em-óleo (w/o) ou óleo-em-água (o/w). Quando uma fase aquosa é finamente dividida e dispersa como gotículas mínimas em uma fase oleosa volumosa, a composição resultante é chamada uma emulsão água-em-óleo (w/o). Alternativamente, quando uma fase oleosa é finamente dividida e dispersa como gotículas mínimas em uma fase aquosa volumosa, a composição resultante é chamada uma emulsão óleo-em-água (o/w). As emulsões podem conter componentes adicionais adicionalmente às fases dispersas, e o fármaco ativo, que pode estar presente como uma solução em qualquer uma das fase aquosa, fase oleosa ou o próprio como uma fase separada. Excipientes farmacêuticos tais como emulsificantes, estabilizantes, corantes, e antioxidantes, podem estar também presentes em emulsões como

necessário. Emulsões farmacêuticas podem ser também emulsões múltiplas que são compreendidas por mais do que duas fases tais como, por exemplo, no caso de emulsões óleo-em-água-em-óleo (o/w/o) e água-em-óleo-em-água (w/o/w). Tais formulações complexas proporcionam frequentemente certas vantagens que emulsões binárias simples não apresentam. Emulsões múltiplas nas quais gotículas de óleo individuais de uma emulsão o/w encerram pequenas gotículas de água constituem uma emulsão w/o/w. Do mesmo modo, um sistema de gotículas de óleo encerradas em glóbulos de água estabilizados em uma fase oleosa contínua proporciona uma emulsão o/w/o.

[00540] As emulsões são caracterizadas por estabilidade termodinâmica pequena ou nula. Frequentemente, a fase dispersa ou descontínua da emulsão está bem dispersa na fase externa ou contínua e mantida em esta forma através 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 bases e cremes de pomadas do estilo emulsão. Outros meios de estabilização de emulsões implicam o uso de emulsificantes que podem ser incorporados em qualquer uma das fases da emulsão. Os emulsificantes podem ser classificados genericamente em quatro categorias: tensoativos sintéticos, emulsificantes naturais, bases de absorção e sólidos finamente dispersos (ver por exemplo, Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., e Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Idson, em Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger e Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 199).

[00541] Tensoativos sintéticos, também conhecidos como agentes ativos de superfície, encontraram ampla aplicabilidade na formulação de emulsões e foram revistos na literatura (ver, por exemplo, Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV.,

Popovich NG., e Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Rieger, em *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger e Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 285; Idson, em *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger e Banker (Eds.), Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 1988, volume 1, p. 199). Os tensoativos são tipicamente anfifílicos e compreendem uma porção hidrofílica e uma hidrofóbica. A razão da natureza hidrofílica em relação à hidrofóbica do tensoativo foi denominada equilíbrio hidrófilo/lipófilo (HLB) e é uma ferramenta valiosa na categorização e seleção de tensoativos na preparação de formulações. Os tensoativos podem ser classificados em diferentes classes com base na natureza do grupo hidrofílico: não iônicos, aniônicos, catiônicos e anfotéricos (ver por exemplo, Ansel's *Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems*, Allen, LV., Popovich NG., e Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY Rieger, em *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger e Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 285).

[00542] Os emulsificantes ocorrendo naturalmente usados em formulações de emulsão incluem lanolina, cera de abelhas, fosfatídeos, lecitina e acácia. As bases de absorção possuem propriedades hidrofílicas tal que possam embeber água para formar emulsões w/o retendo no entanto suas consistências semissólidas, tais como lanolina anidra e petrolato hidrofílico. Sólidos finamente divididos têm sido também usados como bons emulsificantes, especialmente em combinação com tensoativos e em preparações viscosas. Estes incluem sólidos inorgânicos polares, tais como hidróxidos de metais pesados, argilas não expansíveis tais como bentonita, atapulgita, hectorita, caulim, montmorilonita, silicato de alumínio coloidal e silicato de alumínio e magnésio coloidal, pigmentos e sólidos não polares tais

como carbono ou triestearato de glicerila.

[00543] Uma grande variedade de materiais não emulsificantes está também incluída em formulações de emulsão e contribui para as propriedades de emulsões. Estes incluem gorduras, óleos, ceras, ácidos graxos, álcoois graxos, ésteres gordurosos, umectantes, coloides hidrofílicos, conservantes e antioxidantes (Block, em *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger e Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 335; Idson, em *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger e Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 199).

[00544] Coloides hidrofílicos ou hidrocoloides incluem gomas ocorrendo naturalmente e polímeros sintéticos tais como polissacarídeos (por exemplo, acácia, ágar, ácido algínico, carragenano, goma de guar, goma Karaya, e tragacanto), derivados de celulose (por exemplo, carboximetilcelulose e carboxipropilcelulose), e polímeros sintéticos (por exemplo, carbômeros, éteres de celulose, e polímeros de carboxivinila). Estes se dispersam ou dilatam em água para formar soluções coloidais que estabilizam emulsões por formação de filmes interfaciais fortes em torno das gotículas da fase dispersa e por aumento da viscosidade da fase externa.

[00545] Uma vez que as emulsões contêm frequentemente um número de ingredientes tais como carboidratos, proteínas, esteróis e fosfatídeos, que podem facilmente suportar o crescimento de micróbios, estas formulações incorporam frequentemente conservantes. Conservantes comumente usados incluídos em formulações de emulsão incluem parabeno de metila, parabeno de propila, sais de amônio quaternário, cloreto de benzalcônio, ésteres do ácido *p*-hidroxibenzoico, e ácido bórico. Antioxidantes são também comumente adicionados a formulações de emulsão para prevenir deterioração da formulação. Os antioxidantes usados podem ser

agentes de remoção de radicais livres tais como tocoferóis, galatos de alquila, hidroxianisol butilado, hidroxitolueno butilado, ou agentes redutores tais como ácido ascórbico e metabissulfito de sódio, e agentes sinérgicos antioxidantes tais como ácido cítrico, ácido tartárico, e lecitina.

[00546] A aplicação de formulações de emulsões por via dermatológica, oral e parenteral e métodos para o seu fabrico foram revistos na literatura (ver, por exemplo, Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., e Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Idson, em Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger e Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 199). Formulações de emulsões para administração oral têm sido muito amplamente utilizadas por causa da facilidade de formulação, bem como pela eficácia do ponto de vista da absorção e biodisponibilidade (ver por exemplo, Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., e Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Rosoff, em Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger e Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 245; Idson, em Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger e Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 199). Laxantes à base de óleos minerais, vitaminas solúveis em óleo e preparações nutritivas com elevado conteúdo de gordura estão entre os materiais que têm sido comumente administrados oralmente como emulsões o/w.

ii. Microemulsões

[00547] Em uma modalidade da presente invenção, as composições de RNAs e ácidos nucleicos são formuladas como microemulsões. Uma microemulsão pode ser definida como um sistema de água, óleo e

anfifílico que é uma solução líquida termodinamicamente estável e isotropicamente isotrópica única (ver por exemplo, Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., e Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Rosoff, em Pharmaceutical Dosage Forms, Lieberman, Rieger e Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 245). Tipicamente, as microemulsões são sistemas que são preparados primeiramente por dispersão de um óleo em uma solução aquosa de tensoativo e depois adição de uma quantidade suficiente de um quarto componente, geralmente um álcool com comprimento intermédio da cadeia, para formar um sistema transparente. Portanto, as microemulsões têm sido também descritas como dispersões termodinamicamente estáveis, isotropicamente límpidas de dois líquidos imiscíveis que são estabilizadas por filmes interfaciais de moléculas com superfície ativa (Leung e Shah, em: Controlled Release of Drugs: Polymers and Aggregate Systems, Rosoff, M., Ed., 1989, VCH Publishers, New York, páginas 185-215). As microemulsões são comumente preparadas através de uma combinação de três a cinco componentes que incluem óleo, água, tensoativo, cotensoativo e eletrólito. Se a microemulsão for do tipo água-em-óleo (w/o) ou óleo-em-água (o/w) está dependente das propriedades do óleo e tensoativo usados e da estrutura e empacotamento geométrico das cabeças polares e caudas de hidrocarbonetos das moléculas de tensoativo Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1985, p. 271).

[00548] A abordagem fenomenológica utilizando diagramas de fase foi extensivamente estudada e originou um conhecimento abrangente, a um perito na técnica, de como formularem microemulsões (ver, por exemplo, Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Allen, LV., Popovich NG., e Ansel HC., 2004, Lippincott

Williams & Wilkins (8th ed.), New York, NY; Rosoff, em *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger e Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 245; Block, em *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger e Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 335). Em comparação com emulsões convencionais, as microemulsões oferecem a vantagem de solubilização de fármacos insolúveis em água em uma formulação de gotículas termodinamicamente estáveis que se formam espontaneamente.

[00549] Os tensoativos usados na preparação de microemulsões incluem, mas não estão limitados a, tensoativos iônicos, tensoativos não iônicos, Brij 96, éteres de oleíla e polioxietileno, ésteres de ácidos graxos e poliglicerol, monolaurato de tetraglicerol (ML310), monooleato de tetraglicerol (MO310), monooleato de hexaglicerol (PO310), pentaoleato de hexaglicerol (PO500), monocaprato de decaglicerol (MCA750), monooleato de decaglicerol (MO750), sequioleato de decaglicerol (SO750), decaoleato de decaglicerol (DAO750), sozinhos ou em combinação com cotensioativos. O cotensioativo, usualmente um álcool de cadeia curta tal como etanol, 1-propanol, e 1-butanol, serve para aumentar a fluidez interfacial por penetração no filme de tensoativo e conseqüentemente criação de um filme desordenado devido ao espaço vazio gerado entre moléculas de tensoativo. No entanto podem ser preparadas microemulsões sem o uso de cotensioativos e sistemas de microemulsão autoemulsificantes isentos de álcool são conhecidos na técnica. A fase aquosa pode tipicamente ser, mas não está limitada a, água, uma solução aquosa do fármaco, glicerol, PEG300, PEG400, poligliceróis, propileno glicóis, e derivados de etileno glicol. A fase de óleo pode incluir, mas não está limitada a, materiais tais como Captex 300, Captex 355, Capmul MCM, ésteres de ácidos graxos, mono, di, e triglicerídeos de cadeia média (C8-C12), ésteres de ácidos graxos e

glicerila polietoxilados, álcoois graxos, glicerídeos poliglicolizados, glicerídeos C8-C10 saturados poliglicolizados, óleos vegetais e óleo de silicone.

[00550] As microemulsões são particularmente de interesse do ponto de vista da solubilização de fármacos e da absorção intensificada de fármacos. Microemulsões à base de lipídeos (o/w e w/o) têm sido propostas para intensificar a biodisponibilidade oral de fármacos, incluindo peptídeos (ver, por exemplo, Patentes dos E.U.A. N°s. 6,191,105; 7,063,860; 7,070,802; 7,157,099; Constantinides *et al.*, *Pharmaceutical Research*, 1994, 11, 1385-1390; Ritschel, *Meth. Find. Exp. Clin. Pharmacol.*, 1993, 13, 205). As microemulsões proporcionam vantagens de solubilização melhorada de fármacos, proteção de fármacos da hidrólise enzimática, possível intensificação da absorção de fármacos devido a alterações, induzidas por tensoativos, da fluidez e permeabilidade membranares, facilidade de preparação, facilidade de administração oral em relação a formas de dosagem sólidas, potência clínica melhorada, e toxicidade diminuída (ver, por exemplo, Patentes dos E.U.A. N°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, 138-143). Frequentemente, as microemulsões podem se formar espontaneamente quando seus componentes são colocados em contato à temperatura ambiente. Isto pode ser particularmente vantajoso na formulação de fármacos termicamente instáveis, peptídeos ou RNAs. As microemulsões têm sido também eficazes na administração transdérmica de componentes ativos em aplicações cosméticas e farmacêuticas. Se espera que as composições e formulações de microemulsão da presente invenção facilitem a absorção sistêmica aumentada de RNAs e ácidos nucleicos a partir do trato gastrointestinal, bem como melhorem a captação celular local de RNAs e ácidos nucleicos.

[00551] As microemulsões da presente invenção podem também conter componentes e aditivos suplementares tais como monoestearato de sorbitana (Grill 3), Labrasol, e intensificadores da penetração para melhorar as propriedades da formulação e intensificar a absorção dos RNAs e ácidos nucleicos da presente invenção. Os intensificadores da penetração usados nas microemulsões da presente invenção podem ser classificados como pertencendo a uma de cinco amplas categorias - tensoativos, ácidos graxos, sais biliares, agentes quelantes, e não tensoativos não quelantes (Lee et al., Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1991, p. 92). Cada uma destas classes foi discutida acima.

iii. Micropartículas

[00552] Um agente de RNAi da invenção pode ser incorporado em uma partícula, por exemplo, uma micropartícula. As micropartículas podem ser produzidas por secagem por pulverização, mas podem ser também produzidas por outros métodos incluindo liofilização, evaporação, secagem em leito fluidizado, secagem por vácuo, ou uma combinação destas técnicas.

iv. Intensificadores da Penetração

[00553] Em uma modalidade, a presente invenção emprega vários intensificadores da penetração para efetuar a distribuição eficaz de ácidos nucleicos, particularmente RNAs, à pele de animais. A maioria dos fármacos está presente em solução em ambas as formas ionizada e não ionizada. No entanto, usualmente apenas fármacos solúveis em lipídeos ou lipofílicos atravessam prontamente membranas celulares. Foi descoberto que mesmo fármacos não lipofílicos conseguem atravessar membranas celulares se a membrana a ser atravessada for tratada com um intensificador da penetração. Adicionalmente a auxiliarem a difusão de fármacos não lipofílicos através de membranas celulares, os intensificadores da penetração intensificam também a

permeabilidade de fármacos lipofílicos.

[00554] Os intensificadores da penetração podem ser classificados como pertencendo a uma de cinco amplas categorias ou seja, tensoativos, ácidos graxos, sais biliares, agentes quelantes, e não tensoativos não quelantes (ver, por exemplo, Malmsten, M. Surfactants and polymers in drug delivery, Informa Health Care, New York, NY, 2002; Lee et al., Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1991, p.92). Cada uma das classes acima mencionadas de intensificadores da penetração é descrita em baixo em mais detalhe.

[00555] Tensoativos (ou "agentes com atividade de superfície") 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 de a absorção de RNAs através da mucosa ser intensificada. Adicionalmente aos sais biliares e ácidos graxos, estes intensificadores da penetração incluem, por exemplo, lauril sulfato de sódio, éter de polioxietileno-9-laurila e éter de polioxietileno-20-cetila) (ver, por exemplo, Malmsten, M. Surfactants and polymers in drug delivery, Informa Health Care, New York, NY, 2002; Lee et al., Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1991, p.92); e emulsões perfluoroquímicas, tais como FC-43. Takahashi et al., J. Pharm. Pharmacol., 1988, 40, 252).

[00556] Vários ácidos graxos e seus derivados que atuam como intensificadores da 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 caprílico, ácido araquidônico, 1-monocaprato de glicerol, 1-dodecilazacicloheptan-2-ona, acilcarnitinas, acilcolinas, seus ésteres de alquila C₁₋₂₀ (por exemplo, metila, isopropila e *t*-butila), e seus mono- e di-glicerídeos (ou seja, oleato, laurato, caprato, miristato, palmitato,

estearato, linoleato, etc.) (ver, 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, p.92; Muranishi, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1990, 7, 1-33; El Hariri et al., *J. Pharm. Pharmacol.*, 1992, 44, 651-654).

[00557] O papel fisiológico da bÍlis inclui a facilitaÇão da dispersão e absorÇão de lipÍdeos e vitaminas solúveis em gordura (ver, por exemplo, Malmsten, M. *Surfactants and polymers in drug delivery*, Informa Health Care, New York, NY, 2002; Brunton, capítulo 38 em: Goodman & Gilman's *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 9th Ed., Hardman et al. Eds., McGraw-Hill, New York, 1996, páginas 934-935). Vários sais biliares naturais, e seus derivados sintéticos, atuam como intensificadores da penetração. Assim, o termo "sais biliares" inclui qualquer um dos componentes ocorrendo naturalmente da bÍlis bem como qualquer um de seus derivados sintéticos. Sais biliares adequados incluem, por exemplo, ácido cólico (ou seu sal de sódio farmaceuticamente aceitável, colato de sódio), ácido desidroc lico (desidrocolato de sódio), ácido desoxic lico (desoxicolato de sódio), ácido glucoc lico (glucocolato de sódio), ácido glicoc lico (glicocolato de sódio), ácido glicodesoxic lico (glicodesoxicolato de sódio), ácido tauroc lico (taurocolato de sódio), ácido taurodesoxic lico (taurodesoxicolato de sódio), ácido quenodesoxic lico (quenodesoxicolato de sódio), ácido ursodesoxicólico (UDCA), tauro-24,25-diidro-fusidato de sódio (STDHF), glicodiidrofusidato de sódio e éter de polioxietileno-9-laurila (POE) (ver, por exemplo, Malmsten, M. *Surfactants and polymers in drug delivery*, Informa Health Care, New York, NY, 2002; Lee et al., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, página 92; Swinyard, capítulo 39 em: Remington's *Pharmaceutical Sciences*, 18th Ed., Gennaro, ed., Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1990, páginas 782-783; Muranishi, *Critical Reviews in*

Therapeutic Drug Carrier Systems, 1990, 7, 1-33; Yamamoto et al., J. Pharm. Exp. Ther., 1992, 263, 25; Yamashita et al., J. Pharm. Sci., 1990, 79, 579-583).

[00558] Agentes quelantes, como usados em conexão com a presente invenção, podem ser definidos como compostos que removem íons metálicos da solução por formação de complexos com eles, com o resultado de a absorção de RNAs através da mucosa ser intensificada. No que diz respeito ao seu uso como intensificadores da penetração na presente invenção, os agentes quelantes têm a vantagem adicional de também servirem como inibidores de DNase, pois a maioria das DNA nucleases caracterizadas requer um íon metálico divalente para catálise e é assim inibida por agentes quelantes (Jarrett, J. Chromatogr., 1993, 618, 315-339). Agentes quelantes adequados incluem, mas não estão limitados a, etilenodiaminatetra-acetato dissódico (EDTA), ácido cítrico, salicilatos (por exemplo, salicilato de sódio, 5-metoxissalicilato e homovanilato), derivados de N-acila de colagênio, laureth-9 e derivados de acila de N-amino de beta-dicetonas (enaminas) (ver, 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, 1-33; Buur et al., J. Control Rel., 1990, 14, 43-51).

[00559] Como usado aqui, compostos intensificadores da penetração não tensoativos não quelantes podem ser definidos como compostos que demonstram atividade insignificante como agentes quelantes ou como tensoativos mas que ainda assim intensificam a absorção de RNAs através da mucosa alimentar (ver, por exemplo, Muranishi, Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1990, 7, 1-33). Esta classe de intensificadores da penetração inclui, por exemplo, ureias cíclicas insaturadas, derivados de 1-alkil- e 1-alkenilazaciclo-

alcanona (Lee et al., Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1991, page 92); e agentes anti-inflamatórios não esteroides tais como diclofenac sódico, indometacina e fenilbutazona (Yamashita et al., J. Pharm. Pharmacol., 1987, 39, 621-626).

[00560] Agentes que intensificam a captação de RNAs ao nível celular podem ser também adicionados à composição farmacêutica e outras composições da presente invenção. Por exemplo se sabe também que lipídeos catiônicos, tais como lipofectina (Junichi *et al.*, Patente dos E.U.A. No. 5,705,188), derivados catiônicos de glicerol, e moléculas policatiônicas, tais como polilisina (Lollo *et al.*, Pedido PCT WO 97/30731), intensificam a captação celular de dsRNAs. Exemplos de reagentes de transfecção comercialmente disponíveis incluem, por exemplo, Lipofectamine™ (Invitrogen; Carlsbad, CA), Lipofectamine 2000™ (Invitrogen; Carlsbad, CA), 293fectin™ (Invitrogen; Carlsbad, CA), Cellfectin™ (Invitrogen; Carlsbad, CA), DMRIE-C™ (Invitrogen; Carlsbad, CA), FreeStyle™ MAX (Invitrogen; Carlsbad, CA), Lipofectamine™ 2000 CD (Invitrogen; Carlsbad, CA), Lipofectamine™ (Invitrogen; Carlsbad, CA), RNAiMAX (Invitrogen; Carlsbad, CA), Oligofectamine™ (Invitrogen; Carlsbad, CA), Optifect™ (Invitrogen; Carlsbad, CA), X-tremeGENE Q2 Transfection Reagent (Roche; Grenzacherstrasse, Suíça), DOTAP Liposomal Transfection Reagent (Grenzacherstrasse, Suíça), DOSPER Liposomal Transfection Reagent (Grenzacherstrasse, Suíça), ou Fugene (Grenzacherstrasse, Suíça), Transfectam® Reagent (Promega; Madison, WI), TransFast™ Transfection Reagent (Promega; Madison, WI), Tfx™-20 Reagent (Promega; Madison, WI), Tfx™-50 Reagent (Promega; Madison, WI), DreamFect™ (OZ Biosciences; Marselha, França), EcoTransfect (OZ Biosciences; Marselha, França), TransPass^a D1 Transfection Reagent (New England Biolabs; Ipswich, MA, EUA), LyoVec™/LipoGen™ (Invitrogen; San Diego, CA, EUA), PerFectin Transfection Reagent

(Genlantis; San Diego, CA, EUA), NeuroPORTER Transfection Reagent (Genlantis; San Diego, CA, EUA), GenePORTER Transfection reagent (Genlantis; San Diego, CA, EUA), GenePORTER 2 Transfection reagent (Genlantis; San Diego, CA, EUA), Cytofectin Transfection Reagent (Genlantis; San Diego, CA, EUA), BaculoPORTER Transfection Reagent (Genlantis; San Diego, CA, EUA), TroganPORTER™ transfection Reagent (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.

[00561] Podem ser utilizados outros agentes para intensificar a penetração dos ácidos nucleicos administrados, incluindo glicóis tais como etileno glicol e propileno glicol, pirróis tais como 2-pirrol, azonas, e terpenos tais como limoneno e mentona.

v. Transportadores

[00562] Certas composições da presente invenção incorporam também compostos transportadores na formulação. Como usado aqui, "composto transportador" ou "transportador" pode se referir a um ácido nucleico, ou seu análogo, que é inerte (ou seja, não possui atividade biológica *per se*) mas que é reconhecido como um ácido nucleico por processos *in vivo* que reduzem a biodisponibilidade de um ácido nucleico tendo atividade biológica por, por exemplo, degradação do ácido nucleico biologicamente ativo ou promoção da sua remoção da circulação. A coadministração de um ácido nucleico e um composto transportador, tipicamente com um excesso da última substância, pode resultar em uma redução substancial da quantidade de ácido nucleico recuperada no fígado, rim ou outros reservatórios extracirculatórios, presumivelmente devido a competição entre o composto transportador

e o ácido nucleico para um receptor comum. Por exemplo, a recuperação de um dsRNA parcialmente de fosforotioato em tecido hepático pode ser reduzida quando é coadministrado com ácido polinosínico, sulfato de dextrana, ácido policitídico ou ácido 4-acetamido-4'-isotiociano-estilbeno-2,2'-dissulfônico (Miyao et al., DsRNA Res. Dev., 1995, 5, 115-121; Takakura et al., DsRNA & Nucl. Acid Drug Dev., 1996, 6, 177-183).

vi. Excipientes

[00563] Em contraste com um composto transportador, um "transportador farmacêutico" ou "excipiente" é um solvente, agente de suspensão farmacêuticamente aceitável ou qualquer outro veículo farmacologicamente inerte para administração de um ou mais ácidos nucleicos a um animal. O excipiente pode ser líquido ou sólido e é selecionado, com o modo de administração planejado em mente, de modo a proporcionar a voluminosidade, consistência, etc., desejadas quando combinado com um ácido nucleico e os outros componentes de uma dada composição farmacêutica. Transportadores farmacêuticos típicos incluem, mas não estão limitados a, agentes de ligação (por exemplo, amido de milho pré-gelatinizado, polivinilpirrolidona ou metilcelulose de hidroxipropila, etc.); enchimentos (por exemplo, lactose e outros açúcares, celulose microcristalina, pectina, gelatina, sulfato de cálcio, celulose de etila, poliacrilatos ou hidrogenofosfato de cálcio, 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 molhantes (por exemplo, lauril sulfato de sódio, etc.).

[00564] Excipientes orgânicos ou inorgânicos farmacêuticamente aceitáveis adequados para administração não parenteral que não

reagem prejudicialmente com ácidos nucleicos podem ser também usados para formular as composições da presente invenção. Transportadores farmacologicamente aceitáveis adequados incluem, mas não estão limitados a, água, soluções salinas, álcoois, polietileno glicóis, gelatina, lactose, amilose, estearato de magnésio, talco, ácido silícico, parafina viscosa, hidroximetilcelulose, polivinilpirrolidona e similares.

[00565] As formulações para administração tópica de ácidos nucleicos podem incluir soluções aquosas estéreis e não estéreis, soluções não aquosas em solventes comuns tais como álcoois, ou soluções dos ácidos nucleicos em bases de óleo líquidas ou sólidas. As soluções podem também conter tampões, diluentes e outros aditivos adequados. Podem ser usados excipientes orgânicos ou inorgânicos farmacologicamente aceitáveis adequados para administração não parenteral que não reajam prejudicialmente com ácidos nucleicos.

[00566] Excipientes farmacologicamente aceitáveis adequados incluem mas, não estão limitados a, água, soluções de sal, álcool, polietileno glicóis, gelatina, lactose, amilose, estearato de magnésio, talco, ácido silícico, parafina viscosa, hidroximetilcelulose, polivinilpirrolidona e similares.

vii. Outros Componentes

[00567] As composições da presente invenção podem adicionalmente conter outros componentes adjuntos convencionalmente encontrados em composições farmacêuticas, a seus níveis de uso estabelecidos na técnica. Assim, por exemplo, as composições podem conter materiais adicionais, compatíveis e farmacologicamente ativos tais como, por exemplo, antiprurícticos, adstringentes, 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, tais como

corantes, agentes aromatizantes, conservantes, antioxidantes, opacificantes, agentes espessantes e estabilizantes. No entanto, tais materiais, quando adicionados, não devem interferir indevidamente com as atividades biológicas dos componentes das composições da presente invenção. As formulações podem ser esterilizadas e, se desejado, misturadas com agentes auxiliares, por exemplo, lubrificantes, conservantes, estabilizantes, agentes molhantes, emulsificantes, sais para influência da pressão osmótica, tampões, substâncias corantes, aromatizantes e/ou aromáticas e similares que não interajam prejudicialmente com o(s) ácido(s) nucleico(s) da formulação.

[00568] Suspensões aquosas podem conter substâncias que aumentam a viscosidade da suspensão, incluindo, por exemplo, carboximetilcelulose sódica, sorbitol e/ou dextrana. A suspensão pode também conter estabilizantes.

[00569] Em algumas modalidades, as composições farmacêuticas apresentadas na invenção incluem (a) um ou mais compostos de RNAi e (b) um ou mais agentes que funcionam por um mecanismo não RNAi e que são úteis no tratamento de uma infecção pelo HBV. Exemplos de tais agentes incluem, mas não se limitam a, agentes antivirais que visam suprimir ou destruir HBV ao interferir com a replicação viral; e imunomoduladores que visam ajudar o sistema imune humano a montar uma defesa contra o vírus. Em contraste, imunomoduladores, tais como corticosteroides, que induzem uma expressão reforçada de vírus e de antígenos virais e uma supressão da função dos linfócitos T, ou adenina arabinosídeo, aciclovir ou didesóxiinosina, não são benéficos para o tratamento da hepatite B crônica. Agentes adequados são discutidos em maior detalhe em baixo.

[00570] A toxicidade e eficácia terapêutica de tais compostos podem ser determinadas por procedimentos farmacêuticos padrão em culturas

de células ou animais experimentais, por exemplo, para determinação da LD₅₀ (a dose letal para 50% da população) e da ED₅₀ (a dose terapeuticamente eficaz em 50% da população). A razão de doses entre efeitos tóxicos e terapêuticos é o índice terapêutico e pode ser expressa como a razão LD₅₀/ED₅₀. São preferenciais compostos que exibem elevados índices terapêuticos.

[00571] Os dados obtidos de ensaios de cultura celular e estudos animais podem ser usados na formulação de uma gama de dosagens para uso em seres humanos. A dosagem de composições apresentadas aqui na invenção está geralmente dentro de uma gama de concentrações em circulação que incluem a ED₅₀ com pouca ou nenhuma toxicidade. A dosagem pode variar dentro desta gama dependendo da forma de dosagem empregue e da rota de administração utilizada. Para qualquer composto usado nos métodos apresentados na invenção, a dose terapeuticamente eficaz pode ser inicialmente estimada a partir de ensaios de cultura de células. Uma dose pode ser formulada em modelos animais para alcançar uma gama de concentrações no plasma em circulação do composto ou, quando apropriado, do produto de polipeptídeo de uma sequência alvo (por exemplo, alcance de uma concentração diminuída do polipeptídeo) que inclui a IC₅₀ (ou seja, a concentração do composto de teste que alcança uma inibição semimáxima de sintomas) como determinado em cultura de células. Tal informação pode ser usada para determinar mais precisamente doses úteis em seres humanos. Os níveis no plasma podem ser medidos, por exemplo, por cromatografia líquida de elevado desempenho.

[00572] Adicionalmente à sua administração, como discutido acima, os RNAs apresentados na invenção podem ser administrados em combinação com outros agentes conhecidos eficazes no tratamento de processos patológicos mediados por expressão de HBV. Em qualquer

caso, o médico administrador pode ajustar a quantidade e calendarização da administração de RNAi com base em resultados observados usando medições de eficácia padrão conhecidas na técnica ou descritas aqui.

VII. Métodos da Invenção

[00573] A presente invenção fornece métodos terapêuticos e profiláticos que incluem a administração a um indivíduo com uma infecção pelo HBV e/ou doença, distúrbio ou condição associados a HBV, ou propenso a desenvolver uma doença, distúrbio ou condição associados a HBV (por exemplo, CHB), composições compreendendo um agente de RNAi, ou composições farmacêuticas compreendendo um agente de RNAi, ou vetores compreendendo um RNAi da invenção.

[00574] Os métodos da invenção são úteis no tratamento de um indivíduo com uma infecção pelo HBV, por exemplo, um indivíduo que beneficiaria da redução da expressão do gene HBV e/ou replicação do HBV. Em um aspecto, a presente invenção proporciona métodos de reduzir o nível de ccc DNA do vírus da hepatite B em um indivíduo infectado com HBV. Em outro aspecto, a presente invenção proporciona métodos de reduzir o nível de antígeno de HBV, por exemplo HBsAg e/ou HBeAg, em um indivíduo infectado com HBV. Em outro aspecto, a presente invenção proporciona métodos de reduzir a carga viral de HBV em um indivíduo infectado com HBV. A presente invenção também fornece métodos para reduzir os níveis de alanina aminotransferase (ALT) e/ou aspartato aminotransferase (AST) em um indivíduo infectado com HBV. Em um aspecto, a presente invenção proporciona métodos de aumentar o nível de anticorpos anti-HBV em um indivíduo infectado com HBV. Em outro aspecto, a presente invenção proporciona métodos de tratamento de um indivíduo tendo uma infecção por HBV. Em um aspecto, a presente invenção providencia métodos de tratar um indivíduo com doença associada a HBV, por exemplo infecção pelo

vírus da hepatite D, delta hepatite, hepatite B aguda; hepatite B aguda fulminante; hepatite B crônica; fibrose hepática; doença hepática de estágio final; carcinoma hepatocelular. Além disso, como a infecção pelo HDV depende de funções auxiliares obrigatórias fornecidas pelo HBV para transmissão, e indivíduos com infecção pelo HBV também podem ter uma infecção pelo HDV, os métodos de tratamento descritos neste documento também são úteis para tratar um indivíduo com uma infecção pelo HDV e/ou um distúrbio associado a HDV, tal como infecção pelo vírus da hepatite B, infecção por hepatite B crônica (CHB), infecção por hepatite B (CHB) crônica, cirrose, insuficiência hepática e carcinoma hepatocelular (HCC). Os métodos de tratamento (e usos) da invenção incluem administração ao indivíduo, por exemplo, um ser humano, de uma quantidade terapeuticamente eficaz de um agente de RNAi da invenção se dirigindo a um gene HBV ou uma composição farmacêutica compreendendo um agente de RNAi da invenção se dirigindo a um gene HBV ou um vetor da invenção compreendendo um agente de RNAi se dirigindo a um gene HBV.

[00575] Em um aspecto, a invenção providencia métodos de prevenir pelo menos um sintoma em um indivíduo com uma infecção pelo HBV, por exemplo, a presença de ccc DNA de HBV sérico e/ou hepático, a presença de DNA de HBV sérico, a presença de antígeno de HBV sérico e/ou hepático, por exemplo, HBsAg e/ou HBeAg, ALT elevado, AST elevado, a ausência ou o baixo nível de anticorpos anti-HBV, lesão hepática; cirrose; infecção pelo vírus da hepatite D, delta hepatite, hepatite B aguda; hepatite B fulminante; hepatite B crônica; fibrose hepática; doença hepática de estágio final; carcinoma hepatocelular; síndrome tipo doença do soro; anorexia; náusea; vômito, febre baixa; mialgia; cansaço; distúrbios da acuidade gustativa e das sensações olfativas (aversão a comida e cigarros); e/ou no quadrante superior direito e dor epigástrica (intermitente, leve a moderada); encefalopatia

hepática; sonolência; distúrbios no padrão de sono; confusão mental; coma; ascite; hemorragia gastrointestinal; coagulopatia; icterícia; hepatomegalia (ligeiramente ampliado, fígado macio); esplenomegalia; eritema palmar; nevos arâneos; atrofia muscular; aranhas vasculares; vasculite; hemorragia varicosa; edema periférico; ginecomastia; atrofia testicular; veias colaterais abdominais (cabeça de medusa); altos níveis de alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST), dentro de um intervalo de 1000 - 2000 UI/mL, embora valores 100 vezes acima do limite superior do normal (ULN) possam ser também identificados; níveis de ALT mais elevados do que níveis de AST; níveis elevados de gama-glutamila transpeptidase (GGT) e fosfatase alcalina (ALP) (por exemplo, não mais do que 3 vezes o ULN); níveis de albumina ligeiramente baixos; níveis de ferro sérico elevados; leucopenia (ou seja, granulocitopenia); linfocitose; taxa de sedimentação de eritrócitos aumentada (ESR); sobrevivência de glóbulos vermelhos reduzida; hemólise; trombocitopenia; um prolongamento da relação normalizada internacional (INR); a presença de imunoglobulina M (IgM) de anticorpos nucleares de hepatite B (anti-HBc), HBsAg, HBeAg sérico e/ou hepático; anticorpo de superfície da hepatite B (anti-HBs), anticorpo e de hepatite B (anti-HBe), e/ou DNA de HBV; elevação das aminotransferases (≤ 5 vezes o ULN); níveis de ALT mais elevados do que os níveis de AST; níveis de bilirrubina aumentados, tempo de protrombina (PT) prolongado; hiperglobulinemia; a presença de anticorpos não específicos de tecido, tais como anticorpos anti-músculo liso (ASMAs) ou anticorpos antinucleares (ANAs) (10-20%); a presença de anticorpos específicos do tecido, tais como anticorpos contra a glândula tireoide (10-20%); níveis elevados de fator reumatoide (RF); hiperbilirrubinemia, PT prolongado, baixa contagem de plaquetas e glóbulos brancos, níveis de AST mais elevados do que os níveis de ALT; níveis elevados de fosfatase alcalina

(ALP) e GGT; lobular, com alterações hepatocelulares degenerativas e regenerativas e inflamação acompanhante; predominantemente necrose centrolobular. Os métodos incluem administração ao indivíduo de uma quantidade terapeuticamente eficaz do agente de RNAi, por exemplo, dsRNA, composições farmacêuticas ou vetores da invenção, prevenindo deste modo pelo menos um sintoma no indivíduo tendo um distúrbio que beneficiaria da redução na expressão do gene HBV, tal como um indivíduo com uma infecção pelo HBV ou um indivíduo com uma infecção pelo HBV e HDV.

[00576] Em um outro aspecto, a presente invenção fornece usos de uma quantidade terapeuticamente eficaz de um agente de RNAi da invenção para tratamento de um indivíduo, por exemplo, um indivíduo que beneficiaria de uma redução e/ou inibição da expressão do gene HBV, tal como um indivíduo com uma infecção pelo HBV ou um indivíduo com uma infecção pelo HBV e HDV.

[00577] Em um outro aspecto, a presente invenção providencia usos de um agente de RNAi, por exemplo, um dsRNA, da invenção visando um gene HBV ou composição farmacêutica compreendendo um agente de RNAi visando um gene HBV no fabrico de um medicamento para o tratamento de um indivíduo, por exemplo, um indivíduo que beneficiaria de uma redução e/ou inibição da expressão do gene HBV e/ou replicação de HBV, tal como um indivíduo com uma infecção pelo HBV ou um indivíduo com uma infecção pelo HBV e HDV e um indivíduo com um distúrbio que beneficiaria da redução da expressão do gene HBV, por exemplo, uma doença associada a HBV.

[00578] Em um outro aspecto, a invenção fornece usos de um RNAi, por exemplo, um dsRNA, da invenção para prevenção de pelo menos um sintoma em um indivíduo sofrendo de um distúrbio que beneficiaria de uma redução e/ou inibição da expressão do gene HBV e/ou replicação de HBV.

[00579] Em um aspecto adicional, a presente invenção fornece usos de um agente de RNAi da invenção na fabricação de um medicamento para prevenção de pelo menos um sintoma em um indivíduo sofrendo de um distúrbio que beneficiaria de uma redução e/ou inibição da expressão do gene HBV e/ou replicação de HBV, tal como uma doença associada a HBV.

[00580] Em uma modalidade, um agente de RNAi visando HBV é administrado a um indivíduo com uma infecção pelo HBV ou com uma infecção pelo HBV e pelo HDV, e/ou uma doença associada a HBV, de forma que a expressão de um ou mais genes HBV, níveis de ccc DNA de HBV, níveis de antígeno de HBV, níveis de carga viral de HBV, ALT e/ou AST, por exemplo, em uma célula, tecido, sangue ou outro tecido ou fluido do indivíduo sejam reduzidos em, pelo menos cerca 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%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 62%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, ou pelo menos cerca de 99% ou mais quando o agente dsRNA é administrado ao indivíduo.

[00581] Em uma modalidade, um agente de RNAi visando HBV é administrado a um indivíduo com uma infecção pelo HBV ou com uma infecção pelo HBV e pelo HDV, e/ou uma doença associada a HBV, de forma que o nível de anticorpos anti-HBV, por exemplo, em uma célula, tecido, sangue ou outro tecido ou fluido do indivíduo sejam aumentados em, pelo menos cerca 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%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%,

42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 62%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, ou pelo menos cerca de 99% ou mais quando o agente dsRNA é administrado ao indivíduo.

[00582] Os métodos e usos da invenção incluem administração de uma composição descrita aqui tal que a expressão do gene HBV alvo seja diminuída, tal como durante cerca de 1, 2, 3, 4 5, 6, 7, 8, 12, 16, 18, 24, 28, 32, 36, 40, 44, 48, 52, 56, 60, 64, 68, 72, 76 ou cerca de 80 horas. Em uma modalidade, a expressão do gene HBV alvo é diminuída durante um período prolongado, por exemplo, pelo menos cerca de dois, três, quatro, cinco, seis, sete dias ou mais, por exemplo, cerca de uma semana, duas semanas, três semanas, ou cerca de quatro semanas ou mais.

[00583] A administração do dsRNA de acordo com os métodos e usos da invenção pode resultar em uma redução da gravidade, sinais, sintomas, e/ou marcadores de tais doenças ou distúrbios em um paciente com uma infecção pelo HBV ou uma infecção pelo HBV e HDV, e/ou uma doença associada a HBV. Por "redução" neste contexto se significa uma diminuição estatisticamente significativa em tal nível. A redução pode ser, por exemplo, pelo menos cerca de 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, ou cerca de 100%.

[00584] A eficácia do tratamento ou prevenção de doença pode ser avaliada, por exemplo, mensurando a progressão da doença, remissão da doença, gravidade de sintomas, redução de dor, qualidade de vida, dose de uma medicação requerida para manter um efeito do tratamento, nível de um marcador de doença ou qualquer outro parâmetro mensurável apropriado para uma doença determinada sendo tratada ou

sendo o alvo de prevenção. Está bem dentro da capacidade de um perito na técnica monitorizar a eficácia do tratamento ou prevenção por medição de qualquer um de tais parâmetros, ou qualquer combinação de parâmetros. Por exemplo, a eficácia do tratamento de CHB pode ser avaliada, por exemplo, por monitorização periódica da carga viral e dos níveis de transaminase. A comparação das últimas leituras com as leituras iniciais dão a um médico uma indicação da eficácia do tratamento. Está bem dentro da capacidade de um perito na técnica monitorizar a eficácia do tratamento ou prevenção por medição de qualquer um de tais parâmetros, ou qualquer combinação de parâmetros. Em conexão com a administração de um RNAi se dirigindo a HBV ou sua composição farmacêutica, "eficaz contra" uma doença associada a HBV indica que a administração de um modo clinicamente apropriado resulta em um efeito benéfico para pelo menos uma fração estatisticamente significativa de pacientes, tal como melhoria de sintomas, uma cura, uma redução na doença, extensão da vida, melhoria na qualidade de vida, ou outro efeito geralmente reconhecido como positivo por médicos familiarizados com o tratamento de uma infecção pelo HBV e/ou uma doença associada a HBV e das causas relacionadas.

[00585] Um efeito de tratamento ou preventivo é evidente quando existe uma melhoria estatisticamente significativa em um ou mais parâmetros do estado de doença, ou por uma ausência do agravamento ou do desenvolvimento de sintomas onde seriam de outro modo antecipados. Como um exemplo, uma alteração favorável de pelo menos 10% em um parâmetro mensurável de doença, e preferencialmente pelo menos 20%, 30%, 40%, 50% ou mais, pode ser indicativa de tratamento eficaz. A eficácia de um dado fármaco de RNAi ou formulação desse fármaco pode ser também avaliada usando um modelo animal experimental para a dada doença como conhecido na

técnica. Quando se usa um modelo animal experimental, a eficácia do tratamento é evidenciada quando é observada uma redução estatisticamente significativa em um marcador ou sintoma.

[00586] Pode ser administrada ao indivíduo uma quantidade terapêutica de RNAi, tal como cerca de 0,01 mg/kg, 0,02 mg/kg, 0,03 mg/kg, 0,04 mg/kg, 0,05 mg/kg, 0,1 mg/kg, 0,15 mg/kg, 0,2 mg/kg, 0,25 mg/kg, 0,3 mg/kg, 0,35 mg/kg, 0,4 mg/kg, 0,45 mg/kg, 0,5 mg/kg, 0,55 mg/kg, 0,6 mg/kg, 0,65 mg/kg, 0,7 mg/kg, 0,75 mg/kg, 0,8 mg/kg, 0,85 mg/kg, 0,9 mg/kg, 0,95 mg/kg, 1,0 mg/kg, 1,1 mg/kg, 1,2 mg/kg, 1,3 mg/kg, 1,4 mg/kg, 1,5 mg/kg, 1,6 mg/kg, 1,7 mg/kg, 1,8 mg/kg, 1,9 mg/kg, 2,0 mg/kg, 2,1 mg/kg, 2,2 mg/kg, 2,3 mg/kg, 2,4 mg/kg, 2,5 mg/kg de dsRNA, 2,6 mg/kg de dsRNA, 2,7 mg/kg de dsRNA, 2,8 mg/kg de dsRNA, 2,9 mg/kg de dsRNA, 3,0 mg/kg de dsRNA, 3,1 mg/kg de dsRNA, 3,2 mg/kg de dsRNA, 3,3 mg/kg de dsRNA, 3,4 mg/kg de dsRNA, 3,5 mg/kg de dsRNA, 3,6 mg/kg de dsRNA, 3,7 mg/kg de dsRNA, 3,8 mg/kg de dsRNA, 3,9 mg/kg de dsRNA, 4,0 mg/kg de dsRNA, 4,1 mg/kg de dsRNA, 4,2 mg/kg de dsRNA, 4,3 mg/kg de dsRNA, 4,4 mg/kg de dsRNA, 4,5 mg/kg de dsRNA, 4,6 mg/kg de dsRNA, 4,7 mg/kg de dsRNA, 4,8 mg/kg de dsRNA, 4,9 mg/kg de dsRNA, 5,0 mg/kg de dsRNA, 5,1 mg/kg de dsRNA, 5,2 mg/kg de dsRNA, 5,3 mg/kg de dsRNA, 5,4 mg/kg de dsRNA, 5,5 mg/kg de dsRNA, 5,6 mg/kg de dsRNA, 5,7 mg/kg de dsRNA, 5,8 mg/kg de dsRNA, 5,9 mg/kg de dsRNA, 6,0 mg/kg de dsRNA, 6,1 mg/kg de dsRNA, 6,2 mg/kg de dsRNA, 6,3 mg/kg de dsRNA, 6,4 mg/kg de dsRNA, 6,5 mg/kg de dsRNA, 6,6 mg/kg de dsRNA, 6,7 mg/kg de dsRNA, 6,8 mg/kg de dsRNA, 6,9 mg/kg de dsRNA, 7,0 mg/kg de dsRNA, 7,1 mg/kg de dsRNA, 7,2 mg/kg de dsRNA, 7,3 mg/kg de dsRNA, 7,4 mg/kg de dsRNA, 7,5 mg/kg de dsRNA, 7,6 mg/kg de dsRNA, 7,7 mg/kg de dsRNA, 7,8 mg/kg de dsRNA, 7,9 mg/kg de dsRNA, 8,0 mg/kg de dsRNA, 8,1 mg/kg de dsRNA, 8,2 mg/kg de

dsRNA, 8,3 mg/kg de dsRNA, 8,4 mg/kg de dsRNA, 8,5 mg/kg de dsRNA, 8,6 mg/kg de dsRNA, 8,7 mg/kg de dsRNA, 8,8 mg/kg de dsRNA, 8,9 mg/kg de dsRNA, 9,0 mg/kg de dsRNA, 9,1 mg/kg de dsRNA, 9,2 mg/kg de dsRNA, 9,3 mg/kg de dsRNA, 9,4 mg/kg de dsRNA, 9,5 mg/kg de dsRNA, 9,6 mg/kg de dsRNA, 9,7 mg/kg de dsRNA, 9,8 mg/kg de dsRNA, 9,9 mg/kg de dsRNA, 9,0 mg/kg de dsRNA, 10 mg/kg de dsRNA, 15 mg/kg de dsRNA, 20 mg/kg de dsRNA, 25 mg/kg de dsRNA, 30 mg/kg de dsRNA, 35 mg/kg de dsRNA, 40 mg/kg de dsRNA, 45 mg/kg de dsRNA, ou cerca de 50 mg/kg de dsRNA. É também pretendido que valores e gamas intermédios dos valores recitados sejam parte desta invenção.

[00587] Em certas modalidades, por exemplo, quando uma composição da invenção compreende um dsRNA como descrito aqui e um lipídeo, pode ser administrada aos indivíduos uma quantidade terapêutica de RNAi, tal como cerca de 0,01 mg/kg a cerca de 5 mg/kg, cerca de 0,01 mg/kg a cerca de 10 mg/kg, cerca de 0,05 mg/kg a cerca de 5 mg/kg, cerca de 0,05 mg/kg a cerca de 10 mg/kg, cerca de 0,1 mg/kg a cerca de 5 mg/kg, cerca de 0,1 mg/kg a cerca de 10 mg/kg, cerca de 0,2 mg/kg a cerca de 5 mg/kg, cerca de 0,2 mg/kg a cerca de 10 mg/kg, cerca de 0,3 mg/kg a cerca de 5 mg/kg, cerca de 0,3 mg/kg a cerca de 10 mg/kg, cerca de 0,4 mg/kg a cerca de 5 mg/kg, cerca de 0,4 mg/kg a cerca de 10 mg/kg, cerca de 0,5 mg/kg a cerca de 5 mg/kg, cerca de 0,5 mg/kg a cerca de 10 mg/kg, cerca de 1 mg/kg a cerca de 5 mg/kg, cerca de 1 mg/kg a cerca de 10 mg/kg, cerca de 1,5 mg/kg a cerca de 5 mg/kg, cerca de 1,5 mg/kg a cerca de 10 mg/kg, cerca de 2 mg/kg a cerca de 2,5 mg/kg, cerca de 2 mg/kg a cerca de 10 mg/kg, cerca de 3 mg/kg a cerca de 5 mg/kg, cerca de 3 mg/kg a cerca de 10 mg/kg, cerca de 3,5 mg/kg a cerca de 5 mg/kg, cerca de 4 mg/kg a cerca de 5 mg/kg, cerca de 4,5 mg/kg a cerca de 5 mg/kg, cerca de 4 mg/kg a cerca de 10 mg/kg, cerca de 4,5 mg/kg a cerca de 10 mg/kg, cerca de 5

mg/kg a cerca de 10 mg/kg, cerca de 5,5 mg/kg a cerca de 10 mg/kg, cerca de 6 mg/kg a cerca de 10 mg/kg, cerca de 6,5 mg/kg a cerca de 10 mg/kg, cerca de 7 mg/kg a cerca de 10 mg/kg, cerca de 7,5 mg/kg a cerca de 10 mg/kg, cerca de 8 mg/kg a cerca de 10 mg/kg, cerca de 8,5 mg/kg a cerca de 10 mg/kg, cerca de 9 mg/kg a cerca de 10 mg/kg, ou cerca de 9,5 mg/kg a cerca de 10 mg/kg. É também pretendido que valores e gamas intermédios dos valores recitados sejam parte desta invenção.

[00588] Por exemplo, o dsRNA pode ser administrado em uma dose de cerca de 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9, ou de cerca de 10 mg/kg. É também pretendido que valores e gamas intermédios dos valores recitados sejam parte desta invenção.

[00589] Em outras modalidades, por exemplo, quando uma composição da invenção compreende um dsRNA como descrito aqui e uma N-acetilgalactosamina, pode ser administrada aos indivíduos uma quantidade terapêutica de RNAi, tal como uma dose de cerca de 0,1 a cerca de 50 mg/kg, cerca de 0,25 a cerca de 50 mg/kg, cerca de 0,5 a cerca de 50 mg/kg, cerca de 0,75 a cerca de 50 mg/kg, cerca de 1 a cerca de 50 mg/kg, cerca de 1,5 a cerca de 50 mg/kg, cerca de 2 a cerca de 50 mg/kg, cerca de 2,5 a cerca de 50 mg/kg, cerca de 3 a cerca de 50 mg/kg, cerca de 3,5 a cerca de 50 mg/kg, cerca de 4 a cerca de 50 mg/kg, cerca de 4,5 a cerca de 50 mg/kg, cerca de 5 a cerca de 50 mg/kg, cerca de 7,5 a cerca de 50 mg/kg, cerca de 10 a cerca de 50 mg/kg, cerca de 15 a cerca de 50 mg/kg, cerca de 20 a cerca de 50 mg/kg, cerca de 20 a cerca de 50 mg/kg, cerca de 25 a cerca de 50

mg/kg, cerca de 25 a cerca de 50 mg/kg, cerca de 30 a cerca de 50 mg/kg, cerca de 35 a cerca de 50 mg/kg, cerca de 40 a cerca de 50 mg/kg, cerca de 45 a cerca de 50 mg/kg, cerca de 0,1 a cerca de 45 mg/kg, cerca de 0,25 a cerca de 45 mg/kg, cerca de 0,5 a cerca de 45 mg/kg, cerca de 0,75 a cerca de 45 mg/kg, cerca de 1 a cerca de 45 mg/kg, cerca de 1,5 a cerca de 45 mg/kg, cerca de 2 a cerca de 45 mg/kg, cerca de 2,5 a cerca de 45 mg/kg, cerca de 3 a cerca de 45 mg/kg, cerca de 3,5 a cerca de 45 mg/kg, cerca de 4 a cerca de 45 mg/kg, cerca de 4,5 a cerca de 45 mg/kg, cerca de 5 a cerca de 45 mg/kg, cerca de 7,5 a cerca de 45 mg/kg, cerca de 10 a cerca de 45 mg/kg, cerca de 15 a cerca de 45 mg/kg, cerca de 20 a cerca de 45 mg/kg, cerca de 20 a cerca de 45 mg/kg, cerca de 25 a cerca de 45 mg/kg, cerca de 25 a cerca de 45 mg/kg, cerca de 30 a cerca de 45 mg/kg, cerca de 30 a cerca de 45 mg/kg, cerca de 35 a cerca de 45 mg/kg, cerca de 40 a cerca de 45 mg/kg, cerca de 0,1 a cerca de 40 mg/kg, cerca de 0,25 a cerca de 40 mg/kg, cerca de 0,5 a cerca de 40 mg/kg, cerca de 0,75 a cerca de 40 mg/kg, cerca de 1 a cerca de 40 mg/kg, cerca de 1,5 a cerca de 40 mg/kg, cerca de 2 a cerca de 40 mg/kg, cerca de 2,5 a cerca de 40 mg/kg, cerca de 3 a cerca de 40 mg/kg, cerca de 3,5 a cerca de 40 mg/kg, cerca de 4 a cerca de 40 mg/kg, cerca de 4,5 a cerca de 40 mg/kg, cerca de 5 a cerca de 40 mg/kg, cerca de 7,5 a cerca de 40 mg/kg, cerca de 10 a cerca de 40 mg/kg, cerca de 15 a cerca de 40 mg/kg, cerca de 20 a cerca de 40 mg/kg, cerca de 20 a cerca de 40 mg/kg, cerca de 25 a cerca de 40 mg/kg, cerca de 25 a cerca de 40 mg/kg, cerca de 30 a cerca de 40 mg/kg, cerca de 35 a cerca de 40 mg/kg, cerca de 0,1 a cerca de 30 mg/kg, cerca de 0,25 a cerca de 30 mg/kg, cerca de 0,5 a cerca de 30 mg/kg, cerca de 0,75 a cerca de 30 mg/kg, cerca de 1 a cerca de 30 mg/kg, cerca de 1,5 a cerca de 30 mg/kg, cerca de 2 a cerca de 30 mg/kg, cerca de 2,5 a cerca de 30 mg/kg, cerca de 3 a cerca de 30 mg/kg, cerca de 3,5 a cerca de 30

mg/kg, cerca de 4 a cerca de 30 mg/kg, cerca de 4,5 a cerca de 30 mg/kg, cerca de 5 a cerca de 30 mg/kg, cerca de 7,5 a cerca de 30 mg/kg, cerca de 10 a cerca de 30 mg/kg, cerca de 15 a cerca de 30 mg/kg, cerca de 20 a cerca de 30 mg/kg, cerca de 20 a cerca de 30 mg/kg, cerca de 25 a cerca de 30 mg/kg, cerca de 0,1 a cerca de 20 mg/kg, cerca de 0,25 a cerca de 20 mg/kg, cerca de 0,5 a cerca de 20 mg/kg, cerca de 0,75 a cerca de 20 mg/kg, cerca de 1 a cerca de 20 mg/kg, cerca de 1,5 a cerca de 20 mg/kg, cerca de 2 a cerca de 20 mg/kg, cerca de 2,5 a cerca de 20 mg/kg, cerca de 3 a cerca de 20 mg/kg, cerca de 3,5 a cerca de 20 mg/kg, cerca de 4 a cerca de 20 mg/kg, cerca de 4,5 a cerca de 20 mg/kg, cerca de 5 a cerca de 20 mg/kg, cerca de 7,5 a cerca de 20 mg/kg, cerca de 10 a cerca de 20 mg/kg, ou cerca de 15 a cerca de 20 mg/kg. Em uma modalidade, quando uma composição da invenção compreende um dsRNA como descrito aqui e uma N-acetilgalactosamina, pode ser administrada aos indivíduos uma quantidade terapêutica de cerca de 10 a cerca de 30 mg/kg de dsRNA. É também pretendido que valores e gamas intermédios dos valores recitados sejam parte desta invenção.

[00590] Por exemplo, pode ser administrada aos indivíduos em uma quantidade terapêutica de RNAi, tal como cerca de 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9, 10, 10,5, 11, 11,5, 12, 12,5, 13, 13,5, 14, 14,5, 15, 15,5, 16, 16,5, 17, 17,5, 18, 18,5, 19, 19,5, 20, 20,5, 21, 21,5, 22, 22,5, 23, 23,5, 24, 24,5, 25, 25,5, 26, 26,5, 27, 27,5, 28, 28,5, 29, 29,5, 30, 31, 32, 33, 34, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, ou cerca de 50 mg/kg. É também pretendido que

valores e gamas intermédios dos valores recitados sejam parte desta invenção.

[00591] Em certas modalidades da invenção, por exemplo, quando um agente de RNAi de fita dupla inclui uma modificação (por exemplo, um ou mais motivos de três modificações idênticas em três nucleotídeos consecutivos), incluindo um tal motivo no ou perto do local de clivagem do agente, seis ligações fosforotioato, e um ligante, tal agente é administrado em uma dose ao redor de 0,01 a cerca de 0,5 mg/kg, cerca de 0,01 a cerca de 0,4 mg/kg, cerca de 0,01 a cerca de 0,3 mg/kg, cerca de 0,01 a cerca de 0,2 mg/kg, cerca de 0,01 a cerca de 0,1 mg/kg, cerca de 0,01 mg/kg a cerca de 0,09 mg/kg, cerca de 0,01 mg/kg a cerca de 0,08 mg/kg, cerca de 0,01 mg/kg a cerca de 0,07 mg/kg, sobre 0,01 mg/kg a cerca de 0,06 mg/kg, cerca de 0,01 mg/kg a cerca de 0,05 mg/kg, cerca de 0,02 a cerca de 0,5 mg/kg, cerca de 0,02 a cerca de 0,4 mg/kg, cerca de 0,02 a cerca de 0,3 mg/kg, cerca de 0,02 a cerca de 0,2 mg/kg, cerca de 0,02 a cerca de 0,1 mg/kg, cerca de 0,02 mg/kg a cerca de 0,09 mg/kg, cerca de 0,02 mg/kg a cerca de 0,08 mg/kg, cerca de 0,02 mg/kg a cerca de 0,07 mg/kg, cerca de 0,02 mg/kg a cerca de 0,06 mg/kg, cerca de 0,02 mg/kg a cerca de 0,05 mg/kg, cerca de 0,03 a cerca de 0,5 mg/kg, cerca de 0,03 a cerca de 0,4 mg/kg, cerca de 0,03 a cerca de 0,3 mg/kg, cerca de 0,03 a cerca de 0,2 mg/kg, cerca de 0,03 a cerca de 0,1 mg/kg, cerca de 0,03 mg/kg a cerca de 0,09 mg/kg, cerca de 0,03 mg/kg a cerca de 0,08 mg/kg, cerca de 0,03 mg/kg a cerca de 0,07 mg/kg, cerca de 0,03 mg/kg a cerca de 0,06 mg/kg, cerca de 0,03 mg/kg a cerca de 0,05 mg/kg, cerca de 0,04 a cerca de 0,5 mg/kg, cerca de 0,04 a cerca de 0,4 mg/kg, cerca de 0,04 a cerca de 0,3 mg/kg, cerca de 0,04 a cerca de 0,2 mg/kg, cerca de 0,04 a cerca de 0,1 mg/kg, cerca de 0,04 mg/kg a cerca de 0,09 mg/kg, cerca de 0,04 mg/kg a cerca de 0,08 mg/kg, cerca de 0,04 mg/kg a cerca de 0,07 mg/kg, cerca de 0,04 mg/kg a cerca de 0,06 mg/kg, cerca de 0,05 a cerca de 0,5 mg/kg, cerca

de 0,05 a cerca de 0,4 mg/kg, cerca de 0,05 a cerca de 0,3 mg/kg, cerca de 0,05 a cerca de 0,2 mg/kg, cerca de 0,05 a cerca de 0,1 mg/kg, cerca de 0,05 mg/kg a cerca de 0,09 mg/kg, cerca de 0,05 mg/kg a cerca de 0,08 mg/kg, ou cerca de 0,05 mg/kg a cerca de 0,07 mg/kg. É também pretendido que valores e gamas intermédios dos valores recitados anteriores sejam parte desta invenção, por exemplo, o agente de RNAi pode ser administrado ao indivíduo em uma dose ao redor de 0,015 mg/kg a cerca de 0,45 mg/kg.

[00592] Por exemplo, o agente de RNAi, por exemplo o agente de RNAi em uma composição farmacêutica pode ser administrado em uma dose ao redor de 0,01 mg/kg, 0,0125 mg/kg, 0,015 mg/kg, 0,0175 mg/kg, 0,02 mg/kg, 0,0225 mg/kg, 0,025 mg/kg, 0,0275 mg/kg, 0,03 mg/kg, 0,0325 mg/kg, 0,035 mg/kg, 0,0375 mg/kg, 0,04 mg/kg, 0,0425 mg/kg, 0,045 mg/kg, 0,0475 mg/kg, 0,05 mg/kg, 0,0525 mg/kg, 0,055 mg/kg, 0,0575 mg/kg, 0,06 mg/kg, 0,0625 mg/kg, 0,065 mg/kg, 0,0675 mg/kg, 0,07 mg/kg, 0,0725 mg/kg, 0,075 mg/kg, 0,0775 mg/kg, 0,08 mg/kg, 0,0825 mg/kg, 0,085 mg/kg, 0,0875 mg/kg, 0,09 mg/kg, 0,0925 mg/kg, 0,095 mg/kg, 0,0975 mg/kg, 0,1 mg/kg, 0,125 mg/kg, 0,15 mg/kg, 0,175 mg/kg, 0,2 mg/kg, 0,225 mg/kg, 0,25 mg/kg, 0,275 mg/kg, 0,3 mg/kg, 0,325 mg/kg, 0,35 mg/kg, 0,375 mg/kg, 0,4 mg/kg, 0,425 mg/kg, 0,45 mg/kg, 0,475 mg/kg, ou cerca de 0,5 mg/kg. É também pretendido que valores intermédios dos valores recitados anteriores sejam parte desta invenção

[00593] Em algumas modalidades, o agente de RNAi é administrado como uma dose fixa de entre 100 mg a cerca de 900 mg, por exemplo entre cerca de 100 mg a cerca de 850 mg, entre cerca de 100 mg a cerca de 800 mg, entre cerca de 100 mg a cerca de 750 mg, entre cerca de 100 mg a cerca de 700 mg, entre cerca de 100 mg a cerca de 650 mg, entre cerca de 100 mg a cerca de 600 mg, entre cerca de 100 mg a cerca de 550 mg, entre cerca de 100 mg a cerca de 500 mg, entre cerca

de 200 mg a cerca de 850 mg, entre cerca de 200 mg a cerca de 800 mg, entre cerca de 200 mg a cerca de 750 mg, entre cerca de 200 mg a cerca de 700 mg, entre cerca de 200 mg a cerca de 650 mg, entre cerca de 200 mg a cerca de 600 mg, entre cerca de 200 mg a 550 mg, entre cerca de 200 mg a cerca de 500 mg, entre cerca de 300 mg a cerca de 850 mg, entre cerca de 300 mg a cerca de 800 mg, entre cerca de 300 mg a cerca de 750 mg, entre cerca de 300 mg a cerca de 700 mg, entre cerca de 300 mg a cerca de 650 mg, entre cerca de 300 mg a cerca de 600 mg, entre cerca de 300 mg a cerca de 550 mg, entre cerca de 300 mg a cerca de 500 mg, entre cerca de 400 mg a cerca de 850 mg, entre cerca de 400 mg a cerca de 800 mg, entre cerca de 400 mg a cerca de 750 mg, entre cerca de 400 mg a cerca de 700 mg, entre cerca de 400 mg a cerca de 650 mg, entre cerca de 400 mg a cerca de 600 mg, entre cerca de 400 mg a cerca de 550 mg ou entre cerca de 400 mg a cerca de 500 mg.

[00594] Em algumas modalidades, o agente de RNAi é administrado como uma dose fixa de cerca de 100 mg, cerca de 125 mg, cerca de 150 mg, cerca de 175 mg, 200 mg, cerca de 225 mg, cerca de 250 mg, cerca de 275 mg, cerca de 300 mg, cerca de 325 mg, cerca de 350 mg, cerca de 375 mg, cerca de 400 mg, cerca de 425 mg, cerca de 450 mg, cerca de 475 mg, cerca de 500 mg, cerca de 525 mg, cerca de 550 mg, cerca de 575 mg, cerca de 600 mg, cerca de 625 mg, cerca de 650 mg, cerca de 675 mg, cerca de 700 mg, cerca de 725 mg, cerca de 750 mg, cerca de 775 mg, cerca de 800 mg, cerca de 825 mg, cerca de 850 mg, cerca de 875 mg ou cerca de 900 mg.

[00595] O RNAi pode ser administrado por infusão intravenosa ao longo de um período de tempo, tal como ao longo de um período de 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, ou cerca de 25 minutos. A administração pode ser repetida, por exemplo, em uma base regular, tal como bissemanalmente (*isto é*, a cada duas

semanas) durante 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 administração semanal ou bissemanal durante três meses, a administração pode ser repetida uma vez por mês, durante seis meses ou um ano ou mais.

[00596] A administração do RNAi pode reduzir a presença de ccc DNA de HBV sérico e/ou hepático, a presença de antígeno HBV sérico e/ou hepático, por exemplo, HBsAg e/ou HBeAg, níveis ALT e/ou níveis AST, por exemplo em uma célula, tecido, sangue, urina ou outro compartimento do paciente em pelo menos cerca de 5%, 6%, 7%, 8%, 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%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, ou pelo menos cerca de 99% ou mais, por exemplo para baixo do nível de detecção do ensaio.

[00597] A administração do RNAi pode aumentar a presença de anticorpos anti-HBV séricos e/ou hepáticos, por exemplo, em uma célula, tecido, sangue, urina ou outro compartimento do paciente em pelo menos cerca de 5%, 6%, 7%, 8%, 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%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%,

87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou pelo menos cerca de 99% ou mais.

[00598] Antes da administração de uma dose completa do RNAi pode ser administrada ao paciente uma dose mais pequena, tal como uma infusão a 5%, e estes monitorizados quanto a efeitos adversos, tais como uma reação alérgica. Em outro exemplo, o paciente pode ser monitorizado quanto a efeitos estimulador imunes indesejados, tais como níveis de citocinas (por exemplo, TNF-alfa ou INF-alfa) aumentados.

[00599] Devido aos efeitos inibidores na expressão de HBV, uma composição de acordo com a invenção ou uma composição farmacêutica preparada a partir dela pode melhorar a qualidade de vida.

[00600] Um RNAi da invenção pode ser administrado em forma "nua", onde o agente de RNAi modificado ou não modificado é suspenso diretamente em solvente tampão aquoso ou apropriado, tal como um "RNAi livre". Um RNAi livre é administrado na ausência de uma composição farmacêutica. O RNAi livre pode estar em uma solução tampão adequada. A solução tampão pode compreender acetato, citrato, prolamina, carbonato, ou fosfato, ou qualquer sua combinação. Em uma modalidade, a solução tampão consiste em solução salina tamponada com fosfato (PBS). O pH e a osmolaridade da solução tampão contendo o RNAi podem ser ajustados de modo que a solução seja adequada para administração a um indivíduo.

[00601] Em alternativa, um RNAi da invenção pode ser administrado na forma de uma composição farmacêutica, como uma formulação lipossômica de dsRNA.

[00602] Os indivíduos que beneficiariam de uma redução e/ou inibição da expressão do gene HBV são aqueles tendo uma infecção pelo HBV e/ou doença ou distúrbio associados a HBV como descrito aqui.

[00603] O tratamento de um indivíduo que beneficiaria de uma redução e/ou inibição da expressão do gene HBV inclui tratamento terapêutico e profilático.

[00604] A invenção proporciona ainda métodos e usos de um agente de RNAi ou de uma respectiva composição farmacêutica para o tratamento de um indivíduo que irá beneficiar de redução e/ou inibição da expressão do gene HBV, por exemplo, um indivíduo com uma doença associada a HBV, em combinação com outros agentes farmacêuticos e/ou outros métodos terapêuticos, por exemplo, com agentes farmacêuticos conhecidos e/ou métodos terapêuticos conhecidos, tais como, por exemplo, os que são correntemente empregues para o tratamento desses distúrbios.

[00605] Por exemplo, em certas modalidades, um RNAi se dirigindo a um ou mais genes HBV é administrado em combinação com, por exemplo, um agente útil no tratamento de uma doença associada a HBV, como descrito aqui em outro local. Por exemplo, terapêutica adicional e métodos terapêuticos adequados para tratar um indivíduo que beneficiaria com a redução na expressão de HBV, por exemplo, um indivíduo com uma doença associada a HBV, incluem um agente de RNAi visando uma porção diferente do genoma do HBV, um agente antiviral, um inibidor da transcriptase reversa (por exemplo, Tenofovir disoproxil fumarato (TDF), Tenofovir alafenamida, Lamivudina, Adefovir dipivoxila, Entecavir (ETV), Telbivudine e AGX-1009), um estimulador imune (por exemplo, interferon alfa 2a submetido a PEG (PEG-IFN- α 2a), interferon alfa-2b, uma interleucina-7 humana recombinante e um agonista do receptor 7 semelhante a Toll (TLR7)), uma vacina terapêutica (por exemplo, GS-4774, DV-601 e TG1050), um inibidor da entrada viral (por exemplo, Myrcludex), um oligonucleotídeo que inibe a secreção ou liberação de HbsAg (por exemplo, REP 9AC), um inibidor do capsídeo (por exemplo, Bay41-4109 e NVR-1221), um inibidor de

cccDNA (por exemplo, IHVR-25), ou outros agentes terapêuticos e/ou procedimentos, por exemplo, transplante de fígado, quimioterapia, para tratamento de uma doença associada a HBV, uma combinação de qualquer um dos anteriores.

[00606] Em determinadas modalidades, um agente de RNAi visando um ou mais genes de HBV é administrado em combinação com um segundo agente de RNAi visando uma porção diferente do genoma do HBV. Por exemplo, um primeiro agente de RNAi visando um ou mais genes estruturais pode ser administrado em combinação com um segundo agente de RNAi visando o gene X. Por exemplo, um primeiro agente de RNAi compreende um primeiro filamento senso e um primeiro filamento antissenso formando uma região de fita dupla, em que substancialmente todos os nucleotídeos do dito primeiro filamento senso e substancialmente todos os nucleotídeos do primeiro filamento antissenso são nucleotídeos modificados, em que o dito primeiro filamento senso é conjugado com um ligante ligado ao terminal 3' e em que o ligante é um ou mais derivados de GalNAc ligados através de um ligante ramificado bivalente ou trivalente; e o segundo agente de RNAi compreende um segundo filamento senso e um segundo filamento antissenso formando uma região de fita dupla, em que substancialmente todos os nucleotídeos do segundo filamento de senso e substancialmente todos os nucleotídeos do segundo filamento antissenso são nucleotídeos modificados, em que o segundo filamento senso é conjugado com um ligante ligado ao terminal 3', e em que o ligante é um ou mais derivados de GalNAc ligados através de um ligante ramificado bivalente ou trivalente; em que o primeiro filamento senso compreende uma sequência selecionada do grupo que consiste em

5'- UCGUGGUGGACUUCUCUCA -3' (SEQ IDNO:5),

5'- GUGCACUUCGCUUCACCUCUA -3' (SEQ IDNO:7),

5'- CGUGGUGGACUUCUCUCAAUU -3' (SEQ IDNO:9),

5'- CGUGGUGGUCUUCUCUAAAUU -3' (SEQ IDNO:37),
 5'- GGUGGACUUCUCUCAAUUUUA -3' (SEQ IDNO:11), e
 5'- GUGUGCACUUCGCUUCACA -3' (SEQ IDNO:39) (ou uma sequência de nucleotídeos que é pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idêntica ao longo de todo seu comprimento a qualquer uma das sequências de nucleotídeos precedentes), e em que os primeiro e segundo filamentos antissenso compreendem cada uma independentemente uma sequência selecionada do grupo que consiste em
 5'- UGAGAGAAGUCCACCACGAUU -3' (SEQ ID NO:6);
 5'- UAGAGGUGAAGCGAAGUGCACUU -3' (SEQ ID NO:8);
 5'- AAUUGAGAGAAGUCCACCAGCAG -3' (SEQ ID NO:10);
 5'- AAUUGAGAGAAGUCCACCAGCUU -3' (SEQ ID NO:38),
 5'- UAAAAUUGAGAGAAGUCCACCAC -3' (SEQ ID NO:12), e
 5'- UGUGAAGCGAAGUGCACACUU -3' (SEQ ID NO:40) (ou uma sequência de nucleotídeos que é pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% idêntica ao longo de todo o seu comprimento a qualquer uma das sequências de nucleotídeos precedentes), tratando desse modo o indivíduo.

[00607] Em uma modalidade, todos os nucleotídeos do primeiro e segundo filamento senso e/ou todos os nucleotídeos do primeiro e segundo filamento antissenso compreendem uma modificação.

[00608] Em uma modalidade, o pelo menos um dos nucleotídeos modificados é selecionado de um nucleotídeo de desóxi-timina (dT) 3' terminal, um nucleotídeo modificado por 2'-O-metila, um nucleotídeo modificado por 2'-flúor, um nucleotídeo modificado por 2'-desóxi, um nucleotídeo bloqueado, um nucleotídeo desbloqueado, um nucleotídeo restrito de forma adaptável, um nucleotídeo de etila constrito, um nucleotídeo abásico, um nucleotídeo modificado por 2'-amino, um nucleotídeo modificado por 2'-O-alila, um nucleotídeo modificado por 2'-

C-alquila, um nucleotídeo modificado por 2'-hidroxila, um nucleotídeo modificado por 2'-metoxietila, um nucleotídeo modificado por 2'-O-alquila, um nucleotídeo de morfolino, um fosforamidato, um nucleotídeo compreendendo base não natural, um nucleotídeo modificado por tetra-hidropirano, um nucleotídeo modificado por 1,5-anidroexitol, um nucleotídeo modificado por ciclo-hexenila, um nucleotídeo compreendendo um grupo fosforotioato, um nucleotídeo compreendendo um grupo metilfosfonato, um nucleotídeo compreendendo um 5'-fosfato, e um nucleotídeo compreendendo um imitador de 5'-fosfato.

[00609] Em determinadas modalidades, um agente de RNAi visando um ou mais genes de HBV é administrado em combinação com um segundo agente de RNAi visando um gene que é diferente de um ou mais genes do HBV. Por exemplo, o agente de RNAi visando um ou mais genes de HBV pode ser administrado em combinação com um segundo agente de RNAi visando um gene CD274/PD-L1. Exemplos de agentes de RNAi visando um gene CD274/PD-L1 são descritos em WO 2011/127180, cuja totalidade do conteúdo é aqui incorporada por referência. O primeiro agente de RNAi visando um ou mais genes de HBV e o segundo agente de RNAi visando um gene diferente de um ou mais genes HBV, por exemplo, um gene CD274/PD-L1 e/ou um gene HDV, podem ser administrados como partes da mesma composição farmacêutica. Em alternativa, o primeiro agente de RNAi visando um ou mais genes de HBV e o segundo agente de RNAi visando um gene diferente de um ou mais genes HBV, por exemplo, um gene CD274/PD-L1 e/ou um gene HDV, podem ser administrados como partes de diferentes composições farmacêuticas.

[00610] CD274 ou PD-L1 é uma proteína transmembrana de aminoácido 290 tipo I codificada pelo gene CD274 no cromossomo 19 de camundongo e cromossomo 9 de humano. Expressão CD274/PD-L1

está implicada na evasão de respostas imunitárias envolvidas na infecção crônica, por exemplo, por vírus (incluindo, por exemplo, HIV, HBV, HCV e HTLV, entre outros), por bactérias (incluindo, por exemplo, *Helicobacter pylori*, entre outras) e por parasitas (incluindo, por exemplo, *Schistosoma mansoni*).

[00611] PD-L1 pode influenciar respostas imunitárias envolvendo PD-1 ou B7-1 (CD80) e modificando sinalização TCR ou BCR, mas pode também transmitir sinais a células expressando PD-L1, ou seja, revertendo a sinalização através de PD-L1. Estudos de ressonância plasmônica de superfície demonstram interação única e específica entre PD-L1 e B7-1, com uma afinidade de 1,7 μ M, e uma afinidade de 0,5 μ M para a interação entre PD-L1 e PD-1. Estudos de reticulação química indicam que PD-L1 e B7-1, como PD-L1 e PD-1, também podem interagir através dos seus domínios tipo IgV. A interface PD-L1:B7-1 sobrepõe-se pelo menos parcialmente com a putativa interface PD-L1:PD-1. As interações B7-1:PD-L1 podem induzir um sinal inibitório para as células T. A ligação de PD-L1 em células T CD4 por B7-1, ou ligação de B7-1 em células T CD4 por PD-L1, fornece um sinal inibitório funcionalmente significativo. Uma vez que PD-L1 e B7-1 são expressos em células T, células B, DCs e macrófagos, existe o potencial para interações bidirecional entre B7-1 e PD-L1 nestes tipos de células. Além disso, PD-L1 em células não hematopoiéticas pode interagir com B7-1 bem como PD-1 em células T para regular as células (Keir ME *et al.*, 2008. *Annu Rev Immunol.* 26:677-704)

[00612] Em infecções virais crônicas em seres humanos, vários grupos têm mostrado que a expressão PD-1 é alta em células T específicas de HIV (Petrovas C *et al.*, 2006, *J. Exp. Med.* 203:2281-92; Day CL *et al.*, 2006, *Nature* 443:350-54; Trautmann L *et al.*, 2006, *Nat. Med.* 12: 1198-202), específicas de HBV (Boettler T *et al.*, 2006, *J. Virol.* 80:3532-40; Boni C *et al.* 2007, *J. Virol.* 81:4215-25), e específicas de

HCV (Urbani S *et al.*, 2006, *J. Virol.* 80: 11398-403). PD-L1 também é regulado para cima nos monócitos de sangue periférico CD14 + e DCs mieloides em pacientes com infecção crônica pelo HBV (Chen L *et al.*, 2007, *J. Immunol.* 178:6634-41; Ceng L *et al.*, 2006, *J. Viral Hepat.* 13:725-33), e em células CD14+ e células T em pacientes com HIV (Trabattoni D *et al.*, 2003. *Blood* 101 :2514-20). Bloquear interações PD-LPD-L *in vitro* reverte a exaustão de células T CD8 e CD4 específicas de HIV, específicas de HBV (Boni C *et al.* 2007, *J. Virol.* 81 :4215-25), específicas de HCV e específicas de SIV (Velu V *et al.*, 2007, *J. Virol.* 81 :5819-28) e restaura a proliferação e produção de citocinas (Petrovas C *et al.*, 2006, *J. Exp. Med.* 203:2281-92; Day CL *et al.*, 2006, *Nature* 443:350-54; Trautmann L *et al.*, 2006, *Nat. Med.* 12: 1198-202; Urbani S *et al.*, 2006, *J. Virol.* 80: 11398-403). Trabalho recente mostra que o núcleo HCV, uma proteína do nucleocapsídeo, pode regular para cima a expressão de PD-1 e PD-L1 em células T de doador saudável e que a regulação para cima de PD-1 é mediada pela interação do núcleo de HCV com o receptor do complemento C1QBP (Yao ZQ *et al.*, 2007, *Viral Immunol.* 20:276-87).

[00613] A um indivíduo ao qual é administrado um primeiro agente de RNAi ou um primeiro e segundo agente de RNAi da invenção podem ainda ser administradas uma ou várias outras terapêuticas que funcionam por um mecanismo não-RNAi e que são úteis no tratamento de uma infecção pelo HBV. Terapêuticas exemplares que podem ser usadas em uma terapia de combinação da invenção incluem imunomoduladores que estimulam o sistema imunitário, por exemplo, aumentando a atividade auxiliar de células T, maturação de linfócitos B, inibindo supressores de células T e intensificando a expressão de HLA tipo I. Imunomoduladores adequados incluem interferons que têm uma variedade de propriedades que incluem efeitos antivirais, imunomoduladores e antiproliferativos.

[00614] Por exemplo, o tratamento atual para a hepatite B crônica é a terapia de interferon, que é administrada a indivíduos com uma infecção pelo HBV documentada durante pelo menos seis meses, enzimas hepáticas elevadas (AST e ALT) e um vírus divisor ativo em seu sangue (testes positivos de HBeAg e/ou DNA de HBV). A terapia de interferon- α produz uma remissão sustentada de longo prazo da doença em cerca de 35% das pessoas com hepatite B crônica, com normalização das enzimas hepáticas e a perda dos três marcadores para uma infecção ativa (HBeAg, DNA de HBV e HBsAg). Indivíduos com infecção aguda do HBV, cirrose terminal ou outros grandes problemas médicos normalmente não são tratados com interferon.

[00615] Além disso, a terapia de interferon em pacientes com cirrose relacionada com o HBV diminui significativamente a taxa de hepatocelular carcinoma (HCC), particularmente em pacientes com uma quantidade maior de DNA HBV sérico. Em pacientes com cirrose compensada HBeAg positiva, a remissão virológica e bioquímica após terapia de interferon está associada a sobrevivência melhorada. Em pacientes com infecção crônica pelo HBV, a eliminação de HBeAg após tratamento com interferon- α está associada a melhores desfechos clínicos.

[00616] A duração padrão da terapia é de 16 semanas. Pacientes que apresentam um baixo nível de replicação viral no final do regime padrão são os que mais beneficiam com o tratamento prolongado.

[00617] Outros agentes terapêuticos exemplificativos que podem ser usados em uma terapia de combinação da invenção incluem, por exemplo, um agente antiviral, um análogo de nucleotídeo, um análogo de nucleosídeo, um inibidor da transcriptase reversa (por exemplo, Tenofovir disoproxil fumarato (TDF), Tenofovir alafenamida, Lamivudina, Adefovir dipivoxila, Entecavir (ETV), Telbivudine, AGX-1009, emtricitabina, clevudina, ritonavir, dipivoxil, lobucavir, famvir, FTC,

N-acetil-Cisteína (NAC), PC1323, theradigm-HBV, timosina-alfa e ganciclovir), um estimulador imune (por exemplo, interferon alfa 2a submetido a PEG (PEG-IFN- α 2a), interferon alfa-2b, uma interleucina-7 humana recombinante e um agonista do receptor 7 semelhante a Toll (TLR7)), uma vacina terapêutica (por exemplo, GS-4774, DV-601 e TG1050), um inibidor da entrada viral (por exemplo, Myrcludex), um oligonucleotídeo que inibe a secreção ou liberação de HbsAg (por exemplo, REP 9AC), um inibidor do capsídeo (por exemplo, Bay41-4109 e NVR-1221), um inibidor de cccDNA (por exemplo, IHVR-25), ou outros agentes terapêuticos e/ou procedimentos, por exemplo, transplante de fígado, quimioterapia, para tratamento de uma doença associada a HBV, uma combinação de qualquer um dos anteriores.

[00618] Em uma modalidade, os métodos da invenção incluem administrar um inibidor de transcriptase reversa a um indivíduo com uma infecção pelo HBV e/ou doença associada a HBV. Em outra modalidade, os métodos da invenção incluem administrar um inibidor de transcriptase reversa e um estimulador imune a um indivíduo com uma infecção pelo HBV e/ou doença associada a HBV.

[00619] O ou os agentes de RNAi e um agente terapêutico adicional e/ou tratamento podem ser administrados ao mesmo tempo e/ou na mesma combinação, por exemplo, parentericamente, ou o agente terapêutico adicional pode ser administrado como parte de uma composição separada ou em instantes separados e/ou mediante outro método conhecido na área ou descrito aqui.

[00620] A presente invenção proporciona também métodos de uso de um agente de RNAi da invenção e/ou uma composição contendo um agente de RNAi da invenção para reduzir e/ou inibir a expressão de HBV em uma célula. Em outros aspectos, a presente invenção proporciona um RNAi da invenção e/ou uma composição compreendendo um RNAi da invenção para uso na redução e/ou inibição da expressão do gene

HBV em uma célula. Ainda em outros aspectos é proporcionado o uso de um RNAi da invenção e/ou uma composição compreendendo um RNAi da invenção para a fabricação de um medicamento para redução e/ou inibição da replicação de HBV em uma célula. Ainda em outro aspecto, a presente invenção proporciona um RNAi da invenção e/ou uma composição compreendendo um RNAi da invenção para uso na redução e/ou inibição da replicação de HBV em uma célula. Ainda em outros aspectos é proporcionado o uso de um RNAi da invenção e/ou uma composição compreendendo um RNAi da invenção para a fabricação de um medicamento para redução e/ou inibição da replicação de HBV em uma célula. Os métodos e usos incluem contato da célula com um RNAi, por exemplo, um dsRNA, da invenção e manutenção da célula durante um tempo suficiente para se obter degradação do transcrito de mRNA de um gene HBV, inibindo deste modo a expressão do gene HBV ou inibindo a replicação de HBV na célula.

[00621] A redução da expressão genética pode ser avaliada por quaisquer métodos conhecidos na área. Por exemplo, pode ser determinada uma redução da expressão de HBV determinando o nível de expressão de mRNA de HBV usando métodos rotineiros para o perito na técnica, por exemplo, Northern blotting, qRT-PCR, determinando o nível de proteína de HBV usando métodos rotineiros para o perito na técnica, como Western blotting, técnicas imunológicas, métodos de citometria de fluxo, ELISA e/ou determinando a atividade biológica de HBV.

[00622] Nos métodos e usos da invenção, a célula pode ser contatada *in vitro* ou *in vivo*, ou seja, a célula pode estar dentro de um indivíduo.

[00623] Uma célula adequada para tratamento usando os métodos da invenção pode ser qualquer célula que expresse um gene HBV, por exemplo, uma célula infectada com HBV ou uma célula compreendendo

um vetor de expressão, compreendendo um genoma HBV ou parte de um gene HBV. Uma célula adequada para uso nos métodos e usos da invenção pode ser uma célula de mamífero, por exemplo, uma célula de primata (tal como uma célula de humano ou uma célula de primata não humano, por exemplo, uma célula de macaco ou uma célula de chimpanzé), uma célula de não primata (tal como uma célula de vaca, uma célula de porco, uma célula de camelo, uma célula de lama, uma célula de cavalo, uma célula de cabra, uma célula de coelho, uma célula de ovelha, um hamster, uma célula de porquinho-da-índia, uma célula de gato, uma célula de cão, uma célula de rato, uma célula de camundongo, uma célula de leão, uma célula de tigre, uma célula de urso, ou uma célula de búfalo), uma célula de pássaro (por exemplo, uma célula de pato ou uma célula de ganso), ou uma célula de baleia. Em uma modalidade, a célula é uma célula de humano, por exemplo, uma célula de fígado de humano.

[00624] A expressão de gene HBV pode ser inibida na célula em pelo menos cerca 5%, 6%, 7%, 8%, 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%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, ou cerca de 100%, ou seja, para abaixo do nível de detecção do ensaio.

[00625] A replicação de HBV pode ser inibida na célula em pelo menos cerca 5%, 6%, 7%, 8%, 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%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%,

52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou cerca de 100%, ou seja, para abaixo do nível de detecção do ensaio.

[00626] Os métodos e usos *in vivo* da invenção podem incluir administração a um indivíduo de uma composição contendo um RNAi, onde o RNAi inclui uma sequência de nucleotídeos que é complementar com pelo menos uma parte de um transcrito de RNA do gene HBV do mamífero a ser tratado. Quando o organismo a ser tratado é um ser humano, a composição pode ser administrada por quaisquer meios conhecidos na técnica incluindo as, mas não se limitando às, rotas subcutânea, intravenosa, oral, intraperitoneal, ou parenteral, incluindo administração intracraniana (por exemplo, intraventricular, intraparenquimal e intratecal), intramuscular, transdérmica, pelas vias aéreas (aerossol), nasal, retal, e tópica (incluindo bucal e sublingual). Em certas modalidades, as composições são administradas por injeção subcutânea. Em algumas modalidades, as composições são administradas por infusão ou injeção intravenosa. Em outras modalidades, as composições são administradas por injeção intramuscular.

[00627] Em algumas modalidades, a administração é através de uma injeção de depósito. Uma injeção de depósito pode liberar o RNAi de um modo consistente ao longo de um período de tempo prolongado. Assim, uma injeção de depósito pode reduzir a frequência de dosagem necessária para se obter um efeito desejado, por exemplo, uma inibição desejada de HBV, ou um efeito terapêutico ou profilático. Uma injeção de depósito pode também proporcionar concentrações no soro mais consistentes. Injeções de depósito podem incluir injeções subcutâneas ou injeções intramusculares. Em modalidades preferenciais, a injeção

de depósito é uma injeção subcutânea.

[00628] Em algumas modalidades, a administração é através de uma bomba. A bomba pode ser uma bomba externa ou uma bomba cirurgicamente implantada. Em certas modalidades, a bomba é uma bomba osmótica implantada por via subcutânea. Em outras modalidades, a bomba é uma bomba de infusão. Uma bomba de infusão pode ser usada para infusões intravenosas, subcutâneas, arteriais, ou epidurais. Em modalidades preferenciais, a bomba de infusão é uma bomba de infusão subcutânea. Em outras modalidades, a bomba é uma bomba cirurgicamente implantada que administra o RNAi no fígado.

[00629] O modo de administração pode ser escolhido com base em se é desejado um tratamento local ou sistêmico e com base na área a ser tratada. A rota e local de administração podem ser escolhidos para intensificar o direcionamento.

[00630] Em um aspecto, a presente invenção proporciona também métodos para inibição da expressão de um gene HBV em um mamífero, por exemplo, um ser humano. A presente invenção proporciona também uma composição compreendendo um RNAi, por exemplo, um dsRNA, que se dirige a um gene HBV em uma célula de um mamífero para uso na inibição da expressão do gene HBV no mamífero. Em outro aspecto, a presente invenção proporciona uso de um RNAi, por exemplo, um dsRNA, que se dirige a um gene HBV em uma célula de um mamífero na fabricação de um medicamento para inibição da expressão do gene HBV no mamífero.

[00631] Os métodos e usos incluem administração ao mamífero, por exemplo, um ser humano, de uma composição compreendendo um RNAi, por exemplo, um dsRNA, que se dirige a um gene HBV em uma célula do mamífero e manutenção do mamífero durante um tempo suficiente para se obter degradação do transcrito de mRNA do gene HBV, inibindo deste modo a expressão do gene HBV no mamífero.

[00632] A redução na expressão do gene pode ser avaliada em uma amostra de sangue periférico do indivíduo a quem foi administrado RNAi por quaisquer métodos conhecidos na técnica, por exemplo, qRT-PCR, aqui descrita. A redução na produção de proteínas pode ser avaliada por quaisquer métodos conhecidos na técnica e por métodos, por exemplo, ELISA ou transferência de western (western blotting), aqui descritos. Em uma modalidade, uma amostra de biópsia do fígado por punção serve como o material de tecido para monitorização da redução na expressão gênica e/ou protéica de HBV. Em outra modalidade, uma amostra de sangue serve como o material de tecido para monitorização da redução na expressão gênica e/ou protéica de HBV.

[00633] Em uma modalidade, a verificação de clivagem RISC medicada do alvo *in vivo* após administração de agente de RNAi é feita através da realização de 5'-RACE ou modificações do protocolo como conhecido na técnica (Lasham A *et al.*, (2010) *Nucleic Acid Res.*, 38 (3) p-e19) (Zimmermann *et al.* (2006) *Nature* 441: 111-4).

[00634] Esta invenção é ainda ilustrada pelos seguintes exemplos que não devem ser interpretados como limitativos. Todo o conteúdo de todas as referências, patentes e pedidos de patente publicados citados ao longo deste pedido, bem como as Figuras e Listagem de Sequências, são por este meio incorporados neste documento por referência.

EXEMPLOS

a. Exemplo 1. Síntese de RNAi

i. Fonte de reagentes

[00635] Quando não for especificamente apresentada aqui a fonte de um reagente, esse reagente pode ser obtido de qualquer fornecedor de reagentes para biologia molecular com um padrão de qualidade/pureza para aplicação em biologia molecular.

Transcritos

Desenho de sRNAi

[00636] A seleção de desenhos de sRNAi visando HBV foi motivada por dois fatores principais: a) potência e b), o desejo de empregar sRNAi com correspondências quase perfeitas, com mais de 90% de cobertura fracionária do grande número de sequências HBV públicas de todos os serotipos conhecidos (A-H). As coordenadas para a seleção de sRNAi foram determinadas em relação à sequência de genoma de referência NCBI HBV NC_003977.1 (número de acesso no Genbank GI:21326584 (SEQ ID NO:1). Um primeiro conjunto de sRNAi contendo modificações de estrutura-atividade, incluindo vários padrões de substituição 2'-O-metil e 2'-flúor, centrados em duas regiões adjacentes do genoma HBV codificando o antígeno de superfície (HbSAg) e a polimerase do HBV, foram concebidos, sintetizados e rastreados *in vitro*. Um segundo conjunto de sRNAi foi concebido, sintetizado e rastreado visando regiões-alvo adicionais com especial atenção às posições 1581-1599 de SEQ ID NO:1 que codificam, para além do HbSAg e da polimerase, o gene X.

[00637] Uma lista detalhada das sequências não modificadas de filamento senso e antissenso de HBV é mostrada na Tabela 3.

[00638] Uma lista detalhada das sequências modificadas de filamento senso e antissenso de HBV é mostrada na Tabela 4.

Síntese de sRNAi

[00639] Sequências de sRNAi de HBV foram sintetizadas em escala 1 µmol em sintetizador Mermade 192 (BioAutomation) usando a química de fosforamidita mediada por suporte sólido. O suporte sólido foi vidro de porosidade controlada (500 Å) carregado com ligante GalNAc personalizado ou suporte sólido universal (bioquímica AM). Reagentes de síntese auxiliares, 2'-F e 2'-O-metil RNA e deoxy fosforamiditas foram obtidos da Thermo-Fisher (Milwaukee, WI) e Hongene (China). 2' F 2'-O-metil, GNA (ácidos nucleicos de glicol), 5' fosfato e modificações abásica foram introduzidos empregando as fosforamiditas

correspondentes. Síntese de filamentos únicos conjugados com 3' GalNAc foi realizada em um suporte CPG modificado com GalNAc. Foi usado suporte sólido universal CPG personalizado para a síntese de filamentos antissenso únicos. O tempo de acoplamento para todas as fosforamiditas (100 mM em acetonitrila) foi de 5 minutos empregando 5-etiltio-1H-tetrazol (ETT) como ativador (0,6 M em acetonitrila). As ligações de fosforotioato foram geradas usando uma solução de 50 mM de 3-((dimetilamino-metilideno) amino)-3H-1,2,4-ditiazole-3-tiona (DDTT, obtido de Chemgenes (Wilmington, MA, E.U.A.)) em acetonitrilo/piridina anidro (1:1 v/v). O tempo de oxidação foi de 3 minutos. Todas as sequências foram sintetizadas com remoção final do grupo DMT ("DMT off").

[00640] Após a conclusão da síntese da fase sólida, foram clivados oligorribonucleotídeos do suporte sólido e desprotegidos em placas de 96 poços profundos seladas usando reagentes de metilamina aquosa de 200 µl a 60 °C durante 20 minutos. No final da etapa de clivagem e desproteção, permitiu-se que a placa de síntese ficasse à temperatura ambiente, sendo depois precipitada pela adição de 1mL de acetonitrila: mistura de etanol (9:1). As placas foram refrigeradas a -80 °C durante 2 horas e o sobrenadante decantado cuidadosamente com o auxílio de uma pipeta multicanal. O pélete do oligonucleotídeo foi ressuspenso em tampão de NaOAc de 20 mM e foi dessalinizado usando uma coluna HiTrap de exclusão de tamanho de 5 mL (GE Healthcare) em um sistema de purificador AKTA equipado com um amostrador automático A905 e um coletor de frações Frac 950. Foram coletadas amostras dessalinizadas em placas de 96 poços. Amostras de cada sequência foram analisadas por LC-MS para confirmar a identidade, UV (260 nm) para quantificação e um conjunto selecionado de amostras por cromatografia IEX para determinar a pureza.

[00641] Foi realizado emparelhamento de filamentos únicos de HBV

em um robô de manipulação de líquido Tecan. Misturas equimolares de filamentos senso e antissenso foram combinadas e emparelhadas em placas de 96 poços. Após combinar os filamentos únicos complementares, a placa de 96 poços foi selada firmemente e aquecida em uma estufa a 100°C durante 10 minutos, permitindo-se que chegasse lentamente à temperatura ambiente durante um período de 2 a 3 horas. A concentração de cada dúplex foi normalizada para 10 µM em 1X PBS.

Exemplo 2. Rastreamento *in vitro* de cópias de sRNAi

Cultura e transfeções de células

[00642] Células Cos7 (ATCC, Manassas, VA) foram cultivadas até à quase confluência a 37°C em uma atmosfera de CO₂ a 5% em DMEM (ATCC) suplementado com FBS a 10%, antes de serem liberadas da placa por tripsinação. Construtos de luciferase Dual-Glo® gerados no plasmídeo psiCHECK2 contendo aproximadamente 1,1 kb de sequências genômicas de HBV foram transfectados para células de aproximadamente 15 x 10⁴ utilizando Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Carlsbad CA. cat # 11668-019). A cada poço de uma placa de 96 poços, foram adicionados 0,2 µl de Lipofectamine a 10 ng de vetor de plasmídeo em 14,8 µL de Opti-MEM, permitindo-se que complexasse à temperatura ambiente durante 15 minutos. A mistura foi então adicionada às células que foram ressuspensas em 80 µL de meio completo fresco. Após aproximadamente 24 horas, o meio foi removido e as células re-transfectadas com sRNAi. Cada sRNAi foi transfectado para células que anteriormente tinham sido transfectadas com o vetor psiCHECK2-HBV que tinha uma correspondência perfeita para o sRNAi. A transfecção de sRNAi foi realizada adicionando 14,8 µL de Opti-MEM mais 0,2 µL de Lipofectamine RNAiMax por poço (Invitrogen, Carlsbad CA. cat # 13778-150) para 5 µL de cópias de sRNAi por poço em uma placa de 96 poços e incubada à temperatura ambiente durante 15

minutos. A mistura foi então adicionada às células previamente transfectadas com o plasmídeo psiCHECK2-HBV que tinha uma correspondência perfeita com a sequência de sRNAi. As células foram incubadas durante 24 horas antes de ser medida a luciferase.

[00643] Foram realizadas experiências de dose única a concentrações finais de dúplex de 10 nM e 0,01 nM.

Ensaio de Luciferase Dual-Glo®

[00644] Vinte e quatro horas depois os sRNAi terem sido transfectados, foram medidos luciferase Firefly (controle de transfecção) e Renilla (fundida com a sequência alvo do HBV). Primeiro, o meio foi removido das células. Em seguida, foi medida a atividade da luciferase Firefly adicionando 75 µL de reagente luciferase Dual-Glo® igual ao volume de meio de cultura para cada poço e misturando. A mistura foi incubada à temperatura ambiente por 30 minutos antes de ser medida a luminescência (500 nm) em um Spectramax (Molecular Devices) para detectar o sinal de luciferase Firefly. A atividade de luciferase Renilla foi medida adicionando 75 µL de reagente Dual-Glo® Stop & Glo® à temperatura ambiente a cada poço e as placas foram incubadas durante 10 a 15 minutos antes da luminescência ser novamente medida para determinar o sinal de luciferase Renilla. O reagente Dual-Glo® Stop & Glo®, extingue o sinal de luciferase firefly e sustenta a luminescência para a reação de luciferase Renilla. A atividade de sRNAi foi determinada normalizando o sinal Renilla (HBV) para o sinal Firefly (controle) dentro de cada poço. A magnitude da atividade de sRNAi foi então avaliada em relação a células que foram transfectadas com o mesmo vetor, mas que não foram tratadas com sRNAi ou que foram tratadas com um sRNAi não direcionado. Todas as transfecções foram feitas a n= 2 ou superior.

[00645] A Tabela 5 mostra os resultados de rastreamento de dose única em células Cos7 transfectadas com os RNAs de HBV indicados.

Os dados são expressos como porcentagem de mRNA remanescente em relação a controle negativo.

[00646] **Tabela 2** Abreviaturas de monômeros de nucleotídeos usadas na representação de sequências de ácidos nucleicos. Será entendido que, salvo indicação em contrário, estes monômeros, quando presentes em um oligonucleotídeo, estão mutuamente ligados por ligações 5'-3'-fosfodiéster.

Abreviatura	Nucleotídeo(s)
A	Adenosina-3'-fosfato
Af	2'-fluoroadenosina-3'-fosfato
Afs	2'-fluoroadenosina-3'-fosforotioato
As	adenosina-3'-fosforotioato
C	citidina-3'-fosfato
Cf	2'-fluorocitidina-3'-fosfato
Cfs	2'-fluorocitidina-3'-fosforotioato
Cs	citidina-3'-fosforotioato
G	guanosina-3'-fosfato
Gf	2'-fluoroguanosina-3'-fosfato
Gfs	2'-fluoroguanosina-3'-fosforotioato
Gs	guanosina-3'-fosforotioato
T	5'-metiluridina-3'-fosfato
Tf	2'-flúor-5-metiluridina-3'-fosfato
Tfs	2'-flúor-5-metiluridina-3'-fosforotioato
Ts	5-metiluridina-3'-fosforotioato
U	Uridina-3'-fosfato
Uf	2'-fluorouridina-3'-fosfato
Ufs	2'-fluorouridina-3'-fosforotioato
Us	uridina-3'-fosforotioato
N	qualquer nucleotídeo (G, A, C, T ou U)
a	2'-O-metiladenosina-3'-fosfato
as	2'-O-metiladenosina-3'-fosforotioato

Abreviatura	Nucleotídeo(s)
c	2'-O-metilcitidina-3'-fosfato
cs	2'-O-metilcitidina-3'-fosforotioato
g	2'-O-metilguanosina-3'-fosfato
gs	2'-O-metilguanosina-3'-fosforotioato
t	2'-O-metil-5-metiluridina-3'-fosfato
ts	2'-O-metil-5-metiluridina-3'-fosforotioato
u	2'-O-metiluridina-3'-fosfato
us	2'-O-metiluridina-3'-fosforotioato
s	ligação fosforotioato
L96	N-[tris(GalNAc-alkyl)-amidodecanoíl)]-4-hidroxiprolinol Hyp-(GalNAc-alkyl) ₃
(dT)	2'-desóxitimidina-3'-fosfato
Y34	2-hidroximetil-tetra-hidrofurano-4-metóxi-3-fosfato (2'-OMe furanose abásica)
Y44	2-hidroximetil-tetra-hidrofurano-5-fosfato
(Agn)	Adenosina-ácido nucleico de glicol (GNA)
(Tgn)	Isômero S de timidina-ácido nucleico de glicol (GNA)
(Cgn)	Citidina-ácido nucleico de glicol (GNA)
P	Fosfato
VP	Vinil-fosfato

Tabela 3. Sequências Não modificadas de Filamentos Senso e Antissenso de dsRNAs de HBV

Nome do Dúplex	Nome do Oligo Senso	Sequência Senso (5' a 3')	SE Q ID NO	Nome do Oligo Antissenso	Sequência Antissenso (5' a 3')	SE Q ID NO	Posição em NC_003977.1
AD-61522.2	A-123463.2	AGUUAUAUGGAUGAUGUGGUA	47	A-123464.2	UACCACAUCAUCCAUAUAACUGA	263	731_753
AD-61547.2	A-123487.2	GGAUGUGUCUGCGGCGUUUUA	48	A-123488.2	UAAAACGCCGCAGACACAUCCAG	264	373_395
AD-63938.2	A-127896.1	ACUCGUGGUGGACUUCUCUCA	49	A-127897.1	UGAGAGAAGUCCACCACGAGUCU	265	250_272
AD-63939.2	A-127909.1	ACUCGUGGUGGACUUCUCUCA	50	A-127906.3	UGAGAGAAGUCCACCACGAGUCU	266	250_272
AD-63940.2	A-127917.1	ACUCGUGGUGGACUUCTCUCA	51	A-127906.11	UGAGAGAAGUCCACCACGAGUCU	267	250_272
AD-63941.2	A-127905.8	ACUCGUGGUGGACUUCUCUCA	52	A-127925.1	UGAGAGAAGUCCACCACGAGUCU	268	250_272
AD-63942.2	A-127933.1	UCGUGGUGGACUUCUCUCA	53	A-127934.1	UGAGAGAAGUCCACCACGAGU	269	252_274
AD-63943.2	A-127944.2	ACUCGUGGUGGACUUCUCUCA	54	A-127942.2	UGAGAGAAGUCCACCACGAGUCU	270	250_272
AD-63945.2	A-127910.1	ACUCGUGGUGGACUUCUCUCA	55	A-127906.4	UGAGAGAAGUCCACCACGAGUCU	271	250_272

Nome do Dúplex	Nome do Oligo Senso	Sequência Senso (5' a 3')	SE Q ID NO	Nome do Oligo Antissenso	Sequência Antissenso (5' a 3')	SE Q ID NO	Posição em NC_003977.1
AD-63946.2	A-127918.1	ACUCGUGGUGGACUUCUCUCA	56	A-127906.12	UGAGAGAAGUCCACCACGAGUCU	272	250_272
AD-63947.2	A-127905.9	ACUCGUGGUGGACUUCUCUCA	57	A-127926.1	UGAGAGAAGUCCACCACGAGUCU	273	250_272
AD-63948.2	A-127935.1	GUGGUGGACUUCUCUCA	58	A-127936.1	UGAGAGAAGUCCACCACGA	274	254_276
AD-63949.2	A-127944.3	ACUCGUGGUGGACUUCUCUCA	59	A-127906.14	UGAGAGAAGUCCACCACGAGUCU	275	250_272
AD-63950.2	A-127900.1	UCGUGGUGGACUUCUCUCAUU	60	A-127901.1	UGAGAGAAGUCCACCACGAUU	276	252_274
AD-63951.2	A-127911.1	ACUCGUGGUGGACUUCUCUCA	61	A-127906.5	UGAGAGAAGUCCACCACGAGUCU	277	250_272
AD-63952.2	A-127905.2	ACUCGUGGUGGACUUCUCUCA	62	A-127919.1	UGAGAGAAGUCCACCACGAGUCU	278	250_272
AD-63953.2	A-127905.10	ACUCGUGGUGGACUUCUCUCA	63	A-127927.1	UGAGAGAAGUCCACCACGAGUCU	279	250_272
AD-63955.2	A-127945.1	ACUCGUGGUGGACUUCUCUCA	64	A-127940.3	UGAGAGAAGUCCACCACGAGUCU	280	250_272
AD-63956.2	A-127902.1	UCGUGGUGGACUUCUCUCA	65	A-127903.1	UGAGAGAAGUCCACCACGAUU	281	252_274

Nome do Dúplex	Nome do Oligo Senso	Sequência Senso (5' a 3')	SE Q ID NO	Nome do Oligo Antissenso	Sequência Antissenso (5' a 3')	SE Q ID NO	Posição em NC_003977.1
AD-63957.2	A-127912.1	ACUCGUGGUGGACUUCUCUCA	66	A-127906.6	UGAGAGAAGUCCACCACGAGUCU	282	250_272
AD-63958.2	A-127905.3	ACUCGUGGUGGACUUCUCUCA	67	A-127920.1	UGAGAGAAGUCCACCACGAGUCU	283	250_272
AD-63959.2	A-127905.11	ACUCGUGGUGGACUUCUCUCA	68	A-127928.1	UGAGAGAAGUCCACCACGAGUCU	284	250_272
AD-63960.2	A-126619.2	UAUUUCCUAGGGUACAA	69	A-127938.1	UGAGAGAAGUCCACCACGA	285	254_276
AD-63961.2	A-127945.2	ACUCGUGGUGGACUUCUCUCA	70	A-127942.3	UGAGAGAAGUCCACCACGAGUCU	286	250_272
AD-63962.2	A-127902.2	UCGUGGUGGACUUCUCUCA	71	A-127904.1	UGAGAGAAGUCCACCACGAUU	287	252_274
AD-63963.2	A-127913.1	ACUCGUGGUGGACUUCUCUCA	72	A-127906.7	UGAGAGAAGUCCACCACGAGUCU	288	250_272
AD-63964.2	A-127905.4	ACUCGUGGUGGACUUCUCUCA	73	A-127921.1	UGAGAGAAGUCCACCACGAGUCU	289	250_272
AD-63965.2	A-127905.12	ACUCGUGGUGGACUUCUCUCA	74	A-127929.1	UGAGAGAAGUCCACCACGAGUCU	290	250_272
AD-63966.2	A-127939.1	ACUCGUGGUGGACUUCUCUCA	75	A-127940.1	UGAGAGAAGUCCACCACGAGUCU	291	250_272

Nome do Dúplex	Nome do Oligo Senso	Sequência Senso (5' a 3')	SE Q ID NO	Nome do Oligo Antissenso	Sequência Antissenso (5' a 3')	SE Q ID NO	Posição em NC_003977.1
AD-63967.2	A-127945.3	ACUCGUGGUGGACUUCUCUCA	76	A-127906.15	UGAGAGAAGUCCACCACGAGUCU	292	250_272
AD-63968.2	A-127905.1	ACUCGUGGUGGACUUCUCUCA	77	A-127906.1	UGAGAGAAGUCCACCACGAGUCU	293	250_272
AD-63968.4	A-127905.15	ACUCGUGGUGGACUUCUCUCA	78	A-127906.17	UGAGAGAAGUCCACCACGAGUCU	294	250_272
AD-63968.5	A-127905.17	ACUCGUGGUGGACUUCUCUCA	79	A-127906.18	UGAGAGAAGUCCACCACGAGUCU	295	250_272
AD-63969.2	A-127914.1	ACUCGUGGUGGACUUCUCUCA	80	A-127906.8	UGAGAGAAGUCCACCACGAGUCU	296	250_272
AD-63970.2	A-127905.5	ACUCGUGGUGGACUUCUCUCA	81	A-127922.1	UGAGAGAAGUCCACCACGAGUCU	297	250_272
AD-63971.2	A-127905.13	ACUCGUGGUGGACUUCUCUCA	82	A-127930.1	UGAGAGAAGUCCACCACGAGUCU	298	250_272
AD-63972.2	A-127941.1	ACUCGUGGUGGACUUCUCUCA	83	A-127942.1	UGAGAGAAGUCCACCACGAGUCU	299	250_272
AD-63973.2	A-127946.1	ACUCGUGGUGGACUUCUCUCA	84	A-127947.1	UGAGAGAAGTCCACCACGAGUCU	300	250_272
AD-63975.2	A-127915.1	ACUCGUGGUGGACUUCTCUCA	85	A-127906.9	UGAGAGAAGUCCACCACGAGUCU	301	250_272

Nome do Dúplex	Nome do Oligo Senso	Sequência Senso (5' a 3')	SE Q ID NO	Nome do Oligo Antissenso	Sequência Antissenso (5' a 3')	SE Q ID NO	Posição em NC_003977.1
AD-63976.2	A-127905.6	ACUCGUGGUGGACUUCUCUCA	86	A-127923.1	UGAGAGAAGUCCACCACGAGUCU	302	250_272
AD-63977.2	A-127917.2	ACUCGUGGUGGACUUCTCUCA	87	A-127931.1	UGAGAGAAGUCCACCACGAGUCU	303	250_272
AD-63978.2	A-127943.1	ACUCGUGGUGGACUUCUCUCA	88	A-127906.13	UGAGAGAAGUCCACCACGAGUCU	304	250_272
AD-63979.2	A-127908.1	ACUCGUGGUGGACUUCUCUCA	89	A-127906.2	UGAGAGAAGUCCACCACGAGUCU	305	250_272
AD-63980.2	A-127916.1	ACUCGUGGUGGACUUCTCUCA	90	A-127906.10	UGAGAGAAGUCCACCACGAGUCU	306	250_272
AD-63981.2	A-127905.7	ACUCGUGGUGGACUUCUCUCA	91	A-127924.1	UGAGAGAAGUCCACCACGAGUCU	307	250_272
AD-63982.2	A-127917.3	ACUCGUGGUGGACUUCTCUCA	92	A-127932.1	UGAGAGAAGUCCACCACGAGUCU	308	250_272
AD-63983.2	A-127944.1	ACUCGUGGUGGACUUCUCUCA	93	A-127940.2	UGAGAGAAGUCCACCACGAGUCU	309	250_272
AD-63985.2	A-127961.1	GUGGUGGACUUCUCUCAUUU	94	A-127956.4	AAAUUGAGAGAAGUCCACCACGA	310	254_276
AD-63986.2	A-127969.1	GUGGUGGACUUCUCUCAUUU	95	A-127956.12	AAAUUGAGAGAAGUCCACCACGA	311	254_276

Nome do Dúplex	Nome do Oligo Senso	Sequência Senso (5' a 3')	SE Q ID NO	Nome do Oligo Antissenso	Sequência Antissenso (5' a 3')	SE Q ID NO	Posição em NC_003977.1
AD-63987.2	A-127955.9	GUGGUGGACUUCUCUCAUUUU	96	A-127977.1	AAAUUGAGAGAAGUCCACCACGA	312	254_276
AD-63988.2	A-127986.1	UGGACUUCUCUCAUUUU	97	A-127987.1	AAAUUGAGAGAAGUCCACC	313	258_280
AD-63989.2	A-127996.1	GUGGUGGACUUCUCUCAUUUU	98	A-127992.2	AAAUUGAGAGAAGUCCACCACGA	314	254_276
AD-63990.2	A-127950.1	GGUGGACUUCUCUCAUUUUUU	99	A-127951.1	AAAUUGAGAGAAGUCCACCUU	315	256_278
AD-63991.2	A-127962.1	GUGGUGGACUUCUCUCAUUUU	100	A-127956.5	AAAUUGAGAGAAGUCCACCACGA	316	254_276
AD-63992.2	A-127955.2	GUGGUGGACUUCUCUCAUUUU	101	A-127970.1	AAAUUGAGAGAAGUCCACCACGA	317	254_276
AD-63993.2	A-127955.10	GUGGUGGACUUCUCUCAUUUU	102	A-127978.1	AAAUUGAGAGAAGUCCACCACGA	318	254_276
AD-63994.2	A-127984.2	GGUGGACUUCUCUCAUUUU	103	A-127988.1	AAAUUGAGAGAAGUCCACCAC	319	256_278
AD-63995.2	A-127996.2	GUGGUGGACUUCUCUCAUUUU	104	A-127993.2	AAAUUGAGAGAAGUCCACCACGA	320	254_276
AD-63996.2	A-127952.1	GGUGGACUUCUCUCAUUUU	105	A-127953.1	AAAUUGAGAGAAGUCCACCUU	321	256_278

Nome do Dúplex	Nome do Oligo Senso	Sequência Senso (5' a 3')	SE Q ID NO	Nome do Oligo Antissenso	Sequência Antissenso (5' a 3')	SE Q ID NO	Posição em NC_003977.1
AD-63997.2	A-127963.1	GUGGUGGACUUCUCUCAUUU	106	A-127956.6	AAAUUGAGAGAAGUCCACCACGA	322	254_276
AD-63999.2	A-127955.11	GUGGUGGACUUCUCUCAUUU	107	A-127979.1	AAAUUGAGAGAAGUCCACCACGA	323	254_276
AD-64000.2	A-127986.2	UGGACUUCUCUCAUUU	108	A-127989.1	AAAUUGAGAGAAGUCCACC	324	258_280
AD-64001.2	A-127996.3	GUGGUGGACUUCUCUCAUUU	109	A-127994.2	AAAUUGAGAGAAGUCCACCACGA	325	254_276
AD-64002.2	A-127952.2	GGUGGACUUCUCUCAUUU	110	A-127954.1	AAAUUGAGAGAAGUCCACCUU	326	256_278
AD-64003.2	A-127964.1	GUGGUGGACUUCUCUCAUUU	111	A-127956.7	AAAUUGAGAGAAGUCCACCACGA	327	254_276
AD-64004.2	A-127955.4	GUGGUGGACUUCUCUCAUUU	112	A-127972.1	AAAUUGAGAGAAGUCCACCACGA	328	254_276
AD-64005.2	A-127955.12	GUGGUGGACUUCUCUCAUUU	113	A-127980.1	AAAUUGAGAGAAGUCCACCACGA	329	254_276
AD-64006.2	A-127990.1	GUGGUGGACUUCUCUCAUUU	114	A-127991.1	AAAUUGAGAGAAGUCCACCACGA	330	254_276
AD-64007.2	A-127996.4	GUGGUGGACUUCUCUCAUUU	115	A-127995.2	AAAUUGAGAGAAGUCCACCACGA	331	254_276

Nome do Dúplex	Nome do Oligo Senso	Sequência Senso (5' a 3')	SE Q ID NO	Nome do Oligo Antissenso	Sequência Antissenso (5' a 3')	SE Q ID NO	Posição em NC_003977.1
AD-64008.2	A-127955.1	GUGGUGGACUUCUCUCAUUU	116	A-127956.1	AAAUUGAGAGAAGUCCACCACGA	332	254_276
AD-64008.4	A-127955.15	GUGGUGGACUUCUCUCAUUU	117	A-127956.14	AAAUUGAGAGAAGUCCACCACGA	333	254_276
AD-64009.2	A-127965.1	GUGGUGGACUUCUCUCAUUU	118	A-127956.8	AAAUUGAGAGAAGUCCACCACGA	334	254_276
AD-64010.2	A-127955.5	GUGGUGGACUUCUCUCAUUU	119	A-127973.1	AAAUUGAGAGAAGUCCACCACGA	335	254_276
AD-64011.2	A-127955.13	GUGGUGGACUUCUCUCAUUU	120	A-127981.1	AAAUUGAGAGAAGUCCACCACGA	336	254_276
AD-64012.2	A-127990.2	GUGGUGGACUUCUCUCAUUU	121	A-127992.1	AAAUUGAGAGAAGUCCACCACGA	337	254_276
AD-64013.2	A-127997.1	GUGGUGGACTTCUCUCAUUU	122	A-127998.1	AAAUUGAGAGAAGTCCACCACGA	338	254_276
AD-64014.2	A-127957.1	GUGGUGGACUUCUCUCAUUU	123	A-127958.1	AAAUUGAGAGAAGUCCACCACGA	339	254_276
AD-64015.2	A-127966.1	GUGGUGGACUUCUCUCAUUU	124	A-127956.9	AAAUUGAGAGAAGUCCACCACGA	340	254_276
AD-64016.2	A-127955.6	GUGGUGGACUUCUCUCAUUU	125	A-127974.1	AAAUUGAGAGAAGUCCACCACGA	341	254_276

Nome do Dúplex	Nome do Oligo Senso	Sequência Senso (5' a 3')	SE Q ID NO	Nome do Oligo Antissenso	Sequência Antissenso (5' a 3')	SE Q ID NO	Posição em NC_003977.1
AD-64017.2	A-127968.2	GUGGUGGACUTCUCUCAUUU	126	A-127982.1	AAAUUGAGAGAAGTCCACCACGA	342	254_276
AD-64018.2	A-127990.3	GUGGUGGACUUCUCUCAUUU	127	A-127993.1	AAAUUGAGAGAAGUCCACCACGA	343	254_276
AD-64019.2	A-127959.1	GUGGUGGACUUCUCUCAUUU	128	A-127956.2	AAAUUGAGAGAAGUCCACCACGA	344	254_276
AD-64020.2	A-127967.1	GUGGUGGACUUCUCUCAUUU	129	A-127956.10	AAAUUGAGAGAAGUCCACCACGA	345	254_276
AD-64021.2	A-127955.7	GUGGUGGACUUCUCUCAUUU	130	A-127975.1	AAAUUGAGAGAAGUCCACCACGA	346	254_276
AD-64022.2	A-127968.3	GUGGUGGACUTCUCUCAUUU	131	A-127983.1	AAAUUGAGAGAAGTCCACCACGA	347	254_276
AD-64023.2	A-127990.4	GUGGUGGACUUCUCUCAUUU	132	A-127994.1	AAAUUGAGAGAAGUCCACCACGA	348	254_276
AD-64024.2	A-127960.1	GUGGUGGACUUCUCUCAUUU	133	A-127956.3	AAAUUGAGAGAAGUCCACCACGA	349	254_276
AD-64025.2	A-127968.1	GUGGUGGACUTCUCUCAUUU	134	A-127956.11	AAAUUGAGAGAAGUCCACCACGA	350	254_276
AD-64026.2	A-127955.8	GUGGUGGACUUCUCUCAUUU	135	A-127976.1	AAAUUGAGAGAAGUCCACCACGA	351	254_276

Nome do Dúplex	Nome do Oligo Senso	Sequência Senso (5' a 3')	SE Q ID NO	Nome do Oligo Antissenso	Sequência Antissenso (5' a 3')	SE Q ID NO	Posição em NC_003977.1
AD-64027.2	A-127984.1	GGUGGACUUCUCUCAUUUU	136	A-127985.1	AAAUUGAGAGAAGUCCACCAC	352	256_278
AD-64028.2	A-127990.5	GUGGUGGACUUCUCUCAUUUU	137	A-127995.1	AAAUUGAGAGAAGUCCACCACGA	353	254_276
AD-64272.2	A-128001.2	GUGCACUUCGCUUACCUCUG	138	A-128002.2	CAGAGGUGAAGCGAAGUGCACA C	354	1577_1599
AD-64274.1	A-128363.1	GUUGACAAAAAUCCUCACAAU	139	A-128364.1	AUUGUGAGGAUUUUUGUCAACAA	355	215_237
AD-64275.1	A-128377.1	UGUUGACAAAAAUCCUCACAA	140	A-128378.1	UUGUGAGGAUUUUUGUCAACAA G	356	214_236
AD-64276.1	A-128393.1	GGUGGACUUCUCUCAUUUUUA	141	A-128394.1	UAAAAUUGAGAGAAGUCCACCAC	357	256_278
AD-64277.1	A-128407.1	UCUUUUGGAGUGUGGAUUCGA	142	A-128408.1	UCGAAUCCACACUCCAAAAGACA	358	2259_2281
AD-64277.1	A-128407.1	UCUUUUGGAGUGUGGAUUCGA	143	A-128408.1	UCGAAUCCACACUCCAAAAGACA	359	2259_2281
AD-64278.1	A-128423.1	ACUGUUCAAGCCUCCAAGCUA	144	A-128424.1	UAGCUUGGAGGCUUGAACAAGA C	360	1857_1879
AD-64279.1	A-128435.1	UCUGCCGAUCCAUAUCUGCGGA	145	A-128436.1	UCCGCAGUAUGGAUCGGCAGAG G	361	1255_1277

Nome do Dúplex	Nome do Oligo Senso	Sequência Senso (5' a 3')	SE Q ID NO	Nome do Oligo Antissenso	Sequência Antissenso (5' a 3')	SE Q ID NO	Posição em NC_003977.1
AD-64280.1	A-128379.1	AUGUGUCUGCGGCGUUUUAUA	146	A-128380.1	UAUAAAACGCCGCAGACACAUC	362	375_397
AD-64281.1	A-128395.1	CCCCGUCUGUGCCUUCUCAUA	147	A-128396.1	UAUGAGAAGGCACAGACGGGGA G	363	1545_1567
AD-64282.1	A-128409.1	GCCUAAUCAUCUCUUGUUCAU	148	A-128410.1	AUGAACAAGAGAUGAUUAGCGAG	364	1831_1853
AD-64283.1	A-128425.1	UCUAGACUCGUGGUGGACUUC	149	A-128426.1	GAAGUCCACCACGAGUCUAGACU	365	245_267
AD-64284.1	A-128437.1	CUGCCGAUCCAUACUGCGGAA	150	A-128438.1	UUCCGCAGUAUGGAUCGGCAGA G	366	1256_1278
AD-64285.1	A-128365.1	UUUUUCUUGUUGACAAAAUA	151	A-128366.1	UAUUUUUGUCAACAAGAAAAACC	367	207_229
AD-64286.1	A-128381.1	AUCUUCUUGUUGGUUCUUCUA	152	A-128382.1	UAGAAGAACCAACAAGAAGAUGA	368	426_448
AD-64289.1	A-128367.1	GUUUUUCUUGUUGACAAAAU	153	A-128368.1	AUUUUUUGUCAACAAGAAAAACCC	369	206_228
AD-64290.1	A-128383.1	CUGCCUAAUCAUCUCUUGUUA	154	A-128384.1	UAACAAGAGAUGAUUAGGCAGAG	370	1829_1851
AD-64291.1	A-128399.1	UCCUCACAAUACCACAGAGUA	155	A-128400.1	UACUCUGUGGUUUUGUGAGGAU U	371	226_248

Nome do Dúplex	Nome do Oligo Senso	Sequência Senso (5' a 3')	SE Q ID NO	Nome do Oligo Antissenso	Sequência Antissenso (5' a 3')	SE Q ID NO	Posição em NC_003977.1
AD-64292.1	A-128413.1	CUUGUUGACAAAAAUCCUCAA	156	A-128414.1	UUGAGGAUUUUUGUCAACAAGAA	372	212_234
AD-64293.1	A-128439.1	GCAACUUUUUCACCUCUGCCU	157	A-128440.1	AGGCAGAGGUGAAAAAGUUGCAU	373	1814_1836
AD-64294.1	A-128369.1	GGGAACAAGAGCUACAGCAUA	158	A-128370.1	UAUGCUGUAGCUCUUGUUCCCA A	374	2828_2850
AD-64295.1	A-128385.1	CGUGGUGGACUUCUCUCAAUU	159	A-128386.1	AAUUGAGAGAAGUCCACCAGCAG	375	253_275
AD-64297.1	A-128415.1	CUGCUGCUAUGCCUCAUCUUA	160	A-128416.1	UAAGAUGAGGCAUAGCAGCAGGA	376	411_433
AD-64298.1	A-128427.1	GUUGGAUGUGUCUGCGGCGU U	161	A-128428.1	AACGCCGCAGACACAUCCAACGA	377	370_392
AD-64299.1	A-128441.1	UUCAUCCUGCUGCUAUGCCUA	162	A-128442.1	UAGGCAUAGCAGCAGGAUGAAGA	378	405_427
AD-64300.1	A-128371.1	UUCUUGUUGACAAAAAUCCUA	163	A-128372.1	UAGGAUUUUUGUCAACAAGAAAA	379	210_232
AD-64302.1	A-128417.1	UAUAUGGAUGAUGUGGUAUUA	164	A-128418.1	UAAUACCACAUCAUCCAUAUAAC	380	734_756
AD-64303.1	A-128429.1	UUCAUCCUGCUGCUAUGCCUC	165	A-128430.1	GAGGCAUAGCAGCAGGAUGAAG A	381	405_427

Nome do Dúplex	Nome do Oligo Senso	Sequência Senso (5' a 3')	SE Q ID NO	Nome do Oligo Antissenso	Sequência Antissenso (5' a 3')	SE Q ID NO	Posição em NC_003977.1
AD-64304.1	A-128443.1	GUGCACUUCGCUUCACCUCUA	166	A-128444.1	UAGAGGUGAAGCGAAGUGCACA C	382	1577_1599
AD-64305.1	A-128373.1	UUGACAAAAUCCUCACAAUA	167	A-128374.1	UAUUGUGAGGAUUUUUGUCAACA	383	216_238
AD-64307.1	A-128403.1	AAGCCUCCAAGCUGUGCCUUA	168	A-128404.1	UAAGGCACAGCUUGGAGGCUUG A	384	1864_1886
AD-64308.1	A-128419.1	CCUCUUCAUCCUGCUGCUAUA	169	A-128420.1	UAUAGCAGCAGGAUGAAGAGGAA	385	401_423
AD-64309.1	A-128431.1	CCUGCUGCUAUGCCUCAUCUU	170	A-128432.1	AAGAUGAGGCAUAGCAGCAGGAU	386	410_432
AD-64310.1	A-128375.1	CAUCUUCUUGUUGGUUCUUCU	171	A-128376.1	AGAAGAACCAACAAGAAGAUGAG	387	425_447
AD-64311.1	A-128391.1	CCGUCUGUGCCUUCUCAUCUA	172	A-128392.1	UAGAUGAGAAGGCACAGACGGG G	388	1547_1569
AD-64312.1	A-128405.1	CCUCAUCUUCUUGUUGGUUCU	173	A-128406.1	AGAACCAACAAGAAGAUGAGGCA	389	422_444
AD-64313.1	A-128421.1	CCACCAAUGCCCCUAUCUUA	174	A-128422.1	UAAGAUAGGGGCAUUUGGUGGU C	390	2298_2320
AD-64314.1	A-128433.1	GCUCCUCUGCCGAUCCAUAUCU	175	A-128434.1	AGUAUGGAUCGGCAGAGGAGCC A	391	1250_1272

Nome do Dúplex	Nome do Oligo Senso	Sequência Senso (5' a 3')	SE Q ID NO	Nome do Oligo Antissenso	Sequência Antissenso (5' a 3')	SE Q ID NO	Posição em NC_003977.1
AD-64315.1	A-128363.2	GUUGACAAAAUCCUCACAAU	176	A-128445.1	AUUGUGAGGAUUUUUGUCAACAA	392	215_237
AD-64316.1	A-128377.2	UGUUGACAAAAUCCUCACAA	177	A-128453.1	UUGUGAGGAUUUUUGUCAACAA G	393	214_236
AD-64317.1	A-128393.2	GGUGGACUUCUCUCAAUUUUA	178	A-128461.1	UAAAAUUGAGAGAAGUCCACCAC	394	256_278
AD-64318.1	A-128407.2	UCUUUUGGAGUGUGGAUUCGA	179	A-128469.1	UCGAAUCCACACUCCAAAAGACA	395	2259_2281
AD-64318.1	A-128407.2	UCUUUUGGAGUGUGGAUUCGA	180	A-128469.1	UCGAAUCCACACUCCAAAAGACA	396	2259_2281
AD-64319.1	A-128423.2	ACUGUUCAAGCCUCCAAGCUA	181	A-128477.1	UAGCUUGGAGGCUUGAACAAGA C	397	1857_1879
AD-64320.1	A-128435.2	UCUGCCGAUCCAUACUGCGGA	182	A-128483.1	UCCGCAGUAUGGAUCGGCAGAG G	398	1255_1277
AD-64321.1	A-123463.3	AGUUUAUAUGGAUGAUGUGGUA	183	A-128446.1	UACCACAUCAUCCAUUAACUGA	399	731_753
AD-64322.1	A-128379.2	AUGUGUCUGCGGCGUUUUAUA	184	A-128454.1	UAUAAAACGCCGCAGACACAUCC	400	375_397
AD-64323.1	A-128395.2	CCCCGUCUGUGCCUUCUCAUA	185	A-128462.1	UAUGAGAAGGCACAGACGGGGA G	401	1545_1567

Nome do Dúplex	Nome do Oligo Senso	Sequência Senso (5' a 3')	SE Q ID NO	Nome do Oligo Antissenso	Sequência Antissenso (5' a 3')	SE Q ID NO	Posição em NC_003977.1
AD-64324.1	A-128409.2	GCCUAAUCAUCUCUUGUUCAU	186	A-128470.1	AUGAACAAGAGAUGAUUAGCGAG	402	1831_1853
AD-64325.1	A-128425.2	UCUAGACUCGUGGUGGACUUC	187	A-128478.1	GAAGUCCACCACGAGUCUAGACU	403	245_267
AD-64326.1	A-128437.2	CUGCCGAUCCAUAACUGCGGAA	188	A-128484.1	UUCCGCAGUAUGGAUCGGCAGAG	404	1256_1278
AD-64328.1	A-128381.2	AUCUUCUUGUUGGUUCUUCUA	189	A-128455.1	UAGAAGAACCAACAAGAAGAUGA	405	426_448
AD-64330.1	A-128411.2	UUCUCUCAAUUUUCUAGGGGA	190	A-128471.1	UCCCCUAGAAAAUUGAGAGAAGU	406	263_285
AD-64331.1	A-127905.16	ACUCGUGGUGGACUUCUCUCA	191	A-127907.2	UGAGAGAAGUCCACCACGAGUCU	407	250_272
AD-64332.1	A-128001.3	GUGCACUUCGCUUACCUCUG	192	A-128485.1	CAGAGGUGAAGCGAAGUGCACAC	408	1577_1599
AD-64333.1	A-128367.2	GUUUUUCUUGUUGACAAAAAU	193	A-128448.1	AUUUUUUGUCAACAAGAAAAACCC	409	206_228
AD-64334.1	A-128383.2	CUGCCUAAUCAUCUCUUGUUA	194	A-128456.1	UAACAAGAGAUGAUUAGGCAGAG	410	1829_1851
AD-64335.1	A-128399.2	UCCUCACAAUACCACAGAGUA	195	A-128464.1	UACUCUGUGGUUUUGUGAGGAUU	411	226_248

Nome do Dúplex	Nome do Oligo Senso	Sequência Senso (5' a 3')	SE Q ID NO	Nome do Oligo Antissenso	Sequência Antissenso (5' a 3')	SE Q ID NO	Posição em NC_003977.1
AD-64336.1	A-128413.2	CUUGUUGACAAAAUCCUCAA	196	A-128472.1	UUGAGGAUUUUUGUCAACAAGAA	412	212_234
AD-64337.1	A-127955.16	GUGGUGGACUUCUCUCAUUUU	197	A-127958.2	AAAUUGAGAGAAGUCCACCACGA	413	254_276
AD-64338.1	A-128439.2	GCAACUUUUUACACCUCUGCCU	198	A-128486.1	AGGCAGAGGUGAAAAAGUUGCAU	414	1814_1836
AD-64339.1	A-128369.2	GGGAACAAGAGCUACAGCAUA	199	A-128449.1	UAUGCUGUAGCUCUUGUUCCCA A	415	2828_2850
AD-64341.1	A-128401.2	UCAUCUUCUUGUUGGUUCUUA	200	A-128465.1	UAAGAACCAACAAGAAGAUGAGG	416	424_446
AD-64342.1	A-128415.2	CUGCUGCUAUGCCUCAUCUUA	201	A-128473.1	UAAGAUGAGGCAUAGCAGCAGGA	417	411_433
AD-64343.1	A-128427.2	GUUGGAUGUGUCUGCGGCGU U	202	A-128479.1	AACGCCGCAGACACAUCCAACGA	418	370_392
AD-64344.1	A-128441.2	UUCAUCCUGCUGCUAUGCCUA	203	A-128487.1	UAGGCAUAGCAGCAGGAUGAAGA	419	405_427
AD-64345.1	A-128371.2	UUCUUGUUGACAAAAUCCUA	204	A-128450.1	UAGGAUUUUUGUCAACAAGAAAA	420	210_232
AD-64347.1	A-123487.3	GGAUGUGUCUGCGGCGUUUUA	205	A-128466.1	UAAAACGCCGCAGACACAUCCAG	421	373_395

Nome do Dúplex	Nome do Oligo Senso	Sequência Senso (5' a 3')	SE Q ID NO	Nome do Oligo Antissenso	Sequência Antissenso (5' a 3')	SE Q ID NO	Posição em NC_003977.1
AD-64348.1	A-128417.2	UAUAUGGAUGAUGUGGUAUUA	206	A-128474.1	UAAUACCACAUCAUCCAUAUAAC	422	734_756
AD-64349.1	A-128429.2	UUCAUCCUGCUGCUAUGCCUC	207	A-128480.1	GAGGCAUAGCAGCAGGAUGAAG A	423	405_427
AD-64350.1	A-128443.2	GUGCACUUCGCUUACCUCUA	208	A-128488.1	UAGAGGUGAAGCGAAGUGCACA C	424	1577_1599
AD-64351.1	A-128373.2	UUGACAAAAUCCUCACAAUA	209	A-128451.1	UAUUGUGAGGAUUUUUGUCAACA	425	216_238
AD-64352.1	A-128389.2	CCAAGUGUUUGCUGACGCAAA	210	A-128459.1	UUUGCGUCAGCAAACACUUGGCA	426	1174_1196
AD-64352.1	A-128389.2	CCAAGUGUUUGCUGACGCAAA	211	A-128459.1	UUUGCGUCAGCAAACACUUGGCA	427	1174_1196
AD-64353.1	A-128403.2	AAGCCUCCAAGCUGUGCCUUA	212	A-128467.1	UAAGGCACAGCUUGGAGGCUUG A	428	1864_1886
AD-64354.1	A-128419.2	CCUCUUCAUCCUGCUGCUAUA	213	A-128475.1	UAUAGCAGCAGGAUGAAGAGGAA	429	401_423
AD-64355.1	A-128431.2	CCUGCUGCUAUGCCUCAUCUU	214	A-128481.1	AAGAUGAGGCAUAGCAGCAGGAU	430	410_432
AD-64356.1	A-128375.2	CAUCUUCUUGUUGGUUCUUCU	215	A-128452.1	AGAAGAACCAACAAGAAGAUGAG	431	425_447

Nome do Dúplex	Nome do Oligo Senso	Sequência Senso (5' a 3')	SE Q ID NO	Nome do Oligo Antissenso	Sequência Antissenso (5' a 3')	SE Q ID NO	Posição em NC_003977.1
AD-64357.1	A-128391.2	CCGUCUGUGCCUUCUCAUCUA	216	A-128460.1	UAGAUGAGAAGGCACAGACGGG G	432	1547_1569
AD-64358.1	A-128405.2	CCUCAUCUUCUUGUUGGUUCU	217	A-128468.1	AGAACCAACAAGAAGAUGAGGCA	433	422_444
AD-64359.1	A-128421.2	CCACCAAUGCCCCUAUCUUA	218	A-128476.1	UAAGAUAGGGGCAUUUGGUGGU C	434	2298_2320
AD-64360.1	A-128433.2	GCUCCUCUGCCGAUCCAUAUCU	219	A-128482.1	AGUAUGGAUCGGCAGAGGAGCC A	435	1250_1272
AD-64700.1	A-129379.1	ACUCGUGGUGTACUUCUCUCA	220	A-127906.26	UGAGAGAAGUCCACCACGAGUCU	436	250_272
AD-64701.1	A-127905.20	ACUCGUGGUGGACUUCUCUCA	221	A-129387.1	UGAGAGAAGTCCACCACGAGUCU	437	250_272
AD-64702.1	A-127905.28	ACUCGUGGUGGACUUCUCUCA	222	A-129395.1	UGAGAGAAGUCCACCACGAGUCU	438	250_272
AD-64703.1	A-129376.2	ACUCGUGGUGGACUUCACUCA	223	A-129385.5	UGAGAGAAGTCCACCACGAGUCU	439	250_272
AD-64704.1	A-129381.3	ACUCGUGGTGTACUUCACUCA	224	A-129389.6	UGAGAGAAGUCCACCACGAGUCU	440	250_272
AD-64705.1	A-129380.1	ACUCGUGGUGTACUUCACUCA	225	A-127906.27	UGAGAGAAGUCCACCACGAGUCU	441	250_272

Nome do Dúplex	Nome do Oligo Senso	Sequência Senso (5' a 3')	SE Q ID NO	Nome do Oligo Antissenso	Sequência Antissenso (5' a 3')	SE Q ID NO	Posição em NC_003977.1
AD-64706.1	A-127905.21	ACUCGUGGUGGACUUCUCUCA	226	A-129388.1	UGAGAGAAGUCCACCACGAGUCU	442	250_272
AD-64707.1	A-127905.29	ACUCGUGGUGGACUUCUCUCA	227	A-129396.1	UGAGAGAAGTCCACCACGAGUCU	443	250_272
AD-64708.1	A-129382.2	ACUCGUGGTGGACUUCTCUCA	228	A-129385.6	UGAGAGAAGTCCACCACGAGUCU	444	250_272
AD-64709.1	A-129373.4	ACUCGUGGUGGACUUCUCUCA	229	A-129391.2	UGAGAGAAGTCCACCACGAGUCU	445	250_272
AD-64710.1	A-129373.1	ACUCGUGGUGGACUUCUCUCA	230	A-127906.20	UGAGAGAAGUCCACCACGAGUCU	446	250_272
AD-64711.1	A-129381.1	ACUCGUGGTGTACUUCACUCA	231	A-127906.28	UGAGAGAAGUCCACCACGAGUCU	447	250_272
AD-64712.1	A-127905.22	ACUCGUGGUGGACUUCUCUCA	232	A-129389.1	UGAGAGAAGUCCACCACGAGUCU	448	250_272
AD-64713.1	A-127905.30	ACUCGUGGUGGACUUCUCUCA	233	A-129397.1	UGAGAGAAGTCCACCACGAGUCU	449	250_272
AD-64714.1	A-129384.2	ACUCGUGGTGGACUUCACUCA	234	A-129385.7	UGAGAGAAGTCCACCACGAGUCU	450	250_272
AD-64715.1	A-129376.4	ACUCGUGGUGGACUUCACUCA	235	A-129391.3	UGAGAGAAGTCCACCACGAGUCU	451	250_272

Nome do Dúplex	Nome do Oligo Senso	Sequência Senso (5' a 3')	SE Q ID NO	Nome do Oligo Antissenso	Sequência Antissenso (5' a 3')	SE Q ID NO	Posição em NC_003977.1
AD-64716.1	A-129374.1	ACUCGUGGUGGACUUCUCUCA	236	A-127906.21	UGAGAGAAGUCCACCACGAGUCU	452	250_272
AD-64717.1	A-129382.1	ACUCGUGGTGGACUUCTCUCA	237	A-127906.29	UGAGAGAAGUCCACCACGAGUCU	453	250_272
AD-64718.1	A-127905.23	ACUCGUGGUGGACUUCUCUCA	238	A-129390.1	UGAGAGAAGUCCACCACGAGUCU	454	250_272
AD-64719.1	A-127917.5	ACUCGUGGUGGACUUCTCUCA	239	A-129385.2	UGAGAGAAGTCCACCACGAGUCU	455	250_272
AD-64720.1	A-129381.2	ACUCGUGGTGTACUUCACUCA	240	A-129385.8	UGAGAGAAGTCCACCACGAGUCU	456	250_272
AD-64721.1	A-129382.4	ACUCGUGGTGGACUUCTCUCA	241	A-129391.4	UGAGAGAAGTCCACCACGAGUCU	457	250_272
AD-64722.1	A-129375.1	ACUCGUGGUGGACUUCCUCA	242	A-127906.22	UGAGAGAAGUCCACCACGAGUCU	458	250_272
AD-64723.1	A-129383.1	ACUCGUGGUGGACUUCTCUCA	243	A-127906.30	UGAGAGAAGUCCACCACGAGUCU	459	250_272
AD-64725.1	A-127917.6	ACUCGUGGUGGACUUCTCUCA	244	A-129398.1	UGAGAGAAGTCCACCACGAGUCU	460	250_272
AD-64726.1	A-129373.3	ACUCGUGGUGGACUUCUCUCA	245	A-129389.2	UGAGAGAAGUCCACCACGAGUCU	461	250_272

Nome do Dúplex	Nome do Oligo Senso	Sequência Senso (5' a 3')	SE Q ID NO	Nome do Oligo Antissenso	Sequência Antissenso (5' a 3')	SE Q ID NO	Posição em NC_003977.1
AD-64727.1	A-129384.4	ACUCGUGGTGGACUUCACUCA	246	A-129391.5	UGAGAGAAGTCCACCACGAGUCU	462	250_272
AD-64728.1	A-129376.1	ACUCGUGGUGGACUUCACUCA	247	A-127906.23	UGAGAGAAGUCCACCACGAGUCU	463	250_272
AD-64729.1	A-129384.1	ACUCGUGGTGGACUUCACUCA	248	A-127906.31	UGAGAGAAGUCCACCACGAGUCU	464	250_272
AD-64730.1	A-127905.25	ACUCGUGGUGGACUUCUCUCA	249	A-129392.1	UGAGAGAAGTCCACCACGAGUCU	465	250_272
AD-64731.1	A-129399.1	ACUCGUGGUGGACUUCTCUCA	250	A-129385.3	UGAGAGAAGTCCACCACGAGUCU	466	250_272
AD-64732.1	A-129376.3	ACUCGUGGUGGACUUCACUCA	251	A-129389.3	UGAGAGAAGUCCACCACGAGUCU	467	250_272
AD-64733.1	A-129381.4	ACUCGUGGTGTACUUCACUCA	252	A-129391.6	UGAGAGAAGTCCACCACGAGUCU	468	250_272
AD-64734.1	A-129377.1	ACUCGUGGUGGACUUCCCUCA	253	A-127906.24	UGAGAGAAGUCCACCACGAGUCU	469	250_272
AD-64735.1	A-127905.18	ACUCGUGGUGGACUUCUCUCA	254	A-129385.1	UGAGAGAAGTCCACCACGAGUCU	470	250_272
AD-64736.1	A-127905.26	ACUCGUGGUGGACUUCUCUCA	255	A-129393.1	UGAGAGAAGTCCACCACGAGUCU	471	250_272

Nome do Dúplex	Nome do Oligo Senso	Sequência Senso (5' a 3')	SE Q ID NO	Nome do Oligo Antissenso	Sequência Antissenso (5' a 3')	SE Q ID NO	Posição em NC_003977.1
AD-64737.1	A-129399.2	ACUCGUGGUGGACUUCTCUCA	256	A-129398.2	UGAGAGAAGTCCACCACGAGUCU	472	250_272
AD-64738.1	A-129382.3	ACUCGUGGTGGACUUCTCUCA	257	A-129389.4	UGAGAGAAGUCCACCACGAGUCU	473	250_272
AD-64739.1	A-129378.1	ACUCGUGGUGGACUUCGCUCA	258	A-127906.25	UGAGAGAAGUCCACCACGAGUCU	474	250_272
AD-64740.1	A-127905.19	ACUCGUGGUGGACUUCUCUCA	259	A-129386.1	UGAGAGAAGTCCACCACGAGUCU	475	250_272
AD-64741.1	A-127905.27	ACUCGUGGUGGACUUCUCUCA	260	A-129394.1	UGAGAGAAGTCCACCACGAGUCU	476	250_272
AD-64742.1	A-129373.2	ACUCGUGGUGGACUUCUCUCA	261	A-129385.4	UGAGAGAAGTCCACCACGAGUCU	477	250_272
AD-64743.1	A-129384.3	ACUCGUGGTGGACUUCACUCA	262	A-129389.5	UGAGAGAAGUCCACCACGAGUCU	478	250_272

Tabela 4. Sequências Modificadas de Fitas Senso e Antissenso de dsRNAs de HBV

Nome do Dúplex	Nome do Oligo Senso	Sequência Senso (5' a 3')	SE Q ID NO:	Nome do Oligo Antissenso	Sequência Antissenso (5' a 3')	SE Q ID NO:
AD-61522.2	A-123463.2	AfsgsUfuAfuAfuGfGfAfuGfaUfgUfgGfuAfl96	479	A-123464.2	usAfscCfaCfaUfcAfuccAfuAfuAfaCfusgsa	694
AD-61547.2	A-123487.2	GfsgsAfuGfuGfuCfUfGfGfgCfgUfuUfuAfl96	480	A-123488.2	usAfsaAfaCfgCfcGfcagAfcAfcAfuCfcsasg	695
AD-63938.2	A-127896.1	Y44ACUCGUGGUGGACUUCUCUCA	481	A-127897.1	UGAGAGAAGUCCACCACGAGUCU	696
AD-63939.2	A-127909.1	ascsucGfuGfgUfGfGfaCfuucUfcucaL96	482	A-127906.3	usGfsaGfaGfaAfgUfccacfcAfcGfaGfuscsu	697
AD-63940.2	A-127917.1	ascsucguggugdGacuuc(Tgn)cucaL96	483	A-127906.11	usGfsaGfaGfaAfgUfccacfcAfcGfaGfuscsu	698
AD-63941.2	A-127905.8	AfscsUfcGfuGfgUfGfGfaCfuUfcUfcUfcAfl96	484	A-127925.1	usGfsaGfagaAfguccaCfcAfcgaGfuscsu	699
AD-63942.2	A-127933.1	uscsGfuGfgUfGfGfaCfuUfcUfcUfcAfl96	485	A-127934.1	usGfsaGfaGfaAfgUfccacfcAfcGfasgsu	700
AD-63943.2	A-127944.2	ascsucGfuGfgUfGfGfaCfuucucucaL96	486	A-127942.2	usGfsAfgaGfaAfgUfccacfcAfcGfaguscsu	701
AD-63945.2	A-127910.1	ascsucguGfgUfGfGfaCfuucUfcucaL96	487	A-127906.4	usGfsaGfaGfaAfgUfccacfcAfcGfaGfuscsu	702

Nome do Dúplex	Nome do Oligo Senso	Sequência Senso (5' a 3')	SE Q ID NO:	Nome do Oligo Antissenso	Sequência Antissenso (5' a 3')	SE Q ID NO:
AD-63946.2	A-127918.1	ascsucguGfgUfGfGfacuuCfucucaL96	488	A-127906.12	usGfsaGfaGfaAfgUfccacfcAfcGfaGfuscsu	703
AD-63947.2	A-127905.9	AfscsUfcGfuGfgUfGfGfaCfuUfcUfcUfcAfL96	489	A-127926.1	usGfsaGfagaagUfccacfcAfcgaGfuscsu	704
AD-63948.2	A-127935.1	gsusGfgUfGfGfaCfuUfcUfcUfcAfL96	490	A-127936.1	usGfsaGfaGfaAfgUfccacfcAfcsgsa	705
AD-63949.2	A-127944.3	ascsucGfuGfgUfGfGfaCfuucucucaL96	491	A-127906.14	usGfsaGfaGfaAfgUfccacfcAfcGfaGfuscsu	706
AD-63950.2	A-127900.1	Y44UfcGfuGfgUfGfGfaCfuUfcUfcUfcAfusuY44	492	A-127901.1	usGfsasGfaGfaAfgUfcCfaCfcAfcGfausu	707
AD-63951.2	A-127911.1	ascsucguGfgUfGfGfaCfuucucucaL96	493	A-127906.5	usGfsaGfaGfaAfgUfccacfcAfcGfaGfuscsu	708
AD-63952.2	A-127905.2	AfscsUfcGfuGfgUfGfGfaCfuUfcUfcUfcAfL96	494	A-127919.1	usGfsaGfaGfaagUfccacfcAfcGfaGfuscsu	709
AD-63953.2	A-127905.10	AfscsUfcGfuGfgUfGfGfaCfuUfcUfcUfcAfL96	495	A-127927.1	usGfsagagaAfgUfccacfcAfcgaguscusu	710
AD-63955.2	A-127945.1	ascsucgugguGfGfacuucucucaL96	496	A-127940.3	usGfsAfgAfgAfaGfuccaCfCfaCfGafguscusu	711
AD-63956.2	A-127902.1	Y44uscsGfuGfgUfGfGfaCfuUfcUfcUfcAfY44	497	A-127903.1	usGfsaGfaGfaAfgUfcCfaCfcAfcGfasusu	712

Nome do Dúplex	Nome do Oligo Senso	Sequência Senso (5' a 3')	SE Q ID NO:	Nome do Oligo Antissenso	Sequência Antissenso (5' a 3')	SE Q ID NO:
AD-63957.2	A-127912.1	ascsucguGfgUfGfGfacuucucucaL96	498	A-127906.6	usGfsaGfaGfaAfgUfccaCfcAfcGfaGfuscsu	713
AD-63958.2	A-127905.3	AfscsUfcGfuGfgUfGfGfaCfuUfcUfcUfcAfL96	499	A-127920.1	usGfsagaGfaAfgUfccaCfcAfcgaGfuscsu	714
AD-63959.2	A-127905.11	AfscsUfcGfuGfgUfGfGfaCfuUfcUfcUfcAfL96	500	A-127928.1	usGfsaGfagaAfguccaCfcAfcgaguscsu	715
AD-63960.2	A-126619.2	usasUfuUfCfCfuAfgGfgUfaCfaAfL96	501	A-127938.1	PusGfsaGfaGfaAfgUfccaCfcAfcsgsa	716
AD-63961.2	A-127945.2	ascsucgugguGfGfacuucucucaL96	502	A-127942.3	usGfsAfgaGfaAfgUfccaCfcAfcGfaguscsu	717
AD-63962.2	A-127902.2	Y44uscsGfuGfgUfgGfaCfuUfcUfcUfcAfY44	503	A-127904.1	PusGfsaGfaGfaAfgUfcCfaCfcAfcGfasusu	718
AD-63963.2	A-127913.1	ascsucguggUfgGfacuucucucaL96	504	A-127906.7	usGfsaGfaGfaAfgUfccaCfcAfcGfaGfuscsu	719
AD-63964.2	A-127905.4	AfscsUfcGfuGfgUfGfGfaCfuUfcUfcUfcAfL96	505	A-127921.1	usGfsaGfaGfaAfgUfccaCfcAfcgaguscsu	720
AD-63965.2	A-127905.12	AfscsUfcGfuGfgUfGfGfaCfuUfcUfcUfcAfL96	506	A-127929.1	usGfsagaGfaaGfuccaCfcAfcgaguscsu	721
AD-63966.2	A-127939.1	ascsUfcGfugguGfGfaCfuUfcUfcUfcAfL96	507	A-127940.1	usGfsAfgAfgAfaGfuccaCfCfaCfgAfguscsu	722

Nome do Dúplex	Nome do Oligo Senso	Sequência Senso (5' a 3')	SE Q ID NO:	Nome do Oligo Antissenso	Sequência Antissenso (5' a 3')	SE Q ID NO:
AD-63967.2	A-127945.3	ascsucgugguGfGfacuucucucaL96	508	A-127906.15	usGfsaGfaGfaAfgUfccaCfcAfcGfaGfuscsu	723
AD-63968.2	A-127905.1	AfscsUfcGfuGfgUfGfGfaCfuUfcUfcUfcAfL96	509	A-127906.1	usGfsaGfaGfaAfgUfccaCfcAfcGfaGfuscsu	724
AD-63968.4	A-127905.15	AfscsUfcGfuGfgUfGfGfaCfuUfcUfcUfcAfL96	510	A-127906.17	usGfsaGfaGfaAfgUfccaCfcAfcGfaGfuscsu	725
AD-63968.5	A-127905.17	AfscsUfcGfuGfgUfGfGfaCfuUfcUfcUfcAfL96	511	A-127906.18	usGfsaGfaGfaAfgUfccaCfcAfcGfaGfuscsu	726
AD-63969.2	A-127914.1	ascsucguggugGfacuucucucaL96	512	A-127906.8	usGfsaGfaGfaAfgUfccaCfcAfcGfaGfuscsu	727
AD-63970.2	A-127905.5	AfscsUfcGfuGfgUfGfGfaCfuUfcUfcUfcAfL96	513	A-127922.1	usGfsagaGfaagUfccaCfcAfcgaGfuscsu	728
AD-63971.2	A-127905.13	AfscsUfcGfuGfgUfGfGfaCfuUfcUfcUfcAfL96	514	A-127930.1	usGfsagaGfaaguccaCfcAfcgaguscusu	729
AD-63972.2	A-127941.1	ascsUfcGfuGfgUfGfGfaCfuUfcUfcUfcAfL96	515	A-127942.1	usGfsAfgaGfaAfgUfccaCfcAfcGfaguscusu	730
AD-63973.2	A-127946.1	ascsucguggudGdGacuucucucaL96	516	A-127947.1	usdGsaGfaGfaAfgdTccadCcAfcGfaguscusu	731
AD-63975.2	A-127915.1	ascsucguggUfgGfacuuc(Tgn)cucaL96	517	A-127906.9	usGfsaGfaGfaAfgUfccaCfcAfcGfaGfuscsu	732

Nome do Dúplex	Nome do Oligo Senso	Sequência Senso (5' a 3')	SE Q ID NO:	Nome do Oligo Antissenso	Sequência Antissenso (5' a 3')	SE Q ID NO:
AD-63976.2	A-127905.6	AfscsUfcGfuGfgUfGfGfaCfuUfcUfcAfL96	518	A-127923.1	usGfsagaGfaAfgUfccaCfcAfcgaguscsu	733
AD-63977.2	A-127917.2	ascsucguggugdGacuuc(Tgn)cucal96	519	A-127931.1	usdGsagagaaguccadCcacgaguscsu	734
AD-63978.2	A-127943.1	ascsUfcGfuGfgUfGfGfaCfuUfcUfcUfcaL96	520	A-127906.13	usGfsaGfaGfaAfgUfccaCfcAfcGfaGfusc u	735
AD-63979.2	A-127908.1	ascsucGfuGfgUfGfGfaCfuucUfcucAfL96	521	A-127906.2	usGfsaGfaGfaAfgUfccaCfcAfcGfaGfusc u	736
AD-63980.2	A-127916.1	ascsucguggugGfacuuc(Tgn)cucal96	522	A-127906.10	usGfsaGfaGfaAfgUfccaCfcAfcGfaGfusc u	737
AD-63981.2	A-127905.7	AfscsUfcGfuGfgUfGfGfaCfuUfcUfcAfL96	523	A-127924.1	usGfsaGfagaAfgUfccaCfcAfcgaGfusc u	738
AD-63982.2	A-127917.3	ascsucguggugdGacuuc(Tgn)cucal96	524	A-127932.1	PusdGsagagaaguccadCcacgaguscsu	739
AD-63983.2	A-127944.1	ascsucGfuGfgUfGfGfaCfuucucucal96	525	A-127940.2	usGfsAfgAfgAfaGfuccaCfCfaCfGafgusc u	740
AD-63985.2	A-127961.1	gsusggugGfaCfUfUfcUfcucAfauuuL96	526	A-127956.4	asAfsaUfuGfaGfaGfaagUfcCfaCfcAfcsgs a	741
AD-63986.2	A-127969.1	gsusggugGfaCfUfUfcucuCfaauuuL96	527	A-127956.12	asAfsaUfuGfaGfaGfaagUfcCfaCfcAfcsgs a	742

Nome do Dúplex	Nome do Oligo Senso	Sequência Senso (5' a 3')	SE Q ID NO:	Nome do Oligo Antissenso	Sequência Antissenso (5' a 3')	SE Q ID NO:
AD-63987.2	A-127955.9	GfsusGfgUfgGfaCfUfUfcUfcAfaUfuUfL96	528	A-127977.1	asAfsaUfugagaGfaagUfcCfaccAfcsgsa	743
AD-63988.2	A-127986.1	usgsGfaCfUfUfcUfcAfaUfuUfL96	529	A-127987.1	asAfsaUfuGfaGfaGfaagUfcCfascsc	744
AD-63989.2	A-127996.1	gsusgguggacUfUfcucucauuuL96	530	A-127992.2	asAfsAfUfuGfaGfaGfaagUfcCfaCfcacsgs a	745
AD-63990.2	A-127950.1	Y44GfgUfgGfaCfuUfcUfcUfcAfaUfuUfusuY 44	531	A-127951.1	asAfsasUfuGfaGfaGfaAfgUfcCfaCfcusu	746
AD-63991.2	A-127962.1	gsusggugGfaCfUfUfcUfcucucauuuL96	532	A-127956.5	asAfsaUfuGfaGfaGfaagUfcCfaCfcAfcsgs a	747
AD-63992.2	A-127955.2	GfsusGfgUfgGfaCfUfUfcUfcUfcAfaUfuUfL96	533	A-127970.1	asAfsaUfuGfagaGfaagUfcCfaCfcAfcsgsa	748
AD-63993.2	A-127955.10	GfsusGfgUfgGfaCfUfUfcUfcUfcAfaUfuUfL96	534	A-127978.1	asAfsauugaGfaGfaagUfcCfaccacsgsa	749
AD-63994.2	A-127984.2	gsgUfgGfaCfUfUfcUfcUfcAfaUfuUfL96	535	A-127988.1	PasAfsaUfuGfaGfaGfaagUfcCfaCfcsasc	750
AD-63995.2	A-127996.2	gsusgguggacUfUfcucucauuuL96	536	A-127993.2	asAfsAfuuGfaGfaGfaagUfcCfcaCfcacsgsa	751
AD-63996.2	A-127952.1	Y44gsgsUfgGfaCfuUfcUfcUfcAfaUfuUfY44	537	A-127953.1	asAfsaUfuGfaGfaGfaAfgUfcCfaCfcsusu	752

Nome do Dúplex	Nome do Oligo Senso	Sequência Senso (5' a 3')	SE Q ID NO:	Nome do Oligo Antissenso	Sequência Antissenso (5' a 3')	SE Q ID NO:
AD-63997.2	A-127963.1	gsusggugGfaCfUfUfcucucauuuL96	538	A-127956.6	asAfsaUfuGfaGfaGfaagUfcCfaCfcAfcsgsa	753
AD-63999.2	A-127955.11	GfsusGfgUfgGfaCfUfUfcUfcUfcAfaUfuUfL96	539	A-127979.1	asAfsaUfugaGfagaagUfcCfaccacsgsa	754
AD-64000.2	A-127986.2	usgsGfaCfUfUfcUfcUfcAfaUfuUfL96	540	A-127989.1	PasAfsaUfuGfaGfaGfaagUfcCfascsc	755
AD-64001.2	A-127996.3	gsusgguggacUfUfcucucauuuL96	541	A-127994.2	asAfsAfUfuGfaGfaGfaagUfcCfaCfcacsgsa	756
AD-64002.2	A-127952.2	Y44gsgsUfgGfaCfuUfcUfcUfcAfaUfuUfY44	542	A-127954.1	PasAfsaUfuGfaGfaGfaAfgUfcCfaCfcsusu	757
AD-64003.2	A-127964.1	gsusgguggaCfuUfcucucauuuL96	543	A-127956.7	asAfsaUfuGfaGfaGfaagUfcCfaCfcAfcsgsa	758
AD-64004.2	A-127955.4	GfsusGfgUfgGfaCfUfUfcUfcUfcAfaUfuUfL96	544	A-127972.1	asAfsaUfuGfaGfaGfaagUfcCfaccacsgsa	759
AD-64005.2	A-127955.12	GfsusGfgUfgGfaCfUfUfcUfcUfcAfaUfuUfL96	545	A-127980.1	asAfsauuGfagAfgaagUfcCfaccacsgsa	760
AD-64006.2	A-127990.1	gsusGfgugGfaCfUfUfcUfcUfcAfaUfuL96	546	A-127991.1	asAfsaUfuGfaGfaGfaagUfcCfaCfcacsgsa	761
AD-64007.2	A-127996.4	gsusgguggacUfUfcucucauuuL96	547	A-127995.2	asAfsAfUfugaGfaGfaagUfcCfaCfcacsgsa	762

Nome do Dúplex	Nome do Oligo Senso	Sequência Senso (5' a 3')	SE Q ID NO:	Nome do Oligo Antissenso	Sequência Antissenso (5' a 3')	SE Q ID NO:
AD-64008.2	A-127955.1	GfsusGfgUfgGfaCfUfUfcUfcAfaUfuUfL96	548	A-127956.1	asAfsaUfuGfaGfaGfaagUfcCfaCfcAfcsgs a	763
AD-64008.4	A-127955.15	GfsusGfgUfgGfaCfUfUfcUfcAfaUfuUfL96	549	A-127956.14	asAfsaUfuGfaGfaGfaagUfcCfaCfcAfcsgs a	764
AD-64009.2	A-127965.1	gsusgguggacuUfcucucauuuL96	550	A-127956.8	asAfsaUfuGfaGfaGfaagUfcCfaCfcAfcsgs a	765
AD-64010.2	A-127955.5	GfsusGfgUfgGfaCfUfUfcUfcAfaUfuUfL96	551	A-127973.1	asAfsauuGfagaGfaagUfcCfaccAfcsgsa	766
AD-64011.2	A-127955.13	GfsusGfgUfgGfaCfUfUfcUfcAfaUfuUfL96	552	A-127981.1	asAfsauuGfagagaagUfcCfaccacsgsa	767
AD-64012.2	A-127990.2	gsusGfgugGfaCfUfUfcUfcAfaUfuL96	553	A-127992.1	asAfsAfUfuGfaGfaGfaagUfcCfaCfcacsgs a	768
AD-64013.2	A-127997.1	gsusgguggacdTdTcucucauuuL96	554	A-127998.1	asdAsAfuugaGfaGfaagdTdCcaCfcacsgsa	769
AD-64014.2	A-127957.1	Y44GfsusGfgUfgGfaCfUfUfcUfcAfaUfuUfL96	555	A-127958.1	PasAfsaUfuGfaGfaGfaagUfcCfaCfcAfcsg sa	770
AD-64015.2	A-127966.1	gsusgguggaCfuUfcucuc(Agn)auuuL96	556	A-127956.9	asAfsaUfuGfaGfaGfaagUfcCfaCfcAfcsgs a	771
AD-64016.2	A-127955.6	GfsusGfgUfgGfaCfUfUfcUfcAfaUfuUfL96	557	A-127974.1	asAfsauuGfaGfaGfaagUfcCfaccacsgsa	772

Nome do Dúplex	Nome do Oligo Senso	Sequência Senso (5' a 3')	SE Q ID NO:	Nome do Oligo Antissenso	Sequência Antissenso (5' a 3')	SE Q ID NO:
AD-64017.2	A-127968.2	gsusgguggacudTcucuc(Agn)auuuL96	558	A-127982.1	asdAsauugagagaagdTccaccacsgsa	773
AD-64018.2	A-127990.3	gsusGfgugGfaCfUfUfcUfcAfaUfuL96	559	A-127993.1	asAfsAfuUGfaGfaGfaagUfCfcaCfcacsgsa	774
AD-64019.2	A-127959.1	gsusggUfgGfaCfUfUfcUfcAfaUfuL96	560	A-127956.2	asAfsaUfuGfaGfaGfaagUfCfcaCfcAfcsgs a	775
AD-64020.2	A-127967.1	gsusgguggacuUfcucuc(Agn)auuuL96	561	A-127956.10	asAfsaUfuGfaGfaGfaagUfCfcaCfcAfcsgs a	776
AD-64021.2	A-127955.7	GfsusGfgUfgGfaCfUfUfcUfcAfaUfuL96	562	A-127975.1	asAfsaUfugaGfaGfaagUfCfaccAfcsgsa	777
AD-64022.2	A-127968.3	gsusgguggacudTcucuc(Agn)auuuL96	563	A-127983.1	PasdAsauugagagaagdTccaccacsgsa	778
AD-64023.2	A-127990.4	gsusGfgugGfaCfUfUfcUfcAfaUfuL96	564	A-127994.1	asAfsAfUfuGfaGfaGfaagUfCfcaCfcacsgs a	779
AD-64024.2	A-127960.1	gsusggUfgGfaCfUfUfcUfcAfaUfuL96	565	A-127956.3	asAfsaUfuGfaGfaGfaagUfCfcaCfcAfcsgs a	780
AD-64025.2	A-127968.1	gsusgguggacudTcucuc(Agn)auuuL96	566	A-127956.11	asAfsaUfuGfaGfaGfaagUfCfcaCfcAfcsgs a	781
AD-64026.2	A-127955.8	GfsusGfgUfgGfaCfUfUfcUfcAfaUfuL96	567	A-127976.1	asAfsaUfugaGfagaagUfCfaccAfcsgsa	782

Nome do Dúplex	Nome do Oligo Senso	Sequência Senso (5' a 3')	SE Q ID NO:	Nome do Oligo Antissenso	Sequência Antissenso (5' a 3')	SE Q ID NO:
AD-64027.2	A-127984.1	gsgUfgGfaCfUfUfcUfcAfaUfuUfL96	568	A-127985.1	asAfsaUfuGfaGfaGfaagUfcCfaCfcsasc	783
AD-64028.2	A-127990.5	gsusGfgugGfaCfUfUfcUfcUfcAfaUfuL96	569	A-127995.1	asAfsAfUfugaGfaGfaagUfCfcaCfcacsgsa	784
AD-64272.2	A-128001.2	GfsusGfcAfcUfuCfGfCfuUfcAfcCfuCfuGfL96	570	A-128002.2	csAfsgAfgGfuGfaAfgcgAfaGfuGfcAfcsasc	785
AD-64274.1	A-128363.1	GfsusUfgAfcAfaAfAfAfUfcUfcAfcAfaUfL96	571	A-128364.1	asUfsuGfuGfaGfgAfuuuUfuGfuCfaAfcsasa	786
AD-64275.1	A-128377.1	UfsgsUfuGfaCfaAfAfAfaUfcCfuCfaCfaAfL96	572	A-128378.1	usUfsgUfgAfgGfaUfuuuUfgUfcAfaCfasasg	787
AD-64276.1	A-128393.1	GfsgsUfgGfaCfuUfCfUfcUfcAfaUfuUfuAfL96	573	A-128394.1	usAfsaAfaUfuGfaGfagaAfgUfcCfaCfcsasc	788
AD-64277.1	A-128407.1	UfscsUfuUfuGfgAfGfUfgUfgGfaUfuCfgAfL96	574	A-128408.1	usCfsgAfaUfcCfaCfacuCfcAfaAfaGfascsa	789
AD-64277.1	A-128407.1	UfscsUfuUfuGfgAfGfUfgUfgGfaUfuCfgAfL96	575	A-128408.1	usCfsgAfaUfcCfaCfacuCfcAfaAfaGfascsa	790
AD-64278.1	A-128423.1	AfscsUfgUfuCfaAfGfCfcUfcCfaAfgCfuAfL96	576	A-128424.1	usAfsgCfuUfgGfaGfgcuUfgAfaCfaAfgsas	791
AD-64279.1	A-128435.1	UfscsUfgCfcGfaUfCfCfaUfaCfuGfcGfgAfL96	577	A-128436.1	usCfscGfcAfgUfaUfggaUfcGfgCfaGfasgsg	792

Nome do Dúplex	Nome do Oligo Senso	Sequência Senso (5' a 3')	SE Q ID NO:	Nome do Oligo Antissenso	Sequência Antissenso (5' a 3')	SE Q ID NO:
AD-64280.1	A-128379.1	AfsusGfuGfuCfuGfCfGfgCfgUfuUfuAfuAfL96	578	A-128380.1	usAfsuAfaAfaCfgCfcgcAfgAfcAfcAfuscsc	793
AD-64281.1	A-128395.1	CfscsCfcGfuCfuGfUfGfcCfuUfcUfcAfuAfL96	579	A-128396.1	usAfsuGfaGfaAfgGfcacAfgAfcGfgGfgsasg	794
AD-64282.1	A-128409.1	GfscsCfuAfaUfcAfUfCfuCfuUfgUfuCfaUfL96	580	A-128410.1	asUfsgAfaCfaAfgAfgauGfaUfuAfgCfgsasg	795
AD-64283.1	A-128425.1	UfscsUfaGfaCfuCfGfUfgGfuGfgAfcUfuCfL96	581	A-128426.1	gsAfsaGfuCfcAfcCfacgAfgUfcUfaGfascsu	796
AD-64284.1	A-128437.1	CfsusGfcCfGfuCfCfAfuAfcUfgCfGfaAfL96	582	A-128438.1	usUfscCfGfaGfuAfuggAfuCfGfcAfgsasg	797
AD-64285.1	A-128365.1	UfsusUfuUfcUfuGfUfUfgAfcAfaAfaAfuAfL96	583	A-128366.1	usAfsuUfuUfuGfuCfaacAfaGfaAfaAfacscsc	798
AD-64286.1	A-128381.1	AfsusCfuUfcUfuGfUfUfgGfuUfcUfuCfuAfL96	584	A-128382.1	usAfsgAfaGfaAfcCfaacAfaGfaAfgAfusgsa	799
AD-64289.1	A-128367.1	GfsusUfuUfuCfuUfGfUfuGfaCfaAfaAfaUfL96	585	A-128368.1	asUfsuUfuUfgUfcAfacaAfgAfaAfaAfcscsc	800
AD-64290.1	A-128383.1	CfsusGfcCfuAfaUfCfAfuCfuCfuUfgUfuAfL96	586	A-128384.1	usAfsaCfaAfgAfgAfugaUfuAfgGfcAfgsasg	801
AD-64291.1	A-128399.1	UfscsCfuCfaCfaAfUfAfcCfaCfaGfaGfuAfL96	587	A-128400.1	usAfscUfcUfgUfgGfuauUfgUfgAfgGfasusu	802

Nome do Dúplex	Nome do Oligo Senso	Sequência Senso (5' a 3')	SE Q ID NO:	Nome do Oligo Antissenso	Sequência Antissenso (5' a 3')	SE Q ID NO:
AD-64292.1	A-128413.1	CfsusUfgUfuGfaCfAfAfaAfaUfcCfuCfaAfL96	588	A-128414.1	usUfsgAfgGfaUfuUfuugUfcAfaCfaAfgsas a	803
AD-64293.1	A-128439.1	GfscsAfaCfuUfuUfUfCfaCfcUfcUfgCfcUfL96	589	A-128440.1	asGfsgCfaGfaGfgUfgaaAfaAfgUfuGfcsas u	804
AD-64294.1	A-128369.1	GfsgsGfaAfcAfaGfAfGfcUfaCfaGfcAfuAfL96	590	A-128370.1	usAfsuGfcUfgUfaGfcucUfuGfuUfcCfcsas a	805
AD-64295.1	A-128385.1	CfsgsUfgGfuGfgAfCfUfuCfuCfuCfaAfuUfL96	591	A-128386.1	asAfsuUfgAfgAfgAfaguCfcAfcCfaGfcsasg	806
AD-64297.1	A-128415.1	CfsusGfcUfgCfuAfUfGfcCfuCfaUfcUfuAfL96	592	A-128416.1	usAfsaGfaUfgAfgGfcuAfgCfaGfcAfgsgs a	807
AD-64298.1	A-128427.1	GfsusUfgGfaUfgUfGfUfcUfgCfGfcGfuUfL96	593	A-128428.1	asAfscGfcCfGcfaGfacaCfaUfcCfaAfcsgsa	808
AD-64299.1	A-128441.1	UfsusCfaUfcCfuGfCfUfgCfuAfuGfcCfuAfL96	594	A-128442.1	usAfsgGfcAfuAfgCfagcAfgGfaUfgAfasgsa	809
AD-64300.1	A-128371.1	UfsusCfuUfgUfuGfAfCfaAfaAfaUfcCfuAfL96	595	A-128372.1	usAfsgGfaUfuUfuUfgucAfaCfaAfgAfasas a	810
AD-64302.1	A-128417.1	UfsasUfaUfgGfaUfGfAfuGfuGfgUfaUfuAfL96	596	A-128418.1	usAfsaUfaCfcAfcAfucaUfcCfaUfaUfasasc	811
AD-64303.1	A-128429.1	UfsusCfaUfcCfuGfCfUfgCfuAfuGfcCfuCfL96	597	A-128430.1	gsAfsgGfcAfuAfgCfagcAfgGfaUfgAfasgsa	812

Nome do Dúplex	Nome do Oligo Senso	Sequência Senso (5' a 3')	SE Q ID NO:	Nome do Oligo Antissenso	Sequência Antissenso (5' a 3')	SE Q ID NO:
AD-64304.1	A-128443.1	GfsusGfcAfcUfuCfGfCfuUfcAfcCfuCfuAfl96	598	A-128444.1	usAfsgAfgGfuGfaAfgcgAfaGfuGfcAfcscasc	813
AD-64305.1	A-128373.1	UfsusGfaCfaAfaAfAfUfcCfuCfaCfaAfuAfl96	599	A-128374.1	usAfsuUfgUfgAfgGfauuUfuUfgUfcAfascsa	814
AD-64307.1	A-128403.1	AfsasGfcCfuCfcAfAfGfcUfgUfgCfcUfuAfl96	600	A-128404.1	usAfsaGfgCfaCfaGfcuuGfgAfgGfcUfusgsa	815
AD-64308.1	A-128419.1	CfscsUfcUfuCfaUfCfCfuGfcUfgCfuAfuAfl96	601	A-128420.1	usAfsuAfgCfaGfcAfggaUfgAfaGfaGfgsasa	816
AD-64309.1	A-128431.1	CfscsUfgCfuGfcUfAfUfgCfcUfcAfuCfuUfl96	602	A-128432.1	asAfsgAfuGfaGfgCfauaGfcAfgCfaGfgsasau	817
AD-64310.1	A-128375.1	CfsasUfcUfuCfuUfGfUfuGfgUfuCfuUfcUfl96	603	A-128376.1	asGfsaAfgAfaCfcAfacaAfgAfaGfaUfgsasg	818
AD-64311.1	A-128391.1	CfscsGfuCfuGfuGfCfCfuUfcUfcAfuCfuAfl96	604	A-128392.1	usAfsgAfuGfaGfaAfggcAfcAfgAfcGfgsgsg	819
AD-64312.1	A-128405.1	CfscsUfcAfuCfuUfCfUfuGfuUfgGfuUfcUfl96	605	A-128406.1	asGfsaAfcCfaAfcAfagaAfgAfuGfaGfgscsa	820
AD-64313.1	A-128421.1	CfscsAfcCfaAfaUfGfCfcCfcUfaUfcUfuAfl96	606	A-128422.1	usAfsaGfaUfaGfgGfgcaUfuUfgGfuGfgsusca	821
AD-64314.1	A-128433.1	GfscsUfcCfuCfuGfCfCfGfAfuCfcAfuAfcUfl96	607	A-128434.1	asGfsuAfuGfgAfuCfggcAfgAfgGfaGfcscsa	822

Nome do Dúplex	Nome do Oligo Senso	Sequência Senso (5' a 3')	SE Q ID NO:	Nome do Oligo Antissenso	Sequência Antissenso (5' a 3')	SE Q ID NO:
AD-64315.1	A-128363.2	GfsusUfgAfcAfaAfAfAfUfcUfcAfaUfL96	608	A-128445.1	PasUfsuGfuGfaGfgAfuuuUfuGfuCfaAfcscas a	823
AD-64316.1	A-128377.2	UfsgsUfuGfaCfaAfAfAfaUfcCfuCfaCfaAfL96	609	A-128453.1	PusUfsgUfgAfgGfaUfuuuUfgUfcAfaCfasa sg	824
AD-64317.1	A-128393.2	GfsgsUfgGfaCfuUfCfUfcUfcAfaUfuUfuAfL96	610	A-128461.1	PusAfsaAfaUfuGfaGfagaAfgUfcCfaCfcsa sc	825
AD-64318.1	A-128407.2	UfscsUfuUfuGfgAfGfUfgUfgGfaUfuCfGfAfL96	611	A-128469.1	PusCfsgAfaUfcCfaCfacuCfcAfaAfaGfasc sa	826
AD-64319.1	A-128423.2	AfscsUfgUfuCfaAfGfCfcUfcCfaAfgCfuAfL96	612	A-128477.1	PusAfsgCfuUfgGfaGfgcuUfgAfaCfaAfgsa sc	827
AD-64320.1	A-128435.2	UfscsUfgCfcGfaUfCfCfaUfaCfuGfcGfgAfL96	613	A-128483.1	PusCfscGfcAfgUfaUfggaUfcGfgCfaGfasgs g	828
AD-64321.1	A-123463.3	AfsgsUfuAfuAfuGfGfAfuGfaUfgUfgGfuAfL96	614	A-128446.1	PusAfscCfaCfaUfcAfuccAfuAfaCfusgs a	829
AD-64322.1	A-128379.2	AfsusGfuGfuCfuGfCfGfgCfGfuUfuUfuAfuAfL96	615	A-128454.1	PusAfsuAfaAfaCfGcfcgcafgAfcAfcAfuscs c	830
AD-64323.1	A-128395.2	CfscsCfcGfuCfuGfUfGfcCfuUfcUfcAfuAfL96	616	A-128462.1	PusAfsuGfaGfaAfgGfcacAfgAfcGfgGfgsa sg	831
AD-64324.1	A-128409.2	GfscsCfuAfaUfcAfUfcCfuCfuUfgUfuCfaUfL96	617	A-128470.1	PasUfsgAfaCfaAfgAfgauGfaUfuAfgCfgsa sg	832

Nome do Dúplex	Nome do Oligo Senso	Sequência Senso (5' a 3')	SE Q ID NO:	Nome do Oligo Antissenso	Sequência Antissenso (5' a 3')	SE Q ID NO:
AD-64325.1	A-128425.2	UfscsUfaGfaCfuCfGfUfgGfuGfgAfcUfuCfL96	618	A-128478.1	PgsAfsaGfuCfcAfcCfacgAfgUfcUfaGfasc su	833
AD-64326.1	A-128437.2	CfsusGfcCfgAfuCfCfAfuAfcUfgCfGfAfl96	619	A-128484.1	PusUfscCfGfCfaGfuAfuggAfuCfGfCfAfgsa sg	834
AD-64328.1	A-128381.2	AfsusCfuUfcUfuGfUfUfgGfuUfcUfuCfuAfl96	620	A-128455.1	PusAfsgAfaGfaAfcCfaacAfaGfaAfgAfusg sa	835
AD-64330.1	A-128411.2	UfsusCfuCfuCfaAfUfUfuUfcUfaGfgGfgAfl96	621	A-128471.1	PusCfscCfcUfaGfaAfaauUfgAfgAfgAfasg su	836
AD-64331.1	A-127905.16	AfscsUfcGfuGfgUfGfGfaCfuUfcUfcUfcAfl96	622	A-127907.2	PusGfsaGfaGfaAfgUfccacCfcAfcGfaGfusc su	837
AD-64332.1	A-128001.3	GfsusGfcAfcUfuCfGfCfuUfcAfcCfuCfuGfl96	623	A-128485.1	PcsAfsgAfgGfuGfaAfgcgAfaGfuGfcAfcsa sc	838
AD-64333.1	A-128367.2	GfsusUfuUfuCfuUfGfUfuGfaCfaAfaAfaUfl96	624	A-128448.1	PasUfsuUfuUfgUfcAfacaAfgAfaAfaAfcscs c	839
AD-64334.1	A-128383.2	CfsusGfcCfuAfaUfCfAfuCfuCfuUfgUfuAfl96	625	A-128456.1	PusAfsaCfaAfgAfgAfugaUfuAfgGfcAfgsa sg	840
AD-64335.1	A-128399.2	UfscsCfuCfaCfaAfUfAfcCfaCfaGfaGfuAfl96	626	A-128464.1	PusAfscUfcUfgUfgGfuauUfgUfgAfgGfasu su	841
AD-64336.1	A-128413.2	CfsusUfgUfuGfaCfAfAfaAfaUfcCfuCfaAfl96	627	A-128472.1	PusUfsgAfgGfaUfuUfuugUfcAfaCfaAfgsa sa	842
AD-	A-	GfsusGfgUfgGfaCfUfUfcUfcUfcAfaUfuUfl96	628	A-127958.2	PasAfsaUfuGfaGfaGfaagUfcCfaCfcAfcsg	843

Nome do Dúplex	Nome do Oligo Senso	Sequência Senso (5' a 3')	SE Q ID NO:	Nome do Oligo Antissenso	Sequência Antissenso (5' a 3')	SE Q ID NO:
64337.1	127955.16				sa	
AD-64338.1	A-128439.2	GfscsAfaCfuUfuUfCfaCfcUfcUfgCfcUfL96	629	A-128486.1	PasGfsgCfaGfaGfgUfgaaAfaAfgUfuGfcsas u	844
AD-64339.1	A-128369.2	GfsgsGfaAfcAfaGfAfGfcUfaCfaGfcAfuAfl96	630	A-128449.1	PusAfsuGfcUfgUfaGfcucUfuGfuUfcCfcsa sa	845
AD-64341.1	A-128401.2	UfscsAfuCfuUfcUfUfGfuUfgGfuUfcUfuAfl96	631	A-128465.1	PusAfsaGfaAfcCfaAfcaaGfaAfgAfuGfasg sg	846
AD-64342.1	A-128415.2	CfsusGfcUfgCfuAfUfGfcCfuCfaUfcUfuAfl96	632	A-128473.1	PusAfsaGfaUfgAfgGfcuAfgCfaGfcAfgsg sa	847
AD-64343.1	A-128427.2	GfsusUfgGfaUfgUfGfUfcUfgCfgGfcGfuUfL96	633	A-128479.1	PasAfscGfcCfgCfaGfacaCfaUfcCfaAfcsg sa	848
AD-64344.1	A-128441.2	UfsusCfaUfcCfuGfCfUfgCfuAfuGfcCfuAfl96	634	A-128487.1	PusAfsgGfcAfuAfgCfagcAfgGfaUfgAfasg sa	849
AD-64345.1	A-128371.2	UfsusCfuUfgUfuGfAfCfaAfaAfaUfcCfuAfl96	635	A-128450.1	PusAfsgGfaUfuUfuUfgucAfaCfaAfgAfasa sa	850
AD-64347.1	A-123487.3	GfsgsAfuGfuGfuCfUfGfcGfgCfgUfuUfuAfl96	636	A-128466.1	PusAfsaAfaCfgCfcGfcagAfcAfcAfuCfcsas g	851
AD-64348.1	A-128417.2	UfsasUfaUfgGfaUfGfAfuGfuGfgUfaUfuAfl96	637	A-128474.1	PusAfsaUfaCfcAfcAfucaUfcCfaUfaUfasas c	852
AD-64349.1	A-128429.2	UfsusCfaUfcCfuGfCfUfgCfuAfuGfcCfuCfl96	638	A-128480.1	PgsAfsgGfcAfuAfgCfagcAfgGfaUfgAfasg sa	853

Nome do Dúplex	Nome do Oligo Senso	Sequência Senso (5' a 3')	SE Q ID NO:	Nome do Oligo Antissenso	Sequência Antissenso (5' a 3')	SE Q ID NO:
AD-64350.1	A-128443.2	GfsusGfcAfcUfuCfGfCfuUfcAfcCfuCfuAfl96	639	A-128488.1	PusAfsGfGfuGfaAfgcgAfaGfuGfcAfcsc	854
AD-64351.1	A-128373.2	UfsusGfaCfaAfaAfAfUfcCfuCfaCfaAfuAfl96	640	A-128451.1	PusAfsuUfgUfgAfgGfauuUfuUfgUfcAfasc	855
AD-64352.1	A-128389.2	CfscsAfaGfuGfuUfUfGfcUfgAfcGfcAfaAfl96	641	A-128459.1	PusUfsuGfcGfuCfaGfcaaAfcAfcUfuGfgsc	856
AD-64352.1	A-128389.2	CfscsAfaGfuGfuUfUfGfcUfgAfcGfcAfaAfl96	642	A-128459.1	PusUfsuGfcGfuCfaGfcaaAfcAfcUfuGfgsc	857
AD-64353.1	A-128403.2	AfsasGfcCfuCfcAfAfGfcUfgUfgCfcUfuAfl96	643	A-128467.1	PusAfsaGfgCfaCfaGfcuuGfgAfgGfcUfusg	858
AD-64354.1	A-128419.2	CfscsUfcUfuCfaUfCfCfuGfcUfgCfuAfuAfl96	644	A-128475.1	PusAfsuAfgCfaGfcAfggaUfgAfaGfaGfgsa	859
AD-64355.1	A-128431.2	CfscsUfgCfuGfcUfAfUfgCfcUfcAfuCfuUfl96	645	A-128481.1	PasAfsGfuGfaGfgCfauaGfcAfgCfaGfgsas	860
AD-64356.1	A-128375.2	CfsasUfcUfuCfuUfGfUfuGfgUfuCfuUfcUfl96	646	A-128452.1	PasGfsaAfgAfaCfcAfacaAfgAfaGfaUfgsa	861
AD-64357.1	A-128391.2	CfscsGfuCfuGfuGfCfCfuUfcUfcAfuCfuAfl96	647	A-128460.1	PusAfsGfuGfaGfaAfggcAfcAfgAfcGfgsg	862
AD-64358.1	A-128405.2	CfscsUfcAfuCfuUfCfUfuGfuUfgGfuUfcUfl96	648	A-128468.1	PasGfsaAfcCfaAfcAfagaAfgAfuGfaGfgsc	863

Nome do Dúplex	Nome do Oligo Senso	Sequência Senso (5' a 3')	SE Q ID NO:	Nome do Oligo Antissenso	Sequência Antissenso (5' a 3')	SE Q ID NO:
AD-64359.1	A-128421.2	CfscsAfcCfaAfaUfGfCfcCfcUfaUfcUfuAfl96	649	A-128476.1	PusAfsaGfaUfaGfgGfgcaUfuUfgGfuGfgsusc	864
AD-64360.1	A-128433.2	GfscsUfcCfuCfuGfCfCfGfAfuCfcAfuAfcUfl96	650	A-128482.1	PasGfsuAfuGfgAfuCfggcAfgAfgGfaGfcscsa	865
AD-64700.1	A-129379.1	ascsucguggugdTacuu(Cgn)ucucal96	651	A-127906.26	usGfsaGfaGfaAfgUfccaCfcAfcGfaGfuscsu	866
AD-64701.1	A-127905.20	AfscsUfcGfuGfgUfGfGfaCfuUfcUfcUfcAfl96	652	A-129387.1	PusgsagagaagdTccadCcacgaguscsu	867
AD-64702.1	A-127905.28	AfscsUfcGfuGfgUfGfGfaCfuUfcUfcUfcAfl96	653	A-129395.1	usGsagadGaaguccaCcacgaguscsu	868
AD-64703.1	A-129376.2	ascsucguggugdGacuucdAcucal96	654	A-129385.5	usdGsagagaagdTccadCcacgaguscsu	869
AD-64704.1	A-129381.3	ascsucguggugdTgdTacuucdAcucal96	655	A-129389.6	usdGsagadGaaguccadCcacgaguscsu	870
AD-64705.1	A-129380.1	ascsucguggugdTacuucdAcucal96	656	A-127906.27	usGfsaGfaGfaAfgUfccaCfcAfcGfaGfuscsu	871
AD-64706.1	A-127905.21	AfscsUfcGfuGfgUfGfGfaCfuUfcUfcUfcAfl96	657	A-129388.1	usdGsadGagaaguccadCcacgaguscsu	872
AD-64707.1	A-127905.29	AfscsUfcGfuGfgUfGfGfaCfuUfcUfcUfcAfl96	658	A-129396.1	usgsagadGaagdTccadCcacgaguscsu	873

Nome do Dúplex	Nome do Oligo Senso	Sequência Senso (5' a 3')	SE Q ID NO:	Nome do Oligo Antissenso	Sequência Antissenso (5' a 3')	SE Q ID NO:
AD-64708.1	A-129382.2	ascsucguggdTgdGacuuc(Tgn)cucal96	659	A-129385.6	usdGsagagaagdTccadCcacgaguscsu	874
AD-64709.1	A-129373.4	ascsucguggugdGacuu(Cgn)ucucal96	660	A-129391.2	usdGsagadGaagdTccadCcacgaguscsu	875
AD-64710.1	A-129373.1	ascsucguggugdGacuu(Cgn)ucucal96	661	A-127906.20	usGfsaGfaGfaAfgUfccaCfcAfcGfaGfuscsu	876
AD-64711.1	A-129381.1	ascsucguggdTgdTacuucdAcucal96	662	A-127906.28	usGfsaGfaGfaAfgUfccaCfcAfcGfaGfuscsu	877
AD-64712.1	A-127905.22	AfscsUfcGfuGfgUfGfGfaCfuUfcUfcAfl96	663	A-129389.1	usdGsagadGaaguccadCcacgaguscsu	878
AD-64713.1	A-127905.30	AfscsUfcGfuGfgUfGfGfaCfuUfcUfcAfl96	664	A-129397.1	PusgsagadGaagdTccadCcacgaguscsu	879
AD-64714.1	A-129384.2	ascsucguggdTgdGacuucdAcucal96	665	A-129385.7	usdGsagagaagdTccadCcacgaguscsu	880
AD-64715.1	A-129376.4	ascsucguggugdGacuucdAcucal96	666	A-129391.3	usdGsagadGaagdTccadCcacgaguscsu	881
AD-64716.1	A-129374.1	ascsucguggugdGacuucu(Cgn)ucal96	667	A-127906.21	usGfsaGfaGfaAfgUfccaCfcAfcGfaGfuscsu	882
AD-64717.1	A-129382.1	ascsucguggdTgdGacuuc(Tgn)cucal96	668	A-127906.29	usGfsaGfaGfaAfgUfccaCfcAfcGfaGfuscsu	883

Nome do Dúplex	Nome do Oligo Senso	Sequência Senso (5' a 3')	SE Q ID NO:	Nome do Oligo Antissenso	Sequência Antissenso (5' a 3')	SE Q ID NO:
AD-64718.1	A-127905.23	AfscsUfcGfuGfgUfGfGfaCfuUfcUfcAfL96	669	A-129390.1	usdGsagagadAguccadCcacgaguscsu	884
AD-64719.1	A-127917.5	ascsucguggugdGacuuc(Tgn)cucal96	670	A-129385.2	usdGsagagaagdTccadCcacgaguscsu	885
AD-64720.1	A-129381.2	ascsucguggdTgdTacuucdAcucal96	671	A-129385.8	usdGsagagaagdTccadCcacgaguscsu	886
AD-64721.1	A-129382.4	ascsucguggdTgdGacuuc(Tgn)cucal96	672	A-129391.4	usdGsagadGaagdTccadCcacgaguscsu	887
AD-64722.1	A-129375.1	ascsucguggugdGacuucY34cucal96	673	A-127906.22	usGfsaGfaGfaAfgUfccacfcAfcGfaGfuscsu	888
AD-64723.1	A-129383.1	ascsucguggugdGdAcuuc(Tgn)cucal96	674	A-127906.30	usGfsaGfaGfaAfgUfccacfcAfcGfaGfuscsu	889
AD-64725.1	A-127917.6	ascsucguggugdGacuuc(Tgn)cucal96	675	A-129398.1	PusdGsagagaagdTccadCcacgaguscsu	890
AD-64726.1	A-129373.3	ascsucguggugdGacuu(Cgn)ucucal96	676	A-129389.2	usdGsagadGaaguccadCcacgaguscsu	891
AD-64727.1	A-129384.4	ascsucguggdTgdGacuucdAcucal96	677	A-129391.5	usdGsagadGaagdTccadCcacgaguscsu	892
AD-64728.1	A-129376.1	ascsucguggugdGacuucdAcucal96	678	A-127906.23	usGfsaGfaGfaAfgUfccacfcAfcGfaGfuscsu	893

Nome do Dúplex	Nome do Oligo Senso	Sequência Senso (5' a 3')	SE Q ID NO:	Nome do Oligo Antissenso	Sequência Antissenso (5' a 3')	SE Q ID NO:
AD-64729.1	A-129384.1	ascsucguggdTgdGacuucdAcucaL96	679	A-127906.31	usGfsaGfaGfaAfgUfccaCfcAfcGfaGfuscsu	894
AD-64730.1	A-127905.25	AfscsUfcGfuGfgUfGfGfaCfuUfcUfcAfl96	680	A-129392.1	usGsagagaagdTccadCcacgaguscsu	895
AD-64731.1	A-129399.1	Y34ascsucguggugdGacuuc(Tgn)cucaL96	681	A-129385.3	usdGsagagaagdTccadCcacgaguscsu	896
AD-64732.1	A-129376.3	ascsucguggugdGacuucdAcucaL96	682	A-129389.3	usdGsagadGaaguccadCcacgaguscsu	897
AD-64733.1	A-129381.4	ascsucguggdTgdTacuucdAcucaL96	683	A-129391.6	usdGsagadGaagdTccadCcacgaguscsu	898
AD-64734.1	A-129377.1	ascsucguggugdGacuucdCcucaL96	684	A-127906.24	usGfsaGfaGfaAfgUfccaCfcAfcGfaGfuscsu	899
AD-64735.1	A-127905.18	AfscsUfcGfuGfgUfGfGfaCfuUfcUfcAfl96	685	A-129385.1	usdGsagagaagdTccadCcacgaguscsu	900
AD-64736.1	A-127905.26	AfscsUfcGfuGfgUfGfGfaCfuUfcUfcAfl96	686	A-129393.1	usdGsagagaagdTccaCcacgaguscsu	901
AD-64737.1	A-129399.2	Y34ascsucguggugdGacuuc(Tgn)cucaL96	687	A-129398.2	PusdGsagagaagdTccadCcacgaguscsu	902
AD-64738.1	A-129382.3	ascsucguggdTgdGacuuc(Tgn)cucaL96	688	A-129389.4	usdGsagadGaaguccadCcacgaguscsu	903

Nome do Dúplex	Nome do Oligo Senso	Sequência Senso (5' a 3')	SE Q ID NO:	Nome do Oligo Antissenso	Sequência Antissenso (5' a 3')	SE Q ID NO:
AD-64739.1	A-129378.1	ascsucguggugdGacuucdGcucaL96	689	A-127906.25	usGfsaGfaGfaAfgUfccaCfcAfcGfaGfuscsu	904
AD-64740.1	A-127905.19	AfscsUfcGfuGfgUfGfGfaCfuUfcUfcUfcAfL96	690	A-129386.1	usgsagagaagdTccadCcacgaguscsu	905
AD-64741.1	A-127905.27	AfscsUfcGfuGfgUfGfGfaCfuUfcUfcUfcAfL96	691	A-129394.1	usGsagagaagdTccaCcacgaguscsu	906
AD-64742.1	A-129373.2	ascsucguggugdGacuu(Cgn)ucucaL96	692	A-129385.4	usdGsagagaagdTccadCcacgaguscsu	907
AD-64743.1	A-129384.3	ascsucguggdTgdGacuucdAcucaL96	693	A-129389.5	usdGsagadGaaguccadCcacgaguscsu	908

Tabela 5. Rastreamento de dose única de HBV usando Ensaio Dual-Glo Luciferase®

ID do Dúplex	Média a 10 nM	Média a 0,1 nM	SD de 10 nM	0,1nM_SD
AD-63938.2	0,12	ND	0,01	ND
AD-63950.2	0,38	ND	0,04	ND
AD-63956.2	0,31	ND	0,02	ND
AD-63962.2	0,16	ND	0,03	ND
AD-63968.2	0,56	ND	0,10	ND
AD-63968.2	0,79	ND	0,09	ND
AD-63979.2	0,54	ND	0,02	ND
AD-63939.2	0,51	ND	0,01	ND
AD-63945.2	0,54	ND	0,08	ND
AD-63951.2	0,60	ND	0,03	ND
AD-63957.2	0,57	ND	0,02	ND
AD-63963.2	0,91	ND	0,06	ND
AD-63969.2	0,92	ND	0,02	ND
AD-63975.2	0,83	ND	0,01	ND
AD-63980.2	0,77	ND	0,01	ND
AD-63940.2	0,77	ND	0,06	ND
AD-63946.2	0,60	ND	0,10	ND
AD-63952.2	0,48	ND	0,04	ND
AD-63958.2	0,51	ND	0,01	ND
AD-63964.2	0,58	ND	0,04	ND
AD-63970.2	0,69	ND	0,07	ND
AD-63976.2	0,63	ND	0,04	ND
AD-63981.2	0,60	ND	0,04	ND
AD-63941.2	0,56	ND	0,09	ND
AD-63947.2	0,55	ND	0,08	ND
AD-63953.2	0,56	ND	0,06	ND
AD-63959.2	0,51	ND	0,03	ND
AD-63965.2	0,55	ND	0,03	ND
AD-63971.2	0,65	ND	0,02	ND
AD-63977.2	0,88	ND	0,01	ND
AD-63982.2	0,73	ND	0,07	ND

ID do Dúplex	Média a 10 nM	Média a 0,1 nM	SD de 10 nM	0,1nM_SD
AD-63942.2	0,32	ND	0,09	ND
AD-63948.2	0,57	ND	0,09	ND
AD-63960.2	0,92	ND	0,05	ND
AD-63966.2	0,85	ND	0,06	ND
AD-63972.2	0,82	ND	0,06	ND
AD-63978.2	0,83	ND	0,02	ND
AD-63983.2	0,89	ND	0,02	ND
AD-63943.2	0,86	ND	0,04	ND
AD-63949.2	0,76	ND	0,02	ND
AD-63955.2	0,82	ND	0,02	ND
AD-63961.2	0,83	ND	0,07	ND
AD-63967.2	0,86	ND	0,03	ND
AD-63973.2	0,86	ND	0,03	ND
AD-63990.2	0,27	ND	0,07	ND
AD-63996.2	0,29	ND	0,06	ND
AD-64002.2	0,30	ND	0,11	ND
AD-64008.2	0,28	ND	0,05	ND
AD-64008.2	0,34	ND	0,07	ND
AD-64014.2	0,30	ND	0,03	ND
AD-64019.2	0,36	ND	0,04	ND
AD-64024.2	0,27	ND	0,03	ND
AD-63985.2	0,28	ND	0,06	ND
AD-63991.2	0,33	ND	0,02	ND
AD-63997.2	0,47	ND	0,07	ND
AD-64003.2	0,69	ND	0,06	ND
AD-64009.2	0,91	ND	0,03	ND
AD-64015.2	0,69	ND	0,09	ND
AD-64020.2	0,81	ND	0,06	ND
AD-64025.2	0,77	ND	0,06	ND
AD-63986.2	0,28	ND	0,05	ND
AD-63992.2	0,44	ND	0,04	ND
AD-64004.2	0,45	ND	0,04	ND
AD-64010.2	0,37	ND	0,05	ND

ID do Dúplex	Média a 10 nM	Média a 0,1 nM	SD de 10 nM	0,1nM_SD
AD-64016.2	0,48	ND	0,05	ND
AD-64021.2	0,39	ND	0,03	ND
AD-64026.2	0,30	ND	0,02	ND
AD-63987.2	0,20	ND	0,02	ND
AD-63993.2	0,33	ND	0,02	ND
AD-63999.2	0,36	ND	0,05	ND
AD-64005.2	0,45	ND	0,11	ND
AD-64011.2	0,39	ND	0,08	ND
AD-64017.2	0,84	ND	0,06	ND
AD-64022.2	0,81	ND	0,03	ND
AD-64027.2	0,38	ND	0,05	ND
AD-63988.2	0,37	ND	0,04	ND
AD-63994.2	0,23	ND	0,01	ND
AD-64000.2	0,29	ND	0,00	ND
AD-64006.2	0,40	ND	0,04	ND
AD-64012.2	0,45	ND	0,17	ND
AD-64018.2	0,65	ND	0,07	ND
AD-64023.2	0,53	ND	0,07	ND
AD-64028.2	0,52	ND	0,07	ND
AD-63989.2	0,47	ND	0,04	ND
AD-63995.2	0,81	ND	0,03	ND
AD-64001.2	0,83	ND	0,04	ND
AD-64007.2	0,87	ND	0,04	ND
AD-64013.2	0,88	ND	0,03	ND
AD-64289.1	0,276	ND	0,009	ND
AD-64333.1	0,208	ND	0,015	ND
AD-64285.1	0,324	ND	0,034	ND
AD-64300.1	0,225	ND	0,005	ND
AD-64345.1	0,102	ND	0,090	ND
AD-64292.1	0,288	ND	0,232	ND
AD-64336.1	0,199	ND	0,056	ND
AD-64275.1	0,287	ND	0,185	ND
AD-64316.1	0,297	ND	0,024	ND

ID do Dúplex	Média a 10 nM	Média a 0,1 nM	SD de 10 nM	0,1nM_SD
AD-64274.1	0,209	ND	0,033	ND
AD-64315.1	0,199	ND	0,002	ND
AD-64305.1	0,360	ND	0,035	ND
AD-64351.1	0,281	ND	0,014	ND
AD-64291.1	0,725	ND	0,005	ND
AD-64335.1	0,478	ND	0,020	ND
AD-64283.1	0,917	ND	0,018	ND
AD-64304.1	0,937	ND	0,050	ND
AD-64325.1	0,446	ND	0,223	ND
AD-64350.1	0,934	ND	0,055	ND
AD-63968.4	0,748	ND	0,008	ND
AD-64331.1	0,294	ND	0,038	ND
AD-64008.4	0,416	ND	0,028	ND
AD-64337.1	0,318	ND	0,049	ND
AD-64295.1	0,415	ND	0,034	ND
AD-64276.1	0,453	ND	0,073	ND
AD-64317.1	0,203	ND	0,040	ND
AD-64330.1	0,313	ND	0,030	ND
AD-64298.1	0,797	ND	0,007	ND
AD-64343.1	0,667	ND	0,020	ND
AD-61547.2	0,637	ND	0,019	ND
AD-64347.1	0,418	ND	0,066	ND
AD-64280.1	0,754	ND	0,092	ND
AD-64322.1	0,407	ND	0,013	ND
AD-64308.1	0,720	ND	0,055	ND
AD-64354.1	0,315	ND	0,034	ND
AD-64303.1	0,815	ND	0,150	ND
AD-64349.1	0,447	ND	0,030	ND
AD-64299.1	0,831	ND	0,007	ND
AD-64344.1	0,404	ND	0,009	ND
AD-64309.1	0,856	ND	0,005	ND
AD-64355.1	0,498	ND	0,040	ND
AD-64297.1	0,895	ND	0,024	ND

ID do Dúplex	Média a 10 nM	Média a 0,1 nM	SD de 10 nM	0,1nM_SD
AD-64342.1	0,508	ND	0,006	ND
AD-64312.1	0,590	ND	0,034	ND
AD-64358.1	0,425	ND	0,044	ND
AD-64341.1	0,223	ND	0,119	ND
AD-64310.1	0,301	ND	0,064	ND
AD-64356.1	0,336	ND	0,024	ND
AD-64286.1	0,611	ND	0,012	ND
AD-64328.1	0,317	ND	0,043	ND
AD-61522.2	0,447	ND	0,008	ND
AD-64321.1	0,237	ND	0,009	ND
AD-64302.1	0,523	ND	0,020	ND
AD-64348.1	0,208	ND	0,003	ND
AD-64352.1	0,343	ND	0,224	ND
AD-64352.1	0,567	ND	0,015	ND
AD-64314.1	0,920	ND	0,044	ND
AD-64360.1	0,778	ND	0,029	ND
AD-64279.1	0,882	ND	0,034	ND
AD-64320.1	0,589	ND	0,017	ND
AD-64284.1	0,696	ND	0,119	ND
AD-64326.1	0,552	ND	0,009	ND
AD-64281.1	0,921	ND	0,019	ND
AD-64323.1	0,715	ND	0,097	ND
AD-64311.1	0,815	ND	0,030	ND
AD-64357.1	0,549	ND	0,001	ND
AD-64272.2	0,965	ND	0,024	ND
AD-64332.1	0,548	ND	0,013	ND
AD-64293.1	0,837	ND	0,013	ND
AD-64338.1	0,597	ND	0,031	ND
AD-64290.1	0,489	ND	0,026	ND
AD-64334.1	0,368	ND	0,003	ND
AD-64282.1	0,767	ND	0,009	ND
AD-64324.1	0,726	ND	0,077	ND
AD-64278.1	0,951	ND	0,077	ND

ID do Dúplex	Média a 10 nM	Média a 0,1 nM	SD de 10 nM	0,1nM_SD
AD-64319.1	0,895	ND	0,029	ND
AD-64307.1	0,890	ND	0,065	ND
AD-64353.1	0,567	ND	0,500	ND
AD-64277.1	0,416	ND	0,019	ND
AD-64277.1	0,839	ND	0,058	ND
AD-64318.1	0,613	ND	0,042	ND
AD-64318.1	0,768	ND	0,042	ND
AD-64313.1	0,698	ND	0,062	ND
AD-64359.1	0,441	ND	0,081	ND
AD-64294.1	0,563	ND	0,066	ND
AD-64339.1	0,486	ND	0,044	ND
AD-63968.5	0,57	0,72	0,07	0,03
AD-63940.3	0,81	0,83	0,11	0,03
AD-64710.1	0,79	0,85	0,12	0,04
AD-64716.1	0,73	0,85	0,08	0,01
AD-64722.1	0,67	0,80	0,06	0,02
AD-64728.1	0,74	0,87	0,06	0,05
AD-64734.1	0,78	0,83	0,08	0,05
AD-64739.1	0,73	0,85	0,07	0,02
AD-64700.1	0,54	0,75	0,13	0,02
AD-64705.1	0,67	0,79	0,15	0,04
AD-64711.1	0,57	0,83	0,13	0,04
AD-64717.1	0,72	0,83	0,13	0,02
AD-64723.1	0,83	0,87	0,12	0,01
AD-64729.1	0,74	0,87	0,08	0,07
AD-64735.1	0,73	0,89	0,05	0,04
AD-64740.1	0,89	0,88	0,05	0,07
AD-64701.1	0,88	0,84	0,07	0,05
AD-64706.1	0,71	0,88	0,12	0,05
AD-64712.1	0,81	0,86	0,13	0,07
AD-64718.1	0,84	0,89	0,16	0,01
AD-64730.1	0,88	0,89	0,02	0,04
AD-64736.1	0,80	0,88	0,10	0,05

ID do Dúplex	Média a 10 nM	Média a 0,1 nM	SD de 10 nM	0,1nM_SD
AD-64741.1	0,85	0,83	0,06	0,05
AD-64702.1	0,87	0,93	0,02	0,06
AD-64707.1	0,95	0,88	0,05	0,08
AD-64713.1	0,90	0,85	0,08	0,03
AD-64719.1	0,80	0,89	0,09	0,09
AD-64725.1	0,70	0,84	0,09	0,03
AD-64731.1	0,82	0,87	0,04	0,08
AD-64737.1	0,76	0,84	0,09	0,08
AD-64742.1	0,76	0,85	0,09	0,03
AD-64703.1	0,79	0,88	0,05	0,02
AD-64708.1	0,83	0,82	0,08	0,06
AD-64714.1	0,75	0,85	0,12	0,03
AD-64720.1	0,61	0,81	0,17	0,04
AD-64726.1	0,75	0,83	0,07	0,02
AD-64732.1	0,86	0,84	0,14	0,10
AD-64738.1	0,80	0,90	0,04	0,02
AD-64743.1	0,75	0,85	0,12	0,04
AD-64704.1	0,67	0,78	0,16	0,02
AD-64709.1	0,83	0,86	0,16	0,03
AD-64715.1	0,87	0,88	0,09	0,04
AD-64721.1	0,77	0,82	0,12	0,06
AD-64727.1	0,75	0,85	0,14	0,02
AD-64733.1	0,67	0,81	0,14	0,03

Exemplo 3. Síntese e Rastreamento *in vitro* de Dúplexes de sRNAi Adicionais

[00647] Moléculas adicionais de RNAi visando o genoma do HBV foram sintetizadas como descrito acima. Uma lista detalhada das sequências não modificadas adicionais de filamentos senso e antissenso de HBV é mostrada na tabela 6 e uma lista detalhada sequências modificadas adicionais de filamentos senso e antissenso de HBV é mostrada na tabela 7.

Tabela 6. Sequências Não modificadas de Filamentos Senso e Antissenso de dsRNAs de HBV

ID do Dúplex	Sequência Senso (5' a 3')	SEQ ID NO:	Sequência Antissenso (5' a 3')	SEQ ID NO:
AD-65369.1	UCGUGGUGGACUUCUCUCA	909	UGAGAGAAGUCCACCACGAUU	938
AD-65381.1	UCGUGGUGGACUUCUCUCA	910	UGAGAGAAGUCCACCACGAUU	939
AD-63962.1	UCGUGGUGGACUUCUCUCA	911	UGAGAGAAGUCCACCACGAUU	940
AD-63938.1	ACUCGUGGUGGACUUCUCUCA	912	UGAGAGAAGUCCACCACGAGUCU	941
AD-65561.1	UCGUGGUGGACUUCUCUCA	913	UGAGAGAAGUCCACCACGAUU	942
AD-65566.1	UCGUGGUGGACUUCUCUCA	914	UGAGAGAAGUCCACCACGAUU	943
AD-63944.1	UCGUGGUGGACUUCUCUCAUU	915	UGAGAGAAGUCCACCACGAUU	944
AD-63968.1	ACUCGUGGUGGACUUCUCUCA	916	UGAGAGAAGUCCACCACGAGUCU	945
AD-65406.1	UCGUGGUGGACUUCUCUCA	917	UGAGAGAAGUCCACCACGAUU	946
AD-65396.1	ACUCGUGGUGGACUUCUCUCA	918	UGAGAGAAGUCCACCACGAGUUU	947
AD-65427.1	GUGCACUUCGCUUACCCUCUA	919	UAGAGGUGAAGCGAAGUGCACUU	948
AD-65573.1	GUGCACUUCGCUUACCCUCUA	920	UAGAGGUGAAGCGAAGUGCACAC	949
AD-65432.1	GCACUUCGCUUACCCUCUA	921	UAGAGGUGAAGCGAAGUGCAC	950
AD-64332.1	GUGCACUUCGCUUACCCUCUG	922	CAGAGGUGAAGCGAAGUGCACAC	951
AD-64322.1	AUGUGUCUGCGGCGUUUUAUA	923	UAUAAAACGCCGCAGACACAUCC	952
AD-64272.1	GUGCACUUCGCUUACCCUCUG	924	CAGAGGUGAAGCGAAGUGCACAC	953
AD-65583.1	GCACUUCGCUUACCCUCUA	925	UAGAGGUGAAGCGAAGUGCUU	954
AD-63994.1	GGUGGACUUCUCUCAUUU	926	AAAUUGAGAGAAGUCCACCAC	955
AD-65370.1	CGUGGUGGACUUCUCUCAUUU	927	AAUUGAGAGAAGUCCACCAGCAG	956
AD-65265.1	GUGGUGGACUUCUCUCAUUU	928	AAAUUGAGAGAAGUCCACCACGA	957
AD-65407.1	CGUGGUGGACUUCUCUCAUUU	929	AAUUGAGAGAAGUCCACCAGCAG	958
AD-64027.1	GGUGGACUUCUCUCAUUU	930	AAAUUGAGAGAAGUCCACCAC	959

ID do Dúplex	Sequência Senso (5' a 3')	SEQ ID NO:	Sequência Antissenso (5' a 3')	SEQ ID NO:
AD-65266.1	GUGGUGGACUUCUCUCAUUUU	931	AAAUUGAGAGAAGUCCACCACGA	960
AD-65389.1	UGGUGGUUCTUCUCUAAAUU	932	AAUUGAGAGAAGUCCACCAUU	961
AD-64008.1	GUGGUGGACUUCUCUCAUUUU	933	AAAUUGAGAGAAGUCCACCACGA	962
AD-65377.1	CGUGGUGGUUCTUCUCUAAAUU	934	AAUUGAGAGAAGUCCACCAGCUU	963
AD-65409.2	GGUGGACUUCUCUCAUUUUUA	935	UAAAAUUGAGAGAAGUCCACCAC	964
AD-65403.1	GGUGGACUUCUCUCAUUUUUA	936	UAAAAUUGAGAGAAGUCCACCAC	965
AD-65385.1	UGGACUACTCUCAAUUUA	937	UAAAAUUGAGAGAAGUCCAUAU	966

Tabela 7. Sequências Modificadas de Fitas Senso e Antissenso de dsRNAs de HBV

DuplexID	Sequência Senso (5' a 3')	SEQ ID NO:	Sequência Antissenso (5' a 3')	SEQ ID NO:
AD-65369	uscsguGfgUfGfGfacuuCfUfcucaL96	967	PusGfsagaGfaAfGfuccaCfcAfcgasusu	996
AD-65381	uscsguGfgUfGfGfacuucucucaL96	968	PusGfsagaGfaAfGfuccaCfcAfcgasusu	997
AD-63962	Y44uscsGfuGfgUfgGfaCfuUfcUfcAfY44	969	PusGfsaGfaGfaAfgUfcCfaCfcAfcGfasusu	998
AD-63938	Y44ACUCGUGGUGGACUUCUCUCA	970	UGAGAGAAGUCCACCACGAGUCU	999
AD-65561	uscsguGfgUfGfGfacuuCfUfcucaL96	971	UfsGfsagaGfaAfGfuccaCfcAfcgasusu	1000
AD-65566	uscsguGfgUfGfGfacuucucucaL96	972	UfsGfsagaGfaAfGfuccaCfcAfcgasusu	1001
AD-63944	Y44ucGuGGuGGAcuucucucAusuY44	973	UfGfagAfgAfAfGUfccaCfCAfcgAusu	1002
AD-63968	AfscsUfcGfuGfgUfGfGfaCfuUfcUfcAfL96	974	usGfsaGfaGfaAfgUfccaCfcAfcGfaGfuscu	1003
AD-65406	uscsguGfgUfGfGfacuuCfUfcucaL96	975	usGfsagaGfaAfGfuccaCfcAfcgasusu	1004
AD-65396	ascsucguGfgUfGfGfacuucucucaL96	976	usGfsagaGfaaguccaCfcAfcgagususu	1005
AD-65427	gsusgcacUfuCfGfCfuucaccucuaL96	977	PusAfsgagGfugaagcgAfaGfugcacsusu	1006
AD-65573	gsusgcacUfuCfGfCfuucaCfCfucuaL96	978	UfsAfsgagGfuGfAfagcgAfaGfugcacsasc	1007
AD-65432	gscsacUfucGfCfuucacCfucuaL96	979	PusAfsgagGfuGfAfagcgAfaGfugcsasc	1008
AD-64332	GfsusGfcAfcUfuCfGfCfuUfcAfcCfuGfL96	980	PcsAfsgAfgGfuGfaAfgcgAfaGfuGfcAfcscasc	1009

DuplexID	Sequência Senso (5' a 3')	SEQ ID NO:	Sequência Antissenso (5' a 3')	SEQ ID NO:
AD-64322	AfsusGfuGfuCfuGfCfGfgCfgUfuUfuAfuAfL96	981	PusAfsuAfaAfaCfgCfcgcAfgAfcAfcAfuscsc	1010
AD-64272	GfsusGfcAfcUfuCfGfCfuUfcAfcCfuCfuGfL96	982	csAfsGfgGfuGfaAfgcgAfaGfuGfcAfcscasc	1011
AD-65583	gscsacuucgdCuucac(Cgn)ucuaL96	983	usdAsgagdGugaagcgdAagugcsusu	1012
AD-63994	gsgsUfgGfaCfUfUfcUfcUfcAfaUfuUfL96	984	PasAfsaUfuGfaGfaGfaagUfcCfaCfcsasc	1013
AD-65370	csgsugguGfgAfCfUfucucUfCfaauuL96	985	asAfsuugAfgAfGfaaguCfcAfcagcsasg	1014
AD-65265	gsusggugGfaCfUfUfcUfcucauuuL96	986	asAfsaUfugagaGfaagUfcCfaccAfcsgsa	1015
AD-65407	csgsugguGfgAfCfUfucucUfCfaauuL96	987	asAfsuugAfgAfgAfaguCfcAfcagcsasg	1016
AD-64027	gsgsUfgGfaCfUfUfcUfcUfcAfaUfuUfL96	988	asAfsaUfuGfaGfaGfaagUfcCfaCfcsasc	1017
AD-65266	gsusggugGfaCfUfUfcucuCfaauuuL96	989	asAfsaUfugagaGfaagUfcCfaccAfcsgsa	1018
AD-65389	usgsgudGgucdTucucuaaaauL96	990	asdAsuugagagdAagudCcaccasusu	1019
AD-64008	GfsusGfgUfgGfaCfUfUfcUfcUfcAfaUfuUfL96	991	asAfsaUfuGfaGfaGfaagUfcCfaCfcAfcsgsa	1020
AD-65377	csgsuggudGgucdTucucuaaaauL96	992	asdAsuugagagdAagudCcaccagcsusu	1021
AD-65409	gsgsuggaCfuUfCfUfcucaAfUfuuuuL96	993	PusAfsaaaUfuGfAfgagaAfgUfccaccsasc	1022
AD-65403	gsgsuggaCfuUfCfUfcucaAfUfuuuuL96	994	usAfsaaaUfuGfAfgagaAfgUfccaccsasc	1023
AD-65385	usgsgacuacdTcucaaaauuuL96	995	usdAsaaaugadGagadAguccasusu	1024

[00648] Um rastreamento de dose única destes dúplices foi realizado em duplicado transfectando os dúplices em células HepG2.215 e Hep3B e medindo RNA viral de HBV usando pares de iniciador/sonda para detectar RNA de grelha de leitura aberta (ORF) de HBV P (PORF-1_A e PORF-1_B) e/ou conjuntos de iniciadores para detectar RNA S ORF de HBV (SORF-2_A e SORF-2_B). Os resultados dos ensaios em células HepG2.2.15 são mostrados na Tabela 8 e os resultados dos ensaios em células Hep3B são fornecidos na Tabela 9.

Tabela 8. Rastreamento de dose única de HBV em Células HepG2.2.15

DuplexID	Conjunto Iniciador/Sonda PORF-1 Experiência A	Conjunto Iniciador/Sonda PORF-1 Experiência Duplicada B	Conjunto Iniciador/Sonda SORF-2 Experiência A	Conjunto Iniciador/ Sonda SORF-2 Experiência Duplicada B
AD-65369	0,1875	0,042	0,0446	0,3018
AD-65381	0,086	0,249	0,1008	0,553
AD-63962	0,4838	0,3475	0,2237	0,5258
AD-63938	0,3587	2,1213	0,0501	1,1434
AD-65561	0,1076	0,3801	0,0718	0,6897
AD-65566	0,4127	0,3211	0,185	11,1161
AD-63944	0,9489	0,7098	0,393	0,2771
AD-63968	NoIC50	NoIC50	1,8788	NoIC50
AD-65406	3,3749	18,8396	3,8204	2,2662
AD-65396	NoIC50	6,8758	3,7382	4,2157
AD-65427	0,0089	0,0181	0,0066	0,015
AD-65573	0,0174	0,0332	0,0029	0,0227
AD-65432	0,0211	0,0593	0,0112	0,0366
AD-64332	0,0268	0,0329	0,0624	0,0217
AD-64322	0,0963	0,1077	0,0992	0,0963
AD-64272	0,0773	0,1199	0,0763	0,093
AD-65583	0,1624	0,2228	0,1568	0,1496

DuplexID	Conjunto Iniciador/Sonda PORF-1 Experiência A	Conjunto Iniciador/Sonda PORF-1 Experiência Duplicada B	Conjunto Iniciador/Sonda SORF-2 Experiência A	Conjunto Iniciador/ Sonda SORF-2 Experiência Duplicada B
AD-63994	0,7019	0,1467	0,0832	0,0385
AD-65370	0,2404	0,7916	0,3952	0,1964
AD-65265	0,2255	0,5008	0,2893	0,318
AD-65407	0,9533	0,261	0,4254	0,1121
AD-64027	0,7692	0,5887	0,5208	0,5697
AD-65266	3,4109	0,5055	0,8532	0,3658
AD-65389	0,9172	0,6514	0,4915	0,2872
AD-64008	1,2738	0,7865	1,9519	0,808
AD-65377	0,6052	1,6	24,9403	0,6065
AD-65409	1,8304	1,6479	0,104	0,0557
AD-65403	12,1516	0,667	1,006	0,233
AD-65385	NoIC50	NoIC50	NoIC50	NoIC50

Tabela 9. Rastreamento de dose única de HBV em Células Hep3B

DuplexID	Conjunto Iniciador/Sonda PORF-1 Experiência A	Conjunto Iniciador/Sonda PORF-1 Experiência B
AD-65369	0,0982	0,0508
AD-65381	0,2392	0,1097
AD-63962	0,0769	0,0706
AD-63938	0,039	0,0111
AD-65561	0,6316	0,6931
AD-65566	0,2747	0,5331
AD-63944	0,1317	0,0566
AD-63968	0,4374	0,8811
AD-65406	1,4961	1,2573
AD-65396	1,9971	0,9952
AD-65427	0,0234	0,006

DuplexID	Conjunto Iniciador/Sonda PORF-1 Experiência A	Conjunto Iniciador/Sonda PORF-1 Experiência B
AD-65573	0,0346	0,0334
AD-65432	0,0352	0,2664
AD-64332	0,0221	0,4541
AD-64322	0,1743	0,1616
AD-64272	0,1885	0,6699
AD-65583	0,1241	8,1611
AD-63994	3,3623	5,2897
AD-65370	0,2281	NoIC50
AD-65265	NoIC50	7,3426
AD-65407	0,1404	1,3833
AD-64027	27,1417	1,1832
AD-65266	NoIC50	NoIC50
AD-65389	NoIC50	NoIC50
AD-64008	NoIC50	NoIC50
AD-65377	NoIC50	NoIC50
AD-65409	1,8065	3,436
AD-65403	0,5113	18,0359
AD-65385	NoIC50	NoIC50

[00649] Um subconjunto destes dúplexes foi também avaliado quanto a estabilidade metabólica *in vitro* usando dois ensaios, um ensaio de estabilidade de tritosoma e um ensaio de estabilidade do citosol.

[00650] Para os ensaios de estabilidade de tritosoma, tritosomas de fígado de rato (produto personalizado Xenotech PR14044) foram descongelados à temperatura ambiente e diluídos a 0,5 unidades/ mL de fosfatase ácida em tampão a pH 5,0 de citrato de sódio a 20mm. Foram preparadas amostras de vinte e quatro horas misturando 100 µL de tritosomas de fosfatase ácida a 0,5 unidades/mL com 25 µL de amostra sRNAi a 0,4 mg/mL em um tubo de microcentrífuga e incubando durante vinte e quatro horas em um Termomisturador Eppendorf Thermomixer

definido para 37°C e 300 rpm. Após vinte e quatro horas de incubação, 300 µL de Tampão de Carregamento de Lise Phenomenex (Cat. # ALO-8498) e 12,5 µL de um sRNAi de padrão interno de 0,4 mg/mL foram adicionados a cada amostra. Amostras de tempo de 0 horas foram preparadas misturando 100 µL de tritosomas de fosfatase ácida a 0,5 unidades/mL com 25 µL de amostra de sRNAi a 0,4 mg/mL, 300 µL de tampão de carregamento de lise Phenomenex e 12,5 µL de um sRNAi de padrão interno a 0,4 mg/mL. Foi extraído sRNAi de amostras de 24 horas e amostras de 0 horas usando um Clarity OTX Starter Kit da Phenomenex (Cat. # KSO-8494). Depois de as amostras serem extraídas foram transferidas para um tubo de microcentrífuga e secadas usando um concentrador CentriVap Labconco (Cat. # 7810010). As amostras foram então ressuspensas com 500 µL de água livre de nuclease. Cinquenta µL de cada amostra foram realizadas em um Infinity Binary LC 1260 da Agilent Technologies com Quadrupole LC/MS 6130 da Agilent Technologies. Foi executado o método da bomba quaternária durante 12,20 minutos a 0,400 mL/min, com o seguinte calendário:

Função de tempo	Parâmetro
0,20	Tampão A a 5% (16mM de TEA 200mM de HFIP), tampão B a 95% (100% de metanol)
2,50	Tampão A a 5% (16mM de TEA 200mM de HFIP), tampão B a 95% (100% de metanol)
3,00	Tampão A a 100% (16mM de TEA 200mM de HFIP)

[00651] Foi executado o método da bomba binária durante 12,20 minutos a 0,700 mL/min, com o seguinte calendário:

Função de tempo	Parâmetro
0,00	Tampão A a 100% (16mM de TEA 200mM de HFIP)
0,40	Tampão A a 100% (16mM de TEA 200mM de HFIP)
10,00	Tampão A a 60% (16mM de TEA 200mM de HFIP), tampão B a 40% (100% de ACN)
10,10	Tampão A a 100% (16mM de TEA 200mM de HFIP)
12,20	Tampão A a 100% (16mM de TEA 200mM de HFIP)

[00652] Tanto a coluna esquerda como a direita foram definidas a 75,00°C. O sinal de UV foi medido no comprimento de onda de 260nm. A porcentagem remanescente de cada filamento foi calculada usando a seguinte equação:

$$\% \text{ de filamento remanescente} = 100 * (\text{área de pico}_{\text{filamento 24h}} / \text{área de pico}_{\text{filamento 0h}} * (\text{área de pico}_{\text{padrão 24h}} / \text{área de pico}_{\text{padrão 0h}})).$$

[00653] Para o ensaio de estabilidade de citosol, citosol de fígado de ratos fêmea (Xenotech Cat. # R1500. C) foi descongelado à temperatura ambiente e diluído a 1 mg/mL em tampão Tris a 50 mM: HCl pH 7,4, 5mM de MgCl₂. Foram preparadas amostras de 24 horas misturando 100 µL de citosol a 1mg/mL com 25 µL de amostra sRNAi a 0,4 mg/mL em um tubo de microcentrífuga e incubando durante 24 horas em um Termomisturador Eppendorf Thermomixer definido para 37°C e 300 rpm. Após 24 horas de incubação, 300 µL de Tampão de Carregamento de Lise Phenomenex (Cat. # ALO-8498) e 12,5 µL de um sRNAi de padrão interno de 0,4 mg/mL foram adicionados a cada amostra. Amostras de 0 horas foram preparadas misturando 100 µL de citosol a 1mg/mL com 25 µL de amostra de sRNAi a 0,4 mg/mL, 300 µL de tampão de carregamento de lise Phenomenex e 12,5 µL de um sRNAi de padrão interno a 0,4 mg/mL. Foi extraído sRNAi de amostras de 24 horas e amostras de 0 horas usando um Clarity OTX Starter Kit da Phenomenex (Cat. # KSO-8494). Depois de as amostras serem extraídas foram transferidas para um tubo de microcentrífuga e secadas usando um concentrador CentriVap Labconco (Cat. # 7810010). As amostras foram então ressuspensas com 500 µL de água livre de nuclease. 50 µL de cada amostra foram realizadas em um Infinity Binary LC 1260 da Agilent Technologies com Quadrupole LC/MS 6130 da Agilent Technologies. Foi executado o método da bomba quaternária durante 12,20 minutos a 0,400 mL/min, com o seguinte calendário:

Função de tempo	Parâmetro
0,20	Tampão A a 5% (16mM de TEA 200mM de HFIP), tampão B a 95% (100% de metanol)
2,50	Tampão A a 5% (16mM de TEA 200mM de HFIP), tampão B a 95% (100% de metanol)
3,00	Tampão A a 100% (16mM de TEA 200mM de HFIP)

[00654] Foi executado o método da bomba binária durante 12,20 minutos a 0,700 mL/min, com o seguinte calendário:

Função de tempo	Parâmetro
0,00	Tampão A a 100% (16mM de TEA 200mM de HFIP)
0,40	Tampão A a 100% (16mM de TEA 200mM de HFIP)
10,00	Tampão A a 60% (16mM de TEA 200mM de HFIP), tampão B a 40% (100% de ACN)
10,10	Tampão A a 100% (16mM de TEA 200mM de HFIP)
12,20	Tampão A a 100% (16mM de TEA 200mM de HFIP)

[00655] Tanto a coluna esquerda como a direita foram definidas a 75,00°C. O sinal de UV foi medido no comprimento de onda de 260nm. A porcentagem remanescente de cada filamento foi calculada usando a seguinte equação:

% de filamento remanescente = $100 * (\text{área de pico}_{\text{filamento 24h}} / \text{área de pico}_{\text{filamento 0h}} * (\text{área de pico}_{\text{padrão 24h}} / \text{área de pico}_{\text{padrão 0h}}))$.

[00656] Os resultados dos ensaios de estabilidade da tritosoma de vinte e quatro horas são fornecidos na Tabela 10 e os resultados dos ensaios da estabilidade de citosol de 24 horas são fornecidos na Tabela 11.

Tabela 10. Ensaios de estabilidade de tritosoma a 24 horas.

% de Antissenso Remanescente	% Senso Remanescente	DuplexID
87,59	72,43	AD-65381
67,59	82,48	AD-65566
30,52	34,98	AD-63968
115,17	79,61	AD-65427
43,00	76,84	AD-65573

% de Antissenso Remanescente	% Senso Remanescente	DuplexID
129,69	128,59	AD-64272
100,30	119,85	AD-65407
94,06	110,90	AD-64008
98,63	127,48	AD-65377
105,06	119,88	AD-65409
117,55	104,30	AD-65403

Tabela 11. Ensaios de estabilidade de citosol a 24 horas.

% de Antissenso Remanescente	% de Senso Remanescente	DuplexID
67,78	22,42	AD-65381
55,89	15,26	AD-65566
88,39	46,94	AD-63968
89,50	66,35	AD-65427
69,01	41,47	AD-65573
96,77	78,00	AD-64272
64,46	24,10	AD-65407
35,39	26,39	AD-64008
79,98	66,50	AD-65377
86,24	74,25	AD-65409
60,45	62,41	AD-65403

Exemplo 4. Síntese e Rastreamento de Dúplexes de sRNAi Adicionais

[00657] Moléculas adicionais de RNAi visando o genoma do HBV foram concebidas e sintetizadas como descrito acima. Uma lista detalhada das sequências não modificadas adicionais de filamentos senso e antissenso de HBV é mostrada na tabela 12 e uma lista detalhada sequências modificadas adicionais de filamentos senso e antissenso de HBV é mostrada na tabela 13.

Tabela 12. Sequências Não modificadas de Filamentos Senso e Antissenso de dsRNAs de HBV

ID do Dúplex	ID do Senso	Sequência Senso Não Modificada (5' a 3')	SEQ ID NO:	ID do Antissenso	Sequência Antissenso Não Modificada (5' a 3')	SEQ ID NO:
AD-65381	A-130366.9	UCGUGGUGGACUUCUCUCA	1025	A-131904.1	UGAGAGAAGUCCACCACGAUU	1036
AD-66019	A-130366.9	UCGUGGUGGACUUCUCUCA	1026	A-131904.1	UGAGAGAAGUCCACCACGAUU	1037
AD-65375	A-130366.9	UCGUGGUGGACUUCUCUCA	1027	A-130364.7	UGAGAGAAGUCCACCACGAUU	1038
AD-65427	A-130441.7	GUGCACUUCGCUUCACCUCUA	1028	A-131905.1	UAGAGGUGAAGCGAAGUGCACUU	1039
AD-66110	A-130441.7	GUGCACUUCGCUUCACCUCUA	1029	A-131905.1	UAGAGGUGAAGCGAAGUGCACUU	1040
AD-65421	A-130441.7	GUGCACUUCGCUUCACCUCUA	1030	A-130442.6	UAGAGGUGAAGCGAAGUGCACUU	1041
AD-65407	A-130371.12	CGUGGUGGACUUCUCUCAUU	1031	A-130372.5	AAUUGAGAGAAGUCCACCAGCAG	1042
AD-65377	A-130384.4	CGUGGUGGUUCTUCUCUAAAUU	1032	A-130748.3	AAUUGAGAGAAGUCCACCAGCUU	1043
AD-65409	A-130388.15	GGUGGACUUCUCUCAAUUUUA	1033	A-131906.1	UAAAAUUGAGAGAAGUCCACCAC	1044
AD-66111	A-130388.15	GGUGGACUUCUCUCAAUUUUA	1034	A-131906.1	UAAAAUUGAGAGAAGUCCACCAC	1045
AD-65403	A-130388.15	GGUGGACUUCUCUCAAUUUUA	1035	A-130389.4	UAAAAUUGAGAGAAGUCCACCAC	1046

Tabela 13. Sequências Modificadas de Fitas Senso e Antissenso de dsRNAs de HBV

ID do Dúplex	ID do Senso	Sequência Senso (5' a 3')	SEQ ID NO:	ID do Antissenso	Sequência Antissenso (5' a 3')	SEQ ID NO:
AD-65381	A-130366.9	uscsguGfgUfGfGfacuucucucaL96	1047	A-131904.1	<u>P</u> usGfsagaGfaAfGfuccaCfcAfcgasusu	1058
AD-66019	A-130366.9	uscsguGfgUfGfGfacuucucucaL96	1048	A-131904.1	VP usGfsagaGfaAfGfuccaCfcAfcgasusu	1059
AD-65375	A-130366.9	uscsguGfgUfGfGfacuucucucaL96	1049	A-130364.7	usGfsagaGfaAfGfuccaCfcAfcgasusu	1060
AD-65427	A-130441.7	gsusgcacUfuCfGfCfuuccaccucuaL96	1050	A-131905.1	<u>P</u> usAfsagagGfugaagcgAfaGfugcacsusu	1061
AD-66110	A-130441.7	gsusgcacUfuCfGfCfuuccaccucuaL96	1051	A-131905.1	VP usAfsagagGfugaagcgAfaGfugcacsusu	1062
AD-65421	A-130441.7	gsusgcacUfuCfGfCfuuccaccucuaL96	1052	A-130442.6	usAfsagagGfugaagcgAfaGfugcacsusu	1063
AD-65407	A-130371.12	csgsugguGfgAfCfUfucucUfCfaauuL96	1053	A-130372.5	asAfsuugAfgAfgAfaguCfcAfcagcsasg	1064
AD-65377	A-130384.4	csgsuggudGgucdTucucuaaaauL96	1054	A-130748.3	asdAsuugagagdAagudCcaccagcsusu	1065
AD-65409	A-130388.15	gsgsuggaCfuUfCfUfcucaAfUfuuuuL96	1055	A-131906.1	<u>P</u> usAfsaaaUfuGfAfgagaAfgUfccaccsasc	1066
AD-66111	A-130388.15	gsgsuggaCfuUfCfUfcucaAfUfuuuuL96	1056	A-131906.1	VP usAfsaaaUfuGfAfgagaAfgUfccaccsasc	1067
AD-65403	A-130388.15	gsgsuggaCfuUfCfUfcucaAfUfuuuuL96	1057	A-130389.4	usAfsaaaUfuGfAfgagaAfgUfccaccsasc	1068

[00658] Foi realizado um rastreamento primário de dose única destes dúplices de RNAi utilizando o ensaio de luciferase Dual-Glo®, como descrito acima. Os resultados deste rastreamento em células Cos7 transfectadas com os RNAs de HBV indicados são mostrados na Tabela 14. Os dados são expressos como porcentagem de mRNA remanescente em relação a controle negativo a 24 horas.

Tabela 14. Rastreamento primário de dose única de HBV em células Cos7 usando Ensaio Dual-Glo Luciferase®

	Rastreamento primário de dual luciferase				
	% de mensagem remanescente a 24 horas				DRC ED50
ID do Dúplex	a 50 nM	DESVPAD	a 1 nM	DESVPAD	(nM)
AD-65381	9,3	0,24	15,6	0,77	0,019
AD-66019	ND	ND	ND	ND	ND
AD-65375	24,2	0,36	71,4	0,69	Nenhum ED50
AD-65427	28,8	1,60	41,0	1,73	0,117
AD-66110	ND	ND	ND	ND	ND
AD-65421	47,6	3,49	85,5	4,76	Nenhum ED50
AD-65407	14,3	0,52	25,3	2,11	0,038
AD-65377	21,8	0,31	37,9	1,12	0,130
AD-65409	9,5	0,41	13,2	0,71	0,013
AD-66111	ND	ND	ND	ND	ND
AD-65403	12,6	0,50	37,2	2,31	0,069

ND – não realizado

[00659] Estes dúplices foram também avaliados quanto a resposta à dose de silenciamento de RNA viral usando o ensaio de luciferase Dual-Glo®, conforme descrito acima. As doses dos dúplices usadas para estes ensaios foram 50 nM, 8,333333333 nM, 1,388888889 nM, 0,231481481 nM, 0,038580247 nM, 0,006430041 nM, 0,001071674 nM, 0,000178612 nM, $2,97687 \times 10^{-5}$ nM, $4,96145 \times 10^{-6}$ nM, $8,26909 \times 10^{-7}$ nM e $1,37818 \times 10^{-7}$ nM, que representam uma diluição de 1 a 6 dos

dúplexes começando em 50 nM ao longo de 12 doses. Os resultados deste rastreamento em células Cos7 transfectadas com os RNAs de HBV indicados são mostrados na Tabela 15. Os dados são expressos como porcentagem de mRNA remanescente em relação a controle negativo a 24 horas.

Tabela 15. Rastreamento de resposta à dose em células Cos7 usando Ensaio Dual-Glo Luciferase®

Células repórter de HBV Dual luciferase									
IC50 (nM) a 24 horas									
Dúplex ID	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Ensaio 4	Ensaio 5	Ensaio 6	Ensaio 7	Média ¹	Desvpad
AD-65381	0,019	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,019	
AD-66019	ND	0,021	0,021	0,016	0,026	0,019	0,031	0,022	0,005
AD-65375	UD	0,215	0,149	0,081	0,246	0,138	0,276	0,184	0,074
AD-65407	0,038	0,045	0,051	0,021	0,050	0,056	0,068	0,047	0,015
AD-65377	0,130	0,029	0,046	0,087	0,096	0,146	0,090	0,089	0,042
AD-65409	0,013	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,013	
AD-66111	ND	0,018	0,013	0,012	0,018	0,021	0,033	0,019	0,007
AD-65403	0,069	0,044	0,033	0,039	0,042	0,046	0,062	0,048	0,013
AD-65427	0,017	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,117	
AD-66110	ND	0,238	0,296	0,145	0,157	0,161	ND	0,199	0,065
AD-65421	UD	1,219	1,385	2,254	0,799	2,906	ND	1,713	0,852

¹Médias de 5-7 replicados biológicos executados em triplicado

ND – não realizado

[00660] A eficácia *in vitro* e potência destes dúplex foram também avaliadas. Em particular, foi determinada a resposta à dose dos dúplexes para silenciamento do RNA viral em lisados celulares transfectados de HepG2.2.15 e Hep3B e para silenciamento de HBsAg em sobrenadantes de células de HepG2.2.15. As células foram transfectadas com 12 doses separadas dos dúplexes que variam de 50 nM a 1×10^{-7} nM e setenta e duas horas após transfecção, o nível de RNA viral foi determinado utilizando pares de iniciador/sonda para detectar P ORF e/ou S ORF. O nível de HBsAg foi determinado

utilizando um ensaio ELISA.

[00661] Os resultados do silenciamento de RNA viral P ORF em células de HepG2.2.15 usando os dúplex indicados são providenciados na Tabela 16. Os resultados do silenciamento de RNA viral S ORF em células de HepG2.2.15 usando os dúplex indicados são providenciados na Tabela 17. Os resultados de silenciamento de HBsAg em células HepG2.2.15 são providenciados na Tabela 18.

[00662] Os resultados do silenciamento de RNA viral P ORF em células de Hep3B usando os dúplex indicados são providenciados na Tabela 19.

Tabela 16. Rastreamento de resposta à dose em células HepG2.2.15

Silenciamento de RNA viral em células HepG2.2.15							
Conjunto iniciador/sonda P-ORF							
IC50 (nM) a 72 horas							
Dúplex ID	Desenvolvimento do Ensaio				Ensaio Otimizado		
					Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3
AD-65381	0,079	0,208	ND	ND	ND	ND	ND
AD-66019	ND	ND	0,265	0,010	0,022	0,032	0,023
AD-65375	12,3	UD	UD	UD	0,172	0,257	0,672
AD-65407	0,247	1,0	0,365	0,109	0,069	0,103	0,095
AD-65377	1,3	UD	4,9	UD	0,842	0,838	0,615
AD-65409	0,436	1,0	ND	ND	ND	ND	ND
AD-66111	ND	ND	0,456	0,030	50	0,294	ND
AD-65403	9,2	10,4	3,4	UD	0,114	0,384	1,0
AD-65427	0,007	0,018	ND	ND	ND	ND	ND
AD-66110	ND	ND	0,012	0,053	0,016	0,010	0,021
AD-65421	0,069	0,091	0,034	0,006	0,002	0,003	0,007

ND – não realizado

Tabela 17. Rastreamento de resposta à dose em células HepG2.2.15

Silenciamento de RNA viral em células HepG2.2.15								
Conjunto iniciador/sonda S-ORF								
IC ₅₀ (nM) a 72 horas								
Dúplex ID	Desenvolvimento do Ensaio				Ensaio Otimizado			
					Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	
AD-65381	0,252	0,215	ND	ND	ND	ND	ND	
AD-66019	ND	ND	0,245	0,011	0,009	0,016	0,005	
AD-65375	45	UD	UD	UD	0,124	0,048	0,056	
AD-65407	0,232	0,645	0,577	0,015	0,021	0,023	0,016	
AD-65377	1,4	8,6	UD	UD	0,575	0,483	0,117	
AD-65409	0,433	0,242	ND	ND	ND	ND	ND	
AD-66111	ND	ND	2,1	0,455	ND	0,416	ND	
AD-65403	0,997	0,670	0,668	UD	0,074	0,270	1,1	
AD-65427	0,008	0,018	ND	ND	ND	ND	ND	
AD-66110	ND	ND	0,022	0,050	0,035	0,038	0,020	
AD-65421	0,083	0,097	0,046	0,003	0,003	0,005	0,001	

ND – não realizado

Tabela 18. Rastreamento de resposta à dose em células HepG2.2.15

ELISA de HBsAg	
IC ₅₀ (nM)	
Dúplex ID	Ensaio 1
AD-65381	ND
AD-66019	0,105
AD-65375	1,2
AD-65407	0,102
AD-65377	2,9
AD-65409	ND
AD-66111	0,018
AD-65403	0,064
AD-65427	ND
AD-66110	0,002
AD-65421	0,008

ND – não realizado

Tabela 19. Rastreamento de resposta à dose em células Hep3B

ID do Dúplex	Rastreamento de células Hep3B		
	DRC ED50		
	Conjunto iniciador/sonda P-ORF		
	P-ORF ensaio 1	P-ORF ensaio 2	Combinado
AD-65381	0,239	0,110	0,194
AD-66019	ND	ND	ND
AD-65375	ND	ND	ND
AD-65427	0,023	0,006	0,018
AD-66110	ND	ND	ND
AD-65421	ND	ND	ND
AD-65407	0,140	1,383	0,527
AD-65377	Nenhum ED50	Nenhum ED50	Nenhum ED50
AD-65409	1,807	3,436	2,905
AD-66111	ND	ND	ND
AD-65403	0,511	18,036	5,013

ND – não realizado

[00663] Estes dúplexes foram também avaliados quanto a estabilidade *in vitro* usando dois ensaios, um ensaio de estabilidade de tritosoma e um ensaio de estabilidade do citosol, como descrito acima. Os resultados destes ensaios são providenciados na Tabela 20.

Tabela 20. Ensaios de estabilidade de tritosoma e citosol a 24 horas.

Dúplex ID	Estabilidade metabólica <i>in vitro</i>			
	% de genitor remanescente após 24 horas de incubação			
	Endo-lisossoma		Citosol	
	% AS	% SS	% AS	% SS
AD-65381	88	72	68	22
AD-66019	ND	ND	ND	ND

Estabilidade metabólica <i>in vitro</i>				
% de genitor remanescente após 24 horas de incubação				
Dúplex ID	Endo-lisossoma		Citosol	
	% AS	% SS	% AS	% SS
AD-65375	ND	ND	ND	ND
AD-65407	100	120	64	24
AD-65377	99	127	80	67
AD-65409	105	120	86	74
AD-66111	ND	ND	ND	ND
AD-65403	ND	ND	ND	ND
AD-65427	115	80	89	66
AD-66110	ND	ND	ND	ND
AD-65421	ND	ND	ND	ND

[00664] Rastreamentos de resposta à dose de várias combinações destes dúplices foram também realizados em células HepG2.215. As doses dos dúplices usadas para estes ensaios foram 50 nM, 8,333333333 nM, 1,388888889 nM, 0,231481481 nM, 0,038580247 nM, 0,006430041 nM, 0,001071674 nM, 0,000178612 nM, $2,97687 \times 10^{-5}$ nM, $4,96145 \times 10^{-6}$ nM, $8,26909 \times 10^{-7}$ nM e $1,37818 \times 10^{-7}$ nM, que representam uma diluição de 1 a 6 dos dúplices começando em 50 nM ao longo de 12 doses. Setenta e duas horas após a transfecção destes dúplices, foram determinados o nível de RNA viral (P ORF e S ORF) e o nível de HBsAg secretado, como descrito acima. Os resultados destes ensaios são providenciados na Tabela 21.

Tabela 21. Rastreamento de dose única de HBV em Células HepG2.2.15 após setenta e duas horas

DuplexID	S-ORF2 IC50_A (nM)	S-ORF2 IC50_B (nM)	S-ORF2 IC50_Combine (nM)	P-ORF1 IC50_A (nM)	P-ORF1 IC50_B (nM)	P-ORF1 IC50_Combine (nM)	S Ag ELISA ED50 (nM)
AD-66019/AD-66110	0,0091	0,0017	0,0038	0,0213	0,002	0,0076	0,007482
AD-66019/AD-65421	0,0438	0,2371	0,0131	0,0367	0,0106	0,0204	0,026398
AD-65375/AD-66110	0,0832	1,0896	0,193	0,0377	0,2348	0,2022	0,004174
AD-65375/AD-65421	0,084	0,0475	0,0708	0,0566	0,0388	0,0371	0,030822
AD-65407/AD-66110	0,0387	0,001	0,0083	0,0402	0,0018	0,0116	0,010172
AD-65407/AD-65421	0,0686	0,0062	0,0225	0,0711	0,0177	0,0396	0,066556
AD-65377/AD-66110	0,0634	0,8267	0,6269	0,0477	0,073	0,0618	0,01435
AD-65377/AD-65421	0,1461	0,0468	0,1372	0,1207	0,0088	0,0451	0,03419
AD-66111/AD-66110	0,0382	0,0094	0,0161	0,0292	0,0027	0,0088	0,013155
AD-66111/AD-65421	0,1628	0,0919	0,1579	0,1297	0,0396	0,0722	0,026889
AD-65403/AD-66110	0,0499	0,0094	0,0444	0,0383	0,0164	0,0348	0,003783
AD-65403/AD-65421	0,1011	0,0007	0,0208	0,1118	0,0031	0,0297	0,014569

Exemplo 5. Síntese e Rastreamento *in vitro* de Dúpliques de sRNAi Adicionais

[00665] Moléculas adicionais de RNAi visando o X ORF do genoma do HBV foram concebidas e sintetizadas como descrito acima. Uma lista detalhada das sequências não modificadas adicionais de filamento senso e antissenso de HBV é mostrada na Tabela 22. Uma lista detalhada das sequências modificadas adicionais de filamento senso e antissenso de HBV é mostrada na Tabela 23.

Tabela 22. Sequências Não modificadas de Filamentos Senso e Antissenso de dsRNAs de HBV

ID do Dúplex	Nome do Oligo Senso	Sequência Senso (5' a 3')	SEQ ID NO:	Nome Oligo Antissenso	Sequência Antissenso (5' a 3')	SEQ ID NO:
AD-65776	A-131859.1	UGUGCACUUCGCUUCACCUCU	1069	A-131860.1	AGAGGUGAAGCGAAGUGCACACG	1115
AD-65782	A-131877.1	UGCACUUCGCUUCACCUCUGA	1070	A-131878.1	UCAGAGGUGAAGCGAAGUGCACA	1116
AD-65792	A-131865.1	GUGUGCACUUCGCUUCACCUA	1071	A-131866.1	UAGGUGAAGCGAAGUGCACACGG	1117
AD-65781	A-131861.1	CGUGUGCACUUCGCUUCACCU	1072	A-131862.1	AGGUGAAGCGAAGUGCACACGGU	1118
AD-64304	A-128443.6	GUGCACUUCGCUUCACCUCUA	1073	A-128444.5	UAGAGGUGAAGCGAAGUGCACAC	1119
AD-65771	A-131857.1	CCGUGUGCACUUCGCUUCACA	1074	A-131858.1	UGUGAAGCGAAGUGCACACGGUC	1120
AD-65758	A-131867.1	CACUUCGCUUCACCUCUGCAA	1075	A-131868.1	UUGCAGAGGUGAAGCGAAGUGCA	1121
AD-65777	A-131875.1	ACUUCGCUUCACCUCUGCACA	1076	A-131876.1	UGUGCAGAGGUGAAGCGAAGUGC	1122
AD-61567	A-123525.2	GGCUGUAGGCAUAAAUUGGUA	1077	A-123526.2	UACCAAUUUUAUGCCUACAGCCUC	1123
AD-65772	A-131873.1	UUCGCUUCACCUCUGCACGUA	1078	A-131874.1	UACGUGCAGAGGUGAAGCGAAGU	1124
AD-65767	A-131871.1	UCGCUUCACCUCUGCACGUCA	1079	A-131872.1	UGACGUGCAGAGGUGAAGCGAAG	1125
AD-65763	A-131869.1	CUUCGCUUCACCUCUGCACGU	1080	A-131870.1	ACGUGCAGAGGUGAAGCGAAGUG	1126
AD-64281	A-128395.3	CCCCGUCUGUGCCUUCUCAUA	1081	A-128396.2	UAUGAGAAGGCACAGACGGGGAG	1127
AD-64311	A-128391.3	CCGUCUGUGCCUUCUCAUCA	1082	A-128392.2	UAGAUGAGAAGGCACAGACGGGG	1128
AD-65790	A-131837.1	CCAGCACCAUGCAACUUUUUA	1083	A-131838.1	UAAAAAGUUGCAUGGUGCUGGUG	1129
AD-65761	A-131841.1	CACCAGCACCAUGCAACUUUU	1084	A-131842.1	AAAAGUUGCAUGGUGCUGGUGCG	1130
AD-65786	A-131849.1	CACCAUGCAACUUUUUACCU	1085	A-131850.1	AGGUGAAAAAGUUGCAUGGUGCU	1131
AD-65785	A-131835.1	CAAUGUCAACGACCGACCUUA	1086	A-131836.1	UAAGGUCGGUCGUUGACAUUGCA	1132

ID do Dúplex	Nome do Oligo Senso	Sequência Senso (5' a 3')	SEQ ID NO:	Nome Oligo Antissenso	Sequência Antissenso (5' a 3')	SEQ ID NO:
AD-65787	A-131863.1	CGCUUCACCUCUGCACGUCGA	1087	A-131864.1	UCGACGUGCAGAGGUGAAGCGAA	1133
AD-65770	A-131845.1	ACCUUGAGGCAUACUCAAAG	1088	A-131846.1	CUUUGAAGUAUGCCUCAAGGUCG	1134
AD-65766	A-131843.1	CCGACCUUGAGGCAUACUUCA	1089	A-131844.1	UGAAGUAUGCCUCAAGGUCGGUC	1135
AD-61555	A-123521.2	GACCUUGAGGCAUACUUCAAA	1090	A-123522.2	UUUGAAGUAUGCCUCAAGGUCGG	1136
AD-65762	A-131855.1	ACCGACCUUGAGGCAUACUUA	1091	A-131856.1	UAAGUAUGCCUCAAGGUCGGUCG	1137
AD-65755	A-131827.1	UCGCAUGGAGACCACCGUGAA	1092	A-131828.1	UUCACGGUGGUCUCCAUGCGACG	1138
AD-65788	A-131811.1	UUACAUAAAGAGGACUCUUGGA	1093	A-131812.1	UCCAAGAGUCCUCUUAUGUAAGA	1139
AD-65768	A-131803.1	UCUUACAUAAGAGGACUCUUA	1094	A-131804.1	UAAGAGUCCUCUUAUGUAAGACC	1140
AD-61561	A-123523.2	ACUUCAAAAGACUGUUUGUUUA	1095	A-123524.2	UAAACAAACAGUCUUUGAAGUAU	1141
AD-65764	A-131801.1	UACUUCAAAAGACUGUUUGUUU	1096	A-131802.1	AAACAAACAGUCUUUGAAGUAUG	1142
AD-65753	A-131799.1	AUACUUCAAAAGACUGUUUGUU	1097	A-131800.1	AACAAACAGUCUUUGAAGUAUGC	1143
AD-65765	A-131817.1	UUGUUUAAAGACUGGGAGGAA	1098	A-131818.1	UUCCUCCCAGUCUUUAAACAAAC	1144
AD-65769	A-131819.1	GCAUACUUCAAAAGACUGUUUA	1099	A-131820.1	UAAACAGUCUUUGAAGUAUGCCU	1145
AD-65759	A-131815.1	CAAAGACUGUUUGUUUAAAGA	1100	A-131816.1	UCUUUAAACAAACAGUCUUUGAA	1146
AD-65774	A-131831.1	AGACUGUUUGUUUAAAGACUA	1101	A-131832.1	UAGUCUUUAAACAAACAGUCUUU	1147
AD-65778	A-131807.1	GUUUGUUUAAAGACUGGGAGA	1102	A-131808.1	UCUCCCAGUCUUUAAACAAACAG	1148
AD-65773	A-131805.1	GGGGGAGGAGAUUAGAUUAAA	1103	A-131806.1	UUUAAUCUAAUCUCCUCCCCCAA	1149
AD-65789	A-131825.1	GGGGAGGAGAUUAGAUUAAAG	1104	A-131826.1	CUUUAAUCUAAUCUCCUCCCCCA	1150
AD-65783	A-131809.1	GUUGGGGGAGGAGAUUAGAUU	1105	A-131810.1	AAUCUAAUCUCCUCCCCCAACUC	1151

ID do Dúplex	Nome do Oligo Senso	Sequência Senso (5' a 3')	SEQ ID NO:	Nome Oligo Antissenso	Sequência Antissenso (5' a 3')	SEQ ID NO:
AD-65754	A-131813.1	UUGGGGGAGGAGAUUAGAUUA	1106	A-131814.1	UAAUCUAAUCUCCUCCCCCAACU	1152
AD-65779	A-131821.1	GGGAGGAGAUUAGAUUAAAGA	1107	A-131822.1	UCUUUAAUCUAAUCUCCUCCCC	1153
AD-65791	A-131851.1	UUAGAUUAAAGGUCUUUGUAA	1108	A-131852.1	UUACAAAGACCUUUAUCUAAUC	1154
AD-65760	A-131829.1	UAGAUUAAAGGUCUUUGUACU	1109	A-131830.1	AGUACAAAGACCUUUAUCUAAU	1155
AD-65784	A-131823.1	AUUAGAUUAAAGGUCUUUGUA	1110	A-131824.1	UACAAAGACCUUUAUCUAAUCU	1156
AD-65757	A-131853.1	GAGGAGAUUAGAUUAAAGGUA	1111	A-131854.1	UACCUUUAAUCUAAUCUCCUCCC	1157
AD-65775	A-131847.1	GGACUCUUGGACUCUCUGCAA	1112	A-131848.1	UUGCAGAGAGUCCAAGAGUCCUC	1158
AD-65780	A-131833.1	ACUCUUGGACUCUCUGCAAUA	1113	A-131834.1	UAUUGCAGAGAGUCCAAGAGUCC	1159
AD-65756	A-131839.1	AGAUUAAAGGUCUUUGUACUA	1114	A-131840.1	UAGUACAAAGACCUUUAUCUAA	1160

Tabela 23. Sequências Não modificadas de Filamentos Senso e Antissenso de dsRNAs de HBV

ID do Dúplex	Nome do Oligo Senso	Sequência Senso (5' a 3')	SEQ ID NO:	Nome do Oligo Antissenso	Sequência Antissenso (5' a 3')	SEQ ID NO:
AD-65776	A-131859.1	UfsgsUfgCfaCfuUfCfGfcUfuCfaCfcUfcUfL 96	1161	A-131860.1	asGfsaGfgUfgAfaGfcgaAfgUfgCfaCfas csg	1207
AD-65782	A-131877.1	UfsgsCfaCfuUfcGfCfUfuCfaCfcUfcUfgAfL 96	1162	A-131878.1	usCfsaGfaGfgUfgAfagcGfaAfgUfgCfas csa	1208
AD-65792	A-131865.1	GfsusGfuGfcAfcUfUfCfGfCfuUfcAfcCfuAfL 96	1163	A-131866.1	usAfsgGfuGfaAfgCfcaaGfuGfcAfcAfcS gsg	1209

ID do Dúplex	Nome do Oligo Senso	Sequência Senso (5' a 3')	SEQ ID NO:	Nome do Oligo Antissenso	Sequência Antissenso (5' a 3')	SEQ ID NO:
AD-65781	A-131861.1	CfsgsUfgUfgCfaCfUfUfcGfcUfuCfaCfcUfL 96	1164	A-131862.1	asGfsgUfgAfaGfcGfaagUfgCfaCfaCfgs gsu	1210
AD-64304	A-128443.6	GfsusGfcAfcUfuCfGfCfuUfcAfcCfuCfuAfL 96	1165	A-128444.5	usAfsgAfgGfuGfaAfgcgAfaGfuGfcAfc asc	1211
AD-65771	A-131857.1	CfscsGfuGfuGfcAfCfUfuCfGfCfuUfcAfcAfL 96	1166	A-131858.1	usGfsuGfaAfgCfGafaguGfcAfcAfcGfgs usc	1212
AD-65758	A-131867.1	CfsasCfuUfcGfcUfUfCfaCfcUfcUfgCfaAfL 96	1167	A-131868.1	usUfsgCfaGfaGfgUfgaaGfcGfaAfgUfgs csa	1213
AD-65777	A-131875.1	AfscsUfuCfGfCfuUfCfAfcCfuCfuGfcAfcAfL9 6	1168	A-131876.1	usGfsuGfcAfgAfgGfugaAfgCfGafafGfus gsc	1214
AD-61567	A-123525.2	GfsgsCfuGfuAfgGfCfAfuAfaAfuUfgGfuAfL 96	1169	A-123526.2	usAfscCfaAfuUfuAfugcCfuAfcAfgCfcsu sc	1215
AD-65772	A-131873.1	UfsusCfGfCfuUfcAfcCfCfuCfuGfcAfcGfuAfL 96	1170	A-131874.1	usAfscGfuGfcAfgAfgguGfaAfgCfGafas gsu	1216
AD-65767	A-131871.1	UfscsGfcUfuCfaCfCfUfcUfgCfaCfGfUfcAfL 96	1171	A-131872.1	usGfsaCfGfUfgCfaGfaggUfgAfaGfcGfas asg	1217
AD-65763	A-131869.1	CfsusUfcGfcUfuCfAfcCfcUfcUfgCfaCfGfUfL 96	1172	A-131870.1	asCfsgUfgCfaGfaGfgugAfaGfcGfaAfgs usg	1218
AD-64281	A-128395.3	CfscsCfcGfuCfuGfUfGfcCfuUfcUfcAfuAfL 96	1173	A-128396.2	usAfsuGfaGfaAfgGfcacAfgAfcGfgGfgs asg	1219
AD-64311	A-128391.3	CfscsGfuCfuGfuGfCfCfuUfcUfcAfuCfuAfL 96	1174	A-128392.2	usAfsgAfuGfaGfaAfggcAfcAfgAfcGfgs gsg	1220

ID do Dúplex	Nome do Oligo Senso	Sequência Senso (5' a 3')	SEQ ID NO:	Nome do Oligo Antissenso	Sequência Antissenso (5' a 3')	SEQ ID NO:
AD-65790	A-131837.1	CfscsAfgCfaCfcAfUfGfcAfaCfuUfuUfuAfL9 6	1175	A-131838.1	usAfsaAfaAfgUfuGfcuGfgUfgCfuGfgs usg	1221
AD-65761	A-131841.1	CfsasCfcAfgCfaCfCfAfuGfcAfaCfuUfuUfL 96	1176	A-131842.1	asAfsaAfgUfuGfcAfuggUfgCfuGfgUfgs csg	1222
AD-65786	A-131849.1	CfsasCfcAfuGfcAfAfCfuUfuUfuCfaCfcUfL 96	1177	A-131850.1	asGfsgUfgAfaAfaAfguuGfcAfuGfgUfgs csu	1223
AD-65785	A-131835.1	CfsasAfuGfuCfaAfCfGfaCfcGfaCfcUfuAfL 96	1178	A-131836.1	usAfsaGfgUfcGfgUfcguUfgAfcAfuUfgs csa	1224
AD-65787	A-131863.1	CfsgsCfuUfcAfcCfuUfCfuGfcAfcGfuCfGfL 96	1179	A-131864.1	usCfsgAfcGfuGfcAfgagGfuGfaAfgCfGs asa	1225
AD-65770	A-131845.1	AfscsCfuUfgAfgGfCfAfuAfcUfuCfaAfaGfL 96	1180	A-131846.1	csUfsuUfgAfaGfuAfugcCfuCfaAfgGfus csg	1226
AD-65766	A-131843.1	CfscsGfaCfcUfuGfAfGfgCfaUfaCfuUfcAfL 96	1181	A-131844.1	usGfsaAfgUfaUfgCfcucAfaGfgUfcGfgs usc	1227
AD-61555	A-123521.2	GfsasCfcUfuGfaGfGfCfaUfaCfuUfcAfaAfL 96	1182	A-123522.2	usUfsuGfaAfgUfaUfgccUfcAfaGfgUfcs gsg	1228
AD-65762	A-131855.1	AfscsCfGfCfuUfGfAfgGfcAfuAfcUfuAfL9 6	1183	A-131856.1	usAfsaGfuAfuGfcCfucaAfgGfuCfGfGfus csg	1229
AD-65755	A-131827.1	UfscsGfcAfuGfgAfGfAfcCfaCfcGfuGfaAfL 96	1184	A-131828.1	usUfscAfcGfgUfgGfucuCfcAfuGfcGfas csg	1230
AD-65788	A-131811.1	UfsusAfcAfuAfaGfAfGfgAfcUfcUfuGfgAfL9 6	1185	A-131812.1	usCfscAfaGfaGfuCfcucUfuAfuGfuAfas gsa	1231

ID do Dúplex	Nome do Oligo Senso	Sequência Senso (5' a 3')	SEQ ID NO:	Nome do Oligo Antissenso	Sequência Antissenso (5' a 3')	SEQ ID NO:
AD-65768	A-131803.1	UfscsUfuAfcAfuAfAfGfaGfgAfcUfcUfuAfL9 6	1186	A-131804.1	usAfsaGfaGfuCfcUfcuuAfuGfuAfaGfas csc	1232
AD-61561	A-123523.2	AfscsUfuCfaAfaGfAfCfuGfuUfuGfuUfuAfL 96	1187	A-123524.2	usAfsaAfcAfaAfcAfgucUfuUfgAfaGfusa su	1233
AD-65764	A-131801.1	UfsasCfuUfcAfaAfGfAfcUfgUfuUfgUfuUfL 96	1188	A-131802.1	asAfsaCfaAfaCfaGfucuUfuGfaAfgUfas usg	1234
AD-65753	A-131799.1	AfsusAfcUfuCfaAfAfGfaCfuGfuUfuGfuUfL 96	1189	A-131800.1	asApscAfaAfcAfgUfcuuUfgAfaGfuAfusg sc	1235
AD-65765	A-131817.1	UfsusGfuUfuAfaAfGfAfcUfgGfgAfgGfaAfL 96	1190	A-131818.1	usUfscCfuCfcCfaGfucuUfuAfaAfcAfas asc	1236
AD-65769	A-131819.1	GfscsAfuAfcUfuCfaAfaGfaCfuGfuUfuAfL 96	1191	A-131820.1	usAfsaAfcAfgUfcUfuugAfaGfuAfuGfcsc su	1237
AD-65759	A-131815.1	CfsasAfaGfaCfuGfUfUfuGfuUfuAfaAfgAfL 96	1192	A-131816.1	usCfsuUfuAfaAfcAfaacAfgUfcUfuUfgsa sa	1238
AD-65774	A-131831.1	AfsgsAfcUfgUfuUfGfUfuUfaAfaGfaCfuAfL 96	1193	A-131832.1	usAfsgUfcUfuUfaAfacaAfaCfaGfuCfus usu	1239
AD-65778	A-131807.1	GfsusUfuGfuUfuAfAfAfgAfcUfgGfgAfgAfL 96	1194	A-131808.1	usCfsuCfcCfaGfuCfuuuAfaAfcAfaAfcsc asg	1240
AD-65773	A-131805.1	GfsgsGfgGfaGfgAfGfAfuUfaGfaUfuAfaAfL 96	1195	A-131806.1	usUfsuAfaUfcUfaAfucuCfcUfcCfcCfcsa sa	1241
AD-65789	A-131825.1	GfsgsGfgAfgGfaGfAfUfuAfgAfuUfaAfaGfL 96	1196	A-131826.1	csUfsuUfaAfuCfuAfaucUfcCfuCfcCfcsc sa	1242

ID do Dúplex	Nome do Oligo Senso	Sequência Senso (5' a 3')	SEQ ID NO:	Nome do Oligo Antissenso	Sequência Antissenso (5' a 3')	SEQ ID NO:
AD-65783	A-131809.1	GfsusUfgGfgGfgAfGfGfaGfaUfuAfgAfuUfL 96	1197	A-131810.1	asAfsuCfuAfaUfcUfccuCfcCfcCfaAfcsu sc	1243
AD-65754	A-131813.1	UfsusGfgGfgGfaGfGfAfgAfuUfaGfaUfuAfL 96	1198	A-131814.1	usAfsaUfcUfaAfuCfuccUfcCfcCfcAfasc su	1244
AD-65779	A-131821.1	GfsgsGfaGfgAfgAfUfUfaGfaUfuAfaAfgAfL 96	1199	A-131822.1	usCfsuUfuAfaUfcUfaauCfuCfcUfcCfcs csc	1245
AD-65791	A-131851.1	UfsusAfgAfuUfaAfAfGfgUfcUfuUfgUfaAfL 96	1200	A-131852.1	usUfsaCfaAfaGfaCfcuuUfaAfuCfuAfas usc	1246
AD-65760	A-131829.1	UfsasGfaUfuAfaAfGfGfuCfuUfuGfuAfcUfL 96	1201	A-131830.1	asGfsuAfcAfaAfgAfccuUfuAfaUfcUfasa su	1247
AD-65784	A-131823.1	AfsusUfaGfaUfuAfAfAfgGfuCfuUfuGfuAfL 96	1202	A-131824.1	usAfscAfaAfgAfcCfuuuAfaUfcUfaAfusc su	1248
AD-65757	A-131853.1	GfsasGfgAfgAfuUfAfGfaUfuAfaAfgGfuAfL 96	1203	A-131854.1	usAfscCfuUfuAfaUfcuaAfuCfuCfcUfcsc sc	1249
AD-65775	A-131847.1	GfsgsAfcUfcUfuGfGfAfcUfcUfcUfgCfaAfL 96	1204	A-131848.1	usUfsgCfaGfaGfaGfuuccAfaGfaGfuCfcs usc	1250
AD-65780	A-131833.1	AfscsUfcUfuGfgAfCfUfcUfcUfgCfaAfuAfL9 6	1205	A-131834.1	usAfsuUfgCfaGfaGfaguCfcAfaGfaGfus csc	1251
AD-65756	A-131839.1	AfsgsAfuUfaAfaGfGfUfcUfuUfgUfaCfuAfL 96	1206	A-131840.1	usAfsgUfaCfaAfaGfaccUfuUfaAfuCfus asa	1252

[00666] Foi realizado um rastreamento de dose única destes dúplices em células Cos7 a 1 nM e 50 nM, utilizando o ensaio de luciferase Dual-Glo® descrito acima. Os resultados dos ensaios são providenciados na Tabela 24.

Tabela 24. Rastreamento de dose única de HBV usando Ensaio Dual-Glo Luciferase®

DuplexID	50 nM	DESVPAD	1 nM	DESVPAD
AD-65776	20,11	4,21	40,79	1,89
AD-65782	26,31	3,10	61,07	9,16
AD-65792	43,31	5,24	61,09	6,02
AD-65781	25,77	3,66	39,63	2,87
AD-64304	18,87	1,26	29,72	3,37
AD-65771	17,16	1,78	37,55	2,20
AD-65758	31,74	8,26	65,77	11,05
AD-65777	59,76	11,15	77,63	5,14
AD-61567	17,69	5,29	26,45	5,66
AD-65772	58,07	9,67	75,66	4,92
AD-65767	29,65	1,60	39,64	4,36
AD-65763	25,10	5,77	47,78	9,99
AD-64281	39,07	6,80	51,46	4,19
AD-64311	20,51	1,96	37,80	3,53
AD-65790	50,41	7,00	70,30	1,95
AD-65761	13,30	4,38	21,14	3,49
AD-65786	12,45	3,51	22,62	0,33
AD-65785	36,87	6,04	51,49	4,18
AD-65787	27,97	5,73	48,18	7,65
AD-65770	22,67	5,39	41,48	8,52
AD-65766	31,44	3,35	50,25	0,45
AD-61555	18,43	10,83	22,61	0,57
AD-65762	18,87	4,86	34,94	4,81
AD-65755	47,03	9,38	83,19	9,68
AD-65788	35,85	10,13	58,07	4,78
AD-65768	24,02	2,49	28,55	2,53

DuplexID	50 nM	DESVPAD	1 nM	DESVPAD
AD-61561	8,11	1,29	14,26	2,27
AD-65764	16,89	3,99	29,10	1,03
AD-65753	19,10	2,87	29,79	5,26
AD-65765	55,40	10,72	76,93	8,79
AD-65769	19,24	4,47	23,18	2,54
AD-65759	48,86	4,81	87,31	13,75
AD-65774	102,27	12,33	100,79	3,24
AD-65778	64,39	2,60	80,67	2,59
AD-65773	72,64	7,87	80,80	4,83
AD-65789	73,59	4,35	94,72	3,32
AD-65783	54,41	7,15	84,46	4,32
AD-65754	62,51	4,12	102,63	21,42
AD-65779	47,40	7,51	76,20	2,05
AD-65791	12,09	0,70	19,19	3,46
AD-65760	13,50	4,84	25,37	2,09
AD-65784	19,84	1,27	31,04	3,49
AD-65757	22,66	3,97	24,50	5,81
AD-65775	47,78	3,30	58,81	3,05
AD-65780	29,10	2,87	42,85	2,73
AD-65756	10,49	1,62	19,95	2,58

[00667] Com base nestes ensaios, agentes de RNAi visando cinco locais em X ORF de HBV (nucleotídeos 1551, 1577, 1580, 1806 e 1812 de número de acesso no Genbank NC_003977.1 foram selecionados para otimização do composto-protótipo e foram projetados e sintetizados agentes adicionais. Estes agentes adicionais são avaliados em ensaios *in vitro* como descrito acima. Uma lista detalhada das sequências não modificadas adicionais de filamento senso e antissenso visando o X ORF de HBV é mostrada na Tabela 25. Uma lista detalhada das sequências modificadas adicionais de filamento senso e antissenso visando o X ORF de HBV é mostrada na Tabela 26.

[00668] Estes agentes de RNAi foram também avaliados quanto a eficácia *in vivo* usando um modelo de camundongo AAV-HBV (ver, por

exemplo Yang, *et al.* (2014) *Cell and Mol Immunol* 11:71). Este modelo de camundongo exibe viremia de HBV sustentada após infecção com um vírus recombinante adeno-associado (AAV) transportando um genoma de HBV replicável. A expressão hepática do gene HBV nestes camundongos imita a infecção pelo HBV em seres humanos e estes camundongos apresentam inflamação do fígado e danos no fígado significativos, manifestados por um aumento dos níveis ALT, fibrose e esteatose.

[00669] A estes camundongos AAV-HBV foi administrada por via subcutânea uma dose única de 3 mg/kg de AD-66808, AD-66809, AD-66810, AD-66811, AD-66812, AD-66813, AD-66814, AD-66815, AD-66816 e AD-66817, sendo determinado o nível de HBsAg no soro dos animais pré-dose e no dia 14/15 pós-dose. Os resultados destas experiências são fornecidos na Figura 2 e na Tabela 27 e demonstram que os níveis séricos de HBsAg diminuem após uma única administração destes agentes. A Tabela 27 também apresenta os resultados de um rastreamento de dose única em células Cos7 transfectadas com os RNAs de HBV indicados usando o ensaio de luciferase Dual-Glo[®], como descrito acima, para os mesmos agentes de RNAi. Os dados são expressos como porcentagem de mRNA remanescente em relação a controle negativo a 24 horas.

Tabela 25. Sequências Não Modificadas Senso e Antissenso de X ORF de HBV.

DuplexID	Sequência Senso Não Modificada (5' a 3')	SEQ ID NO:	Sequência Antissenso Não Modificada (5' a 3')	SEQ ID NO:
AD-66808	GUCUGUGCCUUCUCAUCUA	1253	UAGAUGAGAAGGCACAGACUU	1263
AD-66809	GUCUGUGCCUUCUCAUCUA	1254	UAGAUGAGAAGGCACAGACUU	1264
AD-66810	GUGUGCACUUCGCUUCACA	1255	UGUGAAGCGAAGUGCACACUU	1265
AD-66811	GUGUGCACUUCGCUUCACA	1256	UGUGAAGCGAAGUGCACACUU	1266
AD-66812	UGUGCACUUCGCUUCACCUCU	1257	AGAGGUGAAGCGAAGUGCACAUU	1267
AD-66813	UGUGCACUUCGCUUCACCUCU	1258	AGAGGUGAAGCGAAGUGCACAUU	1268
AD-66814	CACCAGCACCAUGCAACUUUU	1259	AAAAGUUGCAUGGUGCUGGUGUU	1269
AD-66815	CACCAGCACCAUGCAACUUUU	1260	AAAAGUUGCAUGGUGCUGGUGUU	1270
AD-66816	CACCAUGCAACUUUUUCACCU	1261	AGGUGAAAAAGUUGCAUGGUGUU	1271
AD-66817	CACCAUGCAACUUUUUCACCU	1262	AGGUGAAAAAGUUGCAUGGUGUU	1272

Tabela 26. Sequências Modificadas Senso e Antissenso de X ORF de HBV.

DuplexID	Sequência Senso Modificada (5' a 3')	SEQ ID NO:	Sequência Antissenso Modificada (5' a 3')	SEQ ID NO:
AD-66808	gsuscuGfuGfCfCfuucucaucuaL96	1273	usAfsgauGfaGfAfaggcAfcAfgacsusu	1283
AD-66809	gsuscuGfuGfCfCfuucucaucuaL96	1274	UfsAfsgauGfaGfAfaggcAfcAfgacsusu	1284
AD-66810	gsusguGfcAfCfUfucgcuucacaL96	1275	usGfsugaAfgCfGfaaguGfcAfcacsusu	1285
AD-66811	gsusguGfcAfCfUfucgcuucacaL96	1276	UfsGfsugaAfgCfGfaaguGfcAfcacsusu	1286
AD-66812	usgsugcaCfuUfCfGfcuucaccucuL96	1277	asGfsaggUfgAfAfgcgaAfgUfgcacasusu	1287
AD-66813	usgsugcaCfuUfCfGfcuucaccucuL96	1278	AfsGfsaggUfgAfAfgcgaAfgUfgcacasusu	1288

DuplexID	Sequência Senso Modificada (5' a 3')	SEQ ID NO:	Sequência Antissenso Modificada (5' a 3')	SEQ ID NO:
AD-66814	csasccagCfaCfCfAfugcaacuuuuL96	1279	asAfsaagUfuGfCfauggUfgCfuggugsusu	1289
AD-66815	csasccagCfaCfCfAfugcaacuuuuL96	1280	AfsAfsaagUfuGfCfauggUfgCfuggugsusu	1290
AD-66816	csasccauGfcAfAfCfuuuuucaccuL96	1281	asGfsgugAfaAfAfaguuGfcAfuggugsusu	1291
AD-66817	csasccauGfcAfAfCfuuuuucaccuL96	1282	AfsGfsgugAfaAfAfaguuGfcAfuggugsusu	1292

Tabela 27.

Local (# vRNA ¹)	ID do Dúplex	In vitro IC ₅₀ Luc HBV (nM)	Log ₁₀ HBsAg KD In Vivo @3 mg/kg
1551 (4)	AD-66808	0,187	2,4
	AD-66809	0,014	1,46
1577 (4)	AD-66810	0,290	1,7
	AD-66811	0,029	1,3
1580 (4)	AD-66812	0,795	2,19
	AD-66813	0,074	>>1,14
1806 (4)	AD-66814	0,0002	1,5
	AD-66815	0,0001	>>1,56
1812 (4)	AD-66816	0,047	1,61
	AD-66817	0,0001	1,60

¹Número de RNAs virais silenciados

Exemplo 6. Rastreamento *in vivo* de cópias de sRNAi

[00670] Um subconjunto de agentes de RNAi composto-protótipo foi avaliado quanto a eficácia *in vivo* usando o modelo de camundongo AAV-HBV descrito acima. A camundongos AAV-HBV foi administrada uma dose única de 3 mg/kg de AD-66019, AD-65375, AD-65047, AD-65377, AD-66111, AD-65421 ou AD-66110, sendo determinado o nível de HBsAg no soro dos animais pré-dose e nos dias 5 e 10 pós-dose. Como controle, foi administrada a camundongos AAV-HBV uma dose de 3 mg/kg de uma transteritina de camundongo/rato visando dsRNA (mrTTR). Os resultados destas experiências são representados na Figura 3 e demonstram que os níveis séricos de HBsAg diminuem após uma única administração destes agentes.

[00671] A Figura 4 é um gráfico mostrando a porcentagem também determinada de HBsAg pré-dose remanescente nos dias 5 e 10 nestes animais após a administração de uma dose única de 3 mg/kg. Os resultados destas experiências são representados na Figura 4. Figura 4 mostra também a porcentagem de HBsAG remanescente no dia 10 pós-dosagem em relação à porcentagem de HBsAG remanescente no dia

10 pós-dosagem em um animal ao qual foram administrados 3 mg/kg de um dsRNA de controle visando transtiretina de camundongo/rato (mrTTR).

[00672] Com base, pelo menos em parte, nos resultados dos ensaios *in vitro* e *in vivo* descritos acima, AD-65403, o qual silenciou 3 RNAs de HBV e AD-66810, o qual silenciou o gene X, foram selecionados como candidatos a fármacos (DC) para uso em uma monoterapia ou em uma terapia de combinação.

[00673] A Figura 5 demonstra que, no modelo de camundongo AAV-HBV de infecção pelo HBV, uma dose única de 3 mg/kg de AD-65403 alcança um silenciamento potente e específico de HBsAg. Em particular, uma dose subcutânea única de 3 mg/kg de AD-65403 alcança até uma redução 3,9 log₁₀ dos níveis de HBsAg, com uma redução média de HBsAg de 1,8 log₁₀ 5 a 10 dias após uma dose única.

[00674] As Figuras 6A e 6B demonstram que, no modelo de camundongo AAV-HBV de infecção pelo HBV, uma dose subcutânea única de 0.3 mg/kg, 1 mg/kg, 3 mg/kg, ou 9 mg/kg de AD-66810 alcança um silenciamento potente e específico de HBsAg, especialmente nas doses mais elevadas de AD-66810. A diminuição porcentual de HBsAg no soro é mostrada em uma escala padrão na Figura 6A e em uma escala log₁₀ na Figura 6B.

[00675] A Figura 7 demonstra que, no modelo de camundongo AAV-HBV da infecção pelo HBV, AD-66810 administrado em três doses subcutâneas semanais de 3 mg/kg atinge um silenciamento potente e específico de HBsAg por um período de mais de 4 meses.

Exemplo 7. Tratamento de infecção pelo HBV com uma combinação de agentes visando HBV

[00676] Um subconjunto de agentes de RNAi foi avaliado quanto a eficácia *in vivo* usando o modelo de camundongo AAV-HBV descrito acima. Aos camundongos AAV-HBV são administradas uma ou mais

doses de AD-65403 e AD-66810, sozinhas ou em combinação umas com as outras. Regimes de dosagens exemplificativos incluem uma dose única de RNAi total de 3 mg/kg de AD-65403, 66810-AD, ou uma combinação de AD-65403 e AD-66810 (ou seja, 1,5 mg/kg de cada agente de RNAi para um total de 3 mg/kg de RNAi administrado como uma mistura ou como duas doses separadas); ou uma única dose de 0,3 mg/kg, 1 mg/kg, 3 mg/kg ou 9 mg/kg de dose de agente de RNAi total de AD-65403, 66810-AD, ou uma combinação de AD-65403 e AD-66810. Regimes de doses múltiplas exemplificativos incluem, por exemplo, três doses semanais, uma por semana usando qualquer um dos níveis de dosagem fornecidos em regimes de dose única exemplificativos. Um agente de RNAi de controle apropriado é também administrado como um controle como é rotina na arte.

[00677] O nível de HBsAg é determinado no soro dos animais pré-dose e a intervalos predeterminados pós-dose, por exemplo, a cada cinco dias pós-dose até o nível de HBsAg voltar à linha de base para todos os animais. A administração de AD-65403, 66810-AD, ou uma combinação de AD-65403 e AD-66810 resulta em silenciamento sustentado e específico de HBsAg sérico.

Exemplo 8. Tratamento da infecção por HDV com agentes de RNAi visando o vírus da hepatite B

[00678] O vírus da Delta Hepatite (HDV) é um vírus RNA defeituoso, que requer a ajuda do HBV para a sua replicação e montagem de novos vírions. Como tal, o HDV apenas é infeccioso na presença de infecção ativa de HBV. O genoma do HDV contém apenas uma grelha de leitura aberta ativamente transcrita que codifica duas isoformas de antígeno de delta hepatite. Modificações pós-translacionais de pequenos e grandes antígenos delta (HDAg-S e L-HDAg) envolvendo fosforilação e isoprenilação conferem respectivamente a estes antígenos as suas propriedades específicas. O tratamento eficaz de HBV também irá

melhorar a infecção de HDV.

[00679] É conhecido um modelo de chimpanzé de HDV. Foi avaliado um subconjunto de agentes de RNAi da invenção quanto a eficácia *in vivo* usando o modelo de HDV de chimpanzé ou outro modelo apropriado de HDV. Aos chimpanzés infectados com HDV são administradas uma ou mais doses de AD-65403 e AD-66810, sozinhas ou em combinação umas com as outras. Regimes de dosagens exemplificativos incluem uma dose única de agente RNAi total de 3 mg/kg de AD-65403, 66810-AD, ou uma combinação de AD-65403 e AD-66810 (ou seja, 1,5 mg/kg de cada agente de RNAi para um total de 3 mg/kg de agente de RNAi administrado como uma mistura ou como duas doses separadas); ou uma única dose de 0,3 mg/kg, 1 mg/kg, 3 mg/kg ou 9 mg/kg de dose de agente de RNAi total de AD-65403, 66810-AD, ou uma combinação de AD-65403 e AD-66810. Regimes de doses múltiplas exemplificativos incluem, por exemplo, três doses semanais, uma por semana usando qualquer um dos níveis de dosagem fornecidos em regimes de dose única exemplificativos. Um RNAi de controle apropriado é também administrado como um controle como é rotina na arte.

[00680] O nível de um ou mais dos S-HDAg, L-HDAg e RNA de HDV, opcionalmente em combinação com HBsAg, é determinado no soro dos animais pré-dose e a intervalos predeterminados pós-dose, por exemplo, a cada cinco dias para monitorizar os níveis de antígeno ou de RNA. A administração de AD-65403, 66810-AD, ou uma combinação de AD-65403 e AD-66810 resulta em silenciamento sustentado e específica de HBsAg sérico, resultando em uma melhoria de HDV como demonstra, por exemplo, uma diminuição estatisticamente significativa em um ou mais de S-HDAg, L-HDAg e RNA de HDV. Estes resultados demonstram que a administração de um ou ambos de AD-65403 e AD-66810 é eficaz no tratamento do HDV.

EQUIVALENTES

[00681] Os peritos na técnica reconhecerão, ou serão capazes de determinar usando não mais do que experimentação de rotina, muitos equivalentes das modalidades e métodos específicos aqui descritos. Tais equivalentes destinam-se a ser englobados pelo escopo das seguintes reivindicações.

REIVINDICAÇÕES

1. Agente de RNAi de fita dupla para inibição da expressão do vírus da hepatite B (HBV) em uma célula, caracterizado pelo fato de que o dito agente de RNAi de fita dupla compreende um filamento senso e um filamento antissenso que forma uma região de fita dupla, em que a dita fita senso compreende 5'- GUGUGCACUUCGCUUCACA -3' (SEQ ID NO:39), e a dita fita antissenso compreende 5'-UGUGAAGCGAAGUGCACACUU -3' (SEQ ID NO:40),

em que todos os nucleotídeos da dita fita senso e todos os nucleotídeos da dita fita antissenso são nucleotídeos modificados,

em que a dita fita senso é conjugada com um ligante ligado ao terminal 3', e

em que o ligante é um ou mais derivados de GalNAc ligados através de um ligante ramificado bivalente ou trivalente.

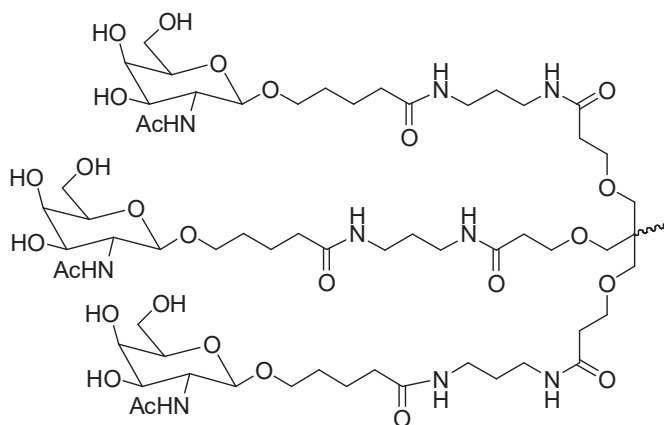
2. Agente de RNAi de fita dupla, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que pelo menos um dos ditos nucleotídeos modificados é um desóxi-nucleotídeo, um nucleotídeo de desóxi-timina (dT) terminal 3', um nucleotídeo modificado por 2'-O-metila, um nucleotídeo modificado por 2'-fluoro, um nucleotídeo modificado por 2'-desóxi, um nucleotídeo bloqueado, um nucleotídeo desbloqueado, um nucleotídeo restrito de forma adaptável, um nucleotídeo de etila constrito, um nucleotídeo abásico, um nucleotídeo modificado por 2'-amino, um nucleotídeo modificado por 2'-O-alila, um nucleotídeo modificado por 2'-C-alquila, , um nucleotídeo modificado por 2'-metoxietila, um nucleotídeo modificado por 2'-O-alquila, um nucleotídeo morfolino, um fosforamidato, um nucleotídeo compreendendo uma base não natural, um nucleotídeo modificado por tetra-hidropirano, um nucleotídeo modificado por 1,5-anidroexitol, um nucleotídeo modificado por cicloexenila, um nucleotídeo compreendendo um grupo de fosforotioato, um nucleotídeo que

compreende um grupo de metilfosfonato, um nucleotídeo compreendendo um 5'-fosfato, ou nucleotídeo compreendendo um imitador de 5'-fosfato.

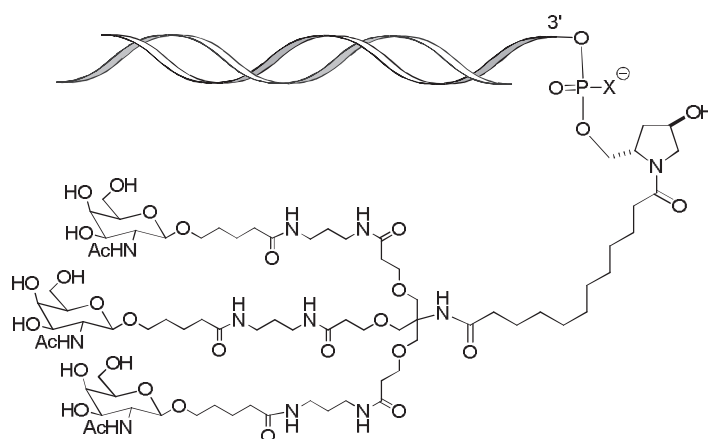
3. Agente de RNAi de fita dupla, de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que o imitador de 5'-fosfato é um 5'-vinil fosfato (5'-VP).

4. Agente de RNAi de fita dupla, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o filamento senso compreende 5'- gsusguGfcAfcUfucgcuucaca -3' (SEQ ID NO:41) e o filamento antissenso compreende 5'- usGfsugaAfgCfGfaaguGfcAfcacsusu -3' (SEQ ID NO:42), em que a, g, c, e u são 2'-O-metila (2'-OMe) A, 2'-OMe G, 2'-OMe C e 2'-OMe U, respectivamente; Af, Cf, Gf e Uf são 2'-fluoro A, 2'-fluoro C, 2'-fluoro G e 2'-fluoro U, respectivamente; e s é uma ligação fosforotioato.

5. Agente de RNAi de fita dupla, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo fato de que o ligante é



6. Agente de RNAi de fita dupla, de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que o agente de RNAi é conjugado com o ligante como mostrado no seguinte esquema



em que X é O ou S.

7. Agente de RNAi de fita dupla, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a fita senso compreende 5'-gsusguGfcAfCfUfucgcuucacaL96-3' (SEQ ID NO: 1275) e a fita antisenso compreende 5'-usGfsugaAfgCfGfaaguGfcAfcacsusu-3' (SEQ ID NO: 1285), em que “g”, “c”, e “u” são 2'-O-metil (2'-OMe) A, 2'-OMe G, 2'-OMe C e 2'-OMe U, respectivamente; “Af”, “Cf”, “Gf” e “Uf” são 2'-fluoro A, 2'-fluoro C, 2'-fluoro G e 2'-fluoro U, respectivamente; “s” é uma ligação fosforotioato; e L96 é N- [tris (GalNAc-alquil) -amidodecanoil)] - 4-hidroxiprolinol.

8. Composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de que compreende

- (a) o agente de RNAi de fita dupla, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 7, e
- (b) uma solução sem tamponamento ou uma solução tampão.

9. Uso do agente de RNAi de fita dupla, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 7, ou da composição farmacêutica, como definida na reivindicação 8, caracterizado pelo fato de que é para a preparação de um medicamento para inibir a expressão do gene do vírus da hepatite B (HBV) em uma célula, em que o uso compreende:

- (a) colocar em contato a célula com o agente de RNAi de fita

dupla, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 7, ou a composição farmacêutica, como definida na reivindicação 8; e

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

10. Uso, de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato de que a expressão do gene HBV ou a replicação do HBV é inibida em pelo menos 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95 %, 98% ou 100%,

em que a inibição da expressão do gene de HBV ou a replicação do HBV é medida usando um ensaio baseado em Luciferase à temperatura ambiente.

11. Uso do agente de RNAi de fita dupla, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 7, ou da composição, como definida na reivindicação 8, caracterizado pelo fato de que é para fabricação de um medicamento para redução da carga viral de vírus da hepatite B (HBV), em um indivíduo infectado com HBV.

12. Uso do agente de RNAi de fita dupla, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 7, ou da composição, como definida na reivindicação 8, caracterizado pelo fato de que é para fabricação de um medicamento para tratar uma infecção por vírus da hepatite B (HBV) ou um distúrbio associado a HBV.

13. Uso, de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo fato de que é para tratar infecção pelo vírus da Hepatite B (HBV).

14. Uso, de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo fato de que o distúrbio associado a HBV é infecção pelo vírus da hepatite D (HDV).

15. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 11 a 14, caracterizado pelo fato de que o indivíduo é um humano.

16. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 11

a 15, caracterizado pelo fato de que o agente de RNAi de fita dupla é para ser administrado ao indivíduo a uma dose baseada em peso de 0,01 mg/kg a 10 mg/kg ou 0,5 mg/kg a 50 mg/kg; uma dose baseada em peso de 10 mg/kg a 30 mg/kg; uma dose baseada em peso de 3 mg/kg; uma dose baseada em peso de 10 mg/kg; ou uma dose fixa de 50 mg a 200 mg.

17. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 11 a 16, caracterizado pelo fato de que o agente de RNAi de fita dupla é para ser administrado em uma composição compreendendo uma nanopartícula, uma partícula lipídica de ácido nucleico, um dendrímero, um polímero, lipossomas, transferossomas, um sistema de distribuição catiônico, ou qualquer combinação dos mesmos.

18. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 11 a 17, caracterizado pelo fato de que o agente de RNAi de fita dupla é para ser administrado com um agente terapêutico adicional.

19. Uso, de acordo com a reivindicação 18, caracterizado pelo fato de que o agente terapêutico adicional é um agente antiviral, um inibidor da transcriptase reversa, um estimulador imune, uma vacina terapêutica, um inibidor da entrada viral, um oligonucleotídeo que inibe a secreção ou liberação de HbsAg, um inibidor de capsídeo, um inibidor de DNA do HVB circular covalentemente fechado (ccc), ou uma combinação de qualquer um dos anteriores.

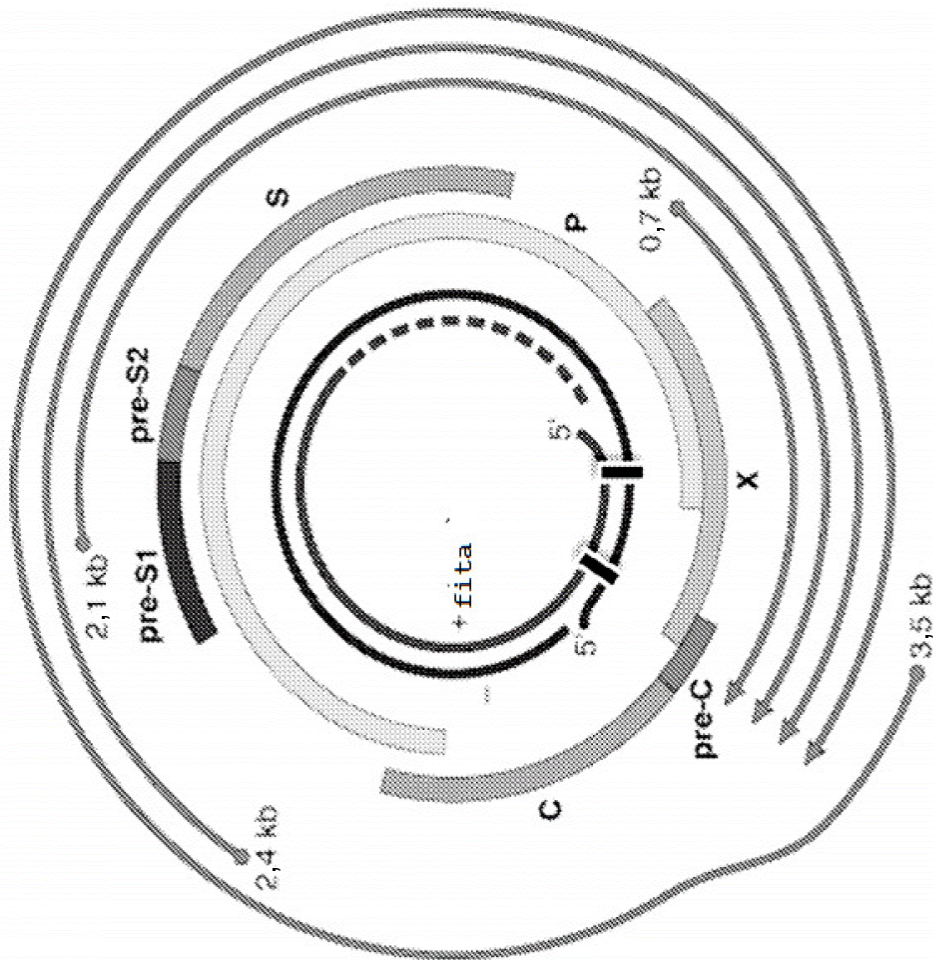


Figura 1

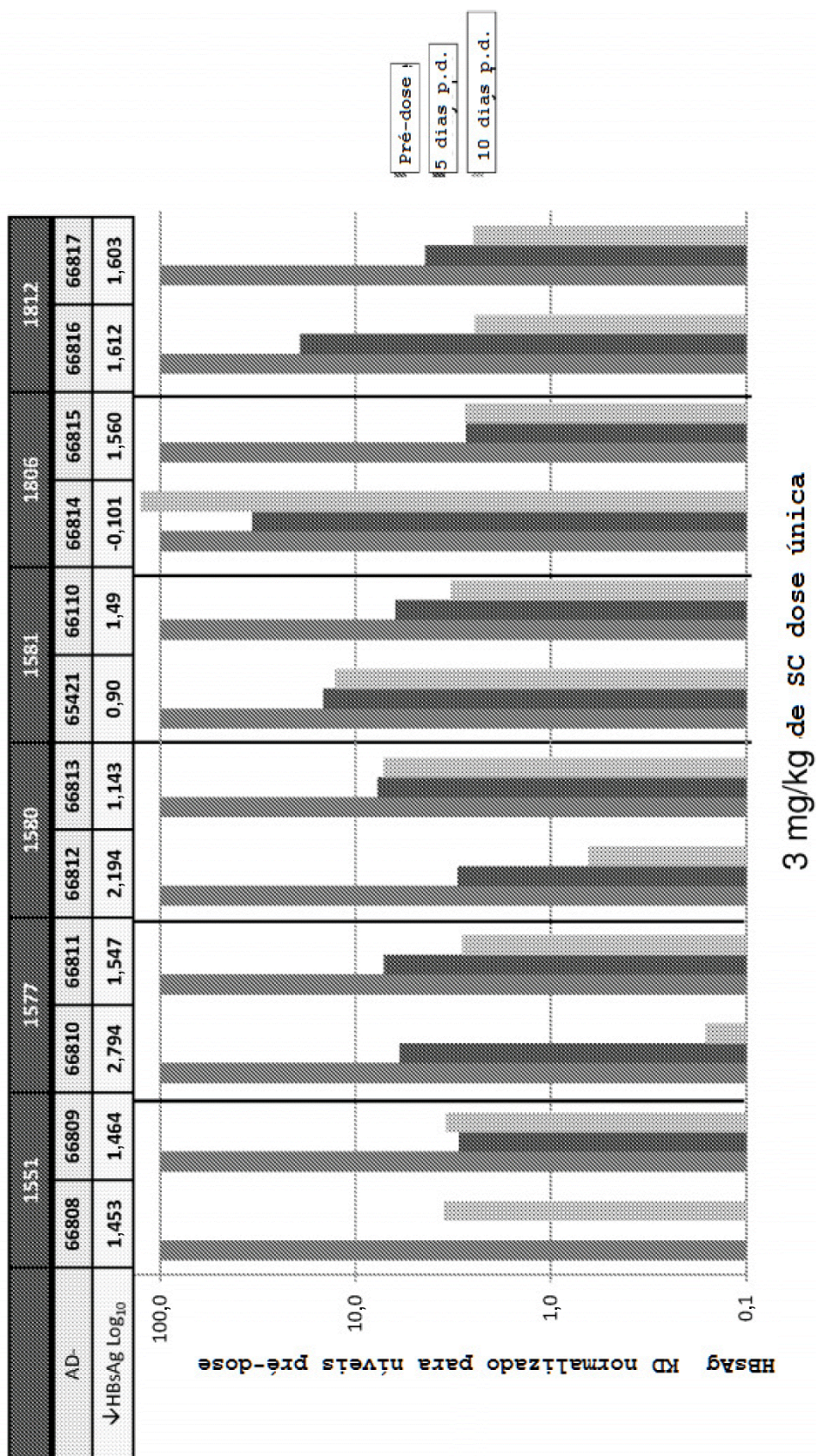
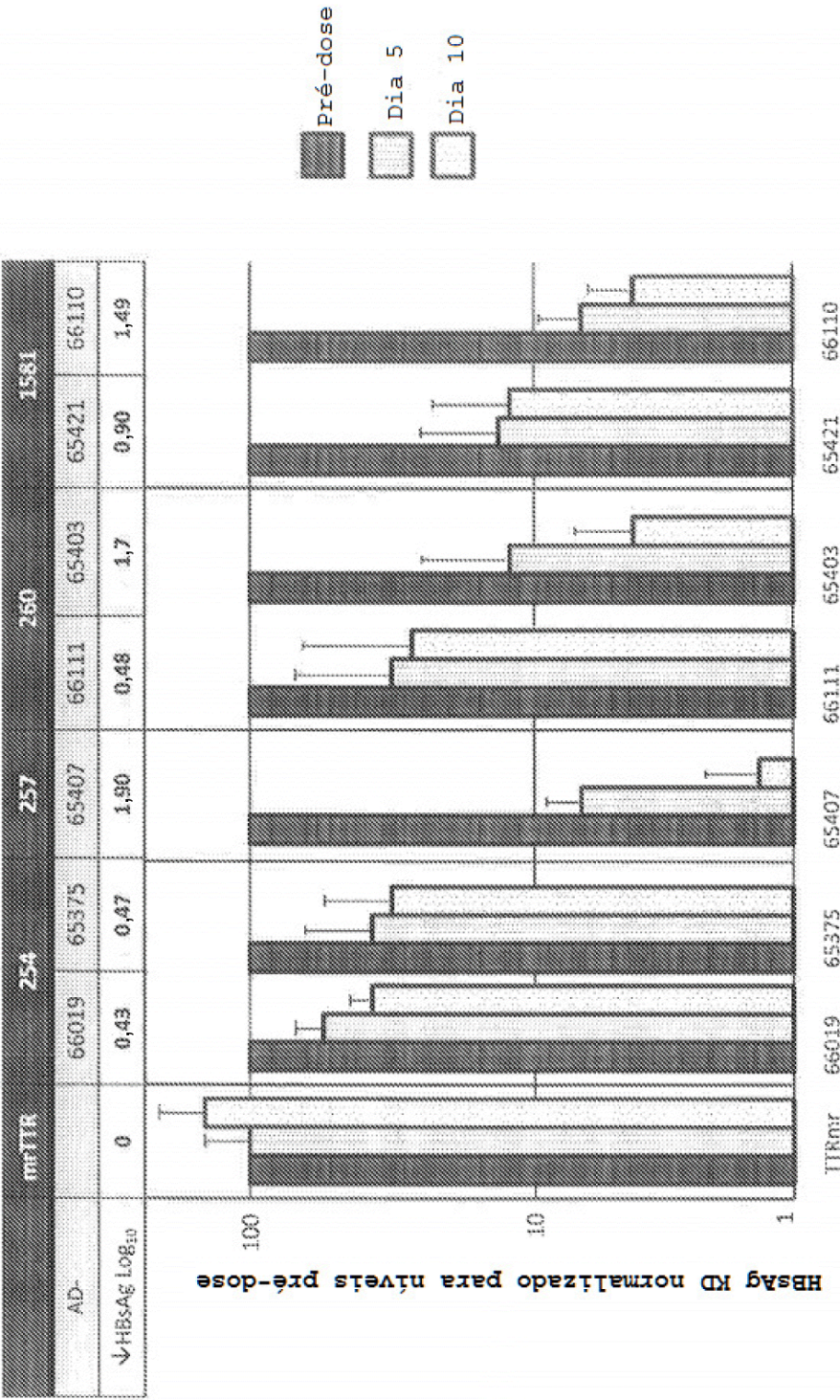
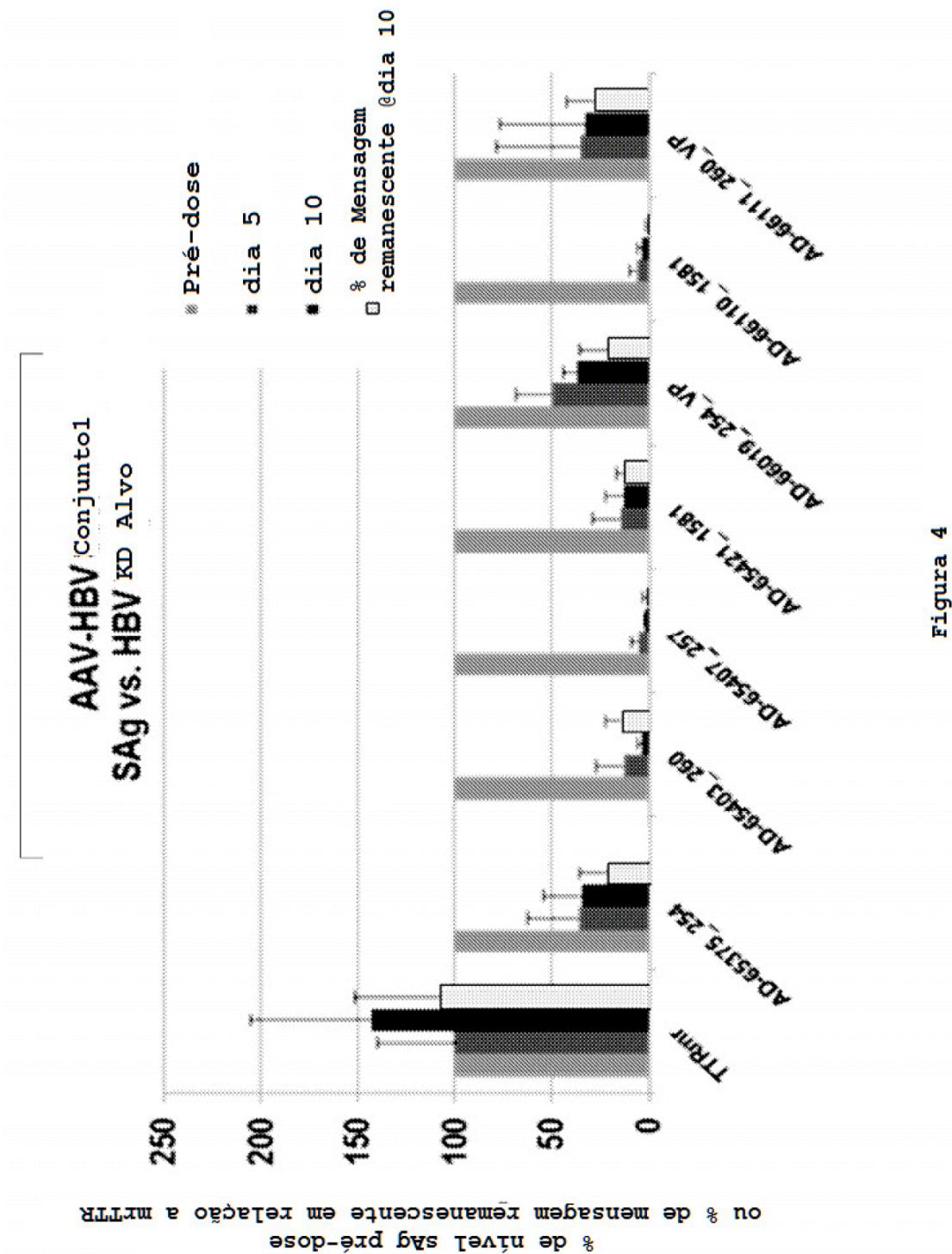


Figura 2



3 mg/kg de SC dose única

Figura 3



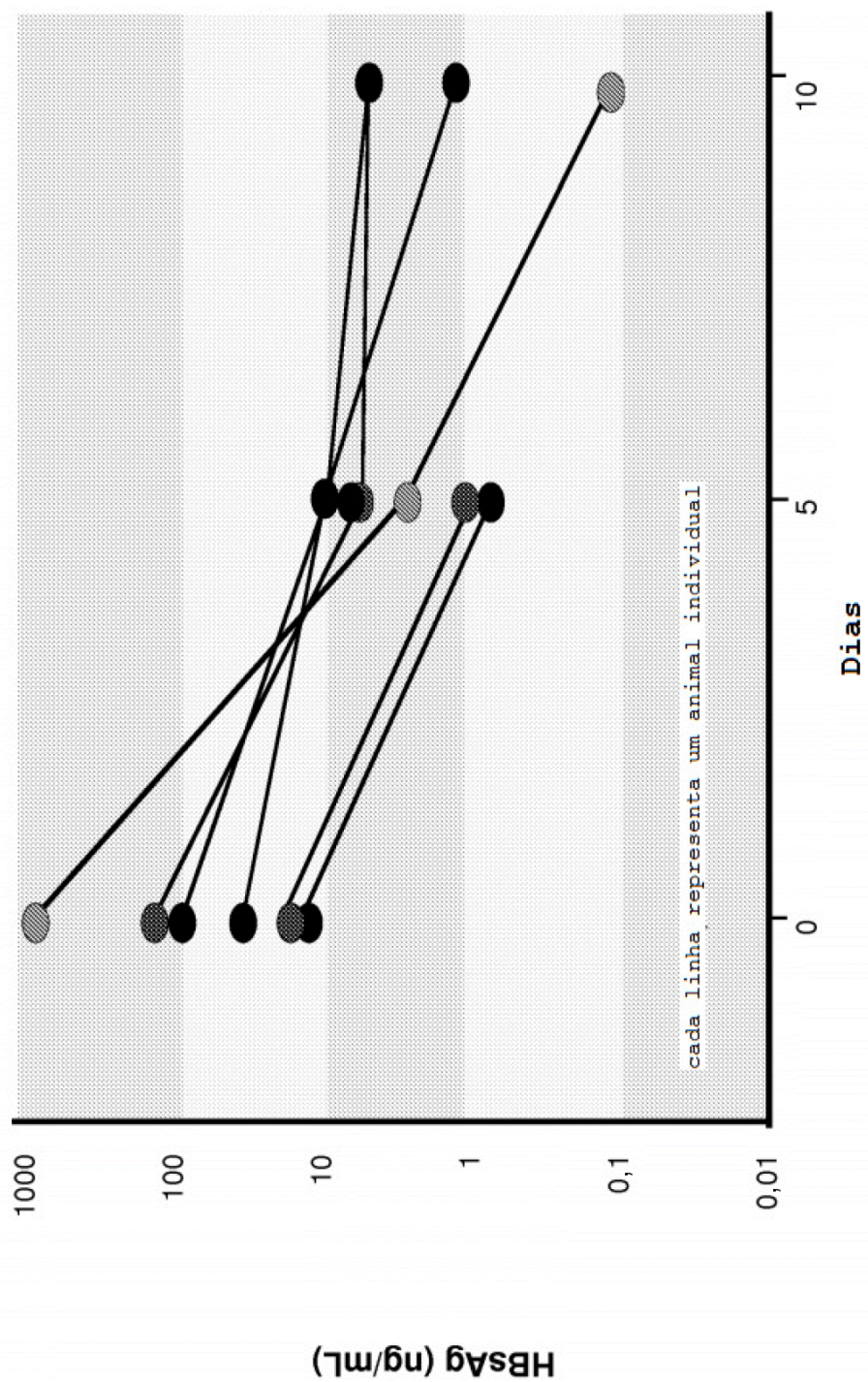


Figura 5

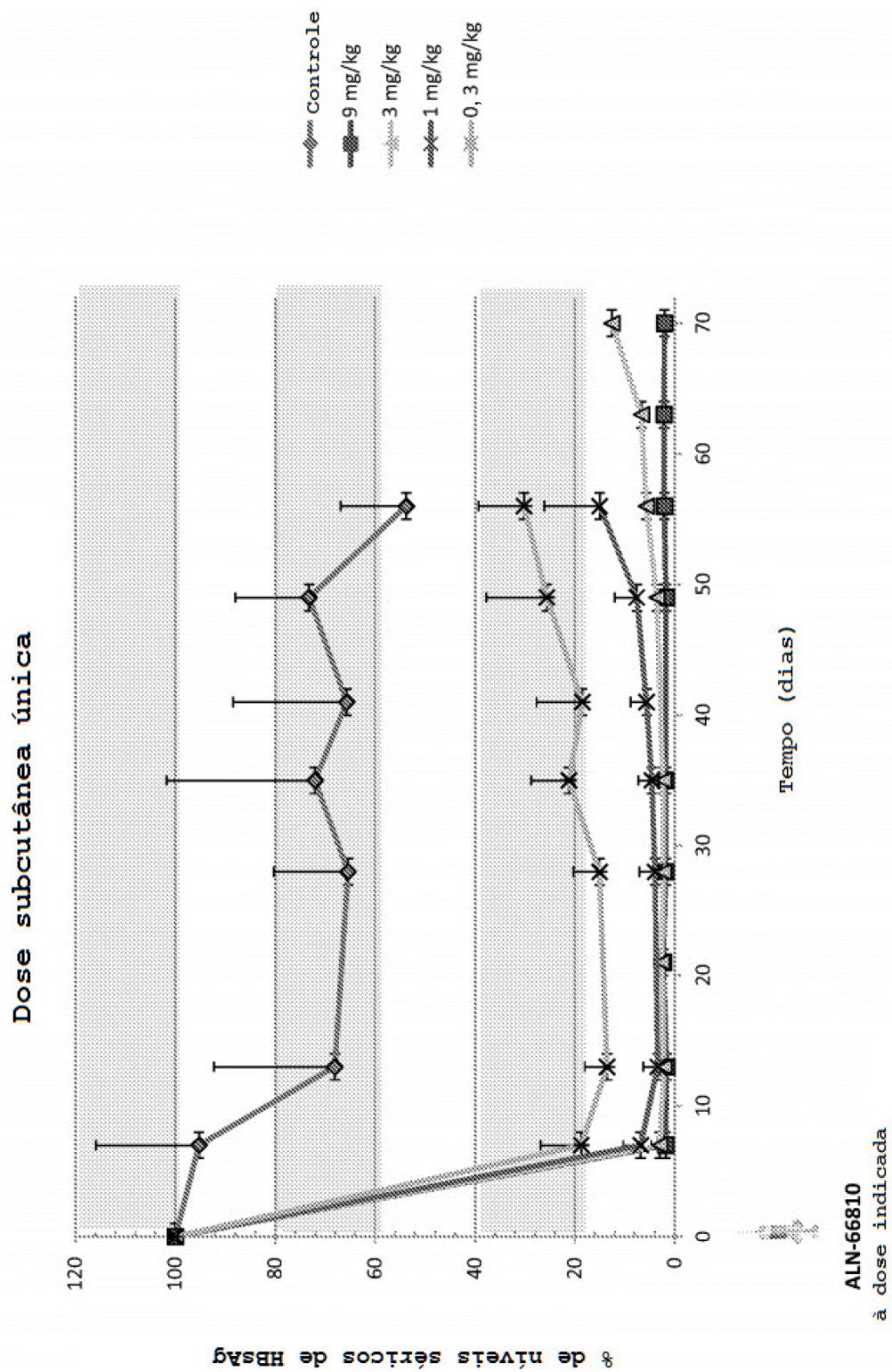


Figura 6A

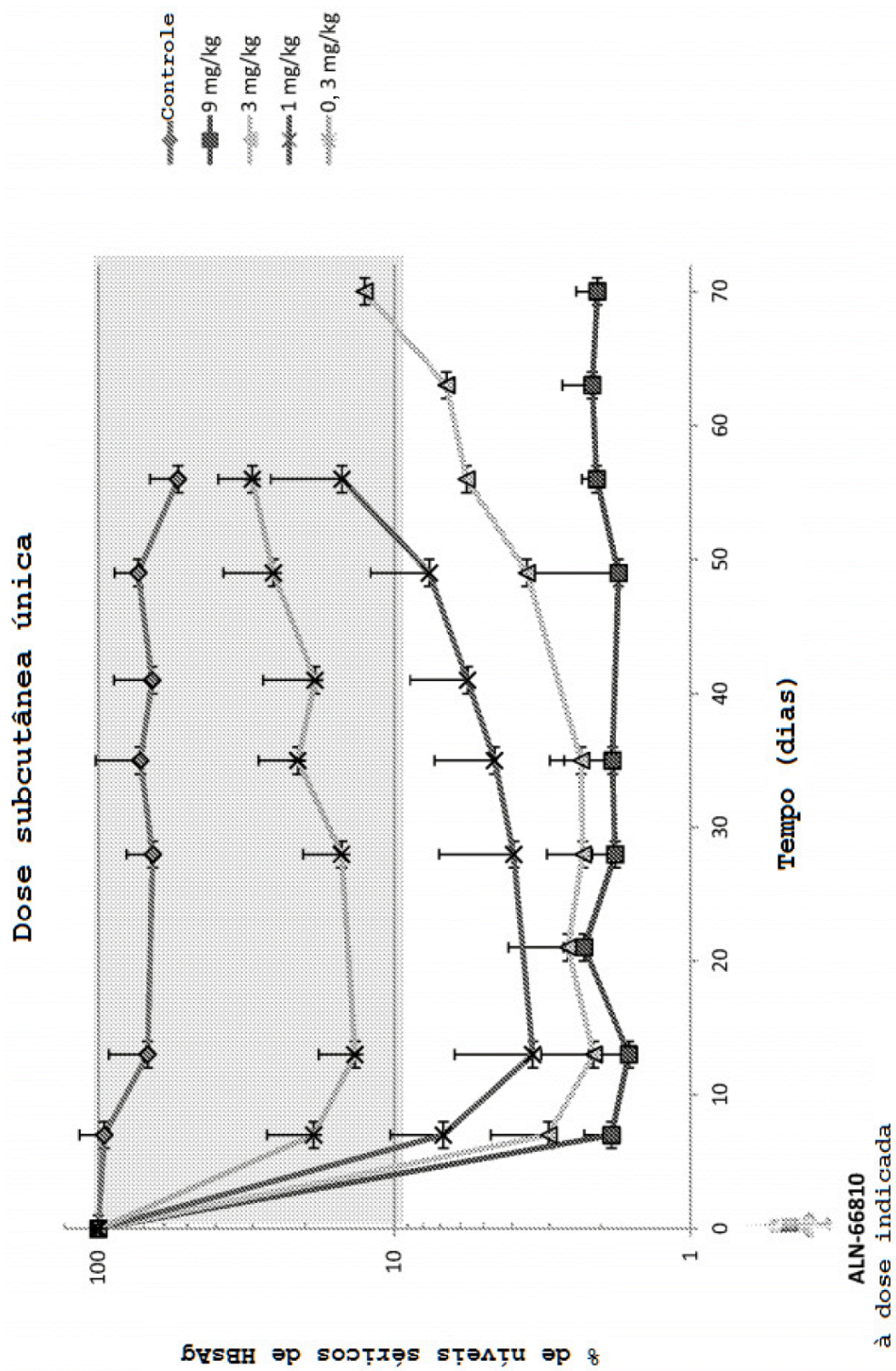


Figura 6B

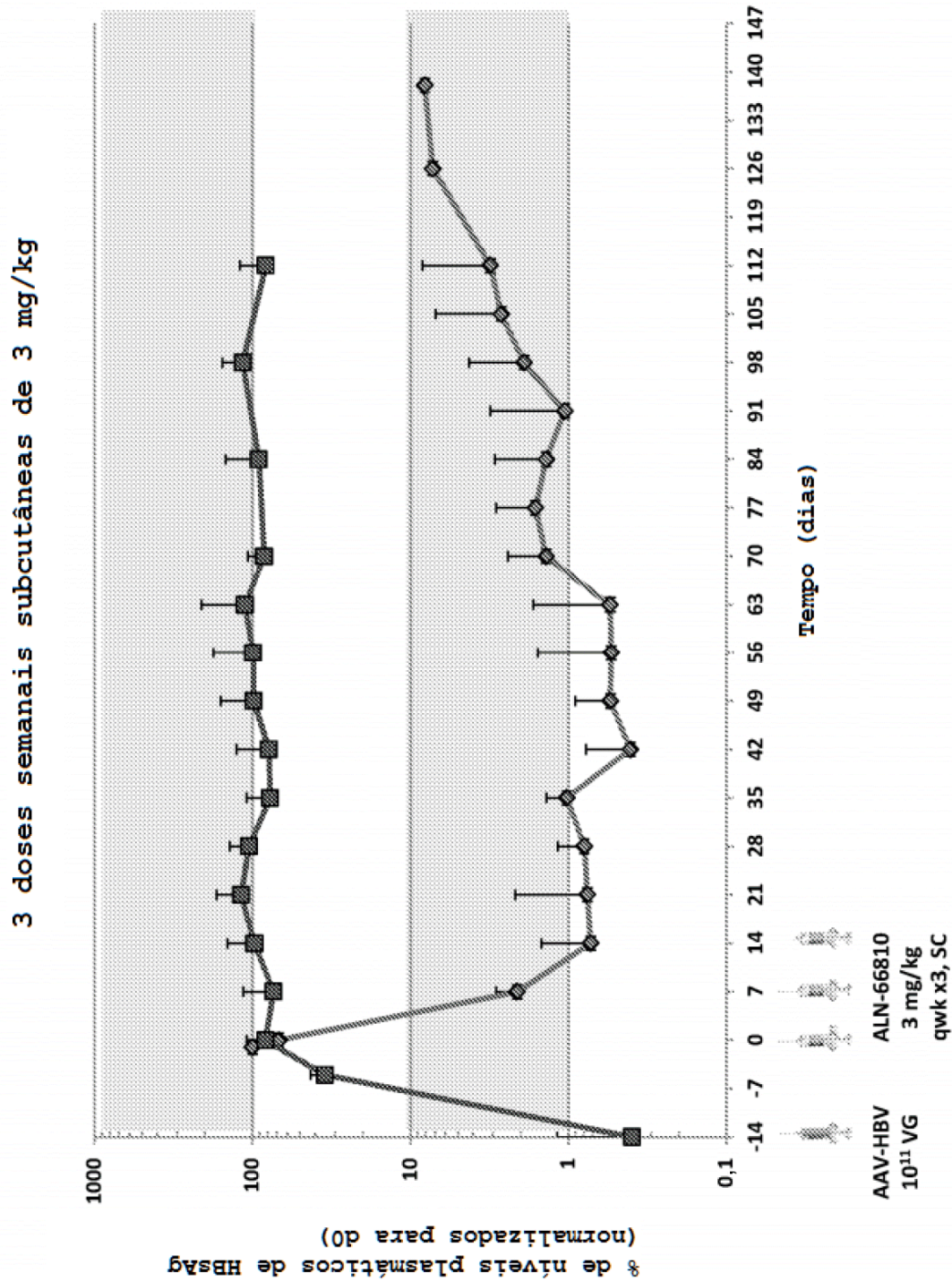


Figura 7