



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

(11) BR 112015013105-0 B1



(22) Data do Depósito: 05/12/2013

(45) Data de Concessão: 08/02/2022

(54) Título: AGENTE DE RNAI DE FITA DUPLA CAPAZ DE INIBIR A EXPRESSÃO DE PCSK9, SEUS USOS, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA E MÉTODO DE INIBIÇÃO DA EXPRESSÃO DE PCSK9 EM UMA CÉLULA IN VITRO

(51) Int.Cl.: C12N 15/113.

(30) Prioridade Unionista: 04/10/2013 US 61/886,916; 05/12/2012 US 61/733,518; 15/03/2013 US 61/793,530; 17/10/2013 US 61/892,188.

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

(72) Inventor(es): ANNA BORODOVSKY; RAJEV G. KALLANTHOTTATHIL; KEVIN FITZGERALD; MARIA FRANK-KAMENETSKY; WILLIAM QUERBES; MARTIN MAIER; KLAUS CHARISSE; SATYANARAYANA KUCHIMANCHI; MUTHIAH MANOHARAN; STUART MILSTEIN.

(86) Pedido PCT: PCT US2013073349 de 05/12/2013

(87) Publicação PCT: WO 2014/089313 de 12/06/2014

(85) Data do Início da Fase Nacional: 05/06/2015

(57) Resumo: AGENTE DE iRNA DE FITA DUPLA CAPAZ DE INIBIR A EXPRESSÃO DE PCSK9, SEUS USOS, CÉLULA, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA E MÉTODO DE INIBIÇÃO DA EXPRESSÃO DE PCSK9 EM UMA CÉLULA IN VITRO. A invenção refere-se a agentes de RNAi, por exemplo, agentes de RNAi de fita dupla, se dirigindo ao gene de PCSK9, e a métodos de uso de tais agentes de RNAi para inibir a expressão de PCSK9 e a métodos de tratamento de sujeitos tendo um distúrbio de lipídeos, tal como uma hiperlipidemia.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**AGENTE DE RNAi DE FITA DUPLA CAPAZ DE INIBIR A EXPRESSÃO DE PCSK9, SEUS USOS, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA E MÉTODO DE INIBIÇÃO DA EXPRESSÃO DE PCSK9 EM UMA CÉLULA *IN VITRO***".

Pedidos Relacionados

[001] Este pedido reivindica prioridade sobre o Pedido Provisório dos E.U.A. No. 61/733.518, depositado a 5 de dezembro, 2012; Pedido Provisório dos E.U.A. No. 61/793.530, depositado a 15 de março, 2013; Pedido Provisório dos E.U.A. No. 61/886.916, depositado a 4 de outubro, 2013; e Pedido Provisório dos E.U.A. No. 61/892.188, depositado a 17 de outubro, 2013. Este pedido está também relacionado com o Pedido Provisório dos E.U.A. No. 61/561.710, depositado a 18 de novembro, 2011. Os conteúdos inteiros de cada um dos pedidos de patentes provisórias anteriores são deste modo incorporados aqui por referência.

Listagem de Sequências

[002] 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 referida cópia ASCII, criada em 29 de outubro, 2013, é chamada 121301-00420_SL.txt e tem 433.512 *bytes* em tamanho.

Antecedentes da Invenção

[003] A pró-proteína convertase subtilisina quexina 9 (PCSK9) é um membro da família das serinas proteases subtilisinas. As outras oito proteases subtilisinas de mamífero, PCSK1-PCSK8 (também chamada PC1/3, PC2, furina, PC4, PC5/6, PACE4, PC7, e S1P/SKI-1) são pró-proteína convertases que processam uma ampla variedade de proteínas na via secretora e desempenham papéis em diversos processos biológicos (Bergeron, F. (2000) *J. Mol. Endocrinol.* 24, 1-22,

Gensberg, K., (1998) *Semin. Cell Dev. Biol.* 9, 11-17, Seidah, N. G. (1999) *Brain Res.* 848, 45-62, Taylor, N. A., (2003) *FASEB J.* 17, 1215-1227, e Zhou, A., (1999) *J. Biol. Chem.* 274, 20745-20748).

[004] Foi proposto que PCSK9 desempenha um papel no metabolismo do colesterol. A expressão de RNAm de PCSK9 é infrarregulada por alimentação de colesterol dietético em camundongos (Maxwell, K. N., (2003) *J. Lipid Res.* 44, 2109-2119), suprarregulada por estatinas em células HepG2 (Dubuc, G., (2004) *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 24, 1454-1459), e suprarreguladas em camundongos transgênicos com proteína de ligação ao elemento regulador de esterol (SREBP) (Horton, J. D., (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 12027-12032), similar às enzimas biossintéticas do colesterol e ao receptor de lipoproteína de baixa densidade (LDLR). Além do mais se descobriu que mutações de sentido trocado de PCSK9 estão associadas a uma forma de hipercolesterolemia dominante autossômica (Hchola3) (Abifadel, M., *et al.* (2003) *Nat. Genet.* 34, 154-156, Timms, K. M., (2004) *Hum. Genet.* 114, 349-353, Leren, T. P. (2004) *Clin. Genet.* 65, 419-422). PCSK9 pode também desempenhar um papel na determinação dos níveis de colesterol LDL na população geral, porque polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) foram associados a níveis de colesterol em uma população japonesa (Shioji, K., (2004) *J. Hum. Genet.* 49, 109-114).

[005] As hipercolesterolemias dominantes autossômicas (ADHs) são doenças monogênicas nas quais os pacientes exibem níveis de colesterol total e LDL elevados, xantomas tandem, e aterosclerose prematura (Rader, D. J., (2003) *J. Clin. Invest.* 111, 1795-1803). A patogênese de ADHs e uma forma recessiva, hipercolesterolemia recessiva autossômica (ARH) (Cohen, J. C., (2003) *Curr. Opin. Lipidol.* 14, 121-127), é devido a deficiências na captação de LDL pelo fígado. A ADH pode ser causada por mutações de LDLR, que previnem a captação de LDL, ou por mutações na proteína em LDL, apolipoproteína

B, que se liga ao LDLR. A ARH é causada por mutações na proteína ARH que são necessárias para endocitose do complexo LDLR-LDL através da sua interação com clatrina. Portanto, se as mutações de PCSK9 são causais em famílias de Hchola3, parece provável que PCSK9 desempenhe um papel na captação de LDL mediada por receptores.

[006] Estudos de superexpressão apontam para o papel de PCSK9 no controle dos níveis de LDLR e, conseqüentemente, captação de LDL pelo fígado (Maxwell, K. N. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 7100-7105, Benjannet, S., *et al.* (2004) *J. Biol. Chem.* 279, 48865-48875, Park, S. W., (2004) *J. Biol. Chem.* 279, 50630-50638). A superexpressão mediada por adenovírus de PCSK9 de camundongo ou humano durante 3 ou 4 dias em camundongos resulta em níveis de colesterol total e LDL elevados; este efeito não é visto em camundongos nocaute em LDLR (Maxwell, K. N. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 7100-7105, Benjannet, S., *et al.* (2004) *J. Biol. Chem.* 279, 48865-48875, Park, S. W., (2004) *J. Biol. Chem.* 279, 50630-50638). Adicionalmente, a superexpressão de PCSK9 resulta em uma redução acentuada na proteína LDLR hepática, sem afetar os níveis de RNAm de LDLR, níveis de proteína SREBP, ou razão de proteína SREBP nuclear em relação a citoplasmática.

[007] Embora a própria hipercolesterolemia seja assintomática, a elevação prolongada do colesterol no soro pode levar a aterosclerose. Ao longo de um período de décadas, colesterol no soro cronicamente elevado contribui para formação de placas ateromatosas nas artérias, o que levar a estenose progressiva ou mesmo oclusão completa das artérias envolvidas. Adicionalmente, as placas menores podem romper e causar a formação de um coágulo e obstruir o fluxo sanguíneo resultando em, por exemplo, infarto do miocárdio e/ou acidente vascular cerebral. Se a formação da estenose ou oclusão for gradual, o

fornecimento de sangue aos tecidos e órgãos diminui lentamente até a função dos órgãos se tornar comprometida.

[008] Portanto, existe uma necessidade na técnica de tratamentos eficazes para doenças associadas a PCSK9, tais como uma hiperlipidemia, por exemplo, hipercolesterolemia.

Sumário da Invenção

[009] Como descrito em mais detalhe em baixo são divulgadas aqui composições compreendendo agentes de RNAi, por exemplo, agentes de RNAi de fita dupla, se dirigindo a PCSK9. São também divulgados aqui métodos usando as composições da invenção para inibição da expressão de PCSK9 e para tratamento de patologias relacionadas com expressão de PCSK9, por exemplo, hipercolesterolemia.

[0010] Portanto, em um aspecto, a presente invenção proporciona agentes de RNAi, por exemplo, agentes de RNAi de fita dupla, capazes de inibirem a expressão da Pro-Proteína Convertase Subtilisina Quexina 9 (PCSK9) em uma célula, em que o agente de RNAi de fita dupla compreende uma fita senso complementar com uma fita antissenso, em que a fita antissenso compreende uma região complementar com parte de um RNAm codificando PCSK9, em que cada fita tem cerca de 14 a cerca de 30 nucleotídeos em comprimento, em que o agente de RNAi de fita dupla é representado pela fórmula (III):

senso: 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'

antissenso: 3' n_p'-N_a'-(X'X'X')_k-N_b'-Y'Y'Y'-N_b'-(Z'Z'Z')_l-N_a'-n_q' 5' (III)

[0011] em que:

[0012] i, j, k, e l são cada um independentemente 0 ou 1;

[0013] p, p', q, e q' são cada um independentemente 0-6;

[0014] cada N_a e N_a' representa independentemente uma sequência de oligonucleotídeos compreendendo 0-25 nucleotídeos que estão ou modificados ou não modificados ou suas combinações, compreendendo cada sequência pelo menos dois nucleotídeos diferentemente modificados;

[0015] cada N_b e N_b' representa independentemente uma sequência de oligonucleotídeos compreendendo 0-10 nucleotídeos que estão ou modificados ou não modificados ou suas combinações;

[0016] cada n_p , n_p' , n_q , e n_q' , cada um dos quais pode ou não estar presente, representa independentemente um nucleotídeo da saliência;

[0017] 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;

[0018] as modificações em N_b diferem da modificação em Y e as modificações em N_b' diferem da modificação em Y'; e

[0019] em que a fita senso está conjugada com pelo menos um ligante.

[0020] Em uma modalidade, i é 0; j é 0; i é 1; j é 1; ambos i e j são 0; ou ambos i e j são 1. Em outra modalidade, k é 0; l é 0; k é 1; l é 1; ambos k e l são 0; ou ambos k e l são 1.

[0021] Em uma modalidade, XXX é complementar com X'X'X', YYY é complementar com Y'Y'Y', e ZZZ é complementar com Z'Z'Z'.

[0022] Em uma modalidade, o motivo YYY ocorre no ou próximo do sítio de clivagem da fita senso.

[0023] Em uma modalidade, o motivo Y'Y'Y' ocorre nas posições 11, 12 e 13 da fita antissenso a partir da extremidade 5'.

[0024] Em uma modalidade, Y' é 2'-O-metila.

[0025] Em uma modalidade, a fórmula (III) é representada pela fórmula (IIIa):

senso: $5' n_p - N_a - Y Y Y - N_a - n_q 3'$

antissenso: $3' n_p' - N_a' - Y'Y'Y' - N_a' - n_q' 5'$ (IIIa).

[0026] Em outra modalidade, a fórmula (III) é representada pela fórmula (IIIb):

senso: $5' n_p - N_a - Y Y Y - N_b - Z Z Z - N_a - n_q 3'$

antissenso: $3' n_p' - N_a' - Y'Y'Y' - N_b' - Z'Z'Z' - N_a' - n_q' 5'$ (IIIb)

[0027] em que cada N_b e N_b' representa independentemente uma sequência de oligonucleotídeos compreendendo 1-5 nucleotídeos modificados.

[0028] Ainda em outra modalidade, a fórmula (III) é representada pela fórmula (IIIc):

senso: $5' n_p - N_a - X X X - N_b - Y Y Y - N_a - n_q 3'$

antissenso: $3' n_p' - N_a' - X'X'X' - N_b' - Y'Y'Y' - N_a' - n_q' 5'$ (IIIc)

[0029] em que cada N_b e N_b' representa independentemente uma sequência de oligonucleotídeos compreendendo 1-5 nucleotídeos modificados.

[0030] Em uma modalidade, a fórmula (III) é representada pela fórmula (IIId):

senso: $5' n_p - N_a - X X X - N_b - Y Y Y - N_b - Z Z Z - N_a - n_q 3'$

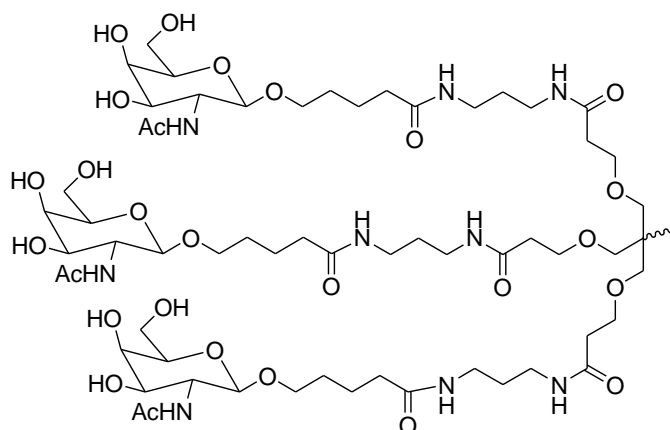
antissenso: $3' n_p' - N_a' - X'X'X' - N_b' - Y'Y'Y' - N_b' - Z'Z'Z' - N_a' - n_q' 5'$ (IIId)

[0031] em que cada N_b e N_b' representa independentemente uma sequência de oligonucleotídeos compreendendo 1-5 nucleotídeos modificados e cada N_a e N_a' representa independentemente uma sequência de oligonucleotídeos compreendendo 2-10 nucleotídeos modificados.

[0032] Em uma modalidade, a região de fita dupla tem 15-30 pares de nucleotídeos em comprimento. Em outra modalidade, a região de fita dupla tem 17-23 pares de nucleotídeos em comprimento. Ainda em outra modalidade, a região de fita dupla tem 17-25 pares de nucleotídeos em comprimento. Em uma modalidade, a região de fita dupla tem 23-27 pares de nucleotídeos em comprimento. Em outra modalidade, a região de fita dupla tem 19-21 pares de nucleotídeos em comprimento. Em outra modalidade, a região de fita dupla tem 21-23 pares de nucleotídeos em comprimento. Em uma modalidade, cada fita tem 15-30 nucleotídeos.

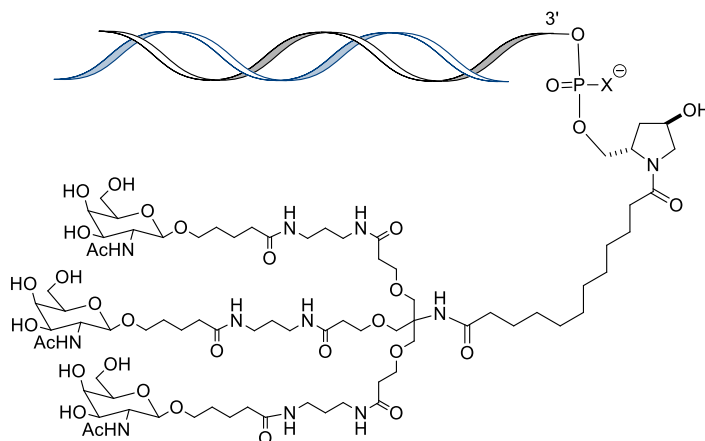
[0033] Em uma modalidade, as modificações nos nucleotídeos são selecionadas do grupo consistindo em LNA, HNA, CeNA, 2'-metoxietila, 2'-O-alquila, 2'-O-alila, 2'-C-alila, 2'-flúor, 2'-deoxi, 2'-hidroxila, e suas combinações. Em outra modalidade, as modificações nos nucleotídeos são modificações de 2'-O-metila ou 2'-flúor.

[0034] Em uma modalidade, o ligante é em um ou mais derivados de GalNAc anexados através de um ligante ramificado bivalente ou trivalente. Em outra modalidade, o ligante é



[0035] Em uma modalidade, o ligante está anexado à extremidade 3' da fita senso.

[0036] Em uma modalidade, o agente de RNAi está conjugado com o ligante como mostrado no seguinte esquema



[0037] em que X é O ou S. Em uma modalidade, X é O.

[0038] Em uma modalidade, o agente compreende adicionalmente pelo menos uma ligação internucleotídica de fosforotioato ou

metilfosfonato.

[0039] Em uma modalidade, a ligação internucleotídica de fosforotioato ou metilfosfonato está no terminal 3' de uma fita. Em uma modalidade, a fita é a fita antissenso. Em outra modalidade, a fita é a fita senso.

[0040] Em uma modalidade, a ligação internucleotídica de fosforotioato ou metilfosfonato está no terminal 5' de uma fita. Em uma modalidade, a fita é a fita antissenso. Em outra modalidade, a fita é a fita senso.

[0041] Em uma modalidade, a ligação internucleotídica de fosforotioato ou metilfosfonato está em ambos os terminais 5' e 3' de uma fita. Em uma modalidade, a fita é a fita antissenso.

[0042] Em uma modalidade, o par de bases na posição 1 da extremidade 5' da fita antissenso do dúplex é um par de bases AU.

[0043] Em uma modalidade, os nucleotídeos de Y contêm uma modificação de 2'-flúor.

[0044] Em uma modalidade, os nucleotídeos de Y' contêm uma modificação de 2'-O-metila.

[0045] Em uma modalidade, $p' > 0$. Em outra modalidade, $p' = 2$.

[0046] Em uma modalidade, $q' = 0$, $p = 0$, $q = 0$, e os nucleotídeos da saliência de p' são complementares com o RNAm alvo. Em outra modalidade, $q' = 0$, $p = 0$, $q = 0$, e os nucleotídeos da saliência de p' não são complementares com o RNAm alvo.

[0047] Em uma modalidade, a fita senso tem um total de 21 nucleotídeos e a fita antissenso tem um total de 23 nucleotídeos.

[0048] Em uma modalidade, pelo menos um np' está ligado a um nucleotídeo da vizinhança através de uma ligação de fosforotioato.

[0049] Em uma modalidade, todos os np' estão ligados a nucleotídeos da vizinhança através de ligações de fosforotioato.

[0050] Em uma modalidade, o agente de RNAi é selecionado do

grupo de agentes de RNAi listados na Tabela 1, Tabela 2, Tabela 9, Tabela 10, Tabela 12 e Figura 12.

[0051] Em uma modalidade, o agente de RNAi é selecionado do grupo consistindo em AD-53815, AD-56663, AD-56658, AD-56676, AD-56666, AD-57928, e AD-60212.

[0052] Em outro aspecto, a presente invenção proporciona agentes de RNAi, por exemplo, agentes de RNAi de fita dupla, capazes de inibirem a expressão da Pro-Proteína Convertase Subtilisina Quexina 9 (PCSK9) em uma célula, em que o agente de RNAi de fita dupla compreende uma fita senso complementar com uma fita antissenso, em que a fita antissenso compreende uma região complementar com parte de um RNAm codificando PCSK9, em que cada fita tem cerca de 14 a cerca de 30 nucleotídeos em comprimento, em que o agente de RNAi de fita dupla é representado pela fórmula (III):

senso: 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'

antissenso: 3' n_p' - N_a' -(X'X'X')_k- N_b' -Y'Y'Y'- N_b' -(Z'Z'Z')_l- N_a' - n_q'

5' (III)

[0053] em que:

[0054] i, j, k, e l são cada um independentemente 0 ou 1;

[0055] p, p', q, e q' são cada um independentemente 0-6;

[0056] cada N_a e N_a' representa independentemente uma sequência de oligonucleotídeos compreendendo 0-25 nucleotídeos que estão ou modificados ou não modificados ou suas combinações, compreendendo cada sequência pelo menos dois nucleotídeos diferentemente modificados;

[0057] cada N_b e N_b' representa independentemente uma sequência de oligonucleotídeos compreendendo 0-10 nucleotídeos que estão ou modificados ou não modificados ou suas combinações;

[0058] cada n_p , n_p' , n_q , e n_q' , cada um dos quais pode ou não estar presente, representa independentemente um nucleotídeo da saliência;

[0059] 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, em que as modificações são modificações de 2'-O-metila ou 2'-fluoro;

[0060] as modificações em N_b diferem da modificação em Y e as modificações em N_b' diferem da modificação em Y'; e

[0061] em que a fita senso está conjugada com pelo menos um ligante.

[0062] Ainda em outro aspecto, a presente invenção proporciona agentes de RNAi, por exemplo, agentes de RNAi de fita dupla, capazes de inibir a expressão da Pro-Proteína Convertase Subtilisina Quexina 9 (PCSK9) em uma célula, em que o agente de RNAi de fita dupla compreende uma fita senso complementar com uma fita antissenso, em que a fita antissenso compreende uma região complementar com parte de um RNAm codificando PCSK9, em que cada fita tem cerca de 14 a cerca de 30 nucleotídeos em comprimento, em que o agente de RNAi de fita dupla é representado pela fórmula (III):

senso: 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'

antissenso: 3' n_p'-N_a'-(X'X'X')_k-N_b'-Y'Y'Y'-N_b'-(Z'Z'Z')_l-N_a'- n_q' 5' (III)

[0063] em que:

[0064] i, j, k, e l são cada um independentemente 0 ou 1;

[0065] cada n_p, n_q, e n_q', cada um dos quais pode ou não estar presente, representa independentemente um nucleotídeo da saliência;

[0066] p, q, e q' são cada um independentemente 0-6;

[0067] n_p' > 0 e pelo menos um n_p' está ligado a um nucleotídeo da vizinhança através de uma ligação de fosforotioato;

[0068] cada N_a e N_a' representa independentemente uma sequência de oligonucleotídeos compreendendo 0-25 nucleotídeos que estão ou modificados ou não modificados ou suas combinações, compreendendo cada sequência pelo menos dois nucleotídeos diferentemente

modificados;

[0069] cada N_b e N_b' representa independentemente uma sequência de oligonucleotídeos compreendendo 0-10 nucleotídeos que estão ou modificados ou não modificados ou suas combinações;

[0070] 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, em que as modificações são modificações de 2'-O-metila ou 2'-fluoro;

[0071] as modificações em N_b diferem da modificação em Y e as modificações em N_b' diferem da modificação em Y'; e

[0072] em que a fita senso está conjugada com pelo menos um ligante.

[0073] Em um aspecto adicional, a presente invenção proporciona agentes de RNAi, por exemplo, agentes de RNAi de fita dupla, capazes de inibirem a expressão da Pro-Proteína Convertase Subtilisina Quexina 9 (PCSK9) em uma célula, em que o agente de RNAi de fita dupla compreende uma fita senso complementar com uma fita antissenso, em que a fita antissenso compreende uma região complementar com parte de um RNAm codificando PCSK9, em que cada fita tem cerca de 14 a cerca de 30 nucleotídeos em comprimento, em que o agente de RNAi de fita dupla é representado pela fórmula (III):

senso: $5' n_p - N_a - (X X X)_i - N_b - Y Y Y - N_b - (Z Z Z)_j - N_a - n_q 3'$

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

[0074] em que:

[0075] i, j, k, e l são cada um independentemente 0 ou 1;

[0076] cada n_p , n_q , e n_q' , cada um dos quais pode ou não estar presente, representa independentemente um nucleotídeo da saliência;

[0077] p, q, e q' são cada um independentemente 0-6;

[0078] $n_p' > 0$ e pelo menos um n_p' está ligado a um nucleotídeo da vizinhança através de uma ligação de fosforotioato;

[0079] cada N_a e N_a' representa independentemente uma sequência de oligonucleotídeos compreendendo 0-25 nucleotídeos que estão ou modificados ou não modificados ou suas combinações, compreendendo cada sequência pelo menos dois nucleotídeos diferentemente modificados;

[0080] cada N_b e N_b' representa independentemente uma sequência de oligonucleotídeos compreendendo 0-10 nucleotídeos que estão ou modificados ou não modificados ou suas combinações;

[0081] 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, em que as modificações são modificações de 2'-O-metila ou 2'-fluoro;

[0082] as modificações em N_b diferem da modificação em Y e as modificações em N_b' diferem da modificação em Y'; e

[0083] em que a fita senso está conjugada a pelo menos um ligante, em que o ligante é um ou mais derivados de GalNAc anexados através de um ligante ramificado bivalente ou trivalente.

[0084] Em outro aspecto, a presente invenção proporciona agentes de RNAi, por exemplo, agentes de RNAi de fita dupla, capazes de inibir a expressão da Pro-Proteína Convertase Subtilisina Quexina 9 (PCSK9) em uma célula, em que o agente de RNAi de fita dupla compreende uma fita senso complementar com uma fita antissenso, em que a fita antissenso compreende uma região complementar com parte de um RNAm codificando PCSK9, em que cada fita tem cerca de 14 a cerca de 30 nucleotídeos em comprimento, em que o agente de RNAi de fita dupla é representado pela fórmula (III):

senso: $5' n_p - N_a - (X X X)_i - N_b - Y Y Y - N_b - (Z Z Z)_j - N_a - n_q 3'$

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

[0085] em que:

[0086] i, j, k, e l são cada um independentemente 0 ou 1;

- [0087] cada n_p , n_q , e $n_{q'}$, cada um dos quais pode ou não estar presente, representa independentemente um nucleotídeo da saliência;
- [0088] p , q , e q' são cada um independentemente 0-6;
- [0089] $n_{p'} > 0$ e pelo menos um $n_{p'}$ está ligado a um nucleotídeo da vizinhança através de uma ligação de fosforotioato;
- [0090] cada N_a e $N_{a'}$ representa independentemente uma sequência de oligonucleotídeos compreendendo 0-25 nucleotídeos que estão ou modificados ou não modificados ou suas combinações, compreendendo cada sequência pelo menos dois nucleotídeos diferentemente modificados;
- [0091] cada N_b e $N_{b'}$ representa independentemente uma sequência de oligonucleotídeos compreendendo 0-10 nucleotídeos que estão ou modificados ou não modificados ou suas combinações;
- [0092] 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, em que as modificações são modificações de 2'-O-metila ou 2'-fluoro;
- [0093] as modificações em N_b diferem da modificação em Y e as modificações em $N_{b'}$ diferem da modificação em Y' ;
- [0094] em que a fita senso compreende pelo menos uma ligação de fosforotioato; e
- [0095] em que a fita senso está conjugada a pelo menos um ligante, em que o ligante é um ou mais derivados de GalNAc anexados através de um ligante ramificado bivalente ou trivalente.
- [0096] Ainda em outro aspecto, a presente invenção proporciona agentes de RNAi, por exemplo, agentes de RNAi de fita dupla, capazes de inibirem a expressão da Pro-Proteína Convertase Subtilisina Quexina 9 (PCSK9) em uma célula, em que o agente de RNAi de fita dupla compreende uma fita senso complementar com uma fita antissenso, em que a fita antissenso compreende uma região

complementar com parte de um RNAm codificando PCSK9, em que cada fita tem cerca de 14 a cerca de 30 nucleotídeos em comprimento, em que o agente de RNAi de fita dupla é representado pela fórmula (III):

senso: $5' n_p - N_a - Y Y Y - N_a - n_q 3'$

antissenso: $3' n_p' - N_a' - Y'Y'Y' - N_a' - n_q' 5'$ (IIIa)

[0097] em que:

[0098] cada n_p , n_q , e n_q' , cada um dos quais pode ou não estar presente, representa independentemente um nucleotídeo da saliência;

[0099] p , q , e q' são cada um independentemente 0-6;

[00100] $n_p' > 0$ e pelo menos um n_p' está ligado a um nucleotídeo da vizinhança através de uma ligação de fosforotioato;

[00101] cada N_a e N_a' representa independentemente uma sequência de oligonucleotídeos compreendendo 0-25 nucleotídeos que estão ou modificados ou não modificados ou suas combinações, compreendendo cada sequência pelo menos dois nucleotídeos diferentemente modificados;

[00102] YYY e $Y'Y'Y'$ representam cada um independentemente um motivo de três modificações idênticas em três nucleotídeos consecutivos, em que as modificações são modificações de 2'-O-metila ou 2'-fluoro;

[00103] em que a fita senso compreende pelo menos uma ligação de fosforotioato; e

[00104] em que a fita senso está conjugada a pelo menos um ligante, em que o ligante é um ou mais derivados de GalNAc anexados através de um ligante ramificado bivalente ou trivalente.

[00105] A presente invenção proporciona também células, vetores, células hospedeiras, e composições farmacêuticas compreendendo os agentes de RNAi de fita dupla da invenção.

[00106] Em uma modalidade, a presente invenção proporciona agente de RNAi selecionado do grupo de agentes de RNAi listados na

Tabela 1, Tabela 2, Tabela 9, Tabela 10, Tabela 12 e Figura 12.

[00107] Em algumas modalidades, o agente de RNAi é administrado usando uma composição farmacêutica.

[00108] Em modalidades preferenciais, o agente de RNAi é administrado em uma solução. Em algumas tais modalidades, o siRNA é administrado em uma solução não tamponada. Em uma modalidade, o siRNA é administrado em água. Em outras modalidades, o siRNA é administrado com uma solução tampão, tal como um tampão de acetato, um tampão de citrato, um tampão de prolamina, um tampão de carbonato, ou um tampão de fosfato ou qualquer sua combinação. Em algumas modalidades, a solução tampão é salino tamponado com fosfato (PBS).

[00109] Em uma modalidade, as composições farmacêuticas compreendem adicionalmente uma formulação de lipídeos. Em uma modalidade, a formulação de lipídeos compreende um LNP, ou XTC. Em outra modalidade, a formulação de lipídeos compreende um MC3.

[00110] Em um aspecto, a presente invenção proporciona métodos de inibição da expressão de PCSK9 em uma célula. Os métodos incluem contato da célula com um agente de RNAi, por exemplo, um agente de RNAi de fita dupla, ou vetor da invenção; e manutenção da célula produzida no passo (a) durante um tempo suficiente para se obter degradação do transcrito de RNAm de um gene de PCSK9, inibindo deste modo a expressão do gene de PCSK9 na célula.

[00111] Em uma modalidade, a célula está dentro de um indivíduo.

[00112] Em uma modalidade, o indivíduo é um humano.

[00113] Em uma modalidade, a expressão de PCSK9 é inibida por pelo menos cerca de 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % ou 95 %.

[00114] Em outro aspecto, a presente invenção proporciona métodos de tratamento de um indivíduo tendo um distúrbio mediado por

expressão de PCSK9. Os métodos incluem administração ao indivíduo de uma quantidade terapeuticamente eficaz de um agente de RNAi, por exemplo, um agente de RNAi de fita dupla, ou do um vetor da invenção, tratando deste modo o indivíduo.

[00115] Em uma modalidade, o indivíduo é um humano.

[00116] Em uma modalidade, o humano tem hipercolesterolemia.

[00117] Em uma modalidade, o agente de RNAi, por exemplo, agente de RNAi de fita dupla, é administrado a uma dose de cerca de 0,01 mg/kg a cerca de 10 mg/kg, cerca de 0,5 mg/kg a cerca de 50 mg/kg, cerca de 10 mg/kg a cerca de 30 mg/kg, cerca de 10 mg/kg a cerca de 20 mg/kg, cerca de 15 mg/kg a cerca de 20 mg/kg, cerca de 15 mg/kg a cerca de 25 mg/kg, cerca de 15 mg/kg a cerca de 30 mg/kg, ou cerca de 20 mg/kg a cerca de 30 mg/kg.

[00118] Em uma modalidade, o agente de RNAi, por exemplo, agente de RNAi de fita dupla, é administrado subcutaneamente ou intravenosamente.

[00119] Em uma modalidade, o agente de RNAi é administrado em um regime de dosagem que inclui uma fase de carga seguida por um fase de manutenção, em que a fase de carga compreende administração de uma dose de 2 mg/kg, 1 mg/kg ou 0,5 mg/kg cinco vezes por semana, e em que a fase de manutenção compreende administração de uma dose de 2 mg/kg, 1 mg/kg ou 0,5 mg/kg uma vez, duas vezes, ou três vezes semanalmente, uma vez a cada duas semanas, uma vez a cada três semanas, uma vez por mês, uma vez a cada dois meses, uma vez a cada três meses, uma vez a cada quatro meses, um vez a cada cinco meses, ou uma vez a cada seis meses.

[00120] Em uma modalidade, o agente de RNAi é administrado em duas ou mais doses. Em uma modalidade específica, o agente de RNAi é administrado a intervalos selecionados do grupo consistindo 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.

[00121] Ainda em outro aspecto, a presente invenção proporciona métodos de tratamento de hipercolesterolemia em um indivíduo. Os métodos incluem administração ao indivíduo de uma quantidade terapêuticamente eficaz de um agente de RNAi, por exemplo, um agente de RNAi de fita dupla, ou do um vetor da invenção, tratando deste modo o indivíduo.

[00122] Em uma modalidade, o indivíduo é um primata ou roedor. Em outra modalidade, o indivíduo é um humano.

[00123] Em uma modalidade, o agente de RNAi, por exemplo, agente de RNAi de fita dupla, é administrado a uma dose de cerca 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 outra modalidade, o agente de RNAi de fita dupla é administrado a uma dose de cerca de 10 mg/kg a cerca de 30 mg/kg.

[00124] Em uma modalidade, o agente de RNAi, por exemplo, agente de RNAi de fita dupla, é administrado subcutaneamente ou intravenosamente.

[00125] Em uma modalidade, o agente de RNAi é administrado em um regime de dosagem que inclui uma fase de carga seguida por um fase de manutenção, em que a fase de carga compreende administração de uma dose de 2 mg/kg, 1 mg/kg ou 0,5 mg/kg cinco vezes por semana, e em que a fase de manutenção compreende administração de uma dose de 2 mg/kg, 1 mg/kg ou 0,5 mg/kg uma vez, duas vezes, ou três vezes semanalmente, uma vez a cada duas semanas, uma vez a cada três semanas, uma vez por mês, uma vez a cada dois meses, uma vez a cada três meses, uma vez a cada quatro meses, um vez a cada cinco meses, ou uma vez a cada seis meses.

[00126] Em uma modalidade, o agente de RNAi é administrado em duas ou mais doses. Em uma modalidade específica, o agente de RNAi

é administrado a intervalos selecionados do grupo consistindo 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.

[00127] Em uma modalidade, os métodos compreendem adicionalmente determinação de um genótipo ou fenótipo de LDLR do indivíduo.

[00128] Em uma modalidade, a administração resulta em uma diminuição no colesterol no soro no indivíduo.

[00129] Em uma modalidade, os métodos compreendem adicionalmente determinação do nível de colesterol no soro no indivíduo.

[00130] A presente invenção é adicionalmente ilustrada pela seguinte descrição detalhada e desenhos.

Breve Descrição das Figuras

[00131] A Figura 1 é um gráfico ilustrando que existe um efeito de resposta à dose com AD-48400 conjugado com GalNAc a todas as três dosagens testadas. AD-48399, conjugado com GalNAc, serve como um controle.

[00132] As Figuras 2A e 2B são gráficos ilustrando a eficácia e duração da resposta *in vivo* para os siRNAs indicados.

[00133] A Figura 3 é uma Tabela mostrando as sequências das fitas senso (SEQ ID NOS 1633-1642, respectivamente, por ordem de aparecimento) e antissenso (SEQ ID NOS 1643-1652, respectivamente, por ordem de aparecimento) dos dúplexes analisados quanto à eficácia *in vivo* e otimização do composto-protótipo.

[00134] A Figura 4 é um gráfico ilustrando os resultados dos ensaios de eficácia *in vivo* quanto à otimização do composto-protótipo.

[00135] A Figura 5 é um gráfico ilustrando os resultados dos ensaios de resposta à dose *in vivo* realizados em camundongos transgênicos

quanto a PCSK9. Setenta e duas horas após uma dose única de 10 mg/kg, 3 mg/kg, 1 mg/kg, e 0,3 mg/kg de AD-57928, os níveis da proteína PCSK9 foram determinados por ELISA.

[00136] A Figura 6 é um gráfico ilustrando os níveis da proteína PCSK9 no soro de camundongos transgênicos quanto a PCSK9 após administração de AD-57928 em doses de 5x2 mg/kg durante a "fase de carga" e doses de 1x2 mg/kg ou 2x2 mg/kg durante a "fase de manutenção".

[00137] A Figura 7 é um gráfico ilustrando os níveis da proteína PCSK9 no soro de camundongos transgênicos quanto a PCSK9 após administração de AD-57928 em doses de 5x1 mg/kg durante a "fase de carga" e doses de 1x1 mg/kg ou 2x1 mg/kg durante a "fase de manutenção".

[00138] A Figura 8 é um gráfico ilustrando os níveis da proteína PCSK9 no soro de camundongos transgênicos quanto a PCSK9 após administração de AD-57928 em doses de 5x0,5 mg/kg durante a "fase de carga" e doses de 1x0,5 mg/kg ou 2x0,5 mg/kg durante a "fase de manutenção".

[00139] A Figura 9 é um gráfico ilustrando os resultados dos ensaios de resposta à dose *in vivo* realizados em camundongos transgênicos quanto a PCSK9. Setenta e duas horas após uma dose única de 0,3 mg/kg de siRNAs, os níveis da proteína PCSK9 foram determinados por ELISA.

[00140] A Figura 10 é um gráfico mostrando a quantidade de AD-57928 e AD-58895 por nanograma de fígado de camundongos de tipo selvagem C57B6 após administração de uma dose única de 1 mg/kg de AD-57928 ou AD-58895.

[00141] A Figura 11 é um gráfico mostrando a quantidade de AD-57928 e AD-58895 expressa como uma % da quantidade teórica no fígado de camundongos de tipo selvagem C57B6 após administração

de uma dose única de 1 mg/kg de AD-57928 ou AD-58895.

[00142] A Figura 12A é uma Tabela ilustrando agentes de RNAi da invenção contendo sequências otimizadas em comparação com sequências de AD-57928. A Figura 12A divulga as sequências "Senso" como SEQ ID NOS 1653-1658, respectivamente, por ordem de aparecimento, e as sequências "Antissenso" como SEQ ID NOS 1659-1664, respectivamente, por ordem de aparecimento.

[00143] A Figura 12B é um gráfico mostrando os valores de IC₅₀ dos agentes de RNAi indicados.

[00144] A Figura 13 é um gráfico mostrando o nível dos agentes de RNAi indicados no fígado de camundongos de tipo selvagem após administração de uma dose única de 1 mg/kg do agente de RNAi indicado.

[00145] A Figura 14A é um gráfico mostrando a quantidade de proteína PCSK9 no soro de primatas não humanos expressa como percentagem de PCSK9 restante em relação a níveis pré-sangramento de PCSK9 após administração dos agentes de RNAi indicados a qdx5 + qwx3.

[00146] A Figura 14B é um gráfico mostrando a quantidade absoluta de proteína PCSK9 no soro de primatas não humanos após administração dos agentes de RNAi indicados a qdx5 + qwx3.

[00147] A Figura 15 é um gráfico mostrando a quantidade de colesterol de lipoproteína de baixa densidade (LDL ou LDLc) no soro de primatas não humanos expressa como uma percentagem de LDL restante em relação a níveis pré-sangramento de LDL após administração dos agentes de RNAi indicados a qdx5 + qwx3.

[00148] A Figura 16A é um gráfico mostrando a quantidade de colesterol de lipoproteína de baixa densidade (LDL ou LDLc) no soro de primatas não humanos expressa como uma percentagem da quantidade média de níveis pré-sangramento de LDL após

administração de AD-57928 a 2 mg/kg, q1w e 1 mg/kg, 2xw.

[00149] A Figura 16B é um gráfico mostrando a quantidade de proteína PCSK9 em relação à quantidade pré-sangramento no soro de primatas não humanos após administração de AD-57928 a 2 mg/kg, q1w e 1 mg/kg, 2xw.

[00150] A Figura 17A é um gráfico mostrando a quantidade de colesterol de lipoproteína de baixa densidade (LDL ou LDLc) no soro de primatas não humanos expressa como uma percentagem da quantidade média de níveis pré-sangramento de LDL após administração de AD-57928 a 2 mg/kg, 2xw e uma dose única de 25 mg/kg. A última dose para o grupo com 2 mg/kg, 2xw foi dia 36.

[00151] A Figura 17B é um gráfico mostrando a quantidade de proteína PCSK9 em relação à quantidade pré-sangramento no soro de primatas não humanos após administração de AD-57928 a 2 mg/kg, 2xw e uma dose única de 25 mg/kg.

[00152] A Figura 18 é um gráfico mostrando a quantidade de colesterol de lipoproteína de baixa densidade (LDL ou LDLc) no soro de primatas não humanos expressa como uma percentagem de LDL restante em relação a níveis pré-sangramento de LDL após administração dos agentes de RNAi indicados a qdx5 + qwx3.

[00153] A Figura 19 é um gráfico mostrando a quantidade de colesterol de lipoproteína de baixa densidade (LDL ou LDLc) no soro de primatas não humanos expressa como uma percentagem de LDL restante em relação a níveis pré-sangramento de LDL após administração dos agentes de RNAi indicados a qdx5 + qwx3.

Descrição Detalhada da Invenção

[00154] A presente invenção proporciona composições compreendendo agentes de RNAi, por exemplo, agentes de RNAi de fita dupla, se dirigindo a PCSK9. São também divulgados aqui métodos usando as composições da invenção para inibição da expressão de

PCSK9 e para tratamento de patologias relacionadas com expressão de PCSK9, por exemplo, hipercolesterolemia.

I. Definições

[00155] 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.

[00156] Os artigos "um" e "uma" são usados aqui para se referirem a um ou mais do que um (*i.e.*, 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.

[00157] O termo "incluindo" é usado aqui para significar, e é usado indistintamente com a frase "incluindo mas não se limitando a".

[00158] 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.

[00159] Como usado aqui, "PCSK9" se refere ao gene da ou proteína pro-proteína convertase subtilisina quexina 9. PCSK9 é também conhecido como FH3, HCHOLA3, NARC-1, ou NARCI. O termo PCSK9 inclui PCSK9 de humano, a sequência de aminoácidos e nucleotídeos da qual pode ser encontrada, por exemplo, no Número de Acesso do GenBank GI:299523249; PCSK9 de camundongo, a sequência de aminoácidos e nucleotídeos da qual pode ser encontrada, por exemplo, no Número de Acesso do GenBank GI:163644257; PCSK9 de rato, a sequência de aminoácidos e nucleotídeos da qual pode ser encontrada, por exemplo, no Número de Acesso do GenBank GI:77020249. Exemplos adicionais de sequências de RNAm de PCSK9 estão prontamente disponíveis usando, por exemplo, GenBank.

[00160] Como usada aqui, "sequência alvo" se refere a uma porção

contígua da sequência de nucleotídeos de uma molécula de RNAm formada durante a transcrição de um gene de PCSK9, incluindo RNAm que é um produto do processamento de RNA de um produto de transcrição primária.

[00161] Como usado aqui, o termo "fita compreendendo uma sequência" se refere a um oligonucleotídeo compreendendo uma cadeia de nucleotídeos que é descrita pela sequência referida usando a nomenclatura de nucleotídeos padrão.

[00162] "G", "C", "A" e "U" designam cada um geralmente um nucleotídeo que contém guanina, citosina, adenina, e uracila como uma base, respectivamente. "T" e "dT" são usados indistintamente aqui e se referem a um deoxirribonucleotídeo em que a nucleobase é timina, por exemplo, deoxirribotimina, 2'-deoxitimidina ou timidina. No entanto será entendido que o termo "ribonucleotídeo" ou "nucleotídeo" ou "deoxirribonucleotídeo" pode também se referir a um nucleotídeo modificado, como adicionalmente detalhado em baixo, ou uma fração de substituição suplente. A pessoa perita 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 transportando 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. Consequentemente, nucleotídeos contendo uracila, guanina, ou adenina podem ser substituídos nas sequências de nucleotídeos da invenção por um nucleotídeo contendo, por exemplo, inosina. Sequências compreendendo tais frações de substituição são modalidades da invenção.

[00163] Os termos "iRNA", "agente de RNAi", "agente de RNAi", "agente de interferência de RNA" como usados indistintamente aqui se

referem a um agente que contém RNA como esse termo é definido aqui, e que medeia a clivagem direcionada de um transcrito de RNA através de uma via do complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC). RNAi dirige a degradação específica quanto à sequência de RNAm através de um processo conhecido como interferência de RNA (RNAi). O RNAi modula, por exemplo, inibe, a expressão de PCSK9 em uma célula, por exemplo, uma célula dentro de um indivíduo, tal como um indivíduo mamífero.

[00164] Em uma modalidade, um agente de RNAi da invenção inclui um RNA de fita única que interage com uma sequência de RNA alvo, por exemplo, uma sequência de RNAm alvo de PCSK9, 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 siRNA 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 saliências 3' de duas bases características (Bernstein, *et al.*, (2001) *Nature* 409:363). Os siRNAs são depois incorporados em um complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC) onde uma ou mais helicases desenrolam o dúplex de siRNA, permitindo que a fita antissenso complementar oriente o reconhecimento do alvo (Nykanen, *et al.*, (2001) *Cell* 107:309). Após ligação ao RNAm 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 se relaciona com um RNA de fita única (siRNA) gerado dentro de uma célula e que promove a formação de um complexo RISC para efetivar o silenciamento do gene alvo, *i.e.*, um gene de PCSK9. Portanto, o termo "siRNA" é também usado aqui para se referir a um RNAi como descrito acima.

[00165] Em outra modalidade, o agente de RNAi pode ser um siRNA de fita única que é introduzido em uma célula ou organismo para inibir um RNAm alvo. O agente de RNAi de fita única se liga à endonuclease Argonauta 2 do RISC, que cliva depois o RNAm alvo. Os siRNAs de fita única têm geralmente 15-30 nucleotídeos e estão quimicamente modificados. O desenho e teste de siRNAs de fita única 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 siRNA de fita única como descrito aqui ou como quimicamente modificada pelos métodos descritos em Lima *et al.*, (2012) *Cell* 150: 883-894.

[00166] Em outra modalidade, um "RNAi" para uso nas composições, usos, e métodos da invenção é um RNA de fita dupla e é referido 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 ácido ribonucleico, tendo uma estrutura de dúplice compreendendo duas fitas de ácidos nucleicos antiparalelas e substancialmente complementares, referido como tendo orientações "senso" e "antissenso" no que diz respeito a um RNA alvo, *i.e.*, um gene de PCSK9. Em algumas modalidades da invenção, o RNA de fita dupla (dsRNA) desencadeia a degradação de um RNA alvo, por exemplo, um RNAm, através de um mecanismo de silenciamento de genes pós-transcricional referido aqui como interferência de RNA ou RNAi.

[00167] Em geral, a maioria dos nucleotídeos de cada fita de uma molécula de dsRNA é ribonucleotídeos, mas, como descrito em detalhe aqui, cada uma das ou ambas as fitas 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. Tais modificações podem incluir todos os tipos de modificações divulgadas aqui ou conhecidas na técnica. Quaisquer tais modificações, como usadas em uma molécula do tipo siRNA, estão englobadas por " agente de RNAi" para os propósitos desta especificação e reivindicações.

[00168] As duas fitas formando a estrutura de dúplex podem ser porções diferentes de uma molécula de RNA maior, ou podem ser moléculas de RNA separadas. Onde as duas fitas são parte de uma molécula maior, e estão portanto, conectadas por uma cadeia ininterrupta de nucleotídeos entre a extremidade 3' de uma fita e a extremidade 5' da respectiva outra fita formando a estrutura de dúplex, a cadeia de RNA conectante é referida como uma "estrutura em gancho". Onde as duas fitas estão conectadas covalentemente por meios sem ser uma cadeia ininterrupta de nucleotídeos entre a extremidade 3' de uma fita e a extremidade 5' da respectiva outra fita formando a estrutura de dúplex, a estrutura conectante é referida como um "ligante". As fitas de RNA podem ter o mesmo ou um diferente número de nucleotídeos. O número máximo de pares de bases é o número de nucleotídeos na fita mais curta de dsRNA menos quaisquer saliências que estejam presentes no dúplex. Adicionalmente à estrutura de dúplex, um agente de RNAi pode compreender uma ou mais saliências de nucleotídeos.

[00169] Em uma modalidade, um agente de RNAi da invenção é um dsRNA de 24-30 nucleotídeos que interage com uma sequência de RNA alvo, por exemplo, uma sequência de RNAm alvo de PCSK9, 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 siRNA 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 saliências 3' de duas bases características (Bernstein, *et al.*, (2001) *Nature* 409:363). Os siRNAs são depois incorporados em um complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC) onde uma ou mais helicases desenrolam o dúplex de siRNA, permitindo que a fita antissenso complementar oriente o reconhecimento do alvo (Nykanen, *et al.*, (2001) *Cell* 107:309). Após ligação ao RNAm alvo apropriado, uma ou mais endonucleases dentro do RISC clivam o alvo para induzir silenciamento (Elbashir, *et al.*, (2001) *Genes Dev.* 15:188). Como usada aqui, uma "saliência de nucleotídeos" se refere ao nucleotídeo ou nucleotídeos não emparelhados que sobressaem da estrutura de dúplex de um agente de RNAi quando uma extremidade 3' de uma fita do agente de RNAi se prolonga para além da extremidade 5' da outra fita, ou *vice versa*. "Coesão" ou "extremidade coesiva" significa que não existem nenhuns nucleotídeos não emparelhados em essa extremidade do agente de RNAi de fita dupla, *i.e.*, nenhuma saliência de nucleotídeos. Um agente de RNAi "de extremidades coesivas" é um dsRNA que tem fita dupla ao longo do seu comprimento inteiro, *i.e.*, nenhuma saliência de nucleotídeos em qualquer uma das extremidades da molécula. Os agentes de RNAi da invenção incluem agentes de RNAi com saliências de nucleotídeos em uma extremidade (*i.e.*, agentes com uma saliência e uma extremidade coesiva) ou com saliências de nucleotídeos em ambas as extremidades.

[00170] O termo "fita antissenso" se refere à fita de um agente de RNAi de fita dupla que inclui uma região que é substancialmente complementar com uma sequência alvo (por exemplo, um RNAm de PCSK9 de humano). Como usado aqui, o termo "região complementar com parte de um RNAm codificando transtiretina" se refere a uma região na fita antissenso que é substancialmente complementar com parte de uma sequência de RNAm de PCSK9. Onde a região de

complementaridade não é completamente complementar com a sequência alvo, as não correspondências são mais toleradas nas regiões terminais e, se presentes, estão geralmente em uma região ou regiões terminais, por exemplo, com 6, 5, 4, 3, ou 2 nucleotídeos do terminal 5' e/ou 3'.

[00171] O termo "fita senso", como usado aqui, se refere à fita de um dsRNA que inclui uma região substancialmente complementar com uma região da fita antissenso.

[00172] Como usada aqui, o termo "sítio de clivagem" se refere a uma região que está localizada imediatamente adjacente ao sítio de clivagem. O sítio de clivagem é o local no alvo no qual ocorre clivagem. Em algumas modalidades, o sítio de clivagem compreende três bases em qualquer uma das extremidades do, e imediatamente adjacente ao sítio de clivagem. Em algumas modalidades, o sítio de clivagem compreende duas bases em qualquer uma das extremidades do, e imediatamente adjacente ao sítio de clivagem. Em algumas modalidades, o sítio de clivagem ocorre especificamente no local ligado pelos nucleotídeos 10 e 11 da fita antissenso, e o sítio de clivagem compreende os nucleotídeos 11, 12 e 13.

[00173] 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, onde 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. Podem ser aplicadas outras condições, tais como condições fisiologicamente relevantes como pode ser encontrado dentro de um organismo. Por exemplo, uma sequência complementar é suficiente para permite que a função relevante do ácido nucleico proceda, por exemplo, RNAi. 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.

[00174] As sequências podem ser "completamente complementares" no que diz respeito a cada uma quando existe emparelhamento de bases dos nucleotídeos da primeira sequência de nucleotídeos com os nucleotídeos da segunda sequência de nucleotídeos ao longo do comprimento inteiro das primeira e segunda sequências de nucleotídeos. No entanto, onde uma primeira sequência é referida como "substancialmente complementar" no que diz respeito a uma segunda sequência aqui, as duas sequências podem ser completamente complementares, ou podem formar um ou mais, mas geralmente não mais do que 4, 3 ou 2, pares de bases não correspondidos após hibridação, enquanto retêm a capacidade de hibridarem sob as condições o mais relevantes à sua aplicação final. No entanto, onde dois oligonucleotídeos são desenhados para formar, após hibridação, uma ou mais saliências de fita única, tais saliências não devem ser consideradas como não correspondências 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 mais longo compreende uma sequência de 21 nucleotídeos que é completamente complementar com o oligonucleotídeo mais curto, pode ser ainda referido como "completamente complementar" para os propósitos descritos aqui.

[00175] Sequências "complementares", como usadas aqui, podem também 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 no que diz respeito à sua capacidade de hibridação. Tais pares de bases não de Watson-Crick incluem, mas não estão limitados a, emparelhamento de bases Oscilantes G:U ou de Hoogstein.

[00176] Os termos "complementar", "completamente complementar" e "substancialmente complementar" aqui podem ser usados no que diz respeito à correspondência de bases entre a fita senso e a fita antissenso de um dsRNA, ou entre a fita antissenso de um dsRNA e uma sequência alvo, como será entendido a partir do contexto do seu uso.

[00177] Como usado aqui, um polinucleotídeo que é "substancialmente complementar com pelo menos parte de" um RNA mensageiro (RNAm) se refere a um polinucleotídeo que é substancialmente complementar com uma porção contígua do RNAm de interesse (por exemplo, um RNAm codificando PCSK9) incluindo uma 5' UTR, uma grelha de leitura aberta (ORF), ou uma 3' UTR. Por exemplo, um polinucleotídeo é complementar com pelo menos uma parte de um RNAm de PCSK9 se a sequência for substancialmente complementar com uma porção ininterrupta de um RNAm codificando PCSK9.

[00178] O termo "inibição", como usado aqui, é usado indistintamente com "redução", "silenciamento", "infrarregulação", "supressão" e outros termos similares, e inclui qualquer nível de inibição.

[00179] A frase "inibição da expressão de um PCSK9", como usada aqui, inclui inibição da expressão de qualquer gene de PCSK9 (tal como, por exemplo, um gene de PCSK9 de camundongo, um gene de PCSK9 de rato, um gene de PCSK9 de macaco, ou um gene de PCSK9 de humano) bem como variantes (por exemplo, variantes ocorrendo

naturalmente), ou mutantes de um gene de PCSK9. Assim, o gene de PCSK9 pode ser um gene de PCSK9 de tipo selvagem, um gene de PCSK9 mutante, ou um gene de PCSK9 transgênico no contexto de uma célula, grupo de células, ou organismo geneticamente manipulado.

[00180] "Inibição da expressão de um gene de PCSK9" inclui qualquer nível de inibição de um gene de PCSK9, por exemplo, supressão pelo menos parcial da expressão de um gene de PCSK9, tal como uma inibição de pelo menos cerca de 5 %, pelo menos cerca de 10 %, pelo menos cerca de 15 %, pelo menos cerca de 20 %, pelo menos cerca de 25 %, pelo menos cerca de 30 %, pelo menos cerca de 35 %, pelo menos cerca de 40 %, pelo menos cerca de 45 %, pelo menos cerca de 50 %, pelo menos cerca de 55 %, pelo menos cerca de 60 %, pelo menos cerca de 65 %, pelo menos cerca de 70 %, pelo menos cerca de 75 %, pelo menos cerca de 80 %, pelo menos cerca de 85 %, pelo menos cerca de 90 %, pelo menos cerca de 91 %, pelo menos cerca de 92 %, pelo menos cerca de 93 %, pelo menos cerca de 94 %, pelo menos cerca de 95 %, pelo menos cerca de 96 %, pelo menos cerca de 97 %, pelo menos cerca de 98 %, ou pelo menos cerca de 99 %.

[00181] A expressão de um gene de PCSK9 pode ser avaliada com base no nível de qualquer variável associada à expressão do gene de PCSK9, por exemplo, nível de RNAm de PCSK9, nível de proteína de PCSK9, ou níveis de lipídeos no soro. A inibição pode ser avaliada por uma diminuição em um nível absoluto ou relativo de uma ou mais destas variáveis em comparação com um nível de controle. O nível de controle pode ser qualquer tipo de nível de controle que seja utilizado na técnica, por exemplo, um nível de linha de base pré-dose, ou um nível determinado a partir de um indivíduo, célula, ou amostra similar que não é tratado ou tratado com um controle (tal como, por exemplo, controle só com tampão ou controle com agente inativo).

[00182] A frase "contato de uma célula com um agente de RNAi de fita dupla", como usada aqui, inclui contato de uma célula por quaisquer meios possíveis. Contato de uma célula com um agente de RNAi de fita dupla inclui contato de uma célula *in vitro* com o agente de RNAi ou contato de uma célula *in vivo* com o agente de RNAi. O contato pode ser feito diretamente ou indiretamente. Assim, por exemplo, o agente de RNAi pode ser colocado em contato físico com a célula pelo indivíduo realizando o método, ou, alternativamente, o agente de RNAi pode ser colocado em uma situação que irá permitir ou fazer com que entre subsequentemente em contato com a célula.

[00183] O contato de uma célula *in vitro* pode ser feito, por exemplo, por incubação da célula com o agente de RNAi. O contato de uma célula *in vivo* pode ser feito, por exemplo, por injeção do agente de RNAi no ou próximo do tecido onde a célula está localizada, ou por injeção do agente de RNAi em outra área, na corrente sanguínea ou no espaço subcutâneo, tal que o agente irá subsequentemente alcançar o tecido onde está localizada a célula a ser contatada. Por exemplo, o agente de RNAi pode conter e/ou estar acoplado a um ligante, por exemplo, um ligante de GalNAc3, que dirige o agente de RNAi para um local de interesse, por exemplo, o fígado. Combinações de métodos de contato *in vitro* e *in vivo* são também possíveis. Em conexão com os métodos da invenção, uma célula pode ser também contatada *in vitro* com um agente de RNAi e subsequentemente transplantada em um indivíduo.

[00184] Um "paciente" ou "indivíduo", como usado aqui, se destina a incluir um humano ou animal não humano, preferencialmente um mamífero, por exemplo, um macaco. O mais preferencialmente, o indivíduo ou paciente é um humano.

[00185] Uma "doença associada a PCSK9", como usada aqui, se destina a incluir qualquer doença associada ao gene de ou proteína PCSK9. Uma tal doença pode ser causada, por exemplo, por produção

em excesso da proteína PCSK9, por mutações do gene de PCSK9, por clivagem anormal da proteína PCSK9, por interações anormais entre PCSK9 e outras proteínas ou outras substâncias endógenas ou exógenas. Doenças associadas a PCSK9 exemplares incluem lipidemias, por exemplo, uma hiperlipidemia, e outras formas de desequilíbrio de lipídeos tais como hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia e as condições patológicas associadas a estes distúrbios tais como doenças do coração e circulatórias.

[00186] É pretendido que "quantidade terapeuticamente eficaz", como usada aqui, inclua a quantidade de um agente de RNAi que, quando administrada a um paciente para tratamento de uma doença associada a PCSK9, é suficiente para efetivar 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 PCSK9, dos tipos de tratamentos precedentes ou concomitantes, se alguns, e outras características individuais do paciente a ser tratado.

[00187] É pretendido que "quantidade profilaticamente eficaz", como usada aqui, inclua a quantidade de um agente de RNAi que, quando administrada a um indivíduo que não experimenta ou exibe ainda sintomas de uma doença associada a PCSK9, mas que possa estar pré-disposto à doença, 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.

[00188] 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.

[00189] 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, fluido cerebrospinal, fluidos oculares, linfa, urina, saliva e similares. Amostras de tecidos podem incluir amostras de tecidos, órgãos ou regiões localizadas. Por exemplo, amostras podem ser derivadas de órgãos particulares, partes de órgãos, ou fluidos ou células dentro desses órgãos. Em certas modalidades, amostras podem ser derivadas do fígado (por exemplo, fígado inteiro ou certos segmentos do fígado ou certos tipos de células no fígado, tais como, por exemplo, hepatócitos). 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-se a tecido do fígado (ou seus subcomponentes) derivado do indivíduo.

II. iRNAs da Invenção

[00190] São descritos aqui agentes de RNAi de fita dupla melhorados que inibem a expressão de um gene de PCSK9 em uma célula, tal como uma célula dentro de um indivíduo, por exemplo, um mamífero, tal como

um humano tendo um distúrbio de lipídeos, por exemplo, hipercolesterolemia e usos de tais agentes de RNAi de fita dupla.

[00191] Os agentes de RNAi de fita dupla da invenção incluem agentes com modificações químicas como divulgado, por exemplo, no Pedido Provisório dos E.U.A. No. 61/561,710, depositado a 18 de novembro, 2011, os conteúdos inteiros dos quais são incorporados aqui por referência.

[00192] Como mostrado aqui e no Pedido Provisório No. 61/561,710 pode ser obtido um resultado superior por introdução de um ou mais motivos de três modificações idênticas em três nucleotídeos consecutivos em uma fita senso e/ou antissenso de um agente de RNAi, particularmente no ou próximo do sítio de clivagem. Em algumas modalidades, a fita senso e fita antissenso do agente de RNAi podem estar de outro modo completamente modificadas. A introdução destes motivos interrompe o padrão de modificação, se presente, da fita senso e/ou antissenso. O agente de RNAi pode estar opcionalmente conjugado com um ligante derivado de GalNAc, por exemplo na fita senso. Os agentes de RNAi resultantes apresentam atividade de silenciamento de gene superior.

[00193] Mais especificamente foi surpreendentemente descoberto que, quando a fita senso e fita antissenso do agente de RNAi de fita dupla estão completamente modificadas para terem um ou mais motivos de três modificações idênticas em três nucleotídeos consecutivos no ou próximo do sítio de clivagem de pelo menos uma fita de um agente de RNAi, a atividade de silenciamento de gene do agente de RNAi foi superiormente intensificada.

[00194] Portanto, a invenção proporciona agentes de RNAi de fita dupla capazes de inibir a expressão de um gene alvo (*i.e.*, um gene de Pró-proteína convertase subtilisina quexina 9 (PCSK9)) *in vivo*. O agente de RNAi compreende uma fita senso e uma fita antissenso. Cada

fita do agente de RNAi pode variar de 12-30 nucleotídeos em comprimento. Por exemplo, cada fita 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.

[00195] A fita senso e fita antissenso formam tipicamente um RNA de fita dupla em dúplex ("dsRNA"), também referido 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.

[00196] Em uma modalidade, o agente de RNAi pode conter uma ou mais regiões de saliência e/ou grupos *capping* na extremidade 3', extremidade 5', ou ambas as extremidades de uma das ou ambas as fitas. A saliência 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 saliências podem ser o resultado de uma fita sendo mais longa do que o outro, ou o resultado de duas fitas do mesmo comprimento estando escalonadas. A saliência pode formar uma não correspondência com o RNAm alvo ou pode ser complementar com as sequências de gene sendo dirigidas ou pode ser outra sequência. As primeira e segunda fitas podem ser também unidas, por exemplo, por bases adicionais para formar uma estrutura em grampo, ou por outros ligantes não de base.

[00197] Em uma modalidade, os nucleotídeos na região de saliência 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 saliência para qualquer uma das extremidades em qualquer uma das fitas. A saliência pode formar uma não correspondência com o RNAm alvo ou pode ser complementar com as sequências de gene sendo dirigidas ou pode ser outra sequência.

[00198] As saliências 5' ou 3' na fita senso, fita antissenso ou ambas as fitas do agente de RNAi podem estar fosforiladas. Em algumas modalidades, a(s) região(ões) de saliência 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 saliência está presente na extremidade 3' da fita senso, fita antissenso, ou ambas as fitas. Em uma modalidade, esta saliência 3' está presente na fita antissenso. Em uma modalidade, esta saliência 3' está presente na fita senso.

[00199] O agente de RNAi pode conter apenas uma única saliência,

que pode fortalecer a atividade de interferência do RNAi, sem afetar a sua estabilidade global. Por exemplo, a saliência de fita única pode estar localizada na extremidade 3'-terminal da fita senso ou, alternativamente, na extremidade 3'-terminal da fita antissenso. O RNAi pode ter também uma extremidade coesiva, localizada na extremidade 5' da fita antissenso (ou da extremidade 3' da fita senso) ou *vice versa*. Geralmente, a fita antissenso do RNAi tem uma saliência de nucleotídeos na extremidade 3', e a extremidade 5' é coesiva. Sem desejar estar limitado pela teoria, a extremidade coesiva assimétrica na extremidade 5' da fita antissenso e saliência na extremidade 3' da fita antissenso favorece a carga da fita guia no processo de RISC.

[00200] Em uma modalidade, o agente de RNAi é um *bluntmer* de extremidade dupla de 19 nucleotídeos em comprimento, em que a fita 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'. A fita 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'.

[00201] Em outra modalidade, o agente de RNAi é um *bluntmer* de extremidade dupla de 20 nucleotídeos em comprimento, em que a fita 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'. A fita 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'.

[00202] Ainda em outra modalidade, o agente de RNAi é um *bluntmer* de extremidade dupla de 21 nucleotídeos em comprimento, em que a fita 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'. A fita 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'.

[00203] Em uma modalidade, o agente de RNAi compreende uma fita senso de 21 nucleotídeos e uma fita antissenso de 23 nucleotídeos, em que a fita 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'; a fita 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 coesiva, enquanto a outra extremidade compreende uma saliência de 2 nucleotídeos. Preferencialmente, a saliência de 2 nucleotídeos está na extremidade 3' da fita antissenso. Quando a saliência de 2 nucleotídeos está na extremidade 3' da fita antissenso podem existir duas ligações internucleotídicas de fosforotioato entre os três nucleotídeos terminais, em que dois dos três nucleotídeos são os nucleotídeos da saliência, e o terceiro nucleotídeo é um nucleotídeo emparelhado próximo do nucleotídeo da saliência. Em uma modalidade, o agente de RNAi tem adicionalmente duas ligações internucleotídicas de fosforotioato entre os três nucleotídeos terminais tanto na extremidade 5' da fita senso como na extremidade 5' da fita antissenso. Em uma modalidade, todos os nucleotídeos na fita senso e fita 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).

[00204] Em uma modalidade, o agente de RNAi compreende fitas senso e antissenso, em que o agente de RNAi compreende uma primeira fita tendo um comprimento que tem pelo menos 25 e no máximo 29 nucleotídeos e uma segunda fita 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' da primeira fita e a extremidade 5' da segunda fita formam uma extremidade coesiva e a segunda fita tem mais 1-4 nucleotídeos na sua extremidade 3' do que a primeira fita, em que a região de dúplex que tem pelo menos 25 nucleotídeos de comprimento, e a segunda fita é suficientemente complementar com um RNAm alvo ao longo de pelo menos 19 nucleotídeos do comprimento da segunda fita 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 siRNA compreendendo a extremidade 3' da segunda fita, reduzindo deste modo a expressão do gene alvo no mamífero. Opcionalmente, o agente de RNAi compreende adicionalmente um ligante.

[00205] Em uma modalidade, a fita senso do agente de RNAi contém pelo menos um motivo de três modificações idênticas em três nucleotídeos consecutivos, onde um dos motivos ocorre no sítio de clivagem na fita senso.

[00206] Em uma modalidade, a fita 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 sítio de clivagem na fita antissenso.

[00207] Para um agente de RNAi tendo uma região de dúplex com 17-23 nucleotídeos em comprimento, o sítio de clivagem da fita 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 da fita antissenso, começando a contagem a partir do 1º nucleotídeo a partir da

extremidade 5' da fita antissenso, ou começando contagem a partir do 1º nucleotídeo emparelhado dentro da região de dúplex a partir da extremidade 5' da fita antissenso. O sítio de clivagem na fita antissenso pode também mudar de acordo com o comprimento da região de dúplex do RNAi a partir da extremidade 5'.

[00208] A fita senso do agente de RNAi pode conter pelo menos um motivo de três modificações idênticas em três nucleotídeos consecutivos no sítio de clivagem da fita; e a fita antissenso pode ter pelo menos um motivo de três modificações idênticas em três nucleotídeos consecutivos no ou próximo do sítio de clivagem da fita. Quando a fita senso e a fita antissenso formam um dúplex de dsRNA, a fita senso e a fita antissenso podem estar tão alinhadas que um motivo dos três nucleotídeos na fita senso e um motivo dos três nucleotídeos na fita antissenso têm pelo menos uma sobreposição de nucleotídeo, *i.e.*, pelo menos um dos três nucleotídeos do motivo na fita senso forma um par de bases com pelo menos um dos três nucleotídeos do motivo na fita antissenso. Alternativamente, pelo menos dois nucleotídeos podem se sobrepor, ou todos os três nucleotídeos podem se sobrepor.

[00209] Em uma modalidade, a fita 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 sítio de clivagem da fita 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 da fita que está separada do motivo no ou próximo do sítio de clivagem da mesma fita. A modificação em asa é adjacente ao primeiro motivo ou está separada por pelo menos um ou mais nucleotídeos. Quando os motivos são 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 sítio de clivagem ou em qualquer um dos lados do motivo líder.

[00210] Como a fita senso, a fita 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 sítio de clivagem da fita. A fita antissenso pode também conter uma ou mais modificações em asa em um alinhamento similar às modificações em asa que possam estar presentes na fita senso.

[00211] Em uma modalidade, a modificação em asa na fita senso ou fita antissenso do agente de RNAi não inclui tipicamente o primeiro um ou dois nucleotídeos terminais na extremidade 3', extremidade 5' ou ambas as extremidades da fita.

[00212] Em outra modalidade, a modificação em asa na fita senso ou fita 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 da fita.

[00213] Quando a fita senso e a fita antissenso do agente de RNAi contêm cada uma 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.

[00214] Quando a fita senso e a fita antissenso do agente de RNAi contêm cada uma pelo menos duas modificações em asa, a fita senso e a fita antissenso podem estar tão alinhadas que duas modificações cada uma de uma fita estão em uma extremidade da região de dúplice, tendo uma sobreposição de um, dois ou três nucleotídeos; duas modificações cada uma de uma fita estão na outra extremidade da

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

[00215] Em uma modalidade, todos os nucleotídeos na fita senso e fita 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.

[00216] 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 uma fita. Uma modificação pode ocorrer em uma região de fita dupla, uma região de fita única, ou em ambas. Uma modificação pode ocorrer apenas na região de fita dupla de um RNA ou pode apenas ocorrer em uma região de fita única 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 uma fita, ou pode ocorrer em regiões de fita dupla e fita única, particularmente nos terminais. A extremidade ou extremidades 5' podem estar fosforiladas.

[00217] Pode ser possível, por exemplo, intensificar a estabilidade, incluir bases particulares em saliências, ou incluir nucleotídeos modificados ou suplentes de nucleotídeos, em saliências de fita única, por exemplo, em uma saliência 3' ou 5', ou em ambas. Por exemplo pode ser desejável incluir nucleotídeos de purina em saliências. Em algumas modalidades, todas as ou algumas das bases em uma saliência 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 deoxirribonucleotídeos, 2'-deoxi-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 saliências não necessitam de ser homólogas com a sequência alvo.

[00218] Em uma modalidade, cada resíduo da fita senso e fita antissenso está independentemente modificado com LNA, HNA, CeNA, 2'-metoxietila, 2'-O-metila, 2'-O-alila, 2'-C-alila, 2'-deoxi, 2'-hidroxila, ou 2'-flúor. As fitas podem conter mais do que uma modificação. Em uma modalidade, cada resíduo da fita senso e fita antissenso está independentemente modificado com 2'-O-metila ou 2'-flúor.

[00219] Pelo menos duas modificações diferentes estão tipicamente presentes na fita senso e fita antissenso. Essas duas modificações podem ser as modificações de 2'-O-metila ou 2'-flúor, ou outras.

[00220] 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 uma fita. 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 e C representarem cada um um tipo de modificação ao nucleotídeo, o motivo alternado pode ser "ABABABABABAB...", "AABBAABBAABB...", "AABAABAABAAB...", "AAABAAABAAAB...", "AAABBBAAABBB...", ou "ABCABCABCABC...", *etc.*

[00221] 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, *i.e.*, modificações em todos os outros nucleotídeos, pode ser o mesmo, mas cada uma da fita senso ou fita antissenso pode ser selecionada de várias possibilidades de modificações dentro do motivo alternado tal como "ABABAB...", "ACACAC...", "BDBDBD..." ou "CDCDCD...", *etc.*

[00222] Em uma modalidade, o agente de RNAi da invenção compreende o padrão de modificação para o motivo alternado na fita senso em relação ao padrão de modificação para o motivo alternado na fita antissenso é trocado. A troca pode ser tal que o grupo modificado de nucleotídeos da fita senso corresponda a um grupo de nucleotídeos diferentemente modificado da fita antissenso e *vice versa*. Por exemplo, a fita senso, quando emparelhada com a fita antissenso no dúplex de dsRNA, o motivo alternado na fita senso pode começar com "ABABAB" a partir de 5'-3' da fita e o motivo alternado na fita antissenso pode começar com "BABABA" a partir de 5'-3' da fita dentro da região de dúplex. Como outro exemplo, o motivo alternado na fita senso pode começar com "AABBAABB" a partir de 5'-3' da fita e o motivo alternado na fita antissenso pode começar com "BBAABBAA" a partir de 5'-3' da fita dentro da região de dúplex, tal que existe uma troca completa ou parcial dos padrões de modificação entre a fita senso e a fita antissenso.

[00223] Em uma modalidade, o agente de RNAi compreende o padrão do motivo alternado de modificação de 2'-O-metila e modificação de 2'-F na fita senso tem uma troca em relação ao padrão do motivo alternado de modificação de 2'-O-metila e modificação de 2'-F na fita antissenso inicialmente, *i.e.*, o nucleotídeo modificado com 2'-O-metila na fita senso emparelhada em termos de base com um nucleotídeo modificado com 2'-F na fita antissenso e *vice versa*. A posição 1 da fita senso pode começar com a modificação de 2'-F, e a posição 1 da fita antissenso pode começar com a modificação de 2'-O-metila.

[00224] A introdução de um ou mais motivos de três modificações idênticas em três nucleotídeos consecutivos na fita senso e/ou fita antissenso interrompe o padrão de modificação inicial presente na fita senso e/ou fita antissenso. Esta interrupção do padrão de modificação das fitas senso e/ou antissenso por introdução de um ou mais motivos de três modificações idênticas em três nucleotídeos consecutivos nas fitas senso e/ou antissenso intensifica surpreendentemente a atividade de silenciamento de gene do gene alvo.

[00225] Em uma modalidade, quando o motivo de três modificações idênticas em três nucleotídeos consecutivos é introduzido em qualquer uma das fitas, 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 do que a 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.

[00226] O agente de RNAi pode adicionalmente compreender pelo menos uma ligação internucleotídica de fosforotioato ou metilfosfonato.

A modificação de ligação internucleotídica de fosforotioato ou metilfosfonato pode ocorrer em qualquer nucleotídeo da fita senso ou fita antissenso ou ambas as fitas em qualquer posição da fita. Por exemplo, a modificação de ligação internucleotídica pode ocorrer em todos os nucleotídeos da fita senso e/ou fita antissenso; cada modificação de ligação internucleotídica pode ocorrer em um padrão alternado na fita senso e/ou fita antissenso; ou a fita senso ou fita antissenso pode conter ambas as modificações de ligação internucleotídica em um padrão alternado. O padrão alternado da modificação de ligação internucleotídica na fita senso pode ser o mesmo ou diferente da fita antissenso, e o padrão alternado da modificação de ligação internucleotídica na fita senso pode ter uma troca em relação ao padrão alternado da modificação de ligação internucleotídica na fita antissenso.

[00227] Em uma modalidade, o RNAi compreende uma modificação de ligação internucleotídica de fosforotioato ou metilfosfonato na região de saliência. Por exemplo, a região de saliência pode conter dois nucleotídeos tendo uma ligação internucleotídica de fosforotioato ou metilfosfonato entre os dois nucleotídeos. As modificações de ligação internucleotídica podem ser também feitas para ligar os nucleotídeos da saliência aos nucleotídeos emparelhados terminais dentro da região de dúplex. Por exemplo, pelo menos 2, 3, 4, ou todos os nucleotídeos da saliência podem estar ligados através de ligação internucleotídica de fosforotioato ou metilfosfonato, e, opcionalmente, podem existir ligações de internucleotídeos de fosforotioato ou metilfosfonato adicionais ligando o nucleotídeo da saliência a um nucleotídeo emparelhado que esteja próximo do nucleotídeo da saliência. 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 saliência, e o terceiro é um nucleotídeo emparelhado

próximo do nucleotídeo da saliência. Estes três nucleotídeos terminais podem estar na extremidade 3' da fita antissenso, na extremidade 3' da fita senso, da extremidade 5' da fita antissenso, e/ou na extremidade 5' da fita antissenso.

[00228] Em uma modalidade, a saliência de 2 nucleotídeos está na extremidade 3' da fita antissenso, e existem duas ligações internucleotídicas de fosforotioato entre os três nucleotídeos terminais, em que dois dos três nucleotídeos são os nucleotídeos da saliência, e o terceiro nucleotídeo é um nucleotídeo emparelhado próximo do nucleotídeo da saliência. Opcionalmente, o agente de RNAi pode adicionalmente ter duas ligações internucleotídicas de fosforotioato entre os três nucleotídeos terminais tanto na extremidade 5' da fita senso como na extremidade 5' da fita antissenso.

[00229] Em uma modalidade, o agente de RNAi compreende não correspondência(s) com o alvo, dentro do dúplex, ou suas combinações. A não correspondência pode ocorrer na região de saliência 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 não correspondências, 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.

[00230] 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' da fita 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 da fita antissenso na extremidade 5' do dúplex.

[00231] Em uma modalidade, o nucleotídeo na posição 1 dentro da região de dúplex a partir da extremidade 5' na fita antissenso é selecionado do grupo consistindo 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' da fita antissenso é um par de bases AU. Por exemplo, o primeiro par de bases dentro da região de dúplex a partir da extremidade 5' da fita antissenso é um par de bases AU.

[00232] Em uma modalidade, a sequência da fita senso pode ser representada pela fórmula (I):



[00233] em que:

[00234] i e j são cada um independentemente 0 ou 1;

[00235] p e q são cada um independentemente 0-6;

[00236] cada N_a representa independentemente uma sequência de oligonucleotídeos compreendendo 0-25 nucleotídeos modificados, compreendendo cada sequência pelo menos dois nucleotídeos diferentemente modificados;

[00237] cada N_b representa independentemente uma sequência de oligonucleotídeos compreendendo 0-10 nucleotídeos modificados;

[00238] cada n_p e n_q representa independentemente um nucleotídeo da saliência;

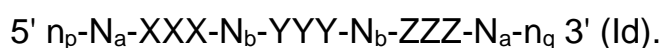
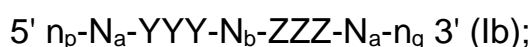
[00239] em que N_b e Y não têm a mesma modificação; e

[00240] XXX, YYY e ZZZ representam cada um independentemente um motivo de três modificações idênticas em três nucleotídeos consecutivos. Preferencialmente, YYY é nucleotídeos todos modificados com 2'-F.

[00241] Em uma modalidade, o N_a e/ou N_b compreendem modificações de padrão alternado.

[00242] Em uma modalidade, o motivo YYY ocorre no ou próximo do sítio de clivagem da fita 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 sítio 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) da fita 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'.

[00243] 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. A fita senso pode ser portanto representada pelas seguintes fórmulas:



[00244] Quando a fita senso é representada 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.

[00245] Quando a fita senso é representada como fórmula (Ic), 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.

[00246] Quando a fita senso é representada como fórmula (Id), cada N_b representa independentemente 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.

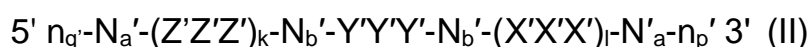
[00247] Cada um de X, Y e Z pode ser o mesmo ou diferente uns dos outros.

[00248] Em outras modalidades, i é 0 e j é 0, e a fita senso pode ser representada pela fórmula:



[00249] Quando a fita senso é representada pela fórmula (Ia), cada N_a pode representar independentemente uma sequência de oligonucleotídeos compreendendo 2-20, 2-15, ou 2-10 nucleotídeos modificados.

[00250] Em uma modalidade, a sequência da fita antissenso do RNAi pode ser representada pela fórmula (II):



[00251] em que:

[00252] k e l são cada um independentemente 0 ou 1;

[00253] p' e q' são cada um independentemente 0-6;

[00254] cada N_a' representa independentemente uma sequência de oligonucleotídeos compreendendo 0-25 nucleotídeos modificados, compreendendo cada sequência pelo menos dois nucleotídeos diferentemente modificados;

[00255] cada N_b' representa independentemente uma sequência de oligonucleotídeos compreendendo 0-10 nucleotídeos modificados;

[00256] cada n_p' e n_q' representa independentemente um nucleotídeo da saliência;

[00257] em que N_b' e Y' não têm a mesma modificação;

[00258] e

[00259] $X'X'X'$, $Y'Y'Y'$ e $Z'Z'Z'$ representam cada um independentemente um motivo de três modificações idênticas em três nucleotídeos consecutivos.

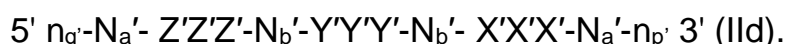
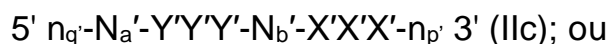
[00260] Em uma modalidade, o N_a' e/ou N_b' compreendem modificações de padrão alternado.

[00261] O motivo $Y'Y'Y'$ ocorre no ou próximo do sítio de clivagem da fita antissenso. Por exemplo, quando o agente de RNAi tem uma região de dúplice 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 da fita 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 dúplice, a partir da extremidade 5'. Preferencialmente, o motivo $Y'Y'Y'$ ocorre nas posições 11, 12, 13.

[00262] Em uma modalidade, o motivo $Y'Y'Y'$ é todos os nucleotídeos modificados com 2'-OMe.

[00263] 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.

[00264] A fita antissenso pode ser portanto, representada pelas seguintes fórmulas:

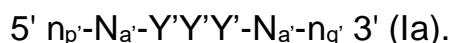


[00265] Quando a fita antissenso é representada pela fórmula (IIb), N_b' representa uma sequência de oligonucleotídeos compreendendo 0-10, 0-7, 0-5, 0-4, 0-2 ou 0 nucleotídeos modificados. Cada N_a' pode representar independentemente uma sequência de oligonucleotídeos compreendendo 2-20, 2-15, ou 2-10 nucleotídeos modificados.

[00266] Quando a fita antissenso é representada como fórmula (IIc), 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.

[00267] Quando a fita antissenso é representada como fórmula (IIId), cada N_b' representa independentemente 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. Preferencialmente, N_b é 0, 1, 2, 3, 4, 5 ou 6.

[00268] Em outras modalidades, k é 0 e l é 0 e a fita antissenso pode ser representada pela fórmula:



[00269] Quando a fita antissenso é representada como fórmula (IIa), cada N_a' representa independentemente uma sequência de oligonucleotídeos compreendendo 2-20, 2-15, ou 2-10 nucleotídeos modificados.

[00270] Cada um de X' , Y' e Z' pode ser o mesmo ou diferente uns dos outros.

[00271] Cada nucleotídeo da fita senso e fita antissenso pode estar independentemente modificado com LNA, HNA, CeNA, 2'-metoxietila, 2'-O-metila, 2'-O-alila, 2'-C-alila, 2'-hidroxila, ou 2'-flúor. Por exemplo, cada nucleotídeo da fita senso e fita 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.

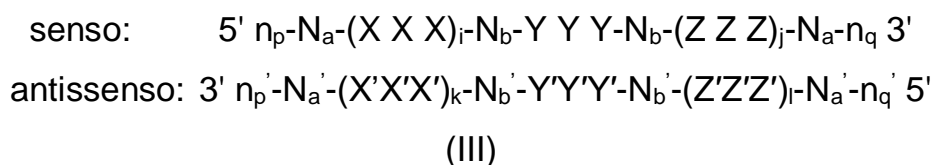
[00272] Em uma modalidade, a fita senso do agente de RNAi pode conter o motivo YYY ocorrendo a 9, 10 e 11 posições da fita quando a

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. A fita 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.

[00273] Em uma modalidade, a fita antissenso pode conter o motivo Y'Y'Y' ocorrendo a 11, 12, 13 posições da fita, 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. A fita 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.

[00274] A fita senso representada por qualquer uma das fórmulas (Ia), (Ib), (Ic), e (Id) acima forma um dúplex com uma fita antissenso sendo representada por qualquer uma das fórmulas (IIa), (IIb), (IIc), e (IId), respectivamente.

[00275] Portanto, os agentes de RNAi para uso nos métodos da invenção podem compreender uma fita senso e uma fita antissenso, tendo cada fita 14 a 30 nucleotídeos, o dúplex de RNAi representado pela fórmula (III):

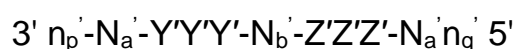
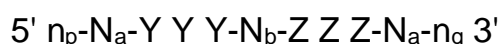


[00276] em que:

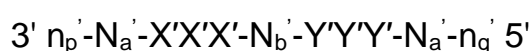
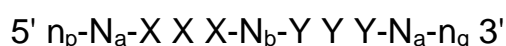
- [00277] i, j, k, e l são cada um independentemente 0 ou 1;
- [00278] p, p', q, e q' são cada um independentemente 0-6;
- [00279] cada N_a e N_a' representa independentemente uma sequência de oligonucleotídeos compreendendo 0-25 nucleotídeos modificados, compreendendo cada sequência pelo menos dois nucleotídeos diferentemente modificados;
- [00280] cada N_b e N_b' representa independentemente uma sequência de oligonucleotídeos compreendendo 0-10 nucleotídeos modificados;
- [00281] em que
- [00282] cada n_p', n_p, n_q', e n_q, cada um dos quais pode ou não estar presente, representa independentemente um nucleotídeo da saliência;
- e
- [00283] 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.
- [00284] 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.
- [00285] Combinações exemplares da fita senso e fita antissenso formando um dúplex de RNAi incluem as fórmulas em baixo:



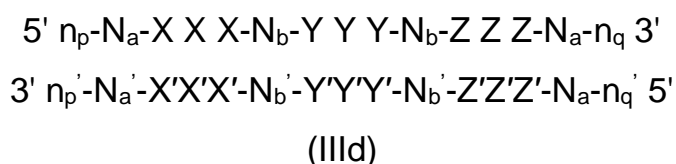
(IIIa)



(IIIb)



(IIIc)



[00286] 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.

[00287] 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.

[00288] 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, 0-5, 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.

[00289] Quando o agente de RNAi é representado como fórmula (III d), cada N_b , N_b' representa independentemente uma sequência de oligonucleotídeos compreendendo 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.

[00290] Cada um de X, Y e Z nas fórmulas (III), (IIIa), (IIIb), (IIIc), e (III d) pode ser o mesmo ou diferentes uns dos outros.

[00291] Quando o agente de RNAi é representado pelas fórmulas (III), (IIIa), (IIIb), (IIIc), e (III d), 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'.

[00292] 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'.

[00293] 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'.

[00294] 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'.

[00295] Em uma modalidade, quando o agente de RNAi é representado pela fórmula (IIId), as modificações de Na 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 Na são modificações de 2'-O-metila ou 2'-flúor e $np' > 0$ e pelo menos um np' 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 Na são modificações de 2'-O-metila ou 2'-flúor, $np' > 0$ e pelo menos um np' está ligado a um nucleotídeo da vizinhança através de ligação de

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

[00296] Em uma modalidade, quando o agente de RNAi é representado pela fórmula (IIIa), as modificações de Na são modificações de 2'-O-metila ou 2'-flúor, $np' > 0$ e pelo menos um np' está ligado a um nucleotídeo da vizinhança através de ligação de fosforotioato, a fita senso compreende pelo menos uma ligação de fosforotioato, e a fita senso está conjugada com um ou mais derivados de GalNAc anexados através de um ligante ramificado bivalente ou trivalente.

[00297] 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 se dirigir ao mesmo gene ou dois genes diferentes; ou cada um dos dúplexes pode se dirigir ao mesmo gene em dois locais alvo diferentes.

[00298] 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 se dirigir ao mesmo gene ou dois genes diferentes; ou cada um dos dúplexes pode se dirigir ao mesmo gene em dois locais alvo diferentes.

[00299] 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.

[00300] 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.

[00301] 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 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 carreador 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 referida aqui como uma subunidade de modificação de substituição de ribose (RRMS). Um carreador cíclico pode ser um sistema em anel carbocíclico, *i.e.*, todos os átomos no anel são átomos de carbono, ou um sistema em anel heterocíclico, *i.e.*, um ou mais átomos no anel podem ser um

heteroátomo, por exemplo, nitrogénio, oxigênio, enxofre. O carreador cíclico pode ser um sistema em anel monocíclico, ou pode conter dois ou mais anéis, por exemplo, anéis fundidos. O carreador cíclico pode ser um sistema em anel completamente saturado, ou pode conter uma ou mais ligações duplas.

[00302] O ligante pode estar anexado ao polinucleotídeo através de um carreador. Os carreadores 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 em 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 carreador na estrutura principal, por exemplo, estrutura principal contendo fosfato, ou fosfato modificado, por exemplo, enxofre, de um ácido ribonucleico. Um "ponto de anexação em corrente" (TAP) em algumas modalidades se refere a um átomo no anel constituinte do carreador 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 de intervenção ao carreador cíclico. Assim, o carreador cíclico incluirá frequentemente um grupo funcional, por exemplo, um grupo amino, ou, geralmente, proporcionará uma ligação, que é adequada para incorporação ou ligação por corrente de outra entidade química, por exemplo, um ligante ao anel constituinte.

[00303] Os agentes de RNAi podem estar conjugados com um ligante através de um carreador, em que o carreador pode ser grupo cíclico ou grupo acíclico; preferencialmente, o grupo cíclico é

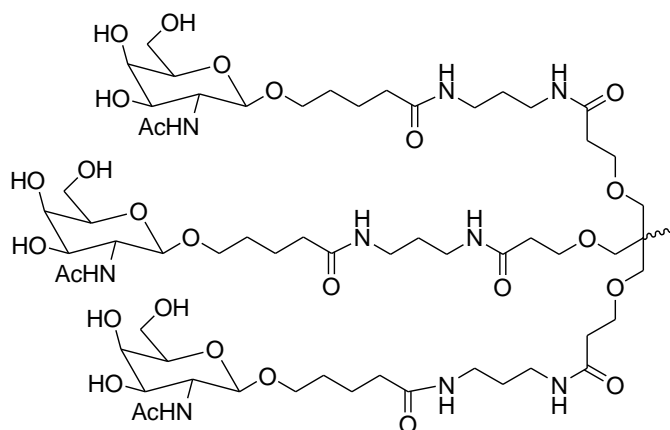
selecionado de pirrolidinila, pirazolinila, pirazolidinila, imidazolinila, imidazolidinila, piperidinila, piperazinila, [1,3]dioxolano, oxazolidinila, isoxazolidinila, morfolinila, tiazolidinila, isotiazolidinila, quinoxalinila, piridazinonila, tetraidrofurila e decalina; preferencialmente, o grupo acíclico é selecionado de estrutura principal de serinol ou estrutura principal de dietanolamina.

[00304] Em certas modalidades específicas, o agente de RNAi para uso nos métodos da invenção é um agente selecionado do grupo de agentes listados na Tabela 1 e Tabela 2.

[00305] Estes agentes podem adicionalmente compreender um ligante.

A. Ligantes

[00306] Os agentes de RNA de fita dupla (dsRNA) da invenção podem estar opcionalmente conjugados com um ou mais ligantes. O ligante pode estar anexado à fita senso, fita antissenso ou ambas as fitas, na extremidade 3', extremidade 5' ou ambas as extremidades. Por exemplo, o ligante pode estar conjugado com a fita senso. Em modalidades preferenciais, o ligante está conjugado com a extremidade 3' da fita senso. Em uma modalidade preferencial, o ligante é um ligante de GalNAc. Em modalidades particularmente preferenciais, o ligante GalNAc₃:



[00307] Em algumas modalidades, o ligante, por exemplo, ligante de GalNAc, está anexado à extremidade 3' do agente de RNAi. Em uma

ao pH endossomal. A conformação "ativa" é aquela conformação na qual o ligante endossomolítico promove a lise do endossoma e/ou transporte da composição da invenção, ou seus componentes, do endossoma para o citoplasma da célula. Ligantes endossomolíticos exemplares incluem o peptídeo GALA (Subbarao *et al.*, *Biochemistry*, 1987, 26: 2964-2972), o peptídeo EALA (Vogel *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 1996, 118: 1581-1586), e seus derivados (Turk *et al.*, *Biochem. Biophys. Acta*, 2002, 1559: 56-68). Em uma modalidade, o componente endossomolítico pode conter um grupo químico (por exemplo, um aminoácido) que sofrerá uma mudança na carga ou protonação em resposta a uma mudança no pH. O componente endossomolítico pode ser linear ou ramificado.

[00312] Os ligantes podem melhorar o transporte, hibridação, e propriedades de especificidade e podem também melhorar a resistência a nucleases do oligorribonucleotídeo natural ou modificado resultante, ou uma molécula polimérica compreendendo qualquer combinação de monômeros descritos aqui e/ou ribonucleotídeos naturais ou modificados.

[00313] Os ligantes podem incluir em geral modificadores terapêuticos, por exemplo, para intensificação da captação; compostos de diagnóstico ou grupos repórter, por exemplo, para monitorização da distribuição; agentes de reticulação; e frações de conferição de resistência a nucleases. Exemplos gerais incluem lipídeos, esteroides, vitaminas, açúcares, proteínas, peptídeos, poliaminas, e mímicos de peptídeos.

[00314] 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); um carboidrato (por exemplo, uma dextrana, pululana, quitina, quitosana, inulina, ciclodextrina 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, um oligonucleotídeo (por exemplo, um aptâmero). 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.

[00315] Os ligantes podem também incluir grupos de direcionamento, por exemplo, um agente de direcionamento de células ou tecidos, por exemplo, uma lectina, glicoproteína, lipídeo ou proteína, por exemplo, um anticorpo, que se liga a um tipo especificado de células tal como uma célula dos rins. Um grupo de direcionamento pode ser uma tirotropina, melanotropina, lectina, glicoproteína, proteína tensioativa A, Carboidrato de mucina, lactose multivalente, galactose multivalente, N-acetil-galactosamina, N-acetil-gulucosamina, 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, um peptídeo RGD, um mimético de peptídeo RGD ou um aptâmero.

[00316] 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, diidrofenazina), endonucleases artificiais ou um quelante (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 peptídeos (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, agregados de imidazol, conjugados acridina-imidazol, complexos de Eu³⁺ de tetraazamacrociclos), dinitrofenila, HRP, ou AP.

[00317] Os ligantes podem ser proteínas, por exemplo, glicoproteínas, ou peptídeos, por exemplo, moléculas tendo uma afinidade específica para um coligando, ou anticorpos, por exemplo, um anticorpo que se liga a um tipo especificado de células tal como uma célula cancerígena, célula endotelial, ou célula dos ossos. Os ligantes podem também 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, fucose multivalente, ou aptâmeros. O ligante pode ser, por exemplo, um lipopolissacarídeo, um ativador de p38 MAP cinase, ou um ativador de NF-κB.

[00318] O ligante pode ser uma substância, por exemplo, um fármaco, que pode aumentar a captação do agente de RNAi para a célula, por exemplo, por ruptura do citoesqueleto da célula, por exemplo, por ruptura dos microtúbulos, microfilamentos, e/ou filamentos intermédios da célula. O fármaco pode ser, por exemplo, taxon, vincristina, vimblastina, citocalasina, nocodazol, japlaquinolida, latrunculina A, faloidina, swinholida A, indanocina ou mioservina.

[00319] O ligante pode aumentar a captação do oligonucleotídeo para a célula por, por exemplo, ativação de uma resposta inflamatória. Ligantes exemplares que teriam um tal efeito incluem fator da necrose tumoral alfa (TNFalfa), interleucina-1 beta, ou interferon gama.

[00320] Em um aspecto, o ligante é um lipídeo ou molécula à base de lipídeos. 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.

[00321] Um ligante à base de lipídeos pode ser usado para modular, por exemplo, controlar a ligação do conjugado a um tecido alvo. Por exemplo é menos provável que um ligante de lipídeo ou à base de lipídeos que se liga à HSA mais fortemente seja dirigido para o rim e portanto, 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 para o rim.

[00322] 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 em 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.

[00323] 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.

[00324] Em outro aspecto, o ligante é uma fração, por exemplo, uma vitamina, que é absorvida por uma célula alvo, por exemplo, uma célula em proliferação. Estes são particularmente úteis para tratamento de distúrbios caracterizados por proliferação celular indesejada, por exemplo, do tipo maligno ou não maligno, por exemplo, células cancerígenas. Vitaminas exemplares incluem vitamina A, E, e K. Outras vitaminas exemplares incluem vitaminas B, por exemplo, ácido fólico, B12, riboflavina, biotina, piridoxal ou outras vitaminas ou nutrientes absorvidos por células cancerígenas. São também incluídos HAS, lipoproteína de baixa densidade (LDL) e lipoproteína de elevada densidade (HDL).

[00325] 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 exemplar é um peptídeo tal como tat ou de *antennopedia*. Se o agente for um peptídeo pode estar modificado, incluindo um mimético de peptídila, 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.

[00326] O ligante pode ser um peptídeo ou peptideomimético. Um peptideomimético (também referido aqui como oligopeptideomimético) é uma molécula capaz de se dobrar em uma estrutura tridimensional definida similar a um peptídeo natural. A fração de peptídeo ou peptideomimético pode ter cerca de 5-50 aminoácidos em comprimento, por exemplo, cerca de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, ou 50 aminoácidos em comprimento. Um peptídeo ou peptideomimético pode ser, por exemplo, um peptídeo de permeação de células, peptídeo catiônico, peptídeo anfipático, ou peptídeo hidrofóbico (por exemplo, consistindo principalmente em 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: 1). Um análogo de RFGF (por exemplo, sequência de aminoácidos AALLPVLLAAP (SEQ ID NO: 2)) contendo uma MTS hidrofóbica pode ser também uma fração de direcionamento. A fração de peptídeo pode ser um peptídeo de "distribuição", 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: 3)) e da proteína *Antennapedia* de *Drosophila* (RQIKIWFQNRRMKWKK (SEQ ID NO: 4)) são capazes de funcionar como peptídeos de distribuição. Um peptídeo ou peptideomimético 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).

Preferencialmente, o peptídeo ou peptideomimético preso a um agente de RNAi através de uma unidade de monômero incorporada é um peptídeo de direcionamento de células tal como um peptídeo de arginina-glicina-ácido aspártico (RGD), ou mímico 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. Qualquer uma das modificações estruturais descrita em baixo pode ser utilizada. Uma fração de peptídeo de RGD pode ser usada para se dirigir a uma célula tumoral, tal como uma célula tumoral endotelial ou uma célula tumoral cancerígena da mama (Zitzmann *et al.*, *Cancer Res.*, 62:5139-43, 2002). Um peptídeo de RGD pode facilitar o direcionamento de um agente de RNAi a tumores de uma variedade de outros tecidos, incluindo o pulmão, rim, baço ou fígado (Aoki *et al.*, *Cancer Gene Therapy* 8:783-787, 2001). Preferencialmente, o peptídeo de RGD facilitará o direcionamento de um agente de RNAi ao rim. O peptídeo de RGD pode ser linear ou cíclico, e pode estar modificado, por exemplo, glicosilado ou metilado para facilitar direcionamento a tecidos específicos. Por exemplo, um peptídeo de RGD glicosilado pode distribuir um agente de RNAi a uma célula tumoral expressando $\alpha V\beta 3$ (Haubner *et al.*, *Jour. Nucl. Med.*, 42:326-336, 2001). Peptídeos que se digirem a marcadores enriquecidos em células em proliferação podem ser usados. Por exemplo, peptídeos contendo RGD e peptideomiméticos podem se dirigir a células cancerígenas, em particular células que exibem uma integrina. Assim se poderiam usar peptídeos de RGD, peptídeos cíclicos contendo RGD, peptídeos de RGD que incluem D-aminoácidos, bem como mímicos de RGD sintéticos. Adicionalmente a RGD se podem usar outras frações que se dirigem ao ligante de integrina. Geralmente, tais ligantes podem ser usados para controlar células em proliferação e

angiogênese. Conjugados preferenciais deste tipo de ligante se dirigem a PECAM-1, VEGF, ou outro gene cancerígeno, por exemplo, um gene cancerígeno descrito aqui.

[00327] Um "peptídeo de permeação de células" é capaz de permear uma célula, por exemplo, uma célula microbiana, tal como uma célula bacteriana ou fúngica, ou uma célula de mamífero, tal como uma célula de humano. 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 apenas 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).

[00328] Em uma modalidade, um peptídeo de direcionamento pode ser um peptídeo α -helicoidal anfipático. Péptidos α -helicoidais exemplares incluem, mas não estão limitados a cecropinas, licotoxinas, paradaxinas, buforina, CPF, peptídeo tipo bombinina (BLP), catelicidinas, ceratotoxinas, peptídeos de *S. clava*, peptídeos antimicrobianos intestinais da enguia-de-casulo (HFIAPs), magaininas, brevininas-2, dermaseptinas, melitinas, pleurocidina, peptídeos H2A, peptídeos de *Xenopus*, esculentinas-1, e caerinas. Um número de fatores será preferencialmente considerado para se manter a integridade da estabilidade da hélice. Por exemplo pode ser utilizado um número máximo de resíduos de estabilização da hélice (por exemplo, Leu, Ala ou Lys), e será utilizado um número mínimo resíduos de desestabilização da hélice (por exemplo, prolina, ou unidades

monoméricas cíclicas). O resíduo de *capping* será considerado (por exemplo, Gly é um resíduo *N-capping* exemplar) e/ou pode ser usada aminação C-terminal para proporcionar uma ligação de H extra para estabilizar a hélice. A formação de pontes de sal entre resíduos com cargas opostas, separadas por $i \pm 3$, ou $i \pm 4$ posições, pode proporcionar estabilidade. Por exemplo, resíduos catiônicos tais como lisina, arginina, homo-arginina, ornitina ou histidina podem formar pontes de sal com os resíduos aniônicos glutamato ou aspartato.

[00329] Os ligantes de peptídeo ou peptideomiméticos incluem aqueles tendo peptídeos ocorrendo naturalmente ou modificados, por exemplo, peptídeos D ou L; peptídeos α , β ou γ ; peptídeos de N-metila; azapeptídeos; peptídeos tendo uma ou mais amidas, *i.e.*, peptídeo, ligações substituídas por uma ou mais ureias, tioureias, carbamatos, ou ligações de ureia de sulfonila; ou peptídeos cíclicos.

[00330] O ligante de direcionamento pode ser qualquer ligante que seja capaz de se dirigir a um receptor específico. Exemplos são: folato, GalNAc, galactose, manose, manose-6P, agregados de açúcares tais como agregado de GalNAc, agregado de manose, agregado de galactose, ou um aptâmero. Um agregado é uma combinação de duas ou mais unidades de açúcar. Os ligantes de direcionamento incluem também ligados do receptor da integrina, ligantes do receptor da Quimiocina, transferrina, biotina, ligantes do receptor da serotonina, PSMA, endotelina, GCPII, somatostatina, ligantes de LDL e HDL. Os ligantes podem ser também baseados em ácido nucleico, por exemplo, um aptâmero. O aptâmero pode estar não modificado ou ter qualquer combinação de modificações divulgadas aqui.

[00331] Agentes de liberação endossomal incluem imidazóis, poli ou oligoimidazóis, PEIs, peptídeos, peptídeos fusogênicos, policarboxilatos, policátions, oligo ou policátions ou ânions mascarados, acetais, poliacetais, cetais/policetals, ortoésteres, polímeros com cargas

catiônicas ou aniônicas mascaradas ou não mascaradas, dendrímeros com cargas catiônicas ou aniônicas mascaradas ou não mascaradas.

[00332] Modulador PK significa modulador farmacocinético. Moduladores PK incluem lipófilos, ácidos biliares, esteroides, análogos de fosfolipídeos, peptídeos, agentes de ligação a proteínas, PEG, vitaminas, *etc.* Moduladores PK exemplares incluem, mas não estão limitados a, colesterol, ácidos graxos, ácido cólico, ácido litocólico, dialquilglicerídeos, diacilglicerídeo, fosfolipídeos, esfingolipídeos, 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, assim, oligonucleotídeos curtos, por exemplo, oligonucleotídeos com cerca de 5 bases, 10 bases, 15 bases ou 20 bases, compreendendo múltiplas ligações de fosforotioato na estrutura principal podem ser também utilizados na presente invenção como ligantes (por exemplo, como ligantes de modulação PK).

[00333] Adicionalmente, aptâmeros que se ligam a componentes do soro (por exemplo, proteínas do soro) são também utilizados na presente invenção como ligantes de modulação PK.

[00334] Outros conjugados de ligante utilizados na invenção são descritos nos Pedidos de Patentes dos E.U.A. USSN: 10/916,185, depositado a 10 de agosto, 2004; USSN: 10/946,873, depositado a 21 de setembro, 2004; USSN: 10/833,934, depositado a 3 de agosto, 2007; USSN: 11/115,989, depositado a 27 de abril, 2005 e USSN: 11/944,227 depositado a 21 de novembro, 2007, que são incorporados por referência nas suas totalidades para todos os propósitos.

[00335] Quando dois ou mais ligantes estão presentes, os ligantes podem ter todos as mesmas propriedades, todos têm diferentes propriedades ou ligantes têm as mesmas propriedades enquanto outros têm diferentes propriedades. Por exemplo, um ligante pode ter

propriedades de direcionamento, ter atividade endossomolítica ou ter propriedades de modulação PK. Em uma modalidade preferencial, todos os ligantes têm propriedades diferentes.

[00336] Os ligantes podem estar acoplados aos oligonucleotídeos em vários locais, por exemplo, extremidade 3', extremidade 5', e/ou em uma posição interna. Em modalidades preferenciais, o ligante está anexado aos oligonucleotídeos através de uma corrente de intervenção, por exemplo, um carreador descrito aqui. O ligante ou ligante preso pode estar presente em um monômero quando o monômero está incorporado na fita em crescimento. Em algumas modalidades, o ligante pode estar incorporado através de acoplamento a um monômero "precursor" após o monômero "precursor" ter sido incorporado na fita em crescimento. Por exemplo, um monômero tendo, por exemplo, uma corrente com terminação amino (*i.e.*, não tendo nenhum ligante associado), por exemplo, TAP-(CH₂)_nNH₂ pode estar incorporado em uma fita de oligonucleotídeo em crescimento. Em uma operação subsequente, *i.e.*, após incorporação do monômero precursor na fita, um ligante tendo um grupo eletrofílico, por exemplo, um grupo éster de pentafluorofenila ou aldeído, pode ser subsequentemente anexado ao monômero precursor por acoplamento do grupo eletrofílico do ligante com o grupo nucleofílico terminal da corrente do monômero precursor.

[00337] Em outro exemplo, um monômero tendo um grupo químico adequado para tomar parte em reação de Química *Click* pode ser incorporado, por exemplo, uma corrente/ligante com terminação de azida ou alquino. Em uma operação subsequente, *i.e.*, após incorporação do monômero precursor na fita, um ligante tendo grupo químico complementar, por exemplo, um alquino ou azida pode ser anexado ao monômero precursor por acoplamento do alquino e da azida em conjunto.

[00338] Para oligonucleotídeos de fita dupla, os ligantes podem ser

anexados a uma das ou ambas as fitas. Em algumas modalidades, um agente de RNAi de fita dupla contém um ligante conjugado com a fita senso. Em outras modalidades, um agente de RNAi de fita dupla contém um ligante conjugado com a fita antissenso.

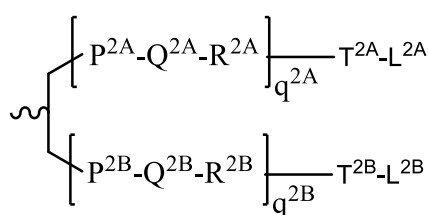
[00339] Em algumas modalidades, o ligante pode estar conjugado com nucleobases, frações de açúcar, ou ligações internucleosídicas de moléculas de ácido nucleico. A conjugação com nucleobases de purina ou seus derivados pode ocorrer em qualquer posição, incluindo átomos endocíclicos e exocíclicos. Em algumas modalidades, as posições 2, 6, 7, ou 8 de uma nucleobase de purina estão anexadas a uma fração do conjugado. A conjugação com nucleobases de pirimidina ou seus derivados pode também ocorrer em qualquer posição. Em algumas modalidades, as posições 2, 5, e 6 de uma nucleobase de purimidina podem estar substituídas por uma fração do conjugado. A conjugação com frações de açúcar de nucleosídeos pode ocorrer em qualquer átomo de carbono. Átomos de carbono exemplares de uma fração de açúcar que pode ser anexada a uma fração do conjugado incluem os átomos de carbono 2', 3', e 5'. A posição 1' pode estar também anexada a uma fração do conjugado, tal como em um resíduo abásico. As ligações internucleosídicas podem também carregar frações do conjugado. Para ligações contendo fósforo (por exemplo, fosfodiéster, fosforotioato, fosforoditiotato, fosforoamidato e similares), a fração do conjugado pode estar anexada diretamente ao átomo de fósforo ou a um átomo de O, N, ou S ligado ao átomo de fósforo. Para ligações internucleosídicas contendo amida ou amida (por exemplo, PNA), a fração do conjugado pode estar anexada ao átomo de nitrogênio da amina ou amida ou a um átomo de carbono adjacente.

[00340] Qualquer ligante adequado na área de interferência de RNA pode ser usado, embora o ligante seja tipicamente um carboidrato, por exemplo, monossacarídeo (tal como GalNac), dissacarídeo,

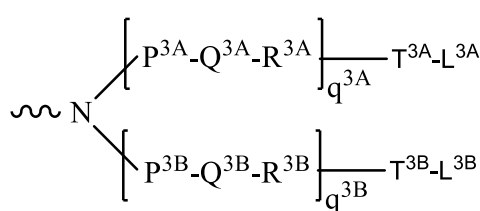
trissacarídeo, tetrassacarídeo, polissacarídeo.

[00341] Ligantes que conjugam o ligante com o ácido nucleico incluem aqueles discutidos acima. Por exemplo, o ligante pode ser um ou mais derivados de GalNAc (N-acetilglucosamina) anexados através de um ligante ramificado bivalente ou trivalente.

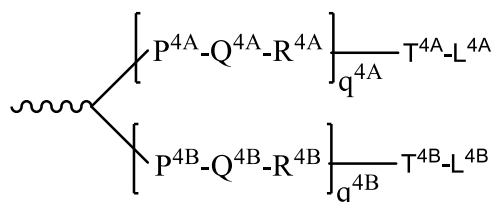
[00342] Em uma modalidade, o dsRNA da invenção está conjugado com um ligante ramificado bivalente ou trivalente inclui as estruturas mostradas em qualquer uma das fórmulas (IV) – (VII):



Formula (IV)

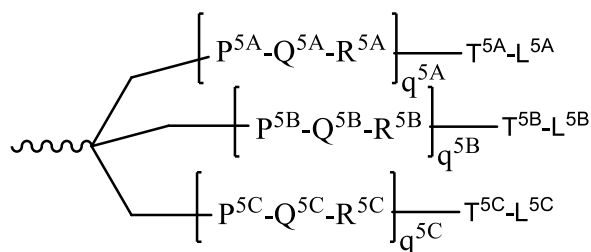


Formula (V)



Formula (VI)

,ou



Formula (VII)

;

[00343] em que:

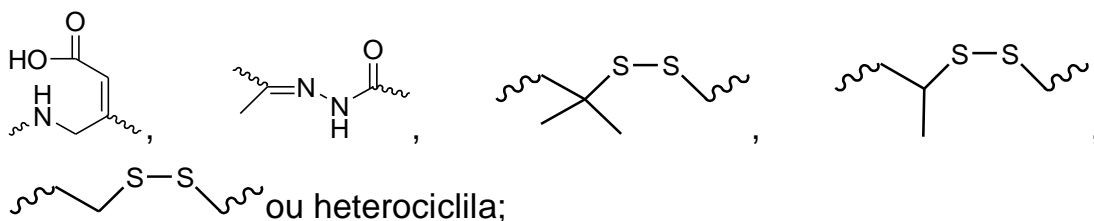
[00344] $q^{2\text{A}}$, $q^{2\text{B}}$, $q^{3\text{A}}$, $q^{3\text{B}}$, $q^{4\text{A}}$, $q^{4\text{B}}$, $q^{5\text{A}}$, $q^{5\text{B}}$ e $q^{5\text{C}}$ representam independentemente para cada ocorrência 0-20 e em que a unidade de repetição pode ser a mesma ou diferente;

[00345] $P^{2\text{A}}$, $P^{2\text{B}}$, $P^{3\text{A}}$, $P^{3\text{B}}$, $P^{4\text{A}}$, $P^{4\text{B}}$, $P^{5\text{A}}$, $P^{5\text{B}}$, $P^{5\text{C}}$, $T^{2\text{A}}$, $T^{2\text{B}}$, $T^{3\text{A}}$, $T^{3\text{B}}$, $T^{4\text{A}}$, $T^{4\text{B}}$, $T^{5\text{A}}$, $T^{5\text{B}}$, $T^{5\text{C}}$ estão cada um independentemente para cada

ocorrência ausentes, são CO, NH, O, S, OC(O), NHC(O), CH₂, CH₂NH ou CH₂O;

[00346] Q^{2A}, Q^{2B}, Q^{3A}, Q^{3B}, Q^{4A}, Q^{4B}, Q^{5A}, Q^{5B}, Q^{5C} 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);

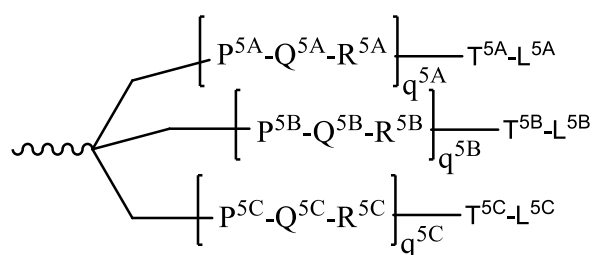
[00347] R^{2A}, R^{2B}, R^{3A}, R^{3B}, R^{4A}, R^{4B}, R^{5A}, R^{5B}, R^{5C} estão cada um independentemente para cada ocorrência ausentes, são NH, O, S, CH₂, C(O)O, C(O)NH, NHCH(R^a)C(O), -C(O)-CH(R^a)-NH-, CO, CH=N-O,



[00348] L^{2A}, L^{2B}, L^{3A}, L^{3B}, L^{4A}, L^{4B}, L^{5A}, L^{5B} e L^{5C} representam o ligante; *i.e.*, cada um independentemente para cada ocorrência um monossacarídeo (tal como GalNAc), dissacarídeo, trissacarídeo, tetrassacarídeo, oligossacarídeo ou polissacarídeo; e

[00349] R^a é H ou cadeia lateral de aminoácidos.

[00350] Derivados de GalNAc de conjugação trivalentes são particularmente úteis para uso com agentes de RNAi para inibição da expressão de um gene alvo, tal como aqueles da fórmula (VII):

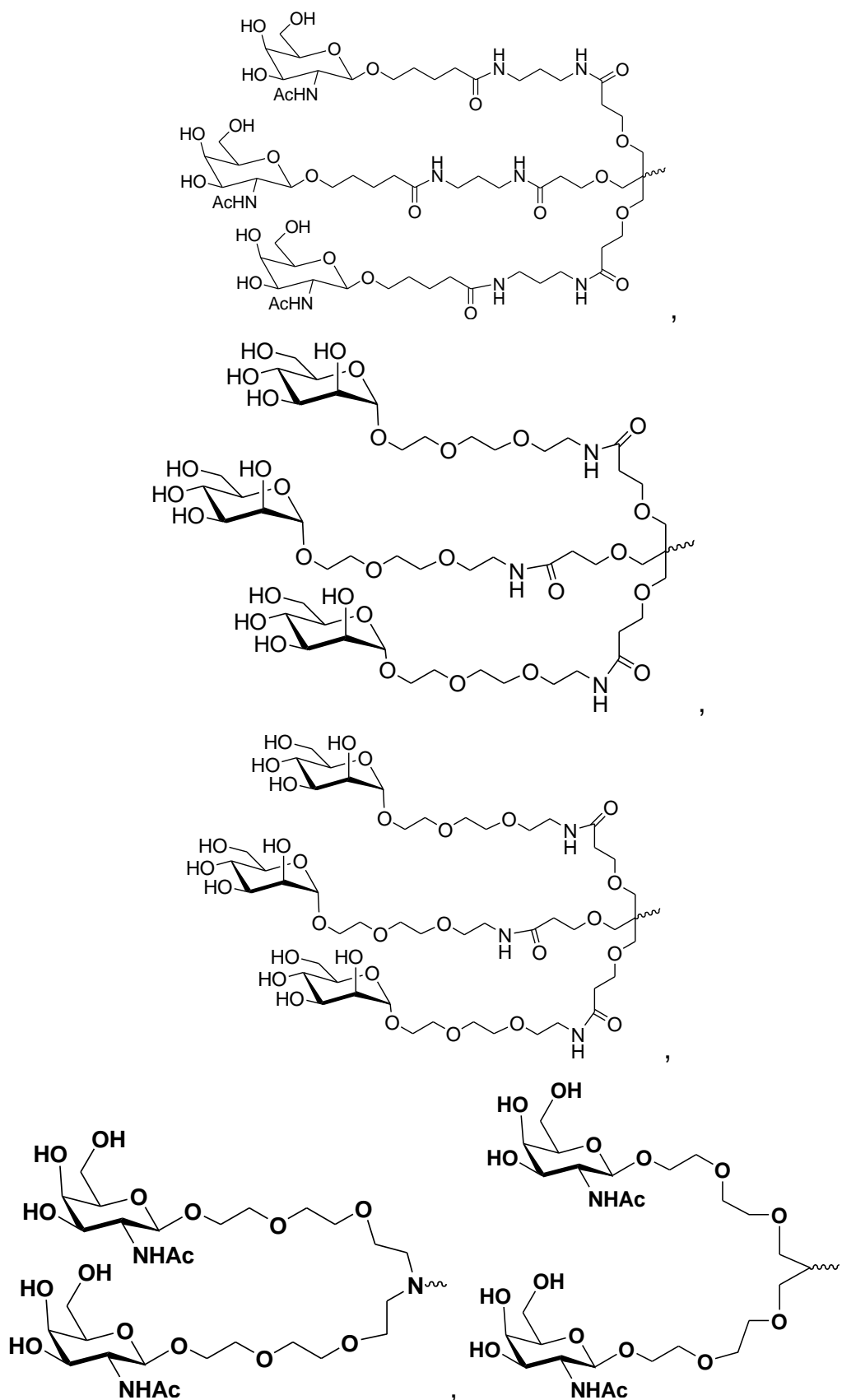


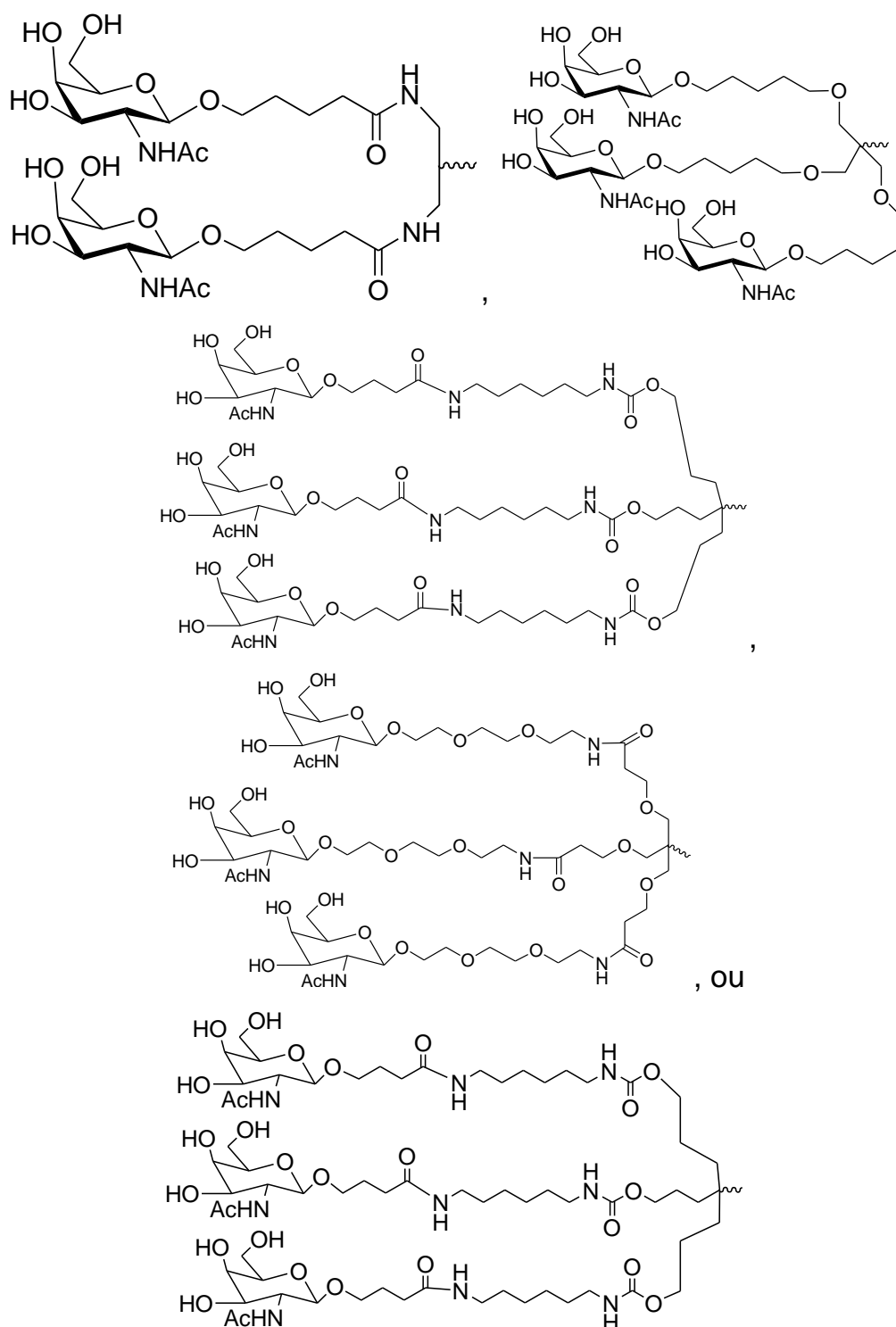
Formula (VII)

[00351] em que L^{5A}, L^{5B} e L^{5C} representam um monossacarídeo, tal como um derivado de GalNAc.

[00352] Exemplos de grupos ligantes ramificados bivalentes e

trivalentes adequados de conjugação a derivados GalNAc incluem os, mas não estão limitados aos, seguintes compostos:





[00353] Em outras modalidades, o agente de RNAi para uso nos métodos da invenção é um agente selecionado do grupo consistindo em AD-53815, AD-56663, AD-56658, AD-56676, AD-56666, AD-57928, e AD-60212.

III. Administração de um RNAi da Invenção

[00354] A administração de um agente de RNAi da invenção em uma célula, por exemplo, uma célula dentro de um indivíduo, tal como um indivíduo humano (por exemplo, um indivíduo com sua necessidade, tal como um indivíduo tendo um distúrbio de lipídeos, tal como uma hiperlipidemia) pode ser alcançada em um número de maneiras diferentes. Por exemplo, a distribuição pode ser realizada por contato de uma célula com um RNAi da invenção *in vitro* ou *in vivo*. A distribuição *in vivo* pode ser 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.

[00355] 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. e Julian RL. (1992) *Trends Cell. Biol.* 2(5):139-144 e WO94/02595, que são incorporados aqui por referência nas suas totalidades). Para administração *in vivo*, fatores a ter em consideração 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 distribuição intraocular de um dsRNA de VEGF por injeção intravítrea em macacos cinomólogos (Tolentino, MJ., *et al.* (2004) *Retina* 24:132-138) e injeções subretinais em camundongos (Reich, SJ., *et al.* (2003) *Mol. Vis.* 9:210-216) previnem a neovascularização em um modelo experimental de 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 pode 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 êxito 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 distribuído usando um sistema de administração de fármacos; ambos os métodos atuam para prevenir a degradação rápida do dsRNA por endo- e exo-nucleases *in vivo*. A modificação do RNA ou do carreador farmacêutico também pode permitir direcionamento da composição de RNAi para o tecido alvo e evitar efeitos fora do alvo indesejáveis. Moléculas de RNAi podem ser modificadas por conjugação química com grupos lipofílicos tais como colesterol para intensificar 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 RNAm de apoB no fígado e jejuno (Soutschek, J. *et al.*, (2004) *Nature* 432:173-178). Foi mostrado que a conjugação de um RNAi com 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 distribuído usando sistemas de administração de fármacos tais como uma nanopartícula, um dendrímero, um polímero, lipossomos, ou um sistema de distribuição catiônico. Sistemas de distribuição 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 catiônicos, dendrímeros, ou polímeros podem ser ligados a um RNAi, ou induzidos para formar uma vesícula ou micélio (ver, por exemplo, Kim SH., *et al.* (2008) *Journal of Controlled Release* 129(2):107-116) que encerra um RNAi. A formação de vesículas ou micélios previne adicionalmente a degradação do RNAi quando administrado sistemicamente. Métodos para preparação e administração de complexos de RNAi catiônicos estão bem dentro das capacidades de um perito na técnica (ver, por exemplo, Sorensen, DR., *et al.* *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 incorporados aqui por referência na sua totalidade). Alguns exemplos não limitantes de sistemas de distribuição de fármacos úteis para distribuição sistêmica de RNAis incluem DOTAP (Sorensen, DR., *et al.* (2003), *supra*; Verma, UN., *et al.* (2003), *supra*), Oligofectamina, "partículas de lipídeo de ácido nucleico sólidas" (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), polietilenoimina (Bonnet ME., *et al.* (2008) *Pharm. Res.* 16 ag Epub antes da impressão; Aigner, A. (2006) *J. Biomed. Biotechnol.* 71659), peptídeos de 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

[00356] iRNA se dirigindo ao gene de PCSK9 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 constructo específico usado e do tipo de tecido ou célula alvo. Estes transgenes podem ser introduzidos como um constructo 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.*, (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1995) 92:1292).

[00357] A fita individual ou fitas de um RNAi podem ser transcritas a partir de um promotor em um vetor de expressão. Onde duas fitas separadas são para serem expressas para gerar, por exemplo, um dsRNA, dois vetores de expressão separados podem ser cointroduzidos (por exemplo, por transfecção ou infecção) em uma célula alvo. Alternativamente, cada fita individual de um dsRNA pode ser transcrita

por promotores, ambos os quais estão localizados no mesmo plasmídeo de expressão. Em uma modalidade, um dsRNA é expresso como e polinucleotídeos com repetições invertidas ligados por uma sequência de polinucleotídeos ligante tal que o dsRNA tenha uma estrutura de haste e alça.

[00358] 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 constructos 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 distribuição 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.

[00359] Plasmídeos de expressão de RNAi podem ser transfectados em células alvo como um complexo com carreadores de lipídeos catiônicos (por exemplo, Oligofectamina) ou carreadores à base de lipídeos não catiônicos (por exemplo, Transit-TKO™). Múltiplas transfecções de lipídeos para silenciamentos mediados por RNAi se dirigindo a 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.

[00360] 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 do poliovírus; (g) vetores de vírus do papiloma; (h) vetores de picornavírus; (i) vetores de vírus da varíola tais como um 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 constructos podem incluir sequências virais para transfecção, se desejado. Alternativamente, o constructo pode ser incorporado em vetores capazes de replicação episomal, por exemplo, vetores de EPV e EBV. Constructos 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 constructos são adicionalmente descritos em baixo.

[00361] 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.

[00362] 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.

[00363] Podem ser usados vetores virais que contêm sequências de ácidos nucleicos codificando um RNAi. Por exemplo pode ser usado um vetor retroviral (ver 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 distribuir o gene *mdr1* em células-tronco hematopoiéticas de modo a tornar as células-tronco mais resistentes a quimioterapia. Outras referências que ilustram o uso de vetores retrovirais em terapia genética 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. Nos. 6,143,520; 5,665,557; e 5,981,276, que são

aqui incorporadas por referência.

[00364] Adenovírus também são contemplados para uso na distribuição de RNAs da invenção. Adenovírus são veículos especialmente atrativos, por exemplo para distribuição de genes em epitélios respiratórios. Os adenovírus infetam 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 infetar células não em divisão. Kozarsky e Wilson, *Current Opinion in Genetics and Development* 3:499-503 (1993) apresentam uma revisão de terapia de genes baseada em adenovírus. Bout *et al.*, *Human Gene Therapy* 5:3-10 (1994) demonstraram o uso de vetores de adenovírus para transferir genes para os epitélios respiratórios de macacos *rhesus*. Outros casos de 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 distribuição do vetor a células alvo, são descritos em Xia H *et al.* (2002), *Nat. Biotech.* 20: 1006-1010.

[00365] Vetores de vírus adeno-associados (AAV) também podem ser usados para distribuir um RNAi da invenção (Walsh *et al.*, (1993) *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 204:289-300 (1993); Pat. dos E.U.A. No. 5,436,146). Em uma modalidade, o RNAi pode ser expresso como duas moléculas de RNA de fita única 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 distribuição dos vetores em 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.

[00366] 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.

[00367] 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 fabricados para se dirigirem a diferentes células por manipulação dos vetores para expressarem diferentes serótipos 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 incorporado por referência.

[00368] 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 distribuição 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 distribuição de genes.

V. Composições Farmacêuticas da Invenção

[00369] 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 veículo 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 de PCSK9, por exemplo, um distúrbio de lipídeos. Tais composições farmacêuticas são formuladas com base no modo de distribuição. Um exemplo é composições que são formuladas para administração sistêmica através de administração parenteral, por exemplo, por administração intravenosa (IV). Outro exemplo é composições que são formuladas para distribuição direta no parênquima do cérebro, por exemplo, por infusão no cérebro, tal como por infusão contínua com bomba.

[00370] As composições farmacêuticas compreendendo agentes de RNAi da invenção podem ser, por exemplo, soluções com ou sem um tampão, ou composições contendo veículos farmacêuticamente aceitáveis. Tais composições incluem, por exemplo, composições aquosas ou cristalinas, formulações lipossomais, formulações micelares, emulsões, e vetores de terapia de genes.

[00371] Nos métodos da invenção, o agente de RNAi pode ser administrado em uma solução. Um agente de RNAi livre pode ser administrado em uma solução não tamponada, por exemplo, em salino ou em água. Alternativamente, o siRNA livre pode ser também administrado em uma solução tampão adequada. A solução tampão pode compreender acetato, citrato, prolamina, carbonato, ou fosfato, ou qualquer sua combinação. Em uma modalidade preferencial, a solução tampão é salino tamponado com fosfato (PBS). O pH e osmolaridade

da solução tampão contendo o agente de RNAi podem ser ajustados tal que seja adequada para administração a um indivíduo.

[00372] Em algumas modalidades, a solução tampão compreende adicionalmente um agente para controle da osmolaridade da solução, tal que a osmolaridade seja mantida a um valor desejado, por exemplo, aos valores fisiológicos do plasma humano. Solutos que podem ser adicionados à solução tampão para controlar a osmolaridade incluem, mas não estão limitados a, proteínas, peptídeos, aminoácidos, polímeros não metabolizados, vitaminas, íons, açúcares, metabolitos, ácidos orgânicos, lipídeos, ou sais. Em algumas modalidades, o agente para controle da osmolaridade da solução é um sal. Em certas modalidades, o agente para controle da osmolaridade da solução é cloreto de sódio ou cloreto de potássio.

[00373] As composições farmacêuticas da invenção podem ser administradas em dosagens suficientes para inibir a expressão de um gene de PCSK9. 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.

[00374] Por exemplo, o agente de RNAi, por exemplo, dsRNA, pode ser administrado a 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 cerca de 10 mg/kg. É também pretendido que valores e gamas intermédias dos valores recitados sejam parte desta invenção.

[00375] Em outra modalidade, o agente de RNAi, por exemplo, dsRNA, é administrado a 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 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 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 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. É também pretendido que valores e gamas intermédias dos valores recitados sejam parte desta invenção.

[00376] Por exemplo, o agente de RNAi, por exemplo, dsRNA, pode ser administrado a 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 cerca de 10 mg/kg. É também pretendido que valores e gamas intermédias dos valores recitados sejam parte desta invenção.

[00377] Em outra modalidade, o agente de RNAi, por exemplo, dsRNA, é administrado a uma dose de 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 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 0,5 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 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 0,5 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 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 0,5 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 25 a cerca de 30 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, o dsRNA é administrado a uma dose de cerca de 10 mg/kg a cerca de 30 mg/kg. É também pretendido que valores e gamas intermédias dos valores recitados sejam parte desta invenção.

[00378] Por exemplo, aos indivíduos pode ser administrada uma quantidade terapêutica de RNAi, tal como cerca de 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, 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 intermédias dos valores recitados sejam parte desta invenção.

[00379] A composição farmacêutica pode ser administrada uma vez diariamente, ou o RNAi pode ser administrado como duas, três, ou mais subdoses em intervalos apropriados ao longo do dia ou mesmo usando infusão ou distribuição contínua através de uma formulação de liberação controlada. Em esse caso, o RNAi contido em cada subdose tem de ser correspondentemente menor para se alcançar a dosagem diária total. A unidade de dosagem pode ser também composta para distribuição ao longo de vários dias, por exemplo, usando uma formulação de liberação sustentada convencional 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 distribuição de agentes em 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.

[00380] 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.

[00381] 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 terapêuticamente 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.

[00382] Progressos em genética de camundongos geraram um número de modelos de camundongo para o estudo de várias doenças humanas, tais como um distúrbio de sangramento que beneficiaria de redução da expressão de PCSK9. Tais modelos podem ser usados para teste *in vivo* de RNAi, bem como para determinação de uma dose terapêuticamente eficaz. Modelos de camundongo adequados são conhecidos na técnica e incluem, por exemplo, um camundongo contendo um transgene expressando PCSK9 de humano.

[00383] 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.

[00384] O RNAi pode ser distribuído de uma maneira para se dirigir a um tecido particular, tal como o fígado (por exemplo, os hepatócitos do fígado).

[00385] Composições e formulações farmacêuticas para administração tópica podem incluir pensos transdérmicos, pomadas, loções, cremes, géis, gotas, supositórios, pulverizações, líquidos e pós. Veículos 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 RNAsi apresentados na invenção estão em mistura com um agente de distribuição tópica tal como lipídeos, lipossomas, ácidos graxos, ésteres de ácidos graxos, esteroides, agentes quelantes e tensioativos. Lipídeos e lipossomas adequados incluem neutros (por exemplo, dioleoílfosfatidil DOPE etanolamina, dimiristoílfosfatidil colina DMPC, diestearolifosfatidil colina), negativos (por exemplo, dimiristoílfosfatidil glicerol DMPG) e catiônicos (por exemplo, dioleoíltetrametilaminopropil DOTAP e dioleoílfosfatidil etanolamina DOTMA). Os RNAsi apresentados na invenção podem ser encapsulados dentro de lipossomas ou podem formar complexos com os mesmos, em particular com lipossomas 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, monooleína, 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

[00386] Um RNAi para uso nas composições e métodos da invenção pode ser formulado para distribuição em uma montagem molecular membranosa, por exemplo, um lipossoma ou um micélio. Como usado aqui, o termo "lipossoma" 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 lipossomas 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 lipossomas são úteis para a transferência e distribuição de ingredientes ativos ao local de ação. Uma vez que a membrana lipossomal é estruturalmente similar a membranas biológicas, quando lipossomas são aplicados em um tecido, a bicamada lipossomal é fundida à bicamada das membranas celulares. À medida que a fusão do lipossoma e célula progride, os conteúdos aquosos internos que incluem o RNAi são distribuídos na célula onde o RNAi pode se ligar especificamente a um RNA alvo e pode mediar RNAi. Em alguns casos, os lipossomas são também especificamente direcionados, por exemplo, para dirigir o RNAi para tipos de células particulares.

[00387] Um lipossoma contendo um agente de RNAi pode ser preparado por uma variedade de métodos. Em um exemplo, o

componente de lipídeo de um lipossoma 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. O detergente pode ter uma elevada concentração de micélio crítica e pode ser não iônico. Detergentes exemplares 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 lipossoma. Após condensação, o detergente é removido, por exemplo, por diálise, para originar a uma preparação lipossomal de agente de RNAi.

[00388] Se necessário, um composto carreador que auxilia a condensação pode ser adicionado durante a reação de condensação, por exemplo, por adição controlada. Por exemplo, o composto carreador pode ser um polímero sem ser um ácido nucleico (por exemplo, espermina ou espermidina). O pH pode ser também ajustado para favorecer a condensação.

[00389] 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 lipossomas pode também incluir um ou mais aspectos de métodos exemplares descritos em Felgner, P. L. *et al.*, (1987) *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 prontamente adaptados ao empacotamento de preparações de agente de RNAi em lipossomas.

[00390] Os lipossomas são classificados em duas amplas classes. Lipossomas catiônicos são lipossomas 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 endossoma. Devido ao pH ácido dentro do endossoma, os lipossomas sofrem ruptura, liberando seus conteúdos no citoplasma da célula (Wang *et al., Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1987, 147, 980-985).

[00391] 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 lipossomas. Lipossomas sensíveis ao pH têm sido usados para distribuir 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).

[00392] Um grande tipo de composição lipossomal inclui

fosfolipídeos sem ser fosfatidilcolina naturalmente derivada. Composições de lipossomas neutras, por exemplo, podem ser formadas a partir de dimiristoíl fosfatidilcolina (DMPC) ou dipalmitoíl fosfatidilcolina (DPPC). Composições de lipossomas aniônicas são geralmente formadas a partir de dimiristoíl fosfatidilglicerol, enquanto lipossomas 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.

[00393] Exemplos de outros métodos para introduzir lipossomas em células *in vitro* e *in vivo* incluem a Pat. 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; e Strauss *EMBO J.* 11:417, 1992.

[00394] Sistemas lipossomais não iônicos foram também examinados para se determinar a sua utilidade na distribuição de fármacos à pele, em particular sistemas compreendendo tensioativo 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 distribuir um fármaco na derme da pele de camundongo. 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).

[00395] Os lipossomas incluem também lipossomas "estericamente estabilizados", um termo que, como usado aqui, se refere a lipossomas compreendendo um ou mais lipídeos especializados que, quando

incorporados em lipossomas, resultam em tempos de vida em circulação intensificados em relação a lipossomas não tendo tais lipídeos especializados. Exemplos de lipossomas estericamente estabilizados são aqueles nos quais parte da porção de lipídeo formadora de vesícula do lipossoma (A) compreende um ou mais glicolipídeos, tais como monossialogangliosídeo GM1, 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 lipossomas estericamente estabilizados contendo gangliosídeos, esfingomielina, ou lipídeos derivatizados com PEG, a meia-vida em circulação intensificada destes lipossomas estericamente estabilizados deriva de uma captação reduzida em células do sistema reticuloendotelial (RES) (Allen *et al.*, (1987) *FEBS Letters*, 223:42; Wu *et al.*, (1993) *Cancer Research*, 53,3765).

[00396] Vários lipossomas 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 GM1, sulfato de galactocerebrosídeo e fosfatidilinositol de melhorar as meias-vidas no sangue de lipossomas. Estas descobertas foram expostas por Gabizon *et al.* (*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1988, 85, 6949). As Pat. dos E.U.A. No. 4,837,028 e WO 88/04924, ambas em nome de Allen *et al.*, divulgam lipossomas compreendendo (1) esfingomielina e (2) o gangliosídeo GM1 ou um éster de sulfato de galactocerebrosídeo. A Pat. dos E.U.A. No. 5,543,152 (Webb *et al.*) divulga lipossomas compreendendo esfingomielina. Lipossomas compreendendo 1,2-sn-dimiristoílfosfatidilcolina são divulgados em WO 97/13499 (Lim *et al.*).

[00397] Em uma modalidade são usados lipossomas catiônicos. Os lipossomas catiônicos têm a vantagem de serem capazes de se fundir

à membrana celular. Os lipossomas 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 distribuir agentes de RNAi em macrófagos.

[00398] Vantagens adicionais de lipossomas incluem: os lipossomas obtidos de fosfolípidos naturais são biocompatíveis e biodegradáveis; os lipossomas podem incorporar uma gama ampla de fármacos solúveis em água e lípidos; os lipossomas podem proteger agentes de RNAi encapsulados em seus compartimentos internos do metabolismo e degradação (Rosoff, em "*Pharmaceutical Dosage Forms*", Lieberman, Rieger e Banker (Editores), 1988, volume 1, p. 245). Considerações importantes na preparação de formulações de lipossomas são a carga superficial do lipídeo, tamanho da vesícula e o volume aquoso dos lipossomas.

[00399] Um lipídeo catiônico sintético positivamente carregado, cloreto de N-[1-(2,3-dioleíloxi)propil]-N,N,N-trimetilamônio (DOTMA), pode ser usado para formar lipossomas pequenos que interagem espontaneamente com ácido nucleico para formar complexos lipídeo-ácido nucleico que são capazes de se fundir aos lipídeos 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).

[00400] Um análogo de DOTMA, 1,2-bis(oleoíloxi)-3-(trimetilamônia)propano (DOTAP), pode ser usado em combinação com um fosfolipídeo para formar vesículas que complexam com DNA. Lipofectina™ (Bethesda Research Laboratories, Gaithersburg, Md.) é um agente eficaz para a distribuição de ácidos nucleicos altamente aniônicos em células de cultura de tecidos vivos que compreendem

lipossomas de DOTMA positivamente carregados que interagem espontaneamente com polinucleotídeos negativamente carregados para formar complexos. Quando são usados suficientes lipossomas 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 distribuem eficazmente ácidos nucleicos funcionais em, por exemplo, células de cultura de tecidos. Outro lipídeo catiônico comercialmente disponível, 1,2-bis(oleoíloxi)-3,3-(trimetilamônia)propano ("DOTAP") (Boehringer Mannheim, Indianapolis, Indiana) difere de DOTMA pelo fato de as frações oleoíla estarem ligadas por ligações éster, em vez de éter.

[00401] 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 dioctaoleoílamida de 5-carboxiespermilglicina ("DOGS") (Transfectam™, Promega, Madison, Wisconsin) e 5-carboxiespermil-amida de dipalmitoílfosfatidiletanolamina ("DPPES") (ver, por exemplo, Pat. dos E.U.A. No. 5,171,678).

[00402] 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 distribuição de oligonucleotídeos são descritos em WO 98/39359 e WO 96/37194.

[00403] 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 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 distribuir um agente de RNAi em 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 na 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).

[00404] Sistemas lipossomais não iônicos foram também examinados para se determinar a sua utilidade na distribuição de fármacos na pele, em particular sistemas compreendendo tensioativo 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

distribuir um fármaco na derme da pele de camundongo. Tais formulações com agente de RNAi são úteis para tratamento de um distúrbio dermatológico.

[00405] Os lipossomas que incluem RNAi podem ser tornados altamente deformáveis. Tal deformabilidade pode permitir que os lipossomas penetrem através de poros que são menores do que o raio médio do lipossoma. Por exemplo, os transfersomas são um tipo de lipossomas deformáveis. Os transferossomas podem ser preparados por adição de ativadores da borda de superfície, usualmente tensioativos, a uma composição lipossomal padrão. Os transfersomas que incluem um agente de RNAi podem ser distribuídos, por exemplo, subcutaneamente por infecção de modo a distribuir o agente de RNAi em queratinócitos da pele. De modo a atravessarem pele intacta de mamífero, 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 transferossomas podem ser auto-otimizantes (adaptação à forma dos poros, por exemplo, na pele), autorreparantes, e conseguem frequentemente alcançar seus alvos sem fragmentação, e frequentemente autocarregantes.

[00406] Outras formulações convenientes para a presente invenção são descritas nos pedidos provisórios dos Estados Unidos Nos. de série 61/018,616, depositado a 2 de janeiro, 2008; 61/018,611, depositado a 2 de janeiro, 2008; 61/039,748, depositado a 26 de março, 2008; 61/047,087, depositado a 22 de abril, 2008, e 61/051,528, depositado a 8 de maio, 2008. O pedido PCT no. PCT/US2007/080331, depositado em 3 de outubro, 2007, descreve também formulações que são convenientes para a presente invenção.

[00407] Transfersomas são ainda outro tipo de lipossomas, e são agregados de lipídeos altamente deformáveis que são candidatos

atrativos para veículos de distribuição de fármacos. Os transfersomas 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 transfersomas são adaptáveis ao ambiente no qual são usados, por exemplo, são auto-otimizantes (adaptativos à forma dos poros na pele), autorreparantes, alcançam frequentemente seus alvos sem fragmentação, e frequentemente autocarregantes. Para preparar transfersomas é possível adicionar ativadores de borda de superfície, habitualmente tensioativos, a uma composição de lipossomos padrão. Os transfersomas foram usados para distribuir albumina do soro na pele. Foi mostrado que a distribuição de albumina do soro mediada por transfersomas é tão eficaz como injeção subcutânea de uma solução contendo albumina do soro.

[00408] Os tensioativos 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 tensioativos, tanto naturais como sintéticos, é pelo uso do equilíbrio hidrófilo/lipófilo (HLB). A natureza do grupo hidrofílico (também conhecido como a "cabeça") proporciona o meio mais útil para categorização dos diferentes tensioativos usados em formulações (Rieger, em *Pharmaceutical Dosage Forms*, Marcel Dekker, Inc., Nova Iorque, N.I., 1988, p. 285).

[00409] Se a molécula de tensioativo não estiver ionizada é classificada como um tensioativo não iônico. Os tensioativos 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 HLB variam de 2 a cerca de 18 dependendo da sua estrutura. Tensioativos 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 tensioativos de polioxietileno são os membros mais populares da classe dos tensioativos não iônicos.

[00410] Se a molécula de tensioativo transportar uma carga negativa quando é dissolvida ou dispersa em água, o tensioativo é classificado como aniônico. Tensioativos 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 tensioativos aniônicos são os sulfatos de alquila e os sabões.

[00411] Se a molécula de tensioativo transportar uma carga positiva quando é dissolvida ou dispersa em água, o tensioativo é classificado como catiônico. Tensioativos catiônicos incluem sais de amônio quaternário e aminas etoxiladas. Os sais de amônio quaternário são os membros mais usados desta classe.

[00412] Se a molécula de tensioativo tiver a capacidade de transportar uma carga positiva ou negativa, o tensioativo é classificado como anfotérico. Tensioativos anfotéricos incluem derivados do ácido acrílico, alquilamidas substituídas, N-alquilbetaínas e fosfatídeos.

[00413] O uso de tensioativos em produtos, formulações e em emulsões de fármacos foi revisto (Rieger, em *Pharmaceutical Dosage Forms*, Marcel Dekker, Inc., Nova Iorque, N.I., 1988, p. 285).

[00414] 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 em que moléculas anfipáticas são dispostas em uma estrutura esférica de modo 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.

[00415] Uma formulação micelar mista adequada para distribuição através de membranas transdérmicas pode ser preparada por mistura de uma solução aquosa da composição de siRNA, 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, trihidroxi oxo colanil glicina e respectivos sais farmaceuticamente aceitáveis, glicerina, poliglicerina, lisina, polilisina, trioleína, éteres de polioxietileno e respectivos análogos, éteres de alquila de polidocanol e respectivos análogos, quenodesoxicolato, desoxicolato, e respectivas misturas. Os compostos formadores de micélios podem ser adicionados ao mesmo tempo ou após a adição do alquil sulfato de metal alcalino. Micélios mistos serão formados com substancialmente qualquer tipo de mistura dos ingredientes, mas mistura vigorosa para proporcionar micélios de menores dimensões.

[00416] Em um método é preparada uma primeira composição micelar que contém a composição de siRNA e pelo menos o alquil sulfato de metal alcalino. A primeira composição micelar é então misturada com pelo menos três compostos formadores de micélios, para formar uma composição micelar mista. Em outro método, a composição micelar é preparada misturando a composição de siRNA, o alquil sulfato de metal alcalino e pelo menos um dos compostos formadores de micélios, seguido da adição dos restantes compostos formadores de micélios, com mistura vigorosa.

[00417] Fenol e/ou m-cresol podem ser adicionados à composição micelar mista para estabilizar a formulação e protegê-la contra crescimento bacteriano. Em alternativa, fenol e/ou m-cresol podem ser adicionados com os ingredientes formadores de micélio. Um agente isotônico, como glicerina, também pode ser adicionado após a formação da composição micelar mista.

[00418] Para administração 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, *i.e.*, existe uma fase. Se existirem duas fases é necessário agitar o distribuidor antes de distribuir 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.

[00419] 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).

[00420] 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

[00421] 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.

[00422] Como usado aqui, o termo "LNP" se refere a uma partícula

estável de ácido nucleico-lipídeo. As LNPs contêm 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 No. WO 00/03683. As partículas da presente invenção têm tipicamente um diâmetro médio de cerca de 50 nm a cerca de 150 nm, mais tipicamente cerca de 60 nm a cerca de 130 nm, mais tipicamente cerca de 70 nm a cerca de 110 nm, 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 a degradação com uma nuclease. Partículas de ácido nucleico-lipídeo e seu método de preparação são revelados, por exemplo, nas Patentes U.S. Nos. 5,976,567; 5,981,501; 6,534,484; 6,586,410; 6,815,432; Publicação U.S. No. 2010/0324120 e Publicação PCT No. WO 96/40964.

[00423] Em uma modalidade, a razão de lipídeo em relação ao fármaco (razão massa/massa) (por exemplo, razão de lipídeo e 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. Também é contemplado que intervalos intermédios dos intervalos listados acima façam parte da invenção.

[00424] O lipídeo catiônico pode ser, por exemplo, cloreto de N,N-dioleíl-N,N-dimetilamônio (DODAC), brometo de N,N-diestearil-N,N-dimetilamônio (DDAB), cloreto de N-(1-(2,3-dioleoíloxi)propil)-N,N,N-

trimetilamônio (DOTAP), cloreto de N-(1-(2,3-dioleíloxi)propil)-N,N,N-trimetilamônio (DOTMA), N,N-dimetil-(2,3-dioleíloxi)propilamina (DODMA), 1,2-Dilinoleíloxi-N,N-dimetilaminopropano (DLinDMA), 1,2-Dilinoleniloxi-N,N-dimetilaminopropano (DLenDMA), 1,2-Dilinoleílcarbamoiloxi-3-dimetilaminopropano (DLin-C-DAP), 1,2-Dilinoleíloxi-3-(dimetilamino)acetoxipropano (DLin-DAC), 1,2-Dilinoleíloxi-3-morfolinopropano (DLin-MA), 1,2-Dilinoleoil-3-dimetilaminopropano (DLinDAP), 1,2-Dilinoleíltio-3-dimetilaminopropano (DLin-S-DMA), 1-Linoleoil-2-linoleíloxi-3-dimetilaminopropano (DLin-2-DMA), sal de cloreto de 1,2-Dilinoleíloxi-3-trimetilaminopropano (DLin-TMA.Cl), sal de cloreto de 1,2-Dilinoleoil-3-trimetilaminopropano (DLin-TAP.Cl), 1,2-Dilinoleíloxi-3-(N-metilpiperazino)propano (DLin-MPZ), ou 3-(N,N-Dilinoleílamino)-1,2-propanodiol (DLinAP), 3-(N,N-Dioleilamino)-1,2-propanodio (DOAP), 1,2-Dilinoleíloxi-3-(2-N,N-dimetilamino)etoxipropano (DLin-EG-DMA), 1,2-Dilinoleniloxi-N,N-dimetilaminopropano (DLinDMA), 2,2-Dilinoleíl-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)tetraidro-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.

[00425] Em outra modalidade, o composto 2,2-Dilinoleíl-4-dimetilaminoetil-[1,3]-dioxolano pode ser usado para preparar nanopartículas de lipídeo-siRNA. A síntese de 2,2-Dilinoleíl-4-dimetilaminoetil-[1,3]-dioxolano é descrita no pedido de patente provisória dos Estados Unidos número 61/107,998 depositada a 23 de outubro, 2008, que é aqui incorporada por referência.

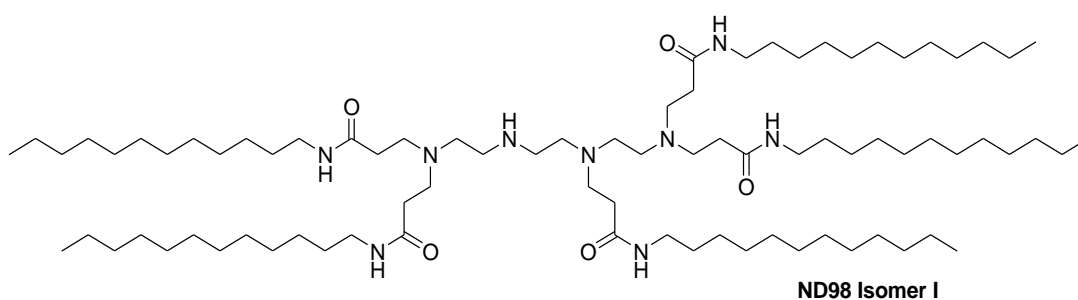
[00426] Em uma modalidade, a partícula de lipídeo-siRNA inclui 2,2-Dilinoiléil-4-dimetilaminoetil-[1,3]-dioxolano a 40 %: DSPC a 10 %: Colesterol a 40 %: PEG-C-DOMG a 10 % (percentagem molar) com um tamanho das partículas de $63,0 \pm 20$ nm e uma Razão de siRNA/Lipídeo de 0,027.

[00427] O lipídeo ionizável/não catiônico pode ser um lipídeo aniônico ou um lipídeo neutro, incluindo, mas não se limitando, a diestearoílfosfatidilcolina (DSPC), dioleoílfosfatidilcolina (DOPC), dipalmitoílfosfatidilcolina (DPPC), dioleoílfosfatidilglicerol (DOPG), dipalmitoílfosfatidilglicerol (DPPG), dioleoíl-fosfatidiletanolamina (DOPE), palmitoíloleoílfosfatidilcolina (POPC), palmitoíloleoílfosfatidiletanolamina (POPE), 4-(N-maleimidometil)-ciclohexano-1-carboxilato de dioleoíl-fosfatidiletanolamina (DOPE-mal), dipalmitoíl fosfatidil etanolamina (DPPE), dimiristoílfosfoetanolamina (DMPE), diestearoílfosfatidil-etanolamina (DSPE), 16-O-monometil PE, 16-O-dimetil PE, 18-1-*trans* PE, 1-estearoíl-2-oleoíl-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.

[00428] O lipídeo conjugado que inibe a agregação de partículas pode ser, por exemplo, um polietilenoglicol (PEG)-lipídeo incluindo, sem limitação, um PEG-diacilglicerol (DAG), um PEG-dialquioxipropila (DAA), um PEG-fosfolipídeo, um PEG-ceramida (Cer), ou uma respectiva mistura. O conjugado PEG-DAA pode ser, por exemplo, um PEG-dilauroiloxipropila (Ci_2), um PEG-dimiristiloxipropila (Ci_4), um PEG-dipalmitiloxipropila (Ci_6), ou um PEG- diesteariloxipropila (Ci_8). 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.

[00429] Em algumas modalidades, a partícula de ácido nucleico-lipídeo inclui adicionalmente colesterol a, por exemplo, cerca de 10 % por mol a cerca de 60 % por mol ou cerca de 48 % por mol do lipídeo total presente na partícula.

[00430] 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 (*i.e.*, 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

[00431] Formulações de LNP01 são descritas, por exemplo, na Publicação do Pedido Internacional No. WO 2008/042973, que é deste modo incorporado por referência.

[00432] Formulações de lipídeo-dsRNA exemplares adicionais são descritas na Tabela A.

Tabela A.

	Lipídeo Ionizável/Catiônico	lipídeo catiônico/lipídeo não catiônico/colesterol/conjugado PEG-lipídeo Razão Lipídeo:siRNA
LNP-1	1,2-Dilineniloxi-N,N-dimetilaminopropano (DLinDMA)	DLinDMA/DPPC/Colesterol/PEG-cDMA (57,1/7,1/34,4/1,4) lipídeo:siRNA ~ 7:1
2-XTC	2,2-Dilinoiléil-4-dimetilaminoetil-[1,3]-dioxolano (XTC)	XTC/DPPC/Colesterol/PEG-cDMA 57,1/7,1/34,4/1,4 lipídeo:siRNA ~ 7:1
LNP05	2,2-Dilinoiléil-4-dimetilaminoetil-[1,3]-dioxolano (XTC)	XTC/DSPC/Colesterol/PEG-DMG 57,5/7,5/31,5/3,5 lipídeo:siRNA ~ 6:1

	Lipídeo Ionizável/Catiônico	lipídeo catiônico/lipídeo não catiônico/colesterol/conjugado PEG-lipídeo Razão Lipídeo:siRNA
LNP06	2,2-Dilinoleíl-4-dimetilaminoetil-[1,3]-dioxolano (XTC)	XTC/DSPC/Colesterol/PEG-DMG 57,5/7,5/31,5/3,5 lipídeo:siRNA ~ 11:1
LNP07	2,2-Dilinoleíl-4-dimetilaminoetil-[1,3]-dioxolano (XTC)	XTC/DSPC/Colesterol/PEG-DMG 60/7,5/31/1,5, lipídeo:siRNA ~ 6:1
LNP08	2,2-Dilinoleíl-4-dimetilaminoetil-[1,3]-dioxolano (XTC)	XTC/DSPC/Colesterol/PEG-DMG 60/7,5/31/1,5, lipídeo:siRNA ~ 11:1
LNP09	2,2-Dilinoleíl-4-dimetilaminoetil-[1,3]-dioxolano (XTC)	XTC/DSPC/Colesterol/PEG-DMG 50/10/38,5/1,5 Lipídeo:siRNA 10:1
LNP10	(3aR,5s,6aS)-N,N-dimetil-2,2-di((9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienil)tetraidro-3aH-ciclopenta[d][1,3]dioxol-5-amina (ALN100)	ALN100/DSPC/Colesterol/PEG-DMG 50/10/38,5/1,5 Lipídeo:siRNA 10:1
LNP11	4-(dimetilamino)butanoato de (6Z,9Z,28Z,31Z)-heptatriacont-6,9,28,31-tetraen-19-ila (MC3)	MC-3/DSPC/Colesterol/PEG-DMG 50/10/38,5/1,5 Lipídeo:siRNA 10:1

	Lipídeo Ionizável/Catiônico	lipídeo catiônico/lipídeo não catiônico/colesterol/conjugado PEG-lipídeo Razão Lipídeo:siRNA
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:siRNA 10:1
LNP13	XTC	XTC/DSPC/Col/PEG-DMG 50/10/38,5/1,5 Lipídeo:siRNA: 33:1
LNP14	MC3	MC3/DSPC/Col/PEG-DMG 40/15/40/5 Lipídeo:siRNA: 11:1
LNP15	MC3	MC3/DSPC/Col/PEG-DSG/GaINAc-PEG-DSG 50/10/35/4,5/0,5 Lipídeo:siRNA: 11:1
LNP16	MC3	MC3/DSPC/Col/PEG-DMG 50/10/38,5/1,5 Lipídeo:siRNA: 7:1
LNP17	MC3	MC3/DSPC/Col/PEG-DSG 50/10/38,5/1,5 Lipídeo:siRNA: 10:1
LNP18	MC3	MC3/DSPC/Col/PEG-DMG 50/10/38,5/1,5 Lipídeo:siRNA: 12:1

	Lipídeo Ionizável/Catiônico	lipídeo catiônico/lipídeo não catiônico/colesterol/conjugado PEG-lipídeo Razão Lipídeo:siRNA
LNP19	MC3	MC3/DSPC/Col/PEG-DMG 50/10/35/5 Lipídeo:siRNA: 8:1
LNP20	MC3	MC3/DSPC/Col/PEG-DPG 50/10/38,5/1,5 Lipídeo:siRNA: 10:1
LNP21	C12-200	C12-200/DSPC/Col/PEG-DSG 50/10/38,5/1,5 Lipídeo:siRNA: 7:1
LNP22	XTC	XTC/DSPC/Col/PEG-DSG 50/10/38,5/1,5 Lipídeo:siRNA: 10:1

DSPC: diestearoilfosfatidilcolina

DPPC: dipalmitoilfosfatidilcolina

[00433] PEG-DMG: PEG-didimiristoíl glicerol (C14-PEG, ou PEG-C14) (PEG com peso molecular médio de 2000)

[00434] PEG-DSG: PEG-diestiril glicerol (C18-PEG, ou PEG-C18) (PEG com peso molecular médio de 2000)

[00435] PEG-cDMA: PEG-carbamoíl-1,2-dimiristiloxipropilamina (PEG com peso molecular médio de 2000)

[00436] Formulações compreendendo LNP (1,2-Dilinoleniloxi-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.

[00437] Formulações compreendendo XTC são descritas, por

exemplo, no Pedido Provisório dos E.U.A. No. de Série 61/148,366, depositado a 29 de janeiro, 2009; Pedido Provisório dos E.U.A. No. de Série 61/156,851, depositado a 2 de março, 2009; Pedido Provisório dos E.U.A. No. de Série depositado a 10 de junho, 2009; Pedido Provisório dos E.U.A. No. de Série 61/228,373, depositado a 24 de julho, 2009; Pedido Provisório dos E.U.A. No. de Série 61/239,686, depositado a 3 de setembro, 2009, e Pedido Internacional No. PCT/US2010/022614, depositado a 29 de janeiro, 2010, que são deste modo incorporados por referência.

[00438] Formulações compreendendo MC3 são descritas, por exemplo, na Publicação dos E.U.A. No. 2010/0324120, depositada a 10 de junho, 2010, os conteúdos inteiros da qual são deste modo incorporados por referência.

[00439] Formulações compreendendo ALNY-100 são descritas, por exemplo, no Pedido de patente internacional número PCT/US09/63933, depositado a 10 de novembro, 2009, que é deste modo incorporado por referência.

[00440] Formulações compreendendo C12-200 são descritas no Pedido Provisório dos E.U.A. No. de Série 61/175,770, depositado a 5 de maio, 2009, e Pedido Internacional No. PCT/US10/33777, depositado a 5 de maio, 2010, que são deste modo incorporados por referência.

Síntese de lipídeos ionizáveis/catiônicos

[00441] Qualquer um dos compostos, por exemplo, lipídeos catiônicos e similares, usado nas partículas de ácido nucleico-lipídeo da invenção pode ser preparado por técnicas conhecidas de síntese orgânica, incluindo os métodos descritos em mais detalhe nos Exemplos. Todos os substituintes são como definidos em baixo a não ser que indicado de outro modo.

[00442] “Alquila” significa um hidrocarboneto alifático saturado, de cadeia linear ou ramificado, não cíclico ou cíclico contendo de 1 a 24 átomos de carbono. Alquilas saturadas de cadeia linear representativas

incluem metila, etila, n-propila, n-butila, n-pentila, n-hexila, e afins; ao passo que alquilas saturadas ramificadas incluem isopropila, sec-butila, isobutila, tert-butila, isopentila, e afins. Alquilas cíclicas saturadas representativas incluem ciclopropila, ciclobutila, ciclopentila, ciclohexila, e similares; enquanto alquilas cíclicas insaturadas incluem ciclopentenila e ciclohexenila, e similares.

[00443] “Alquenila” significa uma alquila, como definido acima, contendo pelo menos uma ligação dupla entre átomos de carbono adjacentes. Alquenilas incluem isômeros cis e trans. Alquenilas representativas de cadeia linear e ramificadas incluem etilenila, propilenila, 1-butenila, 2-butenila, isobutilenila, 1-pentenila, 2-pentenila, 3-metil-1-butenila, 2-metil-2-butenila, 2,3-dimetil-2-butenila, e similares.

[00444] “Alquinila” significa qualquer alquila ou alquenila, como definido acima, que contém adicionalmente pelo menos uma ligação tripla entre carbonos adjacentes. Alquinilas representativas de cadeia linear e ramificadas incluem acetilenila, propinila, 1-butinila, 2-butinila, 1-pentinila, 2-pentinila, 3-metil-1 butinila, e similares.

[00445] “Acila” significa qualquer alquila, alquenila, ou alquinila em que o carbono no ponto de anexação está substituído por um grupo oxo, como definido em baixo. Por exemplo, $-C(=O)$ alquila, $-C(=O)$ alquenila, e $-C(=O)$ alquinila são grupos acila.

[00446] “Heterociclo” significa um anel heterocíclico monocíclico de 5 até 7 membros, ou bicíclico de 7 até 10 membros, que é saturado, insaturado, ou aromático, e que contém desde 1 ou 2 heteroátomos independentemente selecionados de nitrogênio, oxigênio e enxofre, e em que os heteroátomos de nitrogênio e enxofre podem estar opcionalmente oxidados, e o heteroátomo de nitrogênio pode estar opcionalmente quaternizado, incluindo anéis bicíclicos em que quaisquer dos heterociclos acima estão fundidos a um anel benzeno. O heterociclo pode estar ligado via qualquer heteroátomo ou átomo de carbono. Heterociclos incluem

heteroarilas como definido em baixo. Heterociclos incluem morfolinila, pirrolidinonila, pirrolidinila, piperidinila, piperizinila, hidantoinila, valerolactamila, oxiranila, oxetanila, tetraidrofuranila, tetraidropiranila, tetraidropiridinila, tetraidroprimidinila, tetraidrotiofenila, tetraidrotiopiranila, tetraidropirimidinila, tetraidrotiofenila, tetraidrotiopiranila, e similares.

[00447] Os termos “alquila opcionalmente substituída”, “alquenila opcionalmente substituída”, “alquinila opcionalmente substituída”, “acila opcionalmente substituída”, e “heterociclo opcionalmente substituído” significam que, quando substituídos, pelo menos um átomo de hidrogênio está substituído por um substituinte. No caso de um substituinte oxo (=O), estão substituídos dois átomos de hidrogênio. A esse respeito, substituintes incluem oxo, halogênio, heterociclo, -CN, -ORx, -NRxRy, -NRxC(=O)Ry, -NRxSO₂Ry, -C(=O)Rx, -C(=O)ORx, -C(=O)NRxRy, -SOnRx e -SOnNRxRy, em que n é 0, 1 ou 2, Rx e Ry são iguais ou diferentes e são independentemente hidrogênio, alquila ou heterociclo, e cada um dos referidos substituintes de alquila e heterociclo pode estar adicionalmente substituído com um ou mais de oxo, halogênio, -OH, -CN, alquila, -ORx, heterociclo, -NRxRy, -NRxC(=O)Ry, -NRxSO₂Ry, -C(=O)Rx, -C(=O)ORx, -C(=O)NRxRy, -SOnRx e -SOnNRxRy.

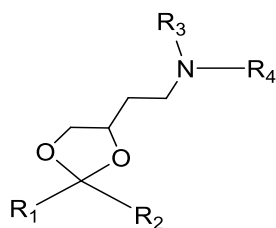
[00448] “Halogênio” significa flúor, cloro, bromo e iodo.

[00449] Em algumas modalidades, os métodos da invenção podem requerer a utilização de grupos protetores. A metodologia de grupos protetores é bem conhecida daqueles peritos na técnica (ver, por exemplo, *Protective Groups in Organic Synthesis*, Green, T.W. *et al.*, Wiley-Interscience, Cidade de Nova Iorque, 1999). Brevemente, grupos protetores, dentro do contexto desta invenção, são qualquer grupo que reduza ou elimine a reatividade indesejada de um grupo funcional. Um grupo protetor pode ser adicionado a um grupo funcional para mascarar a sua reatividade durante certas reações e depois é removido para

revelar o grupo funcional original. Em algumas modalidades é usado um “grupo protetor de álcool”. Um “grupo protetor de álcool” é qualquer grupo que diminua ou elimine a reatividade indesejada de um grupo funcional álcool. Grupos protetores podem ser adicionados e removidos usando técnicas bem conhecidas na técnica.

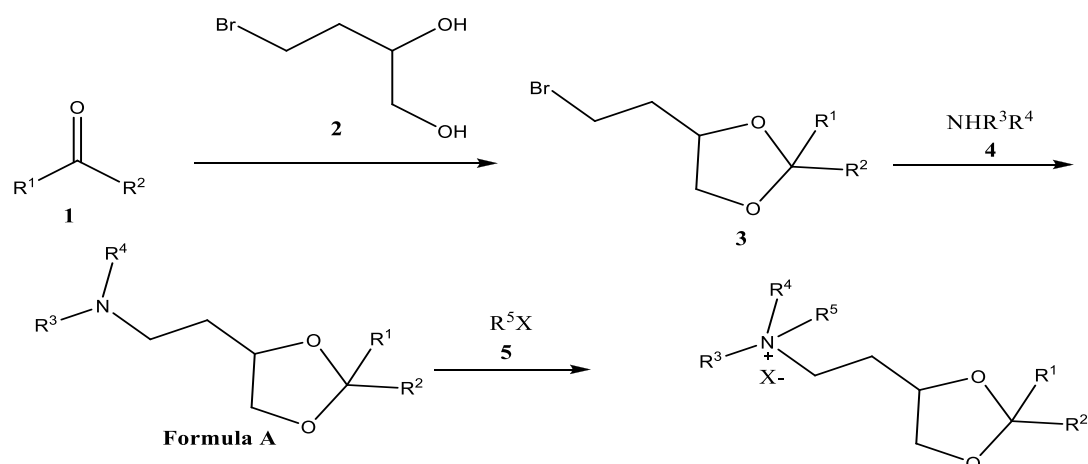
Síntese da Fórmula A

[00450] Em algumas modalidades, partículas de ácido nucleico-lipídeo da invenção são formuladas usando um lipídeo catiônico de fórmula A:



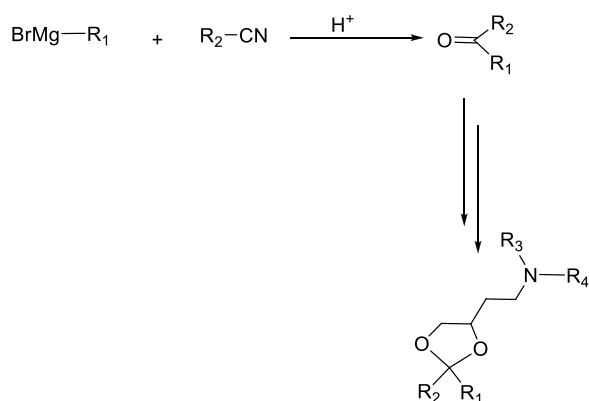
[00451] onde R1 e R2 são independentemente alquila, alquenila ou alquinila, cada uma pode estar opcionalmente substituída, e R3 e R4 são independentemente alquila inferior ou R3 e R4 podem ser tomados em conjunto para formar um anel heterocíclico opcionalmente substituído. Em algumas modalidades, o lipídeo catiônico é XTC (2,2-Dilinoleíl-4-dimetilaminoetil-[1,3]-dioxolano). Em geral, o lipídeo de fórmula A acima pode ser preparado pelos seguintes Esquemas Reacionais 1 ou 2, em que todos os substituintes são como definido acima a menos que indicado em contrário.

Esquema 1



[00452] O lipídeo A, em que R1 e R2 são independentemente alquila, alcenila ou alcinila, em que cada um pode estar opcionalmente substituído, e R3 e R4 são independentemente alquila de cadeia curta ou R3 e R4 podem ser tomados em conjunto para formar um anel heterocíclico opcionalmente substituído, pode ser preparado de acordo com o Esquema 1. A cetona 1 e o brometo 2 podem ser comprados ou preparados de acordo com métodos conhecidos daqueles com perícia ordinária na técnica. A reação de 1 e 2 origina o cetral 3. O tratamento do cetral 3 com a amina 4 origina lipídeos da fórmula A. Os lipídeos da fórmula A podem ser convertidos no correspondente sal de amônio com um sal orgânico da fórmula 5, onde X é um contraíon aniônico selecionado de halogênio, hidróxido, fosfato, sulfato, ou similares.

Esquema 2



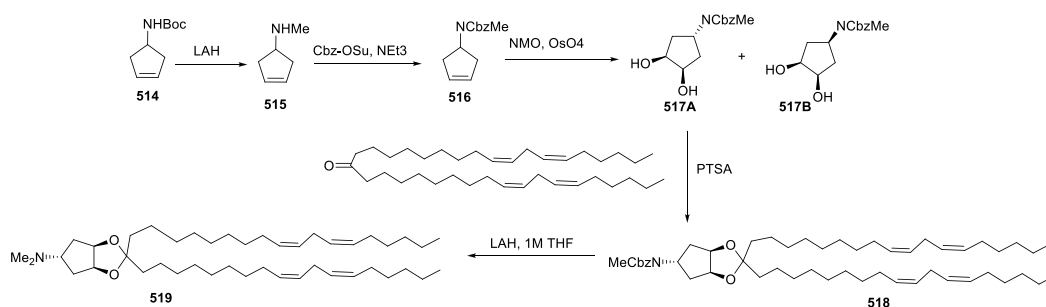
[00453] Alternativamente, o material de início cetona 1 pode ser preparado de acordo com o Esquema 2. O reagente de Grignard 6 e o cianeto 7 podem ser comprados ou preparados de acordo com métodos conhecidos daqueles com perícia ordinária na técnica. A reação de 6 e 7 origina a cetona 1. A conversão da cetona 1 nos correspondentes lipídeos de fórmula A é como descrito no Esquema 1.

Síntese de MC3

[00454] A preparação de DLin-M-C3-DMA (isto é, 4-(dimetilamino)butanoato de (6Z,9Z,28Z,31Z)-heptatriaconta-6,9,28,31-tetraen-19-ila) foi realizada do modo seguinte. Uma solução de

(6Z,9Z,28Z,31Z)-heptatriaconta-6,9,28,31-tetraen-19-ol (0,53 g), hidrocloreto do ácido 4-N,N-dimetilaminobutírico (0,51 g), 4-N,N-dimetilaminopiridina (0,61 g) e hidrocloreto de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (0,53 g) em diclorometano (5 mL) foi agitada à temperatura ambiente durante uma noite. A solução foi lavada com ácido clorídrico diluído seguido de bicarbonato de sódio aquoso diluído. As frações orgânicas foram secas sobre sulfato de magnésio anidro, filtradas e o solvente foi removido em um rotovap. O resíduo foi passado em uma coluna de sílica gel (20 g) usando um gradiente de eluição de metanol/diclorometano a 1-5 %. As frações contendo o produto purificado foram combinadas e o solvente removido, originando um óleo incolor (0,54 g). *Síntese de ALNY-100*

A síntese do cetel 519 [ALNY-100] foi realizada usando o seguinte esquema 3:



Síntese de 515

[00455] A uma suspensão agitada de LiAlH_4 (3,74 g, 0,09852 mol) em 200 mL de THF anidro em um BFR de duas tubuladuras (1 L) foi adicionada uma solução de 514 (10 g, 0,04926 mol) em 70 mL de THF lentamente a 0 °C sob atmosfera de nitrogênio. Após adição completa, a mistura reacional foi aquecida até à temperatura ambiente e depois aquecida até ao refluxo durante 4 horas. A progressão da reação foi monitorada por TLC. Após completção da reação (por TLC), a mistura foi resfriada até 0 °C e extinta com adição cuidadosa de solução saturada de Na_2SO_4 . A mistura reacional foi agitada durante 4 horas à temperatura ambiente e filtrada. O resíduo foi bem lavado com THF. O

filtrado e as lavagens foram misturados e diluídos com 400 mL de dioxano e 26 mL de HCl conc. e agitados durante 20 minutos à temperatura ambiente. As volatilidades foram extraídas sob vácuo para originar o sal hidrocloreto de 515 como um sólido branco. Rendimento: 7,12 g $^1\text{H-NMR}$ (DMSO, 400 MHz): δ = 9,34 (largo, 2H), 5,68 (s, 2H), 3,74 (m, 1H), 2,66-2,60 (m, 2H), 2,50-2,45 (m, 5H).

Síntese de 516

[00456] A uma solução agitada do composto 515 em 100 mL de DCM seco em um BFR de duas tubuladuras de 250 mL foi adicionado NEt_3 (37,2 mL, 0,2669 mol) e resfriado até 0 °C sob atmosfera de nitrogênio. Após uma adição lenta de N-(benziloxi-carboniloxi)-succinimida (20 g, 0,08007 mol) em 50 mL de DCM seco, se permitiu que a mistura reacional aquecesse até à temperatura ambiente. Após completção da reação (2-3 h por TLC), a mistura foi lavada sucessivamente com solução de HCl a 1 N (1 x 100 mL) e solução saturada de NaHCO_3 (1 x 50 mL). A camada orgânica foi depois seca sobre Na_2SO_4 anid. e o solvente foi evaporado para dar material em bruto que foi purificado por cromatografia em coluna de sílica gel para se obter 516 como massa pegajosa. Rendimento: 11 g (89 %). $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): δ = 7,36-7,27 (m, 5H), 5,69 (s, 2H), 5,12 (s, 2H), 4,96 (la., 1H), 2,74 (s, 3H), 2,60 (m, 2H), 2,30-2,25 (m, 2H). LC-MS $[\text{M}+\text{H}]^-$ -232,3 (96,94 %).

Síntese de 517A e 517B

[00457] O ciclopenteno 516 (5 g, 0,02164 mol) foi dissolvido em uma solução de 220 mL de acetona e água (10:1) em um BFR de uma tubuladura de 500 mL e foi-lhe adicionado morfolina-N-óxido de N-metila (7,6 g, 0,06492 mol) seguido de 4,2 mL de solução de OsO_4 a 7,6 % (0,275 g, 0,00108 mol) em *tert*-butanol à temperatura ambiente. Após completção da reação (~ 3 h), a mistura foi extinta com adição de Na_2SO_3 sólido e a mistura resultante foi agitada durante 1,5 h à temperatura ambiente. A mistura reacional foi diluída com DCM (300

mL) e lavada com água (2 x 100 mL) seguido de solução saturada de NaHCO_3 (1 x 50 mL), água (1 x 30 mL) e finalmente com salmoura (1 x 50 mL). A fase orgânica foi seca sobre Na_2SO_4 an. e o solvente foi removido *in vacuo*. A purificação cromatográfica em coluna de sílica gel do material em bruto foi originada uma mistura de diastereômeros, que foram separados por HPLC prepa. Rendimento: - 6 g em bruto

[00458] 517A - Pico 1 (sólido branco), 5,13 g (96 %). $^1\text{H-NMR}$ (DMSO, 400 MHz): δ = 7,39-7,31 (m, 5H), 5,04 (s, 2H), 4,78-4,73 (m, 1H), 4,48-4,47 (d, 2H), 3,94-3,93 (m, 2H), 2,71 (s, 3H), 1,72-1,67 (m, 4H). LC-MS - $[\text{M}+\text{H}]$ -266,3, $[\text{M}+\text{NH}_4^+]$ -283,5 presente, HPLC-97,86 %. Estereoquímica confirmada por raios X.

Síntese de 518

[00459] Usando um procedimento análogo àquele descrito para a síntese do composto 505, o composto 518 (1,2 g, 41 %) foi obtido como um óleo incolor. $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): δ = 7,35-7,33 (m, 4H), 7,30-7,27 (m, 1H), 5,37-5,27 (m, 8H), 5,12 (s, 2H), 4,75 (m, 1H), 4,58-4,57 (m, 2H), 2,78-2,74 (m, 7H), 2,06-2,00 (m, 8H), 1,96-1,91 (m, 2H), 1,62 (m, 4H), 1,48 (m, 2H), 1,37-1,25 (m, 36H), 0,87 (m, 6H). HPLC-98,65 %.

Procedimento Geral para a Síntese do Composto 519

[00460] Uma solução do composto 518 (1 eq) em hexano (15 mL) foi adicionada de um modo gota a gota a uma solução gelada de LAH em THF (1 M, 2 eq). Após adição completa, a mistura foi aquecida a 40 °C ao longo de 0,5 h, depois resfriada novamente em um banho de gelo. A mistura foi cuidadosamente hidrolisada com Na_2SO_4 aquoso saturado, depois filtrada através de celite e reduzida a um óleo. A cromatografia em coluna proporcionou o 519 puro (1,3 g, 68 %) que foi obtido como um óleo incolor. $^{13}\text{C NMR}$ δ = 130,2, 130,1 (x2), 127,9 (x3), 112,3, 79,3, 64,4, 44,7, 38,3, 35,4, 31,5, 29,9 (x2), 29,7, 29,6 (x2), 29,5 (x3), 29,3 (x2), 27,2 (x3), 25,6, 24,5, 23,3, 2,6, 14,1; Eletropulverização MS (+ve): Peso molecular para $\text{C}_{44}\text{H}_{80}\text{NO}_2$ (M + H)⁺ Calc. 654,6, Experimental 654,6.

[00461] As formulações preparadas pelo método padrão ou isento de extrusão podem ser caracterizadas de modos similares. Por exemplo, as formulações são tipicamente caracterizadas por inspeção visual. Devem ser soluções translúcidas esbranquiçadas isentas de agregados ou sedimento. O tamanho das partículas e a distribuição do tamanho das partículas de nanopartículas de lipídeo podem ser medidos por dispersão de luz usando, por exemplo, um Malvern Zetasizer Nano ZS (Malvern, EUA). As partículas devem ter um tamanho de cerca de 20-300 nm, tal como 40-100 nm. A distribuição do tamanho das partículas deve ser unimodal. A concentração total de dsRNA na formulação, bem como a fração aprisionada, é estimada usando um ensaio de exclusão de corante. Uma amostra do dsRNA formulado pode ser incubada com um corante de ligação a RNA, tal como Ribogreen (Molecular Probes), na presença ou ausência de um tensioativo desagregador da formulação, por exemplo, Triton-X100 a 0,5 %. O dsRNA total presente na formulação pode ser determinado pelo sinal da amostra contendo o tensioativo, em relação a uma curva padrão. A fração aprisionada é determinada por subtração do conteúdo de dsRNA “livre” (como medido pelo sinal na ausência de tensioativo) do conteúdo de dsRNA total. A percentagem de dsRNA aprisionado é tipicamente >85 %. Para formulação de LNP, o tamanho das partículas é pelo menos 30 nm, pelo menos 40 nm, pelo menos 50 nm, pelo menos 60 nm, pelo menos 70 nm, pelo menos 80 nm, pelo menos 90 nm, pelo menos 100 nm, pelo menos 110 nm, e pelo menos 120 nm. A gama adequado é tipicamente cerca de pelo menos 50 nm a cerca de pelo menos 110 nm, cerca de pelo menos 60 nm a cerca de pelo menos 100 nm, ou cerca de pelo menos 80 nm a cerca de pelo menos 90 nm.

[00462] 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 aglutinantes. Em algumas modalidades, formulações orais são aquelas nas quais dsRNAs apresentados na invenção são administrados em conjunção com um ou mais surfactantes intensificadores da penetração e queladores. Tensioativos adequados incluem ácidos graxos e/ou seus ésteres ou sais, ácidos biliares e/ou seus sais. Ácidos biliares/sais adequados incluem ácido quenodeoxicólico (CDCA) e ácido ursodeoxiquenodeoxicólico (UDCA), ácido cólico, ácido desidrocólico, ácido deoxicólico, ácido glucocólico, ácido glicocólico, ácido glicodeoxicólico, ácido taurocólico, ácido taurodeoxicólico, tauro-24,25-diidro-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, monooleína, 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 exemplar 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; poliiminas; poliacrilatos; polialquilacrilatos, polioxetanos, polialquilcianoacrilatos; gelatinas cationizadas, albuminas, amidos, acrilatos, polietilenoglicóis (PEG) e amidos; polialquilcianoacrilatos;

poliiminas derivatizadas com DEAE, pululanas, celulosas e amidos. Agentes de complexação adequados incluem quitosana, N-trimetilquitosana, poli-L-lisina, polihistidina, poliornitina, poliesperminas, protamina, polivinilpiridina, politiodietilaminometileno 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.

[00463] Composições e formulações para administração parentérica, intraparênquima (no interior do cérebro), intratecal, intraventricular ou intrahepática podem incluir soluções aquosas esterilizadas que também podem conter tampões, diluentes e outros aditivos adequados, tais como mas não se limitando a intensificadores da penetração, compostos carreadores e outros veículos ou excipientes farmacêuticamente aceitáveis.

[00464] As composições farmacêuticas da presente invenção incluem, mas não estão limitadas a soluções, emulsões, e formulações contendo lipossomos. 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 preferidas formulações que têm como alvo o fígado ao tratar distúrbios hepáticos, como carcinoma hepático.

[00465] As formulações farmacêuticas da presente invenção, que podem ser convenientemente apresentadas em forma galênica unitária,

podem ser preparadas de acordo com técnicas convencionais bem conhecidas na indústria farmacêutica. Tais técnicas incluem o passo de colocar em associação os ingredientes ativos com o(s) veículo(s) ou excipiente(s) farmacêutico(s). Em geral, as formulações são preparadas por colocação em associação uniforme e íntima dos ingredientes ativos com veículos líquidos ou veículos sólidos finamente divididos ou ambos, e depois, se necessário, moldagem do produto.

[00466] As composições da presente invenção podem ser formuladas em qualquer uma de muitas formas galênicas 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 também podem ser 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 também pode conter estabilizadores.

C. Formulações Adicionais

i. Emulsões

[00467] As composições da presente invenção podem ser preparadas e formuladas como emulsões. Emulsões são tipicamente sistemas heterogêneos de um líquido disperso em outro na forma de gotículas com um diâmetro usualmente excedendo 0,1 μm (ver, por exemplo, *Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems*, Allen, LV., Popovich NG., e Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8ª ed.), Nova Iorque, NI; Idson, em *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger e Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nova Iorque, N.I., volume 1, p. 199; Rosoff, em *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger e Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nova Iorque, N.I., Volume 1, p. 245; Block

em *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger e Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nova Iorque, N.I., 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, como emulsificantes, estabilizadores, corantes, e antioxidantes, também podem estar presentes em emulsões, consoante o necessário. Emulsões farmacêuticas também podem ser emulsões múltiplas que são compreendidas de mais de 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.

[00468] As emulsões são caracterizadas por estabilidade termodinâmica pequena ou nula. Frequentemente, a fase dispersa ou

descontínua da emulsão é bem dispersa na fase externa ou contínua e mantida em esta forma através dos meios de emulsificantes ou da viscosidade da formulação. Qualquer uma das fases da emulsão pode ser um semissólido ou um sólido, como no caso de bases e cremes de unguentos do estilo emulsão. Outros meios de estabilizar emulsões implicam a utilização de emulsificantes que podem ser incorporados em qualquer uma das fases da emulsão. Os emulsificantes podem ser amplamente classificados em quatro categorias: tensioativos sintéticos, emulsificantes ocorrendo naturalmente, 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 (8ª ed.), Nova Iorque, NI; Idson, em *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger e Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nova Iorque, N.I., volume 1, p. 199).

[00469] Os tensioativos, também conhecidos como agentes com superfície ativa, sintéticos têm encontrado 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 (8ª ed.), Nova Iorque, NI; Rieger, em *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger e Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nova Iorque, N.I., volume 1, p. 285; Idson, em *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger e Banker (Eds.), Marcel Dekker, Inc., Nova Iorque, N.I., 1988, volume 1, p. 199). Os tensioativos são tipicamente anfifílicos e compreendem uma porção hidrofílica e uma hidrofóbica. A razão da natureza hidrofílica em relação à hidrofóbica do tensioativo foi denominada equilíbrio hidrófilo/lipófilo (HLB) e é uma ferramenta valiosa na categorização e seleção de tensioativos na preparação de formulações. Os tensioativos podem ser classificados em diferentes classes com base na natureza do grupo hidrofílico: não iônico, aniônico,

catiônico e anfotérico (ver, por exemplo, *Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems*, Allen, LV., Popovich NG., e Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8ª ed.), Nova Iorque, NI, Rieger, em *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger e Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nova Iorque, N.I., volume 1, p. 285).

[00470] 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 também sido usados como bons emulsificantes, especialmente em combinação com tensioativos 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.

[00471] 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 graxos, umectantes, coloides hidrofílicos, conservantes e antioxidantes (Block, em *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger e Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nova Iorque, N.I., volume 1, p. 335; Idson, em *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger e Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nova Iorque, N.I., volume 1, p.199).

[00472] Coloides hidrofílicos ou hidrocoloides incluem gomas ocorrendo naturalmente e polímeros sintéticos tais como polissacarídeos (por exemplo, acácia, ágar, ácido alginico,

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 redor das gotículas da fase dispersa e por aumento da viscosidade da fase externa.

[00473] Uma vez que emulsões contêm muitas vezes alguns ingredientes, tais como carboidratos, proteínas, esteróis e fosfatídeos, que podem facilmente suportar o crescimento de micróbios, é frequente estas formulações incorporarem 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, como ácido cítrico, ácido tartárico, e lecitina.

[00474] A aplicação de formulações de emulsão através de rotas dermatológicas, orais e parenterais e métodos para sua preparação 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 (8ª ed.), Nova Iorque, NY; Idson, em *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger e Banker (Edits.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nova Iorque, N.I., volume 1, p. 199). Formulações de emulsão para distribuição oral têm sido muito amplamente usadas devido à facilidade de formulação, bem como

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 (8ª ed.), Nova Iorque, NY; Rosoff, em *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger e Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nova Iorque, N.Y., volume 1, p. 245; Idson, em *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger e Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nova Iorque, 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

[00475] 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 única opticamente isotrópica e termodinamicamente estável (ver, por exemplo, *Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems*, Allen, LV., Popovich NG., e Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8ª ed.), Nova Iorque, NY; Rosoff, em *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger e Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nova Iorque, 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 tensioativo 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, Nova Iorque, páginas 185-215). As microemulsões são comumente preparadas através de uma combinação de três a cinco componentes que incluem óleo, água, tensioativo, cotensioativo e eletrólito. Se a microemulsão é do tipo água-em-óleo (w/o) ou óleo-em-água (o/w) está dependente das propriedades do óleo e tensioativo usados e da estrutura e empacotamento geométrico das cabeças polares e caudas de hidrocarbonetos das moléculas de tensioativo (Schott, em *Remington's Pharmaceutical Sciences*, Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1985, p. 271).

[00476] A abordagem fenomenológica utilizando diagramas de fase tem sido extensamente estudada e originou um conhecimento abrangente, para um perito na técnica, de como formular microemulsões (ver, por exemplo, *Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems*, Allen, LV., Popovich NG., e Ansel HC., 2004, Lippincott Williams & Wilkins (8ª ed.), Nova Iorque, NY; Rosoff, em *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger e Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nova Iorque, N.Y., volume 1, p. 245; Block, em *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger e Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., Nova Iorque, 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.

[00477] Os tensioativos usados na preparação de microemulsões incluem, mas não estão limitados a, tensioativos iônicos, tensioativos 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 tensioativo e consequentemente criação de um filme desordenado devido ao espaço vazio gerado entre moléculas de tensioativo. No entanto, microemulsões podem ser preparadas sem a utilização de cossurfactantes, e sistemas de microemulsão autoemulsificantes desprovidos de álcool são conhecidos na área. 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 oleosa pode incluir, mas não está limitada a materiais 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, C8-C10 glicerídeos saturados poliglicolizados, óleos vegetais e óleo de silicone.

[00478] 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. Nos. 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 tensioativos, 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. Nos. 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). Muitas vezes, microemulsões podem se formar espontaneamente quando seus componentes são reunidos à temperatura ambiente. Isto pode ser particularmente vantajoso na formulação de fármacos termicamente instáveis, peptídeos ou RNAs. As microemulsões têm sido também eficazes na distribuição transdérmica de componentes ativos em aplicações cosméticas e farmacêuticas. É esperado que as composições e formulações de microemulsão da presente invenção facilitarão 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.

[00479] Microemulsões da presente invenção também podem conter componentes e aditivos suplementares, 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 - tensioativos, ácidos graxos, sais biliares, agentes quelantes, e não tensioativos não quelantes (Lee *et al.*, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, p. 92). Cada uma destas classes foi discutida acima.

iii. Micropartículas

[00480] Um agente de RNAi da invenção pode ser incorporado em uma partícula, por exemplo, uma micropartícula. Micropartículas podem

ser produzidas mediante secagem por pulverização, mas também podem ser produzidas por outros métodos, incluindo liofilização, evaporação, secagem em leito fluidizado, secagem por vácuo, ou uma combinação dessas técnicas.

iv. Intensificadores da Penetração

[00481] 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.

[00482] Os intensificadores da penetração podem ser classificados como pertencendo a uma de cinco amplas categorias, *i.e.*, tensioativos, ácidos graxos, sais biliares, agentes quelantes, e não tensioativos não quelantes (ver, por exemplo, Malmsten, M. *Surfactants and polymers in drug delivery*, Informa Health Care, Nova Iorque, 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.

[00483] Surfactantes (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 a 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, Nova Iorque, 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).

[00484] 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 (*i.e.*, oleato, laurato, caprato, miristato, palmitato, estearato, linoleato, *etc.*) (ver, por exemplo, Tavitou, 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).

[00485] O papel fisiológico da bÍlis inclui a facilitação da dispersão e absorção de lípÍdeos e vitaminas solúveis em gordura (ver, por exemplo, Malmsten, M. *Surfactants and polymers in drug delivery*, Informa Health Care, Nova Iorque, NY, 2002; Brunton, Capítulo 38 em: *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 9ª Ed., Hardman *et al.* Eds., McGraw-Hill, Nova Iorque, 1996, pp. 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 desidrocólico (desidrocolato de sódio), ácido desoxicólico (desoxicolato de sódio), ácido glucocólico (glucocolato de sódio), ácido glicocólico (glicocolato de sódio), ácido glicodesoxicólico (glicodesoxicolato de sódio), ácido taurocólico (taurocolato de sódio), ácido taurodesoxicólico (taurodesoxicolato de sódio), ácido quenodesoxicólico (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, Nova Iorque, NY, 2002; Lee *et al.*, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, p. 92; Swinyard, Capítulo 39 Em: *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18^a 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).

[00486] Agentes quelantes, como usado 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 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 etilenodiaminotetraacetato dissódico (EDTA), ácido cítrico, salicilatos (por exemplo, salicilato de sódio, 5-metoxisalicilato e homovanilato), derivados de N-acila de colagênio, derivados de lauret-

9 e N-amino acila 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).

[00487] Como usado aqui, compostos intensificadores da penetração não tensioativos não quelantes podem ser definidos como compostos que demonstram atividade insignificante como agentes quelantes ou como tensioativos 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-alkenilazacicloalcanona (Lee *et al.*, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, página 92); e agentes anti-inflamatórios não esteroides tais como diclofenac sódio, indometacina e fenilbutazona (Yamashita *et al.*, *J. Pharm. Pharmacol.*, 1987, 39, 621-626).

[00488] Agentes que aumentam a captação de RNAs ao nível celular também podem ser 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), Reagente de Transfecção X-tremeGENE Q2 (Roche; Grenzacherstrasse, Suíça), Reagente de Transfecção Lipossômica DOTAP (Grenzacherstrasse, Suíça), Reagente de Transfecção Lipossômica DOSPER (Grenzacherstrasse, Suíça), ou Fugene (Grenzacherstrasse, Suíça), Reagente Transfectam® (Promega; Madison, WI), Reagente de Transfecção TransFast™ (Promega; Madison, WI), Reagente Tfx™-20 (Promega; Madison, WI), Reagente Tfx™-50 (Promega; Madison, WI), DreamFect™ (OZ Biosciences; Marselha, França), EcoTransfect (OZ Biosciences; Marselha, França), Reagente de Transfecção TransPass^a D1 (New England Biolabs; Ipswich, MA, EUA), LyoVec™/LipoGen™ (Invitrogen; San Diego, CA, EUA), Reagente de Transfecção PerFectina (Genlantis; San Diego, CA, EUA), Reagente de Transfecção NeuroPORTER (Genlantis; San Diego, CA, EUA), reagente de Transfecção GenePORTER (Genlantis; San Diego, CA, EUA), reagente de Transfecção GenePORTER 2 (Genlantis; San Diego, CA, EUA), Reagente de Transfecção Cytofectina (Genlantis; San Diego, CA, EUA), Reagente de Transfecção BaculoPORTER (Genlantis; San Diego, CA, EUA), Reagente de transfecção TroganPORTER™ (Genlantis; San Diego, CA, EUA), RiboFect (Bioline; Taunton, MA, EUA), PlasFect (Bioline; Taunton, MA, EUA), UniFECTOR (B-Bridge International; Mountain View, CA, EUA), SureFECTOR (B-Bridge International; Mountain View, CA, EUA), ou HiFect™ (B-Bridge International; Mountain View, CA, EUA), entre outros.

[00489] Podem ser utilizados outros agentes para intensificar a penetração dos ácidos nucleicos administrados, incluindo glicóis, como etileno glicol e propileno glicol, pirróis, como 2-pirrol, azonas, e terpenos, como limoneno e mentona.

v. Carreadores

[00490] Certas composições da presente invenção incorporam também compostos carreadores na formulação. Como usado aqui, "composto carreador" ou "carreador" pode se referir a um ácido nucleico, ou seu análogo, que é inerte (*i.e.*, 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 carreador, 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 carreador 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 poliinosínico, 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

[00491] Em contraste com um composto carreador, um "veículo farmacêutico" ou "excipiente" é um solvente, agente de suspensão farmaceuticamente aceitável ou qualquer outro veículo farmacologicamente inerte para distribuição de um ou mais ácidos nucleicos a um animal. O excipiente pode ser líquido ou sólido e é selecionado, tendo em mente o modo de administração planejado, de modo a proporcionar o volume, consistência, *etc.*, desejados quando combinado com um ácido nucleico e os outros componentes de uma dada composição farmacêutica. Veículos 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.*).

[00492] Excipientes orgânicos ou inorgânicos farmacologicamente aceitáveis adequados para administração não parenteral que não reagem prejudicialmente com ácidos nucleicos podem ser também usados para formular as composições da presente invenção. Veículos 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.

[00493] Formulações para administração tópica de ácidos nucleicos podem incluir soluções aquosas esterilizadas ou não esterilizadas, soluções não aquosas em solventes comuns, como álcoois, ou soluções dos ácidos nucleicos em bases oleosas líquidas ou sólidas. As soluções também podem conter tampões, diluentes e outros aditivos adequados. Podem ser usados excipientes orgânicos ou inorgânicos farmacologicamente aceitáveis adequados para administração não parenteral que não reagem prejudicialmente com ácidos nucleicos.

[00494] Excipientes farmacologicamente aceitáveis adequados incluem, mas não estão limitados a, água, soluções salinas, álcool, polietileno glicóis, gelatina, lactose, amilose, estearato de magnésio, talco, ácido silícico, parafina viscosa, hidroximetilcelulose, polivinilpirrolidona e similares.

vii. Outros Componentes

[00495] As composições da presente invenção podem adicionalmente conter outros componentes adjuntos convencionalmente presentes em composições farmacêuticas, a seus níveis de utilização estabelecidos na área. Assim, por exemplo, as composições podem conter materiais adicionais, compatíveis e farmaceuticamente ativos, tais como, por exemplo, antipruríticos, adstringentes, anestésicos locais ou agentes anti-inflamatórios, ou podem conter materiais adicionais úteis na formulação física de várias formas galênicas das composições da presente invenção, como corantes, agentes aromatizantes, conservantes, antioxidantes, opacificantes, agentes espessantes e estabilizadores. 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.

[00496] Suspensões aquosas podem conter substâncias que aumentam a viscosidade da suspensão, incluindo, por exemplo, carboximetilcelulose sódica, sorbitol e/ou dextrana. A suspensão também pode conter estabilizadores.

[00497] 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 de RNAi e que são úteis no tratamento de um distúrbio de sangramento. Exemplos de tais agentes incluem mas não estão limitados a um agente anti-inflamatório, agente antiesteatose, agente antiviral, e/ou antifibrose.

Adicionalmente, outras substâncias comumente usadas para proteger o fígado, tais como silimarina, podem ser também usadas em conjunto com os RNAs descritos aqui. Outros agentes úteis para tratamento de doenças do fígado incluem telbivudina, entecavir, e inibidores de proteases tais como telaprevir, e outros divulgados, por exemplo, em Tung *et al.*, Publicações de Pedidos dos E.U.A. Nos. 2005/0148548, 2004/0167116, e 2003/0144217; e em Hale *et al.*, Publicação de Pedido dos E.U.A. No. 2004/0127488.

[00498] 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 preferidos compostos que exibem altos índices terapêuticos.

[00499] Os dados obtidos de ensaios de cultura celular e estudos animais podem ser usados na formulação de uma gama de dosagens para uso em 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 via 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 se 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 (*i.e.*, 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 humanos. Níveis no plasma podem ser mensurados, por exemplo, mediante cromatografia líquida de alto desempenho.

[00500] Adicionalmente à sua administração, como discutido acima, os RNAsi apresentados na invenção podem ser administrados em combinação com outros agentes conhecidos eficazes no tratamento de processos patológicos mediados por expressão de PCSK9. 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.

IV. Métodos para Inibição da Expressão de PCSK9

[00501] A presente invenção proporciona métodos de inibição da expressão de uma Pró-proteína Convertase Subtilisina Quexina 9 (PCSK9) em uma célula. Os métodos incluem contato de uma célula com um agente de RNAi, por exemplo, um agente de RNAi de fita dupla, em uma quantidade eficaz para inibir a expressão da PCSK9 na célula, inibindo deste modo a expressão da PCSK9 na célula.

[00502] O contato de uma célula com um agente de RNAi de fita dupla pode ser feito *in vitro* ou *in vivo*. O contato de uma célula *in vivo* com o agente de RNAi inclui contato de uma célula ou grupo de células dentro de um indivíduo, por exemplo, um indivíduo humano, com o agente de RNAi. Combinações de métodos de contato *in vitro* e *in vivo* são também possíveis. O contato pode ser direto ou indireto, como discutido acima. Além do mais, o contato de uma célula pode ser alcançado através de um ligante de direcionamento, incluindo qualquer ligante descrito aqui ou conhecido na técnica. Em modalidades, o ligante de direcionamento é uma fração carboidrato, por exemplo, um ligante

de GalNAc, ou qualquer outro ligante que dirige o agente de RNAi a um local de interesse, por exemplo, o fígado de um indivíduo.

[00503] O termo "inibição", como usado aqui, é usado indistintamente com "redução", "silenciamento", "infrarregulação" e outros termos similares, e inclui qualquer nível de inibição.

[00504] A frase "inibição da expressão de uma PCSK9" se destina a se referir a inibição da expressão de qualquer gene de PCSK9 (tal como, por exemplo, um gene de PCSK9 de camundongo, um gene de PCSK9 de rato, um gene de PCSK9 de macaco, ou um gene de PCSK9 de humano) bem como variantes ou mutantes de um gene de PCSK9. Assim, o gene de PCSK9 pode ser um gene de PCSK9 de tipo selvagem, um gene de PCSK9 mutante, ou um gene de PCSK9 transgênico no contexto de uma célula, grupo de células, ou organismo geneticamente manipulado.

[00505] "Inibição da expressão de um gene de PCSK9" inclui qualquer nível de inibição de um gene de PCSK9, por exemplo, supressão pelo menos parcial da expressão de um gene de PCSK9. A expressão do gene de PCSK9 pode ser avaliada com base no nível, ou na mudança no nível, de qualquer variável associada à expressão do gene de PCSK9, por exemplo, nível de RNAm de PCSK9, nível de proteína PCSK9, ou níveis de lipídeos. Este nível pode ser avaliado em uma célula individual ou em um grupo de células, incluindo, por exemplo, uma amostra derivada de um indivíduo.

[00506] A inibição pode ser avaliada por uma diminuição em um nível absoluto ou relativo de uma ou mais variáveis que estão associadas à expressão de PCSK9 em comparação com um nível de controle. O nível de controle pode ser qualquer tipo de nível de controle que seja utilizado na técnica, por exemplo, um nível de linha de base pré-dose, ou um nível determinado a partir de um indivíduo, célula, ou amostra similar que não é tratado ou tratado com um controle (tal como, por exemplo, controle só com tampão ou controle com agente inativo).

[00507] Em algumas modalidades dos métodos da invenção, a expressão de um gene de PCSK9 é inibida por pelo menos cerca de 5 %, pelo menos cerca de 10 %, pelo menos cerca de 15 %, pelo menos cerca de 20 %, pelo menos cerca de 25 %, pelo menos cerca de 30 %, pelo menos cerca de 35 %, pelo menos cerca de 40 %, pelo menos cerca de 45 %, pelo menos cerca de 50 %, pelo menos cerca de 55 %, pelo menos cerca de 60 %, pelo menos cerca de 65 %, pelo menos cerca de 70 %, pelo menos cerca de 75 %, pelo menos cerca de 80 %, pelo menos cerca de 85 %, pelo menos cerca de 90 %, pelo menos cerca de 91 %, pelo menos cerca de 92 %, pelo menos cerca de 93 %, pelo menos cerca de 94 %, pelo menos cerca de 95 %, pelo menos cerca de 96 %, pelo menos cerca de 97 %, pelo menos cerca de 98 %, ou pelo menos cerca de 99 %.

[00508] A inibição da expressão de um gene de PCSK9 pode ser manifestada por uma redução da quantidade de RNAm expressa por uma primeira célula ou grupo de células (tais células podem estar presentes, por exemplo, em uma amostra derivada de um indivíduo) no qual um gene de PCSK9 é transcrito e que foi ou foram tratado(s) (por exemplo, por contato da célula ou células com um agente de RNAi da invenção, ou por administração de um agente de RNAi da invenção a um indivíduo no qual as células estão ou estiveram presentes) tal que a expressão de um gene de PCSK9 seja inibida, em comparação com uma segunda célula ou grupo de células substancialmente idêntico à primeira célula ou grupo de células mas que não foi ou foram assim tratado(s) (célula(s) de controle). Em modalidades, a inibição é avaliada por expressão do nível de RNAm em células tratadas como uma percentagem do nível de RNAm em células de controle, usando a seguinte fórmula:

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

[00509] Alternativamente, a inibição da expressão de um gene de PCSK9 pode ser avaliada em termos de uma redução de um parâmetro que está funcionalmente ligado à expressão do gene de PCSK9, por exemplo, expressão da proteína PCSK9, tal como níveis de lipídeos, níveis de colesterol, por exemplo, níveis de LDLc. O silenciamento do gene de PCSK9 pode ser determinado em qualquer célula expressando PCSK9, ou constitutivamente ou por manipulação genômica, e por qualquer ensaio conhecido na técnica. O fígado é o maior local da expressão de PCSK9. Outros locais de expressão significativos incluem o pâncreas, rim, e intestinos.

[00510] A inibição da expressão de uma proteína PCSK9 pode ser manifestada por uma redução no nível da proteína PCSK9 que é expressa por uma célula ou grupo de células (por exemplo, no nível de proteína expressa em uma amostra derivada de um indivíduo). Como explicado acima para a avaliação da supressão de RNAm, a inibição dos níveis de expressão de proteína em uma célula ou grupo de células não tratado pode ser similarmente expressa como uma percentagem do nível de proteína em uma célula ou grupo de células de controle.

[00511] Uma célula ou grupo de células de controle que pode ser usado para avaliar a inibição da expressão de um gene de PCSK9 inclui uma célula ou grupo de células que não foi ainda contatado com um agente de RNAi da invenção. Por exemplo, a célula ou grupo de células de controle pode ser derivado de um indivíduo individual (por exemplo, um indivíduo humano ou animal) antes do tratamento do indivíduo com um agente de RNAi.

[00512] O nível de RNAm de PCSK9 que é expresso por uma célula ou grupo de células pode ser determinado usando qualquer método conhecido na técnica para avaliação da expressão de RNAm. Em uma modalidade, o nível de expressão de PCSK9 em uma amostra é determinado por detecção de um polinucleotídeo transcrito, ou sua

porção, RNAm do gene de PCSK9. O RNA pode ser extraído de células usando técnicas de extração de RNA incluindo, por exemplo, uso de extração com fenol ácido/isotiocianato de guanidina (RNAzol B; Biogenesis), kits de preparação de RNA RNeasy (Qiagen) ou PAXgene (PreAnalytix, Suíça). Formatos de ensaio típicos utilizando hibridação de ácido ribonucleico incluem ensaios de operação nucleares, RT-PCR, ensaios de proteção RNase (Melton *et al.*, *Nuc. Acids Res.* 12:7035), transferência de Northern, hibridação *in situ*, e análise por microrrede.

[00513] Em uma modalidade, o nível de expressão de PCSK9 é determinado usando uma sonda de ácido nucleico. O termo "sonda", como usado aqui, se refere a qualquer molécula que é capaz de se ligar seletivamente a uma PCSK9 específica. As sondas podem ser sintetizadas por um com perícia na técnica, ou derivadas de preparações biológicas apropriadas. As sondas podem ser especificamente desenhadas para serem marcadas. Exemplos de moléculas que podem ser utilizadas como sondas incluem, mas não estão limitados a, RNA, DNA, proteínas, anticorpos, e moléculas orgânicas.

[00514] RNAm isolado pode ser usado em ensaios de hibridação ou amplificação que incluem, mas não estão limitados a, análises de Southern ou Northern, análises por reação em cadeia da polimerase (PCR) e redes de sonda. Um método para a determinação de níveis de RNAm envolve contato do RNAm isolado com uma molécula de ácido nucleico (sonda) que pode hibridar com RNAm de PCSK9. Em uma modalidade, o RNAm é imobilizado em uma superfície sólida e contatado com uma sonda, por exemplo por uso do RNAm isolado em um gel de agarose e transferência do RNAm do gel para uma membrana, tal como nitrocelulose. Em uma modalidade, a(s) sonda(s) são imobilizadas em uma superfície sólida e o RNAm é contatado com a(s) sonda(s), por exemplo, em uma rede de *chip* de genes Affymetrix. Um especialista perito consegue prontamente adaptar métodos de

detecção de RNAm conhecidos para uso na determinação do nível de RNAm de PCSK9.

[00515] Um método alternativo para determinação do nível de expressão de PCSK9 em uma amostra envolve o processo de amplificação de ácido nucleico e/ou transcriptase reversa (para preparar cDNA) de por exemplo RNAm na amostra, por exemplo, por RT-PCR (a modalidade experimental apresentada em Mullis, 1987, Pat. dos E.U.A. No. 4,683,202), e reação em cadeia da ligase (Barany (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:189-193), replicação de sequência autossustentada (Guatelli *et al.* (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:1874-1878), sistema de amplificação transcricional (Kwoh *et al.* (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:1173-1177), Q-Beta Replicase (Lizardi *et al.* (1988) *Bio/Technology* 6:1197), replicação com círculo rolante (Lizardi *et al.*, Pat. dos E.U.A. No. 5,854,033) ou qualquer outro método de amplificação de ácidos nucleicos, seguido pela detecção das moléculas amplificadas usando técnicas bem conhecidas daqueles com perícia na técnica. Estes esquemas de detecção são especialmente úteis para a detecção de moléculas de ácido nucleico se tais moléculas estiverem presentes em números muito baixos. Em aspectos particulares da invenção, o nível de expressão de PCSK9 é determinado por RT-PCR fluorogênica quantitativa (*i.e.*, o Sistema TaqManTM).

[00516] Os níveis de expressão de RNAm de PCSK9 podem ser monitorizados usando uma transferência de membrana (tal como usada em análise de hibridação tal como Northern, Southern, *dot*, e similares), ou micropoços, tubos de amostra, géis, esférulas ou fibras (ou qualquer suporte sólido compreendendo ácidos nucleicos ligados). Ver Pat. dos E.U.A. Nos. 5,770,722, 5,874,219, 5,744,305, 5,677,195 e 5,445,934, que são incorporadas aqui por referência. A determinação do nível de expressão de PCSK9 pode também compreender uso de sondas de ácido nucleico em solução.

[00517] Em modalidades preferenciais, o nível de expressão de RNAm é avaliado usando ensaios de DNA ramificado (bDNA) ou PCR em tempo real (qPCR). O uso destes métodos é descrito e exemplificado nos Exemplos apresentados aqui.

[00518] O nível de expressão da proteína PCSK9 pode ser determinado usando qualquer método conhecido na técnica para a medição de níveis de proteína. Tais métodos incluem, por exemplo, eletroforese, eletroforese capilar, cromatografia líquida de elevado desempenho (HPLC), cromatografia em camada delgada (TLC), cromatografia por hiperdifusão, reações de precipitina de fluido ou gel, espectroscopia por absorção, um ensaio colorimétrico, ensaios espectrofotométricos, citometria de fluxo, imunodifusão (única ou dupla), imunoeletroforese, transferência de Western, radioimunoensaio (RIA), ensaios imunoabsorventes ligados a enzima (ELISAs), ensaios imunofluorescentes, ensaios eletroquimioluminescentes, e similares.

[00519] O termo "amostra" como usado aqui se refere a 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, linfa, urina, fluido cerebrospinal, saliva, fluidos oculares, e similares. Amostras teciduais podem incluir amostras de tecidos, órgãos ou regiões localizadas. Por exemplo, amostras podem ser derivadas de órgãos particulares, partes de órgãos, ou fluidos ou células no interior desses órgãos. Em certas modalidades, amostras podem ser derivadas do fígado (por exemplo, fígado inteiro ou certos segmentos do fígado ou certos tipos de células no fígado, tais como, por exemplo, hepatócitos). 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 derivado do indivíduo.

[00520] Em algumas modalidades dos métodos da invenção, o agente de RNAi é administrado a um indivíduo tal que o agente de RNAi seja distribuído a um local específico dentro do indivíduo. A inibição da expressão de PCSL9 pode ser avaliada usando medições do nível ou mudança no nível de RNAm de PCSK9 ou proteína PCSK9 em uma amostra derivada de fluido ou tecido do local específico dentro do indivíduo. Em modalidades preferenciais, o local é o fígado. O local pode ser também uma subseção ou subgrupo de células de qualquer um dos locais acima mencionados. O local pode também incluir células que expressam um tipo particular de receptor.

V. Métodos para Tratamento ou Prevenção de uma Doença Associada a PCSK9.

[00521] A presente invenção proporciona também métodos para tratamento ou prevenção de doenças e condições que podem ser moduladas por infrarregulação da expressão do gene de PCSK9. Por exemplo, as composições descritas aqui podem ser usadas para tratar lipidemia, por exemplo, uma hiperlipidemia e outras formas de desequilíbrio de lipídeos tais como hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia e as condições patológicas associadas a estes distúrbios tais como doenças do coração e circulatórias. Outras doenças e condições que podem ser moduladas por infrarregulação da expressão do gene de PCSK9 incluem doenças de armazenamento lisossomal incluindo, mas não limitadas a, doença de Niemann-Pick, doença de Tay-Sachs, Deficiência de lipase ácida lisossomal, e Doença de Gaucher. Os métodos incluem administração ao indivíduo de uma quantidade terapeuticamente eficaz ou profilaticamente eficaz de um agente de RNAi da invenção. Em algumas modalidades, o método inclui administração de uma quantidade eficaz de um siRNA de PCSK9 a um paciente tendo um genótipo de LDLR heterozigoto.

[00522] O efeito do gene de PCSK9 diminuído resulta

preferencialmente em uma diminuição nos níveis de LDLc (colesterol de lipoproteína de baixa densidade) no sangue, e mais particularmente no soro, do mamífero. Em algumas modalidades, os níveis de LDLs são diminuídos por pelo menos 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % ou mais, em comparação com níveis pré-tratamento.

[00523] Como usado aqui, um "indivíduo" inclui um humano ou animal não humano, preferencialmente um vertebrado, e mais preferencialmente um mamífero. Um indivíduo pode incluir um organismo transgênico. O mais preferencialmente, o indivíduo é um humano, tal como um humano sofrendo de ou predisposto a desenvolver uma doença associada a PCSK9.

[00524] Em algumas modalidades dos métodos da invenção, a expressão de PCSK9 é diminuída durante uma duração prolongada, por exemplo, pelo menos uma semana, duas semanas, três semanas, ou quatro semanas ou mais tempo. Por exemplo, em certos casos, a expressão do gene de PCSK9 é suprimida por pelo menos cerca de 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, ou 50 % por administração de um agente de RNAi descrito aqui. Em algumas modalidades, o gene de PCSK9 é suprimido por pelo menos cerca de 60 %, 70 %, ou 80 % por administração de um agente de RNAi. Em algumas modalidades, o gene de PCSK9 é suprimido por pelo menos cerca de 85 %, 90 %, ou 95 % por administração do oligonucleotídeo de fita dupla.

[00525] Os agentes de RNAi da invenção podem ser administrados a um indivíduo usando qualquer modo de administração conhecido na técnica, incluindo, mas não se limitando a, subcutânea, intravenosa, intramuscular, intraocular, intrabronquial, intrapleural, intraperitoneal, intra-arterial, linfática, cerebrospinal, e quaisquer suas combinações. Em modalidades preferenciais, os agentes são administrados subcutaneamente.

[00526] Em algumas modalidades, a administração é efetuada via uma injeção de depósito. Uma injeção de depósito pode liberar o agente de RNAi de uma maneira 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 PCSK9, ou um efeito terapêutico ou profilático. Uma injeção de depósito também pode proporcionar concentrações no soro mais consistentes. Injeções de depósito podem incluir injeções subcutâneas ou injeções intramusculares. Em modalidades preferidas, a injeção de depósito é uma injeção subcutânea.

[00527] Em algumas modalidades, a administração é efetuada via uma bomba. A bomba pode ser uma bomba externa ou uma bomba cirurgicamente implantada. Em certas modalidades, a bomba é uma bomba osmótica implantada subcutaneamente. Em outras modalidades, a bomba é uma bomba de infusão. Uma bomba de infusão pode ser usada para infusões intravenosa, subcutânea, arterial, ou epidural. Em modalidades preferidas, a bomba de infusão é uma bomba de infusão subcutânea. Em outras modalidades, a bomba é uma bomba cirurgicamente implantada que distribui o agente de RNAi no fígado.

[00528] Outros modos de administração incluem epidural, intracerebral, intracerebroventricular, administração nasal, intra-arterial, intracardíaca, infusão intraóssea, intratecal, e intravítrea, e pulmonar. O modo de administração pode ser escolhido com base em ser desejado um tratamento local ou sistêmico e com base na área a ser tratada. A via e sítio de administração podem ser escolhidos para aumentar o direcionamento para o alvo.

[00529] O método inclui administração de um agente de RNAi, por exemplo, uma dose suficiente para diminuir os níveis de RNAm de PCSK9 durante pelo menos 5, mais preferencialmente 7, 10, 14, 21, 25,

30 ou 40 dias; e, opcionalmente, administração de uma segunda dose única de dsRNA, em que a segunda dose única é administrada pelo menos 5, mais preferencialmente 7, 10, 14, 21, 25, 30 ou 40 dias após a primeira dose única ter sido administrada, inibindo deste modo a expressão do gene de PCSK9 em um indivíduo.

[00530] Em uma modalidade, as doses do agente de RNAi da invenção são administradas não mais do que uma vez a cada quatro semanas, não mais do que uma vez a cada três semanas, não mais do que uma vez a cada duas semanas, ou não mais do que uma vez a cada semana. Em outra modalidade, as administrações podem ser mantidas durante um, dois, três, ou seis meses, ou um ano ou mais.

[00531] Em outra modalidade, a administração pode ser proporcionada quando os níveis de colesterol de Lipoproteína de Baixa Densidade (LDLc) alcançam ou ultrapassam um nível mínimo pré-determinado, tal como mais do que 70 mg/dL, 130 mg/dL, 150 mg/dL, 200 mg/dL, 300 mg/dL, ou 400 mg/dL.

[00532] Em geral, o agente de RNAi não ativa o sistema imune, por exemplo, não aumenta os níveis de citocina, tais como os níveis de TNF-alfa ou IFN-alfa. Por exemplo, quando medidos por um ensaio, tal como um ensaio de PBMC *in vitro*, tal como descrito aqui, o aumento nos níveis de TNF-alfa ou IFN-alfa é menos do que 30 %, 20 %, ou 10 % de células de controle tratadas com um dsRNA de controle, tal como um dsRNA que não se dirige a PCSK9.

[00533] Por exemplo, a um indivíduo pode ser administrada uma quantidade terapêutica de um agente de RNAi, tal como 0,5 mg/kg, 1,0 mg/kg, 1,5 mg/kg, 2,0 mg/kg, ou 2,5 mg/kg de dsRNA. O agente de RNAi pode ser administrado por infusão intravenosa ao longo de um período de tempo, tal como ao longo de um período de 5 minutos, 10 minutos, 15 minutos, 20 minutos, ou 25 minutos. A administração é repetida, por exemplo, em uma base regular, tal como bissemanalmente (*i.e.*, 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 bissemanal durante três meses, a administração pode ser repetida uma vez por mês, durante seis meses ou um ano ou mais. A administração do agente de RNAi pode reduzir os níveis de PCSK9, por exemplo, em uma célula, tecido, sangue, urina ou outro compartimento do paciente por pelo menos 10 %, pelo menos 15 %, pelo menos 20 %, pelo menos 25 %, pelo menos 30 %, pelo menos 40 %, pelo menos 50 %, pelo menos 60 %, pelo menos 70 %, pelo menos 80 % ou pelo menos 90 % ou mais.

[00534] Antes da administração de uma dose completa do agente de RNAi aos paciente pode ser administrada uma dose mais pequena, tal como uma reação de infusão a >5 %, e estes podem ser monitorizados quanto a efeitos adversos, tais como uma reação alérgica, ou quanto a elevados níveis de lipídeos ou pressão sanguínea. Em outro exemplo, o paciente pode ser monitorizado quanto a efeitos imunoestimuladores indesejados, tais como níveis de citocinas aumentados (por exemplo, TNF-alfa ou INF-alfa).

[00535] Um efeito de tratamento ou preventivo é evidente quando ocorre uma melhoria estatisticamente significativa de um ou mais parâmetros do estado de doença, ou por uma ausência do agravamento ou do desenvolvimento de sintomas que de outro modo seriam antecipados. Como exemplo, uma alteração favorável de pelo menos 10 % em um parâmetro mensurável de doença, e preferivelmente pelo menos 20 %, 30 %, 40 %, 50 % ou mais, pode ser indicador de tratamento eficaz. A eficácia de um dado agente de RNAi da invenção ou formulação desse agente de RNAi pode ser também avaliada usando um modelo animal experimental para a dada doença como conhecido na técnica. Ao usar um modelo animal experimental, a eficácia do

tratamento é evidenciada quando é observada uma redução estatisticamente significativa em um marcador ou sintoma.

[00536] Em uma modalidade, o agente de RNAi é administrado a uma dose de cerca de 0,25 mg/kg e cerca de 50 mg/kg, por exemplo, entre cerca de 0,25 mg/kg e cerca de 0,5 mg/kg, entre cerca de 0,25 mg/kg e cerca de 1 mg/kg, entre cerca de 0,25 mg/kg e cerca de 5 mg/kg, entre cerca de 0,25 mg/kg e cerca de 10 mg/kg, entre cerca de 1 mg/kg e cerca de 10 mg/kg, entre cerca de 5 mg/kg e cerca de 15 mg/kg, entre cerca de 10 mg/kg e cerca de 20 mg/kg, entre cerca de 15 mg/kg e cerca de 25 mg/kg, entre cerca de 20 mg/kg e cerca de 30 mg/kg, entre cerca de 25 mg/kg e entre cerca de 35 mg/kg, ou entre cerca de 40 mg/kg e entre cerca de 50 mg/kg.

[00537] Em algumas modalidades, o agente de RNAi é administrado a uma dose de cerca de 0,25 mg/kg, cerca de 0,5 mg/kg, cerca de 1 mg/kg, cerca de 2 mg/kg, cerca de 3 mg/kg, cerca de 4 mg/kg, cerca de 5 mg/kg, cerca de 6 mg/kg, cerca de 7 mg/kg, cerca de 8 mg/kg, cerca de 9 mg/kg, cerca de 10 mg/kg, cerca de 11 mg/kg, cerca de 12 mg/kg, cerca de 13 mg/kg, cerca de 14 mg/kg, cerca de 15 mg/kg, cerca de 16 mg/kg, cerca de 17 mg/kg, cerca de 18 mg/kg, cerca de 19 mg/kg, cerca de 20 mg/kg, cerca de 21 mg/kg, cerca de 22 mg/kg, cerca de 23 mg/kg, cerca de 24 mg/kg, cerca de 25 mg/kg, cerca de 26 mg/kg, cerca de 27 mg/kg, cerca de 28 mg/kg, cerca de 29 mg/kg, 30 mg/kg, cerca de 31 mg/kg, cerca de 32 mg/kg, cerca de 33 mg/kg, cerca de 34 mg/kg, cerca de 35 mg/kg, cerca de 36 mg/kg, cerca de 37 mg/kg, cerca de 38 mg/kg, cerca de 39 mg/kg, cerca de 40 mg/kg, cerca de 41 mg/kg, cerca de 42 mg/kg, cerca de 43 mg/kg, cerca de 44 mg/kg, cerca de 45 mg/kg, cerca de 46 mg/kg, cerca de 47 mg/kg, cerca de 48 mg/kg, cerca de 49 mg/kg ou cerca de 50 mg/kg. Em uma modalidade, o agente de RNAi é administrado a uma dose de cerca de 25 mg/kg.

[00538] A dose de um agente de RNAi que é administrada a um

indivíduo pode ser ajustada para equilibrar os riscos e benefícios de uma dose particular, por exemplo, para alcançar um nível desejado de supressão de gene de PCSK9 (como avaliado, por exemplo, com base em supressão de RNAm de PCSK9, expressão de proteína PCSK9, ou uma redução nos níveis de lipídeos) ou um efeito terapêutico ou profilático desejado, enquanto ao mesmo tempo evitando efeitos secundários indesejáveis.

[00539] Em algumas modalidades, o agente de RNAi é administrado em duas ou mais doses. Se desejado para facilitar infusões repetidas ou frequentes pode ser aconselhável implantação de um dispositivo de distribuição, por exemplo, uma bomba, *stent* semipermanente (por exemplo, intravenoso, intraperitoneal, intracisternal ou intracapsular), ou reservatório. Em algumas formas de realizações, o número ou quantidade de doses subsequentes é dependente do alcance de um efeito desejado, por exemplo, a supressão de um gene de PCSK9, ou o alcance de um efeito terapêutico ou profilático, por exemplo, redução de um sintoma de hipercolesterolemia. Em algumas modalidades, o agente de RNAi é administrado de acordo com um programa. Por exemplo, o agente de RNAi pode ser administrado uma vez por semana, duas vezes por semana, três vezes por semana, quatro vezes por semana, ou cinco vezes por semana. Em algumas modalidades, o programa envolve administrações regularmente espaçadas, por exemplo, de hora em hora, a cada quatro horas, a cada seis horas, a cada oito horas, a cada doze horas, diariamente, a cada 2 dias, a cada 3 dias, a cada 4 dias, a cada 5 dias, semanalmente, bissemanalmente, ou mensalmente. Em modalidades, o programa envolve administrações estreitamente espaçadas seguidas por um período de tempo mais longo durante o qual o agente não é administrado. Por exemplo, o programa pode envolver um conjunto inicial de doses que são administradas em um período de tempo relativamente curto (por exemplo, cerca de a cada 6

horas, cerca de a cada 12 horas, cerca de a cada 24 horas, cerca de a cada 48 horas, ou cerca de a cada 72 horas) seguido por um período de tempo mais longo (por exemplo, cerca de 1 semana, cerca de 2 semanas, cerca de 3 semanas, cerca de 4 semanas, cerca de 5 semanas, cerca de 6 semanas, cerca de 7 semanas, ou cerca de 8 semanas) durante o qual o agente de RNAi não é administrado. Em uma modalidade, o agente de RNAi é inicialmente administrado de hora em hora e é posteriormente administrado em um intervalo mais longo (por exemplo, diariamente, semanalmente, bissemanalmente, ou mensalmente). Em outra modalidade, o agente de RNAi é inicialmente administrado diariamente e é posteriormente administrado em um intervalo mais longo (por exemplo, diariamente, semanalmente, bissemanalmente, ou mensalmente). Em certas modalidades, o intervalo mais longo aumenta ao longo do tempo ou é determinado com base no alcance de um efeito desejado. Em uma modalidade específica, o agente de RNAi é administrado uma vez diariamente durante uma primeira semana, seguido por dosagem semanal começando a partir do oitavo dia de administração. Em outra modalidade específica, o agente de RNAi é administrado a cada dois dias durante uma primeira semana seguido por dosagem semanal começando a partir do oitavo dia de administração.

[00540] Em uma modalidade, o agente de RNAi é administrado duas vezes por semana. Em uma modalidade, o agente de RNAi é administrado duas vezes por semana a uma dose de 1 mg/kg. Em outra modalidade, o agente de RNAi é administrado duas vezes por semana a uma dose de 2 mg/kg.

[00541] Em uma modalidade, o agente de RNAi é administrado uma vez a cada duas semanas. Em uma modalidade, o agente de RNAi é administrado uma vez a cada duas semanas a uma dose de 1 mg/kg. Em outra modalidade, o agente de RNAi é administrado uma vez a cada

duas semanas a uma dose de 2 mg/kg.

[00542] Em uma modalidade, o agente de RNAi é administrado uma vez por semana. Em uma modalidade, o agente de RNAi é administrado uma vez por semana a uma dose de 0,5 mg/kg. Em uma modalidade, o agente de RNAi é administrado uma vez por semana a uma dose de 1 mg/kg. Em outra modalidade, o agente de RNAi é administrado uma vez por semana a uma dose de 2 mg/kg.

[00543] Em algumas modalidades, o agente de RNAi é administrado em um regime de dosagem que inclui uma "fase de carga" de administrações estreitamente espaçadas que pode ser seguida por uma "fase de manutenção", na qual o agente de RNAi é administrado em intervalos espaçados mais longos. Em uma modalidade, a fase de carga compreende cinco administrações diárias do agente de RNAi durante a primeira semana. Em outra modalidade, a fase de manutenção compreende uma ou duas administrações semanais do agente de RNAi. Em uma modalidade adicional, a fase de manutenção dura 5 semanas. Em uma modalidade, a fase de carga compreende administração de uma dose de 2 mg/kg, 1 mg/kg ou 0,5 mg/kg cinco vezes por semana. Em outra modalidade, a fase de manutenção compreende administração de uma dose de 2 mg/kg, 1 mg/kg ou 0,5 mg/kg uma vez, duas vezes, ou três vezes semanalmente, uma vez a cada duas semanas, uma vez a cada três semanas, uma vez por mês, uma vez a cada dois meses, uma vez a cada três meses, uma vez a cada quatro meses, uma vez a cada cinco meses, ou uma vez a cada seis meses.

[00544] Qualquer um destes programas pode ser opcionalmente repetido durante uma ou mais iterações. O número de iterações pode depender do alcance de um efeito desejado, por exemplo, a supressão de um gene de PCSK9, e/ou o alcance de um efeito terapêutico ou profilático, por exemplo, redução dos níveis de colesterol no soro ou redução de um sintoma de hipercolesterolemia.

[00545] Em modalidades adicionais, a administração de um siRNA é administrada em combinação um agente terapêutico adicional. O siRNA e um agente terapêutico adicional podem ser administrados em combinação na mesma composição, por exemplo, parenteralmente, ou o agente terapêutico adicional pode ser administrado como parte de uma composição separada ou por outro método descrito aqui.

[00546] Exemplos de agentes terapêuticos adicionais incluem aqueles que se sabe que tratam um distúrbio de lipídeos, tal como hipercolesterolemia, aterosclerose ou dislipidemia. Por exemplo, um siRNA apresentado na invenção pode ser administrado com, por exemplo, um inibidor da HMG-CoA reductase (por exemplo, uma estatina), um fibrato, um sequestrante de ácido biliar, niacina, um agente antiplaquetas, um inibidor de enzima de conversão da angiotensina, um antagonista do receptor II da angiotensina (por exemplo, potássio de losartan, tal como Cozaar[®] da Merck & Co.), um inibidor da acil CoA colesterol acetiltransferase (ACAT), um inibidor da absorção de colesterol, um inibidor da proteína de transferência de éster de colesterol (CETP), um inibidor da proteína de transferência de glicerídeo microssomal (MTTP), um modulador do colesterol, um modulador do ácido biliar, um agonista do receptor ativado de proliferação de peroxissoma (PPAR), uma terapia baseada em genes, um protetor vascular compósito (por exemplo, AGI-1067, da Atherogenics), um inibidor da glicoproteína IIb/IIIa, aspirina ou um composto tipo aspirina, um inibidor de IBAT (por exemplo, S-8921, da Shionogi), um inibidor da esqualeno sintase, ou um inibidor da proteína quimioatrativa de monócitos (MCP)-I. Inibidores da HMG-CoA reductase exemplares incluem atorvastatina (Lipitor[®]/Tahor/Sortis/Torvast/Cardyl da Pfizer), pravastatina (Pravachol da Bristol-Myers Squibb, Mevalotin/Sanaprav da Sankyo), simvastatina (Zocor[®]/Sinvacor da Merck, Denan da Boehringer Ingelheim, Lipovas da Banyu), lovastatina

(Mevacor/Mevinacor da Merck, Lovastatina, Ceba da Bexal; Liposcler da Schwarz Pharma), fluvastatina (Lescol[®]/Locol/Lochol da Novartis, Cranoc da Fujisawa, Digaril da Solvay), cerivastatina (Lipobay da Bayer/Baycol da GlaxoSmithKline), rosuvastatina (Crestor[®] da AstraZeneca), e pitivastatina (itavastatina/risivastatina) (Nissan Chemical, Kowa Kogyo, Sankyo, e Novartis). Fibratos exemplares incluem, por exemplo, bezafibrato (por exemplo, Befizal[®]/Cedur[®]/Bezalip[®] da Roche, Bezatol da Kissei), clofibrato (por exemplo, Atromid-S[®] da Wyeth), fenofibrato (por exemplo, Lipidil/Lipantil da Fournier, Tricor[®] da Abbott, Lipantil da Takeda, genéricos), gemfibrozil (por exemplo, Lopid/Lipur da Pfizer) e ciprofibrato (Modalim[®] da Sanofi-Synthelabo). Sequestrantes de ácido biliar incluem, por exemplo, colestiramina (Questran[®] e Questran Light[™] da Bristol-Myers Squibb), colestipol (por exemplo, Colestid da Pharmacia), e colesevelam (WelChol[™] da Genzyme/Sankyo). Terapias com niacina exemplares incluem, por exemplo, formulações de liberação imediata, tais como Nicobid da Aventis, Niacor da Upsher-Smith, Nicolar da Aventis, e Perycit da Sanwakagaku. Formulações de liberação prolongada de niacina incluem, por exemplo, Niaspan da Kos Pharmaceuticals e Slo-Niacin da Upsher-Smith. Agentes antiplaquetas exemplares incluem, por exemplo, aspirina (por exemplo, aspirina da Bayer), clopidogrel (Plavix da Sanofi-Synthelabo/Bristol-Myers Squibb), e ticlopidina (por exemplo, Ticlid da Sanofi-Synthelabo e Panaldina da Daiichi). Outros compostos tipo aspirina úteis em combinação com um dsRNA se dirigindo a PCSK9 incluem, por exemplo, Asacard (aspirina de liberação lenta, pela Pharmacia) e Pamicogrel (Kanebo/Angelini Recherche/CEPA). Inibidores da enzima de conversão da angiotensina exemplares incluem, por exemplo, ramipril (por exemplo, Altace da Aventis) e enalapril (por exemplo, Vasotec da Merck & Co.). Inibidores da acil CoA colesterol acetiltransferase (AC AT) incluem, por exemplo,

avasimiba (Pfizer), eflucimiba (BioMerieux Pierre Fabre/Eli Lilly), CS-505 (Sankyo e Kyoto), e SMP-797 (Sumito). Inibidores da absorção de colesterol exemplares incluem, por exemplo, ezetimiba (Zetia® da Merck/Schering-Plough Pharmaceuticals) e Pamaqueside (Pfizer). Inibidores de CETP exemplares incluem, por exemplo, Torcetrapib (também chamado CP-529414, Pfizer), JTT-705 (Japan Tobacco), e CETi-I (Avant Immunotherapeutics). Inibidores da proteína de transferência de triglicerídeo microssomal (MTTP) exemplares incluem, por exemplo, implitapide (Bayer), R-103757 (Janssen), e CP-346086 (Pfizer). Outros moduladores do colesterol exemplares incluem, por exemplo, NO-1886 (Otsuka/TAP Pharmaceutical), CI-1027 (Pfizer), e WAY-135433 (Wyeth-Ayerst).

[00547] Moduladores do ácido biliar exemplares incluem, por exemplo, HBS-107 (Hisamitsu/Banyu), Btg-511 (British Technology Group), BARI-1453 (Aventis), S-8921 (Shionogi), SD-5613 (Pfizer), e AZD-7806 (AstraZeneca). Agonistas do receptor ativado da proliferação de peroxissoma (PPAR) exemplares incluem, por exemplo, tesaglitazar (AZ-242) (AstraZeneca), Netoglitazona (MCC-555) (Mitsubishi/Johnson & Johnson), GW-409544 (Ligand Pharmaceuticals/GlaxoSmithKline), GW-501516 (Ligand Pharmaceuticals/GlaxoSmithKline), LY-929 (Ligand Pharmaceuticals e Eli Lilly), LY-465608 (Ligand Pharmaceuticals e Eli Lilly), LY-518674 (Ligand Pharmaceuticals e Eli Lilly), e MK-767 (Merck e Kyorin). Terapias baseadas em genes exemplares incluem, por exemplo, AdGWEGF 121.10 (GenVec), ApoAI (UCB Pharma/Groupe Fournier), EG-004 (Trinam) (Ark Therapeutics), e carreador-AI de cassete de ligação ao ATP (ABCA1) (CV Therapeutics/Incyte, Aventis, Xenon). Inibidores da Glicoproteína IIb/IIIa exemplares incluem, por exemplo, roxifiban (também chamado DMP754, Bristol-Myers Squibb), Gantofiban (Merck KGaA/Yamanouchi), e Cromafiban (Millennium Pharmaceuticals). Inibidores da

esqualeno sintase exemplares incluem, por exemplo, BMS-1884941 (Bristol-Myers Squibb), CP-210172 (Pfizer), CP-295697 (Pfizer), CP-294838 (Pfizer), e TAK-475 (Takeda). Um inibidor de MCP-I exemplar é, por exemplo, RS-504393 (Roche Bioscience). O agente anti-aterosclerótico BO-653 (Chugai Pharmaceuticals), e o derivado do ácido nicotínico Niclina (Yamanouchi Pharmaceuticals) são também apropriados para administração em combinação com um dsRNA apresentado na invenção. Terapias de combinação exemplares adequadas para administração com um dsRNA se dirigindo a PCSK9 incluem, por exemplo, advicor (Niacina/lovastatina da Kos Pharmaceuticals), amlodipina/atorvastatina (Pfizer), e ezetimiba/simvastatina (por exemplo, comprimidos Vytorin® 10/10, 10/20, 10/40, e 10/80 pela Merck/Schering-Plough Pharmaceuticals). Agentes para tratamento da hipercolesterolemia, e adequados para administração em combinação com um dsRNA se dirigindo a PCSK9 incluem, por exemplo, lovastatina, Comprimidos de Liberação Prolongada Altoprev® de niacina (Andrx Labs), Comprimidos Caduet® de lovastatina (Pfizer), besilato de amlodipina, Comprimidos Crestor® de cálcio de atorvastatina (AstraZeneca), Cápsulas Lescol® de cálcio de rosuvastatina (Novartis), Lescol® de sódio de fluvastatina (Reliant, Novartis), Comprimidos Lipitor® de sódio de fluvastatina (Parke-Davis), Cápsulas Lofibra® de cálcio de atorvastatina (Gate), Comprimidos de Liberação Prolongada Niaspan (Kos), Comprimidos Pravachol de niacina (Bristol-Myers Squibb), Comprimidos TriCor® de sódio de pravastatina (Abbott), Comprimidos Vytorin® 10/10 de fenofibrato (Merck/Schering-Plough Pharmaceuticals), ezetimiba, Comprimidos WelChol™ da simvastatina (Sankyo), Comprimidos Zetia® de hidrocloreto de colesvelam (Schering), Comprimidos Zetia® de ezetimiba (Merck/Schering-Plough Pharmaceuticals), e Comprimidos Zocor® de ezetimiba (Merck).

[00548] Em uma modalidade, um agente de RNAi é administrado em

combinação com anezetimiba/simvastatina (por exemplo, Vytorin® (Merck/Schering-Plough Pharmaceuticals)). Em uma modalidade, o agente de RNAi é administrado ao paciente, e depois o agente terapêutico adicional é administrado ao paciente (ou *vice versa*). Em outra modalidade, o agente de RNAi e o agente terapêutico adicional são administrados ao mesmo tempo.

[00549] Em outro aspecto, a invenção apresenta um método de instrução de um usuário final, por exemplo, um cuidador ou um indivíduo, de como administrar um agente de RNAi descrito aqui. O método inclui, opcionalmente, proporcionar ao usuário final uma ou mais doses do agente de RNAi, e instrução do usuário final como administrar o agente de RNAi em um regime descrito aqui, instruindo deste modo o usuário final.

[00550] Em um aspecto, a invenção proporciona um método de tratamento de um paciente por seleção de um paciente com base de que o paciente está com necessidade de diminuição de LDL, diminuição de LDL sem diminuição de HDL, diminuição de ApoB, ou diminuição de colesterol total. O método inclui administração ao paciente de um siRNA em uma quantidade suficiente para diminuir os níveis de LDL ou níveis de ApoB do paciente, por exemplo, sem diminuir substancialmente os níveis de HDL.

[00551] A predisposição genética desempenha um papel no desenvolvimento de doenças associadas a genes alvo, por exemplo, hiperlipidemia. Portanto, um paciente com necessidade de um siRNA pode ser identificado através de um historial familiar, ou, por exemplo, rastreio quanto a um ou mais marcadores ou variantes genéticos. Exemplos de genes envolvidos na hiperlipidemia incluem mas não estão limitados a, por exemplo, receptor de LDL (LDLR), as apolipoproteínas (ApoA1, ApoB, ApoE, e similares), Proteína de transferência de éster de colesterol (CETP), Lipoproteína lipase (LPL), lipase hepática (LIPC),

Lipase endotelial (EL), Lecitinoxholesterila aciltransferase (LCAT).

[00552] Um prestador de cuidados de saúde, tal como um médico, enfermeira, ou membro da família, pode fazer um historial familiar antes da prescrição ou administração de um agente de RNAi da invenção. Adicionalmente pode ser realizado um teste para se determinar um genótipo ou fenótipo. Por exemplo pode ser realizado um teste de DNA em uma amostra do paciente, por exemplo, uma amostra de sangue, para identificar o genótipo e/ou fenótipo de PCSK9 antes de um dsRNA de PCSK9 ser administrado ao paciente. Em outra modalidade é realizado um teste para identificar um genótipo e/ou fenótipo relacionado, por exemplo, um genótipo de LDLR. Exemplos de variantes genéticas com o gene de LDLR podem ser encontrados na técnica, por exemplo, nas seguintes publicações que são incorporadas por referência: Costanza *et al.* (2005) *Am J Epidemiol.* 15;161(8):714-24; Yamada *et al.* (2008) *J Med Genet.* Jan;45(1):22-8, Epub 31 de agosto de 2007; e Boes *et al.* (2009) *Exp. Gerontol* 44: 136-160, Epub 17 de novembro de 2008.

VI. Kits

[00553] A presente invenção proporciona também kits para uso de qualquer um dos agentes de RNAi e/ou realização de qualquer um dos métodos da invenção. Tais kits incluem um ou mais agente(s) de RNAi e instruções para uso, por exemplo, instruções para inibição da expressão de uma PCSK6 em uma célula por contato da célula com o(s) agente(s) de RNAi em uma quantidade eficaz para inibir a expressão da PCSK9. Os kits podem opcionalmente adicionalmente compreender meios para contato da célula com o agente de RNAi (por exemplo, um dispositivo de injeção), ou meios para medição da inibição de PCSK9 (por exemplo, meios para medição da inibição do RNAm de PCSK9 ou proteína TTR). Tais meios para medição da inibição de PCSK9 podem compreender um meio para obtenção de uma amostra de um indivíduo,

tal como, por exemplo, uma amostra de plasma. Os kits da invenção podem opcionalmente adicionalmente compreender meios para administração do(s) agente(s) de RNAi a um indivíduo ou meios para determinação da quantidade terapeuticamente eficaz ou profilaticamente eficaz.

[00554] A não ser que definido de outro modo, todos os termos técnicos e científicos usados aqui têm o mesmo significado como comumente entendido por um com perícia ordinária na técnica à qual esta invenção pertence. Embora métodos e materiais similares ou equivalentes àqueles descritos aqui poderem ser usados na prática ou teste dos RNAs e métodos apresentados na invenção, métodos e materiais adequados são descritos em baixo. Todas as publicações, pedidos de patentes, patentes, e outras referências mencionadas aqui são incorporadas por referência na sua totalidade. No caso de conflito, a presente especificação, incluindo definições, controlará. Adicionalmente, os materiais, métodos, e exemplos são somente ilustrativos e não se destinam a ser limitantes.

EXEMPLOS

Materiais e Métodos

[00555] Os seguintes materiais e métodos foram usados nos Exemplos.

[00556] *Síntese de cDNA usando Kit de transcrição reversa de cDNA de elevada capacidade ABI (Applied Biosystems, Foster City, CA, # de Cát 4368813)*

[00557] Uma mistura mãe de 2 µL de 10X Tampão, 0,8 µL de 25X dNTPs, 2 µL de Iniciadores aleatórios, 1 µL de Transcriptase Reversa, 1 µL de inibidor de RNase e 3,2 µL de H₂O por reação foi adicionada a 10 µL de RNA total. Foi gerado cDNA usando um termociclador C-1000 ou S-1000 Bio-Rad (Hercules, CA) através dos seguintes passos: 25 °C 10 min, 37 °C 120 min, 85 °C 5 seg, manutenção a 4 °C.

Cultura e transfecções de células

[00558] Células Hep3B, HepG2 ou HeLa (ATCC, Manassas, VA) foram cultivadas quase até à confluência a 37 °C em uma atmosfera de CO₂ a 5 % em meio recomendados (ATCC) suplementado com FBS a 10 % e glutamina (ATCC) antes de serem liberadas da placa por tripsinação. Para dúplexes rastreados em formato de 96 poços, a transfecção foi levada a cabo por adição de 44,75 µL de Opti-MEM mais 0,25 µL de Lipofectamina RNAiMax por poço (Invitrogen, Carlsbad CA. # de cat 13778-150) a 5 µL de cada dúplex de siRNA a um poço individual em uma placa de 96 poços. A mistura foi depois incubada à temperatura ambiente durante 15 minutos. Cinquenta µL de meio de crescimento completo sem antibiótico contendo $\sim 2 \times 10^4$ células foram depois adicionados à mistura de siRNA. Para dúplexes rastreados em formato de 384 poços, 5 µL de Opti-MEM mais 0,1 µL de Lipofectamina RNAiMax (Invitrogen, Carlsbad CA. # de cat 13778-150) foram misturados com 5 µL de cada dúplex de siRNA por um poço individual. A mistura foi depois incubada à temperatura ambiente durante 15 minutos seguida por adição de 40 µL de meio de crescimento completo sem antibiótico contendo $\sim 8 \times 10^3$ células. As células foram incubadas durante 24 horas antes da purificação do RNA. Experiências de dose única foram realizadas às concentrações finais dos dúplexes de 10 nM e 0,1 nM e experiências de resposta à dose foram feitas usando 8 X diluições em série de 5 vezes começando a partir de 2 nM.

Transfecção de captação livre

[00559] Cinco µL de cada siRNA conjugado com GalNac em PBS foram combinados com 3×10^4 hepatócitos de macaco *Cynomolgus* criopreservados recém-descongelados (In Vitro Technologies- Celsis, Baltimore, MD; # de lote JQD) ressuspensos em 95 µL de meio In Vitro Gro CP (In Vitro Technologies- Celsis, Baltimore, MD) em cada poço de uma placa de 96 poços ou 5 µL de siRNA e 45 µL de meio contendo

$1,2 \times 10^3$ células para formato de placa de 384 poços. A mistura foi incubada durante cerca de 24 horas a 37 °C em uma atmosfera de CO₂ a 5 %. siRNAs foram testados a concentrações múltiplas entre 500 e 0,1 nM para experiências de dose única e usando 8 X diluições em série de 5 vezes começando a partir de 500 nM para experiências de resposta à dose.

[00560] Isolamento de *RNA Total usando Kit de Isolamento de RNAm DYNABEADS (Invitrogen, parte #: 610-12)*

[00561] As células foram coletadas e lisadas em 150 µL de Tampão de Lise/Ligação, depois misturadas durante 5 minutos a 850 rpm usando um Termomisturador Eppendorf (a velocidade de mistura foi a mesma ao longo do processo). Dez microlitros de esférulas magnéticas e 80 µL de mistura de Tampão de Lise/Ligação foram adicionados a uma placa de fundo redondo e misturados durante 1 minuto. As esférulas magnéticas foram capturadas usando suporte magnético e o sobrenadante foi removido sem perturbar as esférulas. Após remoção do sobrenadante, as células lisadas foram adicionadas às esférulas restantes e misturadas durante 5 minutos. Após remoção do sobrenadante, as esférulas magnéticas foram lavadas 2 vezes com 150 µL de Tampão de Lavagem A e misturadas durante 1 minuto. As esférulas foram capturadas novamente e o sobrenadante removido. As esférulas foram depois lavadas com 150 µL de Tampão de Lavagem B, capturadas e o sobrenadante foi removido. As esférulas foram de seguida lavadas com 150 µL de Tampão de Eluição, capturadas e o sobrenadante removido. Se permitiu que as esférulas secassem durante 2 minutos. Após secagem, 50 µL de Tampão de Eluição foram adicionados e misturados durante 5 minutos a 70 °C. As esférulas foram capturadas em um íman durante 5 minutos. Cinquenta µL de sobrenadante foram removidos e adicionados a outra placa de 96 poços.

[00562] Para formato de 384 poços, as células foram lisadas durante um minuto por adição de 50 µL de tampão de Lise/Ligação. Foram usados dois µL de esférulas magnéticas por poço. O volume requerido de esférulas foi aliquotado, capturado em um suporte magnético, e a solução de armazenamento de esférulas foi removida. As esférulas foram depois ressuspensas no volume requerido de tampão de Lise/Ligação (25 µL por poço) e 25 µL de suspensão de esférulas foram adicionados às células lisadas. A mistura lisato-esférulas foi incubada durante 10 minutos em VibraTransaltor na definição #7 (UnionScientific Corp., Randallstown, MD). Subsequentemente, as esférulas foram capturadas usando um suporte magnético, o sobrenadante removido e as esférulas são lavadas uma vez com 90 µL de Tampão A, seguida por passos de lavagem única com 90 µL de Tampão B e 100 µL de tampão de Eluição. As esférulas foram embebidas em cada tampão de lavagem durante ~1 minuto (nenhuma mistura envolvida). Após o passo de lavagem final, as esférulas foram ressuspensas em 15 µL de tampão de eluição durante 5 minutos a 70 °C, seguido por captura de esférulas e a remoção do sobrenadante (até 8 µL) para síntese de cDNA e/ou armazenamento de RNA purificado (-20 °C).

PCR em tempo real

[00563] Dois µL de cDNA foram adicionados a uma mistura mãe contendo 0,5 µL de Sonda TaqMan de GAPDH de humano (# de Cát 4326317E da Applied Biosystems), 0,5 µL de sonda TaqMan de PCSK9 de humano (# de cát Hs03037355_m1da Applied Biosystems) para células humanas ou 0,5 µL de Ensaio TaqMan personalizado de GAPDH de *Cynomolgus* (iniciador F de GAP de *cyno* a 150 nM- 5'GCATCCTGGGCTACACTGA (SEQ ID NO: 5); iniciador R de GAP de *cyno* a 150 nM-5'-TGGGTGTCGCTGTTGAAGTC (SEQ ID NO: 6) sonda de GAP de *cyno* a 250 nM- 5'-5HEX-CCAGGTGGTCTCCTCC-BHQ1-Q-3'(SEQ ID NO: 7)), 0,5 µL de Ensaio TaqMan personalizado

de PCSK9 de *Cynomolgus* (iniciador F de PCSK9 de *cyno* a 900 nM 5'-ACGTGGCTGGCATTGCA (SEQ ID NO: 8); ensaio R de PCSK9 de *cyno* a 900 nM 5'-AAGTGGATCAGTCTCTGCCTCAA (SEQ ID NO: 9); sonda de PCSK9 de *cyno* a 250 nM 5'-6FAM-CATGATGCTGTCTGCCGAGCCG-BHQ1-Q-3' (SEQ ID NO: 10)) para células de *Cynomolgus* e 5 µL de mistura mãe de sonda Lightcycler 480 (# de Cát04887301001 da Roche) por poço em uma placa de 384 poços (# de cát04887301001 da Roche). PCR em tempo real foi realizado em um sistema de PCR em Tempo Real LC480 da Roche (Roche) usando o ensaio de $\Delta\Delta C_t$ (RQ). Cada dúplex foi testado em duas transfecções independentes e cada transfecção foi avaliada em duplicado, a não ser que notado de outro modo.

[00564] Para calcular a mudança relativa do número de vezes, os dados de tempo real foram analisados usando o método $\Delta\Delta C_t$ e normalizados para ensaios realizados com células transfectadas com AD-1955 a 10 nM, ou células pseudotransfectadas. Para ensaios de captação livre, os dados foram normalizados em relação a células tratadas com PBS ou GalNAc-1955 (concentração mais elevada usada para compostos experimentais). As IC₅₀s foram calculadas usando um modelo de ajustamento de 4 parâmetros usando XLFit e normalizadas em relação a células transfectadas com AD-1955 ao longo da mesma gama de doses, ou para a sua própria dose mais baixa.

[00565] As sequências senso e antissenso de AD-1955 são: SENSO: 5'-cuuAcGcuGAGuAcuucGAdTsdT-3' (SEQ ID NO: 11); e ANTISSENTO: 5'-UCGAAGuACUcAGCGuAAGdTsdT-3' (SEQ ID NO: 12).

Tabela B: Abreviaturas de monômeros de nucleotídeos usadas na representação de sequências de ácidos nucleicos.

Abreviatura	Nucleotídeo(s)
A	Adenosina-3'-fosfato
Ab	beta-L-adenosina-3`-fosfato

Abreviatura	Nucleotídeo(s)
Af	2'-fluoroadenosina-3'-fosfato
Afs	2'-fluoroadenosina-3'-fosforotioato
As	adenosina-3'-fosforotioato
C	citidina-3'-fosfato
Cb	beta-L-citidina-3'-fosfato
Cf	2'-fluorocitidina-3'-fosfato
Cfs	2'-fluorocitidina-3'-fosforotioato
Cs	citidina-3'-fosforotioato
G	guanosina-3'-fosfato
Gb	beta-L-guanosina-3'-fosfato
Gbs	beta-L-guanosina-3'-fosforotioato
Gf	2'-fluoroguanosina-3'-fosfato
Gfs	2'-fluoroguanosina-3'-fosforotioato
Gs	guanosina-3'-fosforotioato
T	5'-metiluridina-3'-fosfato
Tf	2'-fluoro-5-metiluridina-3'-fosfato
Tfs	2'-fluoro-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
c	2'-O-metilcitidina-3'-fosfato
cs	2'-O-metilcitidina-3'-fosforotioato
g	2'-O-metilguanosina-3'-fosfato

Abreviatura	Nucleotídeo(s)
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
dT	2'-deoxitimidina
dTs	2'-deoxitimidina-3'-fosforotioato
dU	2'-deoxiuridina
s	ligação fosforotioato
L96	N-[tris(GalNAc-alquil)-amidodecanoíl]-4-hidroxiprolinol Hyp-(GalNAc-alquil) ₃
(Aeo)	2'-O-metoxietiladenosina-3'-fosfato
(Aeos)	2'-O-metoxietiladenosina-3'-fosforotioato
(Geo)	2'-O-metoxietilguanosina-3'-fosfato
(Geos)	2'-O-metoxietilguanosina-3'-fosforotioato
(Teo)	2'-O-metoxietil-5-metiluridina-3'-fosfato
(Teos)	2'-O-metoxietil-5-metiluridina-3'-fosforotioato
(m5Ceo)	2'-O-metoxietil-5-metilcitidina-3'-fosfato
(m5Ceos)	2'-O-metoxietil-5-metilcitidina-3'-fosforotioato
(A3m)	3'-O-metiladenosina-2'-fosfato
(A3mx)	3'-O-metil-xilofuranosiladenosina-2'-fosfato
(G3m)	3'-O-metilguanosina-2'-fosfato
(G3mx)	3'-O-metil-xilofuranosilguanosina-2'-fosfato
(C3m)	3'-O-metilcitidina-2'-fosfato
(C3mx)	3'-O-metil-xilofuranosilcitidina-2'-fosfato
(U3m)	3'-O-metiluridina-2'-fosfato
(U3mx)	3'-O-metilxilouridina-2'-fosfato
(Chd)	2'-O-hexadecil-citidina-3'-fosfato

Abreviatura	Nucleotídeo(s)
(pshe)	Hidroxietilfosforotioato
(Uhd)	2'-O-hexadecil-uridina-3'-fosfato
(Tgn)	Isômero S de timidina-ácido nucleico de glicol (GNA)
(Cgn)	Citidina-ácido nucleico de glicol (GNA)
(Chd)	2'-O-hexadecil-citidina-3'-fosfato
(Ggn)	2'-O-hexadecil-citidina-3'-fosfato
(Agn)	Adenosina-ácido nucleico de glicol (GNA)
P	5'-fosfato
(m5Cam)	2'-O-(N-metilacetamida)-5-metilcitidina-3'-fosfato
(m5Cams)	2'-O-(N-metilacetamida)-5-metilcitidina-3'-fosforotioato
(Tam)	2'-O-(N-metilacetamida)timidina-3'-fosfato
(Tams)	2'-O-(N-metilacetamida)timidina-3'-fosforotioato
(Aam)	2'-O-(N-metilacetamida)adenosina-3'-fosfato
(Aams)	2'-O-(N-metilacetamida)adenosina-3'-fosforotioato
(Gam)	2'-O-(N-metilacetamida)guanosina-3'-fosfato
(Gams)	2'-O-(N-metilacetamida)guanosina-3'-fosforotioato
(Uyh)	2'-O-(1-hexil-4-metileno-1,2,3-triazolil)-uridina-3'-fosfato
(Ayh)	2'-O-(1-hexil-4-metileno-1,2,3-triazolil)-adenosina-3'-fosfato
(Gyh)	2'-O-(1-hexil-4-metileno-1,2,3-triazolil)-guanosina-3'-fosfato
(Cyh)	2'-O-(1-hexil-4-metileno-1,2,3-triazolil)-citidina-3'-fosfato

Exemplo 1. Síntese de Oligonucleotídeos Conjugados com GalNAc

[00566] Uma série de dúplexes de siRNA abrangendo a sequência de RNAm de PCSK9 foi desenhada, sintetizada, e conjugada com um GalNAc trivalente na extremidade 3' da fita senso usando as técnicas

descritas acima. As sequências destes dúplexes são mostradas na Tabela 1. Estas mesmas sequências foram também sintetizadas com várias modificações de nucleotídeos e conjugadas com um GalNAc trivalente. As sequências dos dúplexes modificados são mostradas na Tabela 2.

Tabela 1. Sequências não modificadas de PCSK9

Nome do Dúplex	Nome do Oligo Senso	Seq de Trans Senso	SE Q ID NO:	Nome do Oligo Antissenso	Seq de Trans Antissenso	SE Q ID NO:	Começo em NM_174936. 3	Final em NM_174936. 3
AD-53649.1	A-110542.1	CGAGGACGGCGACUACGAGGA	13	A-109239.2	UCCUCGUAGUCGCCGUCCU CGUC	234	459	481
AD-53661.1	A-110544.1	ACCGCUGCGCCAAGGAUCCGU	14	A-109243.2	ACGGAUCCUUGGCGCAGCG GUGG	235	554	576
AD-53667.1	A-110545.1	GCUGCGCCAAGGAUCCGUGGA	15	A-109245.2	UCCACGGAUCCUUGGCGCA GCGG	236	557	579
AD-53679.1	A-110547.1	CUACGUGGUGGUGCUGAAGGA	16	A-109249.2	UCCUUCAGCACCACCACGUA GGU	237	591	613
AD-53685.1	A-110548.1	CCCGCCGGGGAUACCUCACCA	17	A-109251.2	UGGUGAGGUAUCCCCGGCG GGCA	238	668	690
AD-53691.1	A-110549.1	CCGCCGGGGAUACCUCACC AA	18	A-109253.2	UUGGUGAGGUAUCCCCGGC GGGC	239	669	691
AD-53650.1	A-110550.1	GCCGGGGAUACCUCACCAA GA	19	A-109255.2	UCUUGGUGAGGUAUCCCCG GCGG	240	671	693
AD-53656.1	A-110551.1	CCGGGGAUACCUCACCAAG AU	20	A-109257.2	AUCUUGGUGAGGUAUCCCC GGCG	241	672	694
AD-53668.1	A-110553.1	AUACCUCACCAAGAUCUG CA	21	A-109261.2	UGCAGGAUCUUGGUGAGGU AUCC	242	678	700
AD-53674.1	A-110554.1	CACCAAGAUCUGCAUGUC UU	22	A-109263.2	AAGACAUGCAGGAUCUUGG UGAG	243	684	706

Nome do Dúplex	Nome do Oligo Senso	Seq de Trans Senso	SE Q ID NO:	Nome do Oligo Antissenso	Seq de Trans Antissenso	SE Q ID NO:	Começo em NM_174936. 3	Final em NM_174936. 3
AD-53680.1	A-110555.1	CAAGAUCCUGCAUGUCUUC CA	23	A-109265.2	UGGAAGACAUGCAGGAUCU UGGU	244	687	709
AD-53692.1	A-110557.1	GUUGCCCCAUGUCGACUAC AU	24	A-109269.2	AUGUAGUCGACAUGGGGCA ACUU	245	768	790
AD-53651.1	A-110558.1	GCCCCAUGUCGACUACAUC GA	25	A-109271.2	UCGAUGUAGUCGACAUGGG GCAA	246	771	793
AD-53657.1	A-110559.1	CCAUGUCGACUACAUCGAG GA	26	A-109273.2	UCCUCGAUGUAGUCGACAU GGGG	247	774	796
AD-53663.1	A-110560.1	UCGACUACAUCGAGGAGGA CU	27	A-109275.2	AGUCCUCCUCGAUGUAGUC GACA	248	779	801
AD-53669.1	A-110561.1	ACUACAUCGAGGAGGACUC CU	28	A-109277.2	AGGAGUCCUCCUCGAUGUA GUCG	249	782	804
AD-53675.1	A-110562.1	UACAUCGAGGAGGACUCCU CU	29	A-109279.2	AGAGGAGUCCUCCUCGAUG UAGU	250	784	806
AD-53681.1	A-110563.1	UCGAGGAGGACUCCUCUGU CU	30	A-109281.2	AGACAGAGGAGUCCUCCUC GAUG	251	788	810
AD-53687.1	A-110564.1	CGAGGAGGACUCCUCUGUC UU	31	A-109283.2	AAGACAGAGGAGUCCUCCUC GAU	252	789	811
AD-53693.1	A-110565.1	GUACCGGGCGGAUGAAUAC CA	32	A-109285.2	UGGUAUUCAUCCGCCCGGU ACCG	253	855	877
AD-53652.1	A-110566.1	CCUGGUGGAGGUGUAUCUC CU	33	A-109287.2	AGGAGAUACACCUCCACCAG GCU	254	894	916

Nome do Dúplex	Nome do Oligo Senso	Seq de Trans Senso	SE Q ID NO:	Nome do Oligo Antissenso	Seq de Trans Antissenso	SE Q ID NO:	Começo em NM_174936. 3	Final em NM_174936. 3
AD-53658.1	A-110567.1	CUGGUGGAGGUGUAUCCUA	34	A-109289.2	UAGGAGAUACACCUCCACCA GGC	255	895	917
AD-53664.1	A-110568.1	GGUGGAGGUGUAUCCUA GA	35	A-109291.2	UCUAGGAGAUACACCUCCAC CAG	256	897	919
AD-53670.1	A-110569.1	UGGAGGUGUAUCCUAGA CA	36	A-109293.2	UGUCUAGGAGAUACACCUCC ACC	257	899	921
AD-53676.1	A-110570.1	AGGUGUAUCCUAGACAC CA	37	A-109295.2	UGGUGUCUAGGAGAUACAC CUCC	258	902	924
AD-53682.1	A-110571.1	GUAUCUCCUAGACACCAGC AU	38	A-109297.2	AUGCUGGUGUCUAGGAGAU ACAC	259	906	928
AD-53688.1	A-110572.1	UAUCUCCUAGACACCAGCA UA	39	A-109299.2	UAUGCUGGUGUCUAGGAGA UACA	260	907	929
AD-53694.1	A-110573.1	UCUCCUAGACACCAGCAUA CA	40	A-109301.2	UGUAUGCUGGUGUCUAGGA GAUA	261	909	931
AD-53653.1	A-110574.1	UCCUAGACACCAGCAUACA GA	41	A-109303.2	UCUGUAUGCUGGUGUCUAG GAGA	262	911	933
AD-53659.1	A-110575.1	AGACACCAGCAUACAGAGU GA	42	A-109305.2	UCACUCUGUAUGCUGGUGU CUAG	263	915	937
AD-53665.1	A-110576.1	CACCAGCAUACAGAGUGAC CA	43	A-109307.2	UGGUCACUCUGUAUGCUGG UGUC	264	918	940
AD-53671.1	A-110577.1	UACAGAGUGACCACCGGGA AA	44	A-109309.2	UUUCCCGGUGGUCACUCUG UAUG	265	926	948

Nome do Dúplex	Nome do Oligo Senso	Seq de Trans Senso	SE Q ID NO:	Nome do Oligo Antissenso	Seq de Trans Antissenso	SE Q ID NO:	Começo em NM_174936. 3	Final em NM_174936. 3
AD-53677.1	A-110578.1	ACAGAGUGACCACCGGGAA AU	45	A-109311.2	AUUUCCCGGUGGUCACUCU GUAU	266	927	949
AD-53683.1	A-110579.1	GAGUGACCACCGGGAAAUC GA	46	A-109313.2	UCGAUUUCCCGGUGGUCAC UCUG	267	930	952
AD-53689.1	A-110580.1	GGAAAUCGAGGGCAGGGUC AU	47	A-109315.2	AUGACCCUGCCCUCGAUUU CCCG	268	942	964
AD-53695.1	A-110581.1	AAUCGAGGGCAGGGUCAUG GU	48	A-109317.2	ACCAUGACCCUGCCCUCGAU UUC	269	945	967
AD-53654.1	A-110582.1	GCAGGGUCAUGGUCACCGA CU	49	A-109319.2	AGUCGGUGACCAUGACCCU GCCC	270	953	975
AD-53660.1	A-110583.1	CAGGGUCAUGGUCACCGAC UU	50	A-109321.2	AAGUCGGUGACCAUGACCC UGCC	271	954	976
AD-53666.1	A-110584.1	GGUCAUGGUCACCGACUUC GA	51	A-109323.2	UCGAAGUCGGUGACCAUGA CCCU	272	957	979
AD-53672.1	A-110585.1	UCAUGGUCACCGACUUCGA GA	52	A-109325.2	UCUCGAAGUCGGUGACCAU GACC	273	959	981
AD-53678.1	A-110586.1	AGGACGGGACCCGCUUCCA CA	53	A-109327.2	UGUGGAAGCGGGUCCCGUC CUCC	274	992	1014
AD-53684.1	A-110587.1	CGGGACCCGCUUCCACAGA CA	54	A-109329.2	UGUCUGUGGAAGCGGGUCC CGUC	275	996	1018
AD-53690.1	A-110588.1	UCCACAGACAGGCCAGCAA GU	55	A-109331.2	ACUUGCUGGCCUGUCUGUG GAAG	276	1007	1029

Nome do Dúplex	Nome do Oligo Senso	Seq de Trans Senso	SE Q ID NO:	Nome do Oligo Antissenso	Seq de Trans Antissenso	SE Q ID NO:	Começo em NM_174936.3	Final em NM_174936.3
AD-53696.1	A-110589.1	CCUGCGCGUGCUAACUGC CA	56	A-109333.2	UGGCAGUUGAGCACGCGCA GGCU	277	1107	1129
AD-53702.1	A-110590.1	CUGCGCGUGCUAACUGCC AA	57	A-109335.2	UUGGCAGUUGAGCACGCGC AGGC	278	1108	1130
AD-53708.1	A-110591.1	CGUGCUAACUGCCAAGGG AA	58	A-109337.2	UUCCCUUGGCAGUUGAGCA CGCG	279	1113	1135
AD-53714.1	A-110592.1	CACCCUCAUAGGCCUGGAG UU	59	A-109339.2	AACUCCAGGCCUAUGAGGG UGCC	280	1149	1171
AD-53720.1	A-110593.1	ACCCUCAUAGGCCUGGAGU UU	60	A-109341.2	AAACUCCAGGCCUAUGAGG GUGC	281	1150	1172
AD-53726.1	A-110594.1	CCCUCAUAGGCCUGGAGUU UA	61	A-109343.2	UAAACUCCAGGCCUAUGAGG GUG	282	1151	1173
AD-53732.1	A-110595.1	CCUCAUAGGCCUGGAGUUU AU	62	A-109345.2	AUAAACUCCAGGCCUAUGAG GGU	283	1152	1174
AD-53738.1	A-110596.1	CUCAUAGGCCUGGAGUUUA UU	63	A-109347.2	AAUAAACUCCAGGCCUAUGA GGG	284	1153	1175
AD-53697.1	A-110597.1	UAGGCCUGGAGUUUAUUCG GA	64	A-109349.2	UCCGAAUAAACUCCAGGCCU AUG	285	1157	1179
AD-53703.1	A-110598.1	AGGCCUGGAGUUUAUUCGG AA	65	A-109351.2	UUCCGAAUAAACUCCAGGCC UAU	286	1158	1180
AD-53709.1	A-110599.1	GGCCUGGAGUUUAUUCGGA AA	66	A-109353.2	UUUCCGAAUAAACUCCAGGC CUA	287	1159	1181

Nome do Dúplex	Nome do Oligo Senso	Seq de Trans Senso	SE Q ID NO:	Nome do Oligo Antissenso	Seq de Trans Antissenso	SE Q ID NO:	Começo em NM_174936. 3	Final em NM_174936. 3
AD-53715.1	A-110600.1	GCCUGGAGUUUUAUUCGGAA AA	67	A-109355.2	UUUUCCGAAUAAACUCCAGG CCU	288	1160	1182
AD-53721.1	A-110601.1	GGAGUUUAUUCGGAAAAGC CA	68	A-109357.2	UGGCUUUUCCGAAUAAACUC CAG	289	1164	1186
AD-53727.1	A-110602.1	GUUUUAUUCGGAAAAGCCAG CU	69	A-109359.2	AGCUGGCUUUCCGAAUAAA CUC	290	1167	1189
AD-53733.1	A-110603.1	GGGCUGGGUCGUGCUGG UCA	70	A-109361.2	UGACCAGCACGACCCCAGCC CUC	291	1277	1299
AD-53739.1	A-110604.1	GGUCACCGCUGCCGGCAAC UU	71	A-109363.2	AAGUUGCCGGCAGCGGUGA CCAG	292	1293	1315
AD-53698.1	A-110605.1	GGGACGAUGCCUGCCUCUA CU	72	A-109365.2	AGUAGAGGCAGGCAUCGUC CCGG	293	1316	1338
AD-53704.1	A-110606.1	CAACUUUGGCCGCGUGUGUG GA	73	A-109367.2	UCCACACAGCGGCCAAAGUU GGU	294	1419	1441
AD-53710.1	A-110607.1	UUGGCCGCGUGUGUGGACC UCU	74	A-109369.2	AGAGGUCCACACAGCGGCC AAAG	295	1424	1446
AD-53716.1	A-110608.1	UGGCCGCGUGUGUGGACCU CUU	75	A-109371.2	AAGAGGUCCACACAGCGGC CAAA	296	1425	1447
AD-53722.1	A-110609.1	GGCCGCGUGUGUGGACCUC UUU	76	A-109373.2	AAAGAGGUCCACACAGCGGC CAA	297	1426	1448
AD-53728.1	A-110610.1	UGUGUGGACCUCUUUGCCC CA	77	A-109375.2	UGGGGCAAAGAGGUCCACA CAGC	298	1432	1454

Nome do Dúplex	Nome do Oligo Senso	Seq de Trans Senso	SE Q ID NO:	Nome do Oligo Antissenso	Seq de Trans Antissenso	SE Q ID NO:	Começo em NM_174936. 3	Final em NM_174936. 3
AD-53734.1	A-110611.1	GGGAGGACAUCAUUGGUGC CU	78	A-109377.2	AGGCACCAAUGAUGUCCUCC CCU	299	1454	1476
AD-53740.1	A-110612.1	ACUGCAGCACCUGCUUUGU GU	79	A-109379.2	ACACAAAGCAGGUGCUGCAG UCG	300	1481	1503
AD-53699.1	A-110613.1	GCAUUGCAGCCAUGAUGCU GU	80	A-109381.2	ACAGCAUCAUGGCUGCAAUG CCA	301	1541	1563
AD-53705.1	A-110614.1	GUUGAGGCAGAGACUGAUC CA	81	A-109383.2	UGGAUCAGUCUCUGCCUCA ACUC	302	1590	1612
AD-53711.1	A-110615.1	UGAGGCAGAGACUGAUCCA CU	82	A-109385.2	AGUGGAUCAGUCUCUGCCU CAAC	303	1592	1614
AD-53717.1	A-110616.1	GAGGCAGAGACUGAUCCAC UU	83	A-109387.2	AAGUGGAUCAGUCUCUGCC UCAA	304	1593	1615
AD-53723.1	A-110617.1	GGCAGAGACUGAUCCACUU CU	84	A-109389.2	AGAAGUGGAUCAGUCUCUG CCUC	305	1595	1617
AD-53729.1	A-110618.1	CAGAGACUGAUCCACUUCU CU	85	A-109391.2	AGAGAAGUGGAUCAGUCUC UGCC	306	1597	1619
AD-53735.1	A-110619.1	ACUGAUCCACUUCUCUGCC AA	86	A-109393.2	UUGGCAGAGAAGUGGAUCA GUCU	307	1602	1624
AD-53741.1	A-110620.1	AUCCACUUCUCUGCCAAAG AU	87	A-109395.2	AUCUUUGGCAGAGAAGUGG AUCA	308	1606	1628
AD-53700.1	A-110621.1	GGCCUGGUUCCUGAGGAC CA	88	A-109397.2	UGGUCCUCAGGGAACCAGG CCUC	309	1638	1660

Nome do Dúplex	Nome do Oligo Senso	Seq de Trans Senso	SE Q ID NO:	Nome do Oligo Antissenso	Seq de Trans Antissenso	SE Q ID NO:	Começo em NM_174936. 3	Final em NM_174936. 3
AD-53706.1	A-110622.1	GGUACUGACCCCCAACCUG GU	89	A-109399.2	ACCAGGUUGGGGGUCAGUA CCCG	310	1662	1684
AD-53712.1	A-110623.1	GUUGGCAGCUGUUUUGCAG GA	90	A-109401.2	UCCUGCAAAACAGCUGCCAA CCU	311	1715	1737
AD-53718.1	A-110624.1	UGGCAGCUGUUUUGCAGGA CU	91	A-109403.2	AGUCCUGCAAAACAGCUGCC AAC	312	1717	1739
AD-53724.1	A-110625.1	GCAGCUGUUUUGCAGGACU GU	92	A-109405.2	ACAGUCCUGCAAAACAGCUG CCA	313	1719	1741
AD-53730.1	A-110626.1	UCUGCCGGGCCACAACGC UU	93	A-109407.2	AAGCGUUGUGGGCCCGGCA GACC	314	1883	1905
AD-53736.1	A-110627.1	CUGCCGGGCCACAACGCU UU	94	A-109409.2	AAAGCGUUGUGGGCCCGGC AGAC	315	1884	1906
AD-53742.1	A-110628.1	GCCCACAACGCUUUUGGGG GU	95	A-109411.2	ACCCCAAAAGCGUUGUGG GCCC	316	1891	1913
AD-53701.1	A-110629.1	CGCUUUUGGGGUGAGGG UGU	96	A-109413.2	ACACCCUCACCCCCAAAAGC GUU	317	1899	1921
AD-53707.1	A-110630.1	CUUUUGGGGUGAGGGUG UCU	97	A-109415.2	AGACACCCUCACCCCCAAA GCG	318	1901	1923
AD-53713.1	A-110631.1	UUUUGGGGUGAGGGUGU CUA	98	A-109417.2	UAGACACCCUCACCCCCAAA AGC	319	1902	1924
AD-53719.1	A-110632.1	GGGGUGAGGGUGUCUACG CCA	99	A-109419.2	UGGCGUAGACACCCUCACC CCCA	320	1907	1929

Nome do Dúplex	Nome do Oligo Senso	Seq de Trans Senso	SE Q ID NO:	Nome do Oligo Antissenso	Seq de Trans Antissenso	SE Q ID NO:	Começo em NM_174936. 3	Final em NM_174936. 3
AD-53725.1	A-110633.1	GGGUGAGGGUGUCUACGC CAU	100	A-109421.2	AUGGCGUAGACACCCUCACC CCC	321	1908	1930
AD-53731.1	A-110634.1	GGUGAGGGUGUCUACGCCA UU	101	A-109423.2	AAUGGCGUAGACACCCUCAC CCC	322	1909	1931
AD-53737.1	A-110635.1	AGGGUGUCUACGCCAUUGC CA	102	A-109425.2	UGGCAAUGGCGUAGACACC CUCA	323	1913	1935
AD-53743.1	A-110636.1	GUGUCUACGCCAUUGCCAG GU	103	A-109427.2	ACCUGGCAAUGGCGUAGAC ACCC	324	1916	1938
AD-53749.1	A-110637.1	UGCAGCGUCCACACAGCUC CA	104	A-109429.2	UGGAGCUGUGUGGACGCUG CAGU	325	1960	1982
AD-53755.1	A-110638.1	GCAUGGGGACCCGUGUCCA CU	105	A-109431.2	AGUGGACACGGGUCCCCAU GCUG	326	1994	2016
AD-53761.1	A-110639.1	CCCACAAGCCGCCUGUGCU GA	106	A-109433.2	UCAGCACAGGCGGCUUGUG GGUG	327	2078	2100
AD-53767.1	A-110640.1	GAGGCCACGAGGUCAGCCC AA	107	A-109435.2	UUGGGCUGACCUCGUGGCC UCAG	328	2097	2119
AD-53773.1	A-110641.1	CACGAGGUCAGCCCAACCA GU	108	A-109437.2	ACUGGUUGGGCUGACCUCG UGGC	329	2102	2124
AD-53779.1	A-110642.1	GGGAGGCCAGCAUCCACGC UU	109	A-109439.2	AAGCGUGGAUGCUGGCCUC CCUG	330	2135	2157
AD-53785.1	A-110643.1	AUCCACGCUUCCUGCUGCC AU	110	A-109441.2	AUGGCAGCAGGAAGCGUGG AUGC	331	2146	2168

Nome do Dúplex	Nome do Oligo Senso	Seq de Trans Senso	SE Q ID NO:	Nome do Oligo Antissenso	Seq de Trans Antissenso	SE Q ID NO:	Começo em NM_174936. 3	Final em NM_174936. 3
AD-53744.1	A-110644.1	GGAAUGCAAAGUCAAGGAGCA	111	A-109443.2	UGCUCUUGACUUUGCAUUCAG	332	2178	2200
AD-53750.1	A-110645.1	AAUCCCGGCCCCUCAGGAGCA	112	A-109445.2	UGCUCUGAGGGGCCGGGAUCC	333	2202	2224
AD-53762.1	A-110647.1	GCUGGGGCUGAGCUUUAAA AU	113	A-109449.2	AUUUUAAAGCUCAGCCCCAGCCC	334	2479	2501
AD-53768.1	A-110648.1	GGAGGUGCCAGGAAGCUCCCU	114	A-109451.2	AGGGAGCUUCCUGGCACCUCCAC	335	2648	2670
AD-53774.1	A-110649.1	ACUGUGGGGCAUUUCACCAUU	115	A-109453.2	AAUGGUGAAAUGCCCCACAGUGA	336	2674	2696
AD-53780.1	A-110650.1	CCACCAAGGAGGCAGGAUUCU	116	A-109455.2	AGAAUCCUGCCUCCUUGGUGGAG	337	2811	2833
AD-53786.1	A-110651.1	CACCAAGGAGGCAGGAUUCUU	117	A-109457.2	AAGAAUCCUGCCUCCUUGGUGGA	338	2812	2834
AD-53804.1	A-110701.1	ACCAAGGAGGCAGGAUUCUU	118	A-109557.2	AAAGAAUCCUGCCUCCUUGGUGG	339	2813	2835
AD-53810.1	A-110702.1	GGAGGCAGGAUUCUCCCCAUUU	119	A-109559.2	AAUGGGAAGAAUCCUGCCUCUU	340	2818	2840
AD-53816.1	A-110703.1	GAGGCAGGAUUCUCCCCAUGA	120	A-109561.2	UCAUGGGAAGAAUCCUGCCUCCU	341	2819	2841
AD-53745.1	A-110652.1	UGAUGGCCCUCAUCUCCAGCU	121	A-109459.2	AGCUGGAGAUGAGGGCCAUCAGC	342	2904	2926

187/277

Nome do Dúplex	Nome do Oligo Senso	Seq de Trans Senso	SE Q ID NO:	Nome do Oligo Antissenso	Seq de Trans Antissenso	SE Q ID NO:	Começo em NM_174936. 3	Final em NM_174936. 3
AD-53822.1	A-110704.1	CUUUCUGGAUGGCAUCUAGCA	122	A-109563.2	UGCUGAUGCCAUCAGAAAGCU	343	2971	2993
AD-53751.1	A-110653.1	UUUCUGGAUGGCAUCUAGCA	123	A-109461.2	UGGCUAGAUGCCAUCAGAAAGC	344	2972	2994
AD-53827.1	A-110705.1	UUCUGGAUGGCAUCUAGCCAA	124	A-109565.2	UUGGCUAGAUGCCAUCAGAAAG	345	2973	2995
AD-53757.1	A-110654.1	UCUGGAUGGCAUCUAGCCAGA	125	A-109463.2	UCUGGCUAGAUGCCAUCAGAAA	346	2974	2996
AD-53833.1	A-110706.1	CUGGAUGGCAUCUAGCCAGAA	126	A-109567.2	UUCUGGCUAGAUGCCAUCAGAA	347	2975	2997
AD-53793.1	A-110707.1	CUUUACUCUGCUCUAUGCCAA	127	A-109569.2	UUGGCAUAGAGCAGAGUAAAGGU	348	3053	3075
AD-53799.1	A-110708.1	UUUACUCUGCUCUAUGCCAGA	128	A-109571.2	UCUGGCAUAGAGCAGAGUAAAGG	349	3054	3076
AD-53763.1	A-110655.1	GCUCUAUGCCAGGCUGUGCUA	129	A-109465.2	UAGCACAGCCUGGCAUAGAGCAG	350	3062	3084
AD-53769.1	A-110656.1	CUCAGCCAACCCGCUCCACUA	130	A-109467.2	UAGUGGAGCGGGUUGGCUGAGAC	351	3158	3180
AD-53805.1	A-110709.1	UCAGCCAACCCGCUCCACUAA	131	A-109573.2	UUAGUGGAGCGGGUUGGCUGAGA	352	3159	3181
AD-53811.1	A-110710.1	CCUGCCAAGCUCACACAGCAA	132	A-109575.2	UUGCUGUGUGAGCUUGGCAGGCA	353	3245	3267

Nome do Dúplex	Nome do Oligo Senso	Seq de Trans Senso	SE Q ID NO:	Nome do Oligo Antissenso	Seq de Trans Antissenso	SE Q ID NO:	Começo em NM_174936.3	Final em NM_174936.3
AD-53781.1	A-110658.1	GCCAAGCUCACACAGCAGGAA	133	A-109471.2	UUCUGCUGUGAGCUUGGCAG	354	3248	3270
AD-53817.1	A-110711.1	CCAAGCUCACACAGCAGGA	134	A-109577.2	UUUCCUGCUGUGAGCUUGGCA	355	3249	3271
AD-53787.1	A-110659.1	CAAGCUCACACAGCAGGAA	135	A-109473.2	AGUUCUGCUGUGAGCUUGGC	356	3250	3272
AD-53823.1	A-110712.1	AAGCUCACACAGCAGGAAC	136	A-109579.2	AAGUUCUGCUGUGAGCUUGG	357	3251	3273
AD-53746.1	A-110660.1	CUGAAGCCAAGCCUCUUCUUA	137	A-109475.2	UAAGAAGAGGCUUGGCUUCAGAG	358	3298	3320
AD-53828.1	A-110713.1	UGAAGCCAAGCCUCUUCUUA	138	A-109581.2	UUAAGAAGAGGCUUGGCUUCAGA	359	3299	3321
AD-53752.1	A-110661.1	GAAGCCAAGCCUCUUCUUA	139	A-109477.2	AGUAAGAAGAGGCUUGGCUUCAG	360	3300	3322
AD-53758.1	A-110662.1	AAGCCAAGCCUCUUCUUA	140	A-109479.2	AAGUAAGAAGAGGCUUGGC	361	3301	3323
AD-53834.1	A-110714.1	AGUGAGGCUGGGAAGGGG	141	A-109583.2	UUUCCCCUCCCAGCCUCACUGU	362	3355	3377
AD-53764.1	A-110663.1	GUGAGGCUGGGAAGGGGA	142	A-109481.2	UGUCCCCUCCCAGCCUCACUG	363	3356	3378
AD-53770.1	A-110664.1	GGCUGGGAAGGGGAACACA	143	A-109483.2	UCUGUGUCCCCUCCCAGCCUC	364	3360	3382

Nome do Dúplex	Nome do Oligo Senso	Seq de Trans Senso	SE Q ID NO:	Nome do Oligo Antissenso	Seq de Trans Antissenso	SE Q ID NO:	Começo em NM_174936. 3	Final em NM_174936. 3
AD-53776.1	A-110665.1	GAAGGGGAACACAGACCAGGA	144	A-109485.2	UCCUGGUCUGUGUUCCCCU UCCC	365	3366	3388
AD-53782.1	A-110666.1	AAGGGGAACACAGACCAGGAA	145	A-109487.2	UUCUGGUCUGUGUUCCCC UCC	366	3367	3389
AD-53794.1	A-110715.1	AGGGGAACACAGACCAGGA AA	146	A-109585.2	UUUCCUGGUCUGUGUUCCC CUUC	367	3368	3390
AD-53788.1	A-110667.1	GGGAACACAGACCAGGAAG CU	147	A-109489.2	AGCUUCCUGGUCUGUGUUC CCCU	368	3370	3392
AD-53747.1	A-110668.1	ACUGUCCCUCCUUGAGCAC CA	148	A-109491.2	UGGUGCUCAAGGAGGGACA GUUG	369	3509	3531
AD-53753.1	A-110669.1	CCAGCCCCACCCAAGCAAG CA	149	A-109493.2	UGCUUGCUUGGGUGGGGCU GGUG	370	3527	3549
AD-53759.1	A-110670.1	CCCCACCAAGCAAGCAGA CA	150	A-109495.2	UGUCUGCUUGCUUGGGUGG GGCU	371	3531	3553
AD-53765.1	A-110671.1	CCCACCAAGCAAGCAGAC AU	151	A-109497.2	AUGUCUGCUUGCUUGGGUG GGGC	372	3532	3554
AD-53771.1	A-110672.1	CCACCAAGCAAGCAGACA UU	152	A-109499.2	AAUGUCUGCUUGCUUGGGU GGGG	373	3533	3555
AD-53777.1	A-110673.1	CACCAAGCAAGCAGACAU UU	153	A-109501.2	AAAUGUCUGCUUGCUUGGG UGGG	374	3534	3556
AD-53783.1	A-110674.1	ACCAAGCAAGCAGACAUU UA	154	A-109503.2	UAAAUGUCUGCUUGCUUGG GUGG	375	3535	3557

Nome do Dúplex	Nome do Oligo Senso	Seq de Trans Senso	SE Q ID NO:	Nome do Oligo Antissenso	Seq de Trans Antissenso	SE Q ID NO:	Começo em NM_174936. 3	Final em NM_174936. 3
AD-53789.1	A-110675.1	CCCAAGCAAGCAGACAUUU AU	155	A-109505.2	AUAAAUGUCUGCUUGCUUG GGUG	376	3536	3558
AD-53800.1	A-110716.1	CCAAGCAAGCAGACAUUUUA UU	156	A-109587.2	AAUAAAUGUCUGCUUGCUUG GGU	377	3537	3559
AD-53748.1	A-110676.1	CAAGCAAGCAGACAUUUUAU CU	157	A-109507.2	AGAUAAAUGUCUGCUUGCUU GGG	378	3538	3560
AD-53754.1	A-110677.1	AAGCAAGCAGACAUUUUAUC UU	158	A-109509.2	AAGAUAAAUGUCUGCUUGCU UGG	379	3539	3561
AD-53760.1	A-110678.1	AGCAAGCAGACAUUUUAUCU UU	159	A-109511.2	AAAGAUAAAUGUCUGCUUGC UUG	380	3540	3562
AD-53806.1	A-110717.1	CAAGCAGACAUUUUAUCUUU UU	160	A-109589.2	AAAAAGAUAAAUGUCUGCUU GCU	381	3542	3564
AD-56975.1	A-116394.4	Mesma	160	A-109589.5	Mesma	381	Mesma	Mesma
AD-56976.1	A-116407.1	Mesma	160	A-109589.11	Mesma	381	Mesma	Mesma
AD-56977.1	A-116406.2	Mesma	160	A-109589.11	Mesma	381	Mesma	Mesma
AD-56978.1	A-116418.1	Mesma	160	A-109589.18	Mesma	381	Mesma	Mesma
AD-56979.1	A-116393.1	Mesma	160	A-109589.6	Mesma	381	Mesma	Mesma
AD-56980.1	A-116408.1	Mesma	160	A-109589.12	Mesma	381	Mesma	Mesma
AD-56981.1	A-116419.1	Mesma	160	A-109589.19	Mesma	381	Mesma	Mesma
AD-56982.1	A-116426.1	Mesma	160	A-109589.19	Mesma	381	Mesma	Mesma
AD-56983.1	A-116400.1	Mesma	160	A-109589.7	Mesma	381	Mesma	Mesma
AD-56984.1	A-116409.1	Mesma	160	A-109589.13	Mesma	381	Mesma	Mesma
AD-56985.1	A-116420.1	Mesma	160	A-109589.20	Mesma	381	Mesma	Mesma

Nome do Dúplex	Nome do Oligo Senso	Seq de Trans Senso	SE Q ID NO:	Nome do Oligo Antissenso	Seq de Trans Antissenso	SE Q ID NO:	Começo em NM_174936.3	Final em NM_174936.3
AD-56986.1	A-116428.1		160	A-109589.20		381		
AD-56986.2	A-116428.2		160	A-109589.17		381		
AD-56987.1	A-116410.1		160	A-109589.14		381		
AD-56988.1	A-116421.1		160	A-109589.21		381		
AD-56989.1	A-116430.1		160	A-109589.21		381		
AD-56990.1	A-116432.1		160	A-109589.9		381		
AD-56991.1	A-116415.1		160	A-109589.15		381		
AD-56992.1	A-116434.1		160	A-109589.15		381		
AD-56993.1	A-116416.1		160	A-109589.16		381		
AD-56994.1	A-116436.1		160	A-109589.22		381		
AD-56995.1	A-116417.1		160	A-109589.17		381		
AD-56996.1	A-116438.1		160	A-109589.17		381		
AD-56997.1	A-116450.1		160	A-109589.17		381		
AD-56998.1	A-116471.1		160	A-109589.17		381		
AD-56999.1	A-116479.2		160	A-109589.17		381		
AD-57000.1	A-116492.3		160	A-109589.17		381		
AD-57001.1	A-116440.1		160	A-109589.17		381		
AD-57002.1	A-116452.1		160	A-109589.17		381		
AD-57003.1	A-116460.1		160	A-109589.17		381		
AD-57004.1	A-116473.1		160	A-109589.17		381		
AD-57005.1	A-116486.1		160	A-109589.17		381		
AD-57006.1	A-116494.3		160	A-109589.17		381		

Nome do Dúplex	Nome do Oligo Senso	Seq de Trans Senso	SE Q ID NO:	Nome do Oligo Antissenso	Seq de Trans Antissenso	SE Q ID NO:	Começo em NM_174936.3	Final em NM_174936.3
AD-57007.1	A-116442.1		160	A-109589.17		381		
AD-57008.1	A-116453.1		160	A-109589.17		381		
AD-57009.1	A-116462.1		160	A-109589.17		381		
AD-57010.1	A-116475.1		160	A-109589.17		381		
AD-57011.1	A-116488.1		160	A-109589.17		381		
AD-57012.1	A-116498.1		160	A-109589.17		381		
AD-57013.1	A-116444.1		160	A-109589.17		381		
AD-57014.1	A-116454.1		160	A-109589.17		381		
AD-57015.1	A-116464.1		160	A-109589.17		381		
AD-57016.1	A-116477.1		160	A-109589.17		381		
AD-57017.1	A-116490.1		160	A-109589.17		381		
AD-57018.1	A-116500.1		160	A-109589.17		381		
AD-57019.1	A-116446.1		160	A-109589.17		381		
AD-57020.1	A-116455.1		160	A-109589.23		381		
AD-57021.1	A-116481.1		160	A-109589.23		381		
AD-57022.1	A-116448.1		160	A-109589.23		381		
AD-57023.1	A-116467.1		160	A-109589.23		381		
AD-57024.1	A-116483.1		160	A-109589.23		381		
AD-57025.1	A-116449.1		160	A-109589.23		381		
AD-57026.1	A-116457.1		160	A-109589.23		381		
AD-57027.1	A-116469.1		160	A-109589.23		381		

Nome do Dúplex	Nome do Oligo Senso	Seq de Trans Senso	SE Q ID NO:	Nome do Oligo Antissenso	Seq de Trans Antissenso	SE Q ID NO:	Começo em NM_174936.3	Final em NM_174936.3
AD-53812.1	A-110718.1	AAGCAGACAUUUAUCUUUU GA	161	A-109591.2	UCAAAGAUAAAUGUCUGCU UGC	382	3543	3565
AD-53818.1	A-110719.1	AGCAGACAUUUAUCUUUUUG GA	162	A-109593.2	UCCAAAAGAUAAAUGUCUGC UUG	383	3544	3566
AD-53766.1	A-110679.1	GCAGACAUUUAUCUUUUUGG GU	163	A-109513.2	ACCCAAAAGAUAAAUGUCUG CUU	384	3545	3567
AD-53772.1	A-110680.1	AGACAUUUAUCUUUUUGGGU CU	164	A-109515.2	AGACCCAAAAGAUAAAUGUC UGC	385	3547	3569
AD-53824.1	A-110720.1	GACAUUUAUCUUUUUGGGUC UU	165	A-109595.2	AAGACCCAAAAGAUAAAUGU CUG	386	3548	3570
AD-53778.1	A-110681.1	ACAUUUAUCUUUUUGGGUCU GU	166	A-109517.2	ACAGACCCAAAAGAUAAAUG UCU	387	3549	3571
AD-53784.1	A-110682.1	UUUAUCUUUUUGGGUCUGUC CU	167	A-109519.2	AGGACAGACCCAAAAGAUAA AUG	388	3552	3574
AD-53829.1	A-110721.1	UUAUCUUUUUGGGUCUGUCC UU	168	A-109597.2	AAGGACAGACCCAAAAGAU AAU	389	3553	3575
AD-53790.1	A-110683.1	UAUCUUUUUGGGUCUGUCCU CU	169	A-109521.2	AGAGGACAGACCCAAAAGAU AAA	390	3554	3576
AD-53835.1	A-110722.1	AUCUUUUUGGGUCUGUCCUC UU	170	A-109599.2	AAGAGGACAGACCCAAAAGA UAA	391	3555	3577
AD-53796.1	A-110684.1	UCUUUUUGGGUCUGUCCUCU CU	171	A-109523.2	AGAGAGGACAGACCCAAAAG AUA	392	3556	3578

Nome do Dúplex	Nome do Oligo Senso	Seq de Trans Senso	SE Q ID NO:	Nome do Oligo Antissenso	Seq de Trans Antissenso	SE Q ID NO:	Começo em NM_174936.3	Final em NM_174936.3
AD-53802.1	A-110685.1	UUUUGGGUCUGUCCUCUCUGU	172	A-109525.2	ACAGAGAGGACAGACCCAAA AGA	393	3558	3580
AD-53808.1	A-110686.1	UUUUGGGUCUGUCCUCUCUGUU	173	A-109527.2	AACAGAGAGGACAGACCCAA AAG	394	3559	3581
AD-53795.1	A-110723.1	UUGGGUCUGUCCUCUCUGUU	174	A-109601.2	AAACAGAGAGGACAGACCCA AAA	395	3560	3582
AD-53801.1	A-110724.1	UGGGUCUGUCCUCUCUGUU	175	A-109603.2	UCAACAGAGAGGACAGACCC AAA	396	3561	3583
AD-53807.1	A-110725.1	GGGUCUGUCCUCUCUGUU	176	A-109605.2	UGCAACAGAGAGGACAGACC CAA	397	3562	3584
AD-53814.1	A-110687.1	GGUCUGUCCUCUCUGUUGC	177	A-109529.2	AGGCAACAGAGAGGACAGAC CCA	398	3563	3585
AD-53820.1	A-110688.1	GUCUGUCCUCUCUGUUGCC	178	A-109531.2	AAGGCAACAGAGAGGACAGA CCC	399	3564	3586
AD-53825.1	A-110689.1	UCUGUCCUCUCUGUUGCCU	179	A-109533.2	AAAGGCAACAGAGAGGACAG ACC	400	3565	3587
AD-53831.1	A-110690.1	CUGUCCUCUCUGUUGCCUU	180	A-109535.2	AAAAGGCAACAGAGAGGACA GAC	401	3566	3588
AD-53791.1	A-110691.1	UGUCCUCUCUGUUGCCUUU	181	A-109537.2	AAAAAGGCAACAGAGAGGAC AGA	402	3567	3589
AD-53797.1	A-110692.1	GUCCUCUCUGUUGCCUUU	182	A-109539.2	UAAAAAGGCAACAGAGAGGA CAG	403	3568	3590
AD-48400.1	A-98247.2	UUUUCUAGACCGUUUUUGC	183	A-93455.4	AAGCAAAACAGGUCUAGAAA	404	3597	3619

Nome do Dúplex	Nome do Oligo Senso	Seq de Trans Senso	SE Q ID NO:	Nome do Oligo Antissenso	Seq de Trans Antissenso	SE Q ID NO:	Começo em NM_174936.3	Final em NM_174936.3
AD-53830.1	A-110872.1	UU		A-110873.1	AGU			
AD-53803.1	A-110693.1	UUUCUAGACCUGUUUUGCU UU	184	A-109541.2	AAAGCAAAACAGGUCUAGAA AAG	405	3598	3620
AD-53809.1	A-110694.1	UUCUAGACCUGUUUUGCUU UU	185	A-109543.2	AAAAGCAAAACAGGUCUAGA AAA	406	3599	3621
AD-53813.1	A-110726.1	UCUAGACCUGUUUUGCUUU UU	186	A-109607.2	AAAAAGCAAAACAGGUCUAG AAA	407	3600	3622
AD-53815.1	A-110695.1	CUAGACCUGUUUUGCUUUU	187	A-109545.2	ACAAAAGCAAAACAGGUCUA	408	3601	3623 Mesma
AD-56610.1	A-115523.2	GU	187	A-115525.1	GAA	408		
AD-56611.1	A-115533.2		187	A-115534.1		408		
AD-56612.1	A-115536.2	Mesma	187	A-115540.3	Mesma	408		
AD-56613.1	A-115538.3		187	A-115541.5		408		
AD-56614.1	A-110695.9		187	A-115548.1		408		
AD-56615.1	A-110695.5	Mesma	187	A-115519.1	Mesma	408		
AD-56616.1	A-115523.3	Mesma	187	A-115526.1	Mesma	408		
AD-56617.1	A-115535.1		187	A-109545.7		408		
AD-56618.1	A-115537.2		187	A-115540.4		408		
AD-56619.1	A-115539.3		187	A-115541.6		408		
AD-56620.1	A-115542.2		187	A-115548.2		408		
AD-56621.1	A-115520.1		187	A-115519.2		408		
AD-56622.1	A-115527.1		187	A-115526.2		408		

Nome do Dúplex	Nome do Oligo Senso	Seq de Trans Senso	SE Q ID NO:	Nome do Oligo Antissenso	Seq de Trans Antissenso	SE Q ID NO:	Começo em NM_174936.3	Final em NM_174936.3
AD-56623.1	A-115536.1		187	A-109545.8		408		
AD-56624.1	A-115538.2		187	A-115540.5		408		
AD-56625.1	A-115542.1		187	A-109545.12		408		
AD-56626.1	A-115543.2		187	A-115548.3		408		
AD-56627.1	A-115521.1		187	A-115519.3		408		
AD-56628.1	A-115527.2		187	A-115528.1		408		
AD-56629.1	A-115537.1		187	A-109545.9		408		
AD-56630.1	A-115539.2		187	A-115540.6		408		
AD-56631.1	A-115543.1		187	A-109545.13		408		
AD-56632.1	A-115544.2		187	A-115548.4		408		
AD-56633.1	A-115520.2		187	A-109545.6		408		
AD-56634.1	A-115529.1		187	A-115530.1		408		
AD-56635.1	A-115538.1		187	A-109545.10		408		
AD-56636.1	A-110695.8		187	A-115541.1		408		
AD-56637.1	A-115544.1		187	A-109545.14		408		
AD-56638.1	A-115545.2		187	A-115548.5		408		
AD-56639.1	A-115520.3		187	A-115522.1		408		
AD-56640.1	A-115529.2		187	A-115531.1		408		
AD-56641.1	A-115539.1		187	A-109545.11		408		
AD-56642.1	A-115535.3		187	A-115541.2		408		
AD-56643.1	A-115545.1		187	A-109545.15		408		
AD-56644.1	A-115546.2		187	A-115548.6		408		

Nome do Dúplex	Nome do Oligo Senso	Seq de Trans Senso	SE Q ID NO:	Nome do Oligo Antissenso	Seq de Trans Antissenso	SE Q ID NO:	Começo em NM_174936.3	Final em NM_174936.3
AD-56645.1	A-110695.6		187	A-115522.2		408		
AD-56646.1	A-115529.3		187	A-115532.1		408		
AD-56647.1	A-110695.7		187	A-115540.1		408		
AD-56648.1	A-115536.3		187	A-115541.3		408		
AD-56649.1	A-115546.1		187	A-109545.16		408		
AD-56650.1	A-115547.2		187	A-115548.7		408		
AD-56651.1	A-115523.1		187	A-115524.1		408		
AD-56652.1	A-115533.1		187	A-115532.2		408		
AD-56653.1	A-115535.2		187	A-115540.2		408		
AD-56654.1	A-115537.3		187	A-115541.4		408		
AD-56655.1	A-115547.1		187	A-109545.17		408		
AD-56656.1	A-110695.10		187	A-115549.1		408		
AD-56657.1	A-115550.1		187	A-115551.1		408		
AD-56658.1	A-115564.1		187	A-115565.1		408		
AD-56659.1	A-110695.12		187	A-115579.1		408		
AD-56662.1	A-115542.3		187	A-115549.2		408		
AD-56663.1	A-115552.1		187	A-115553.1		408		
AD-56664.1	A-115566.1		187	A-115567.1		408		
AD-56668.1	A-115543.3		187	A-115549.3		408		
AD-56669.1	A-115554.1		187	A-115555.1		408		
AD-56670.1	A-115568.1		187	A-115569.1		408		
AD-56673.1	A-115544.3		187	A-115549.4		408		

Nome do Dúplex	Nome do Oligo Senso	Seq de Trans Senso	SE Q ID NO:	Nome do Oligo Antissenso	Seq de Trans Antissenso	SE Q ID NO:	Começo em NM_174936. 3	Final em NM_174936. 3
AD-56674.1	A-115556.1		187	A-115557.1		408		
AD-56678.1	A-115545.3		187	A-115549.5		408		
AD-56679.1	A-115558.1		187	A-115559.1		408		
AD-56680.1	A-115572.1		187	A-115573.1		408		
AD-56683.1	A-115546.3		187	A-115549.6		408		
AD-56684.1	A-115560.1		187	A-115561.1		408		
AD-56685.1	A-115574.1		187	A-115575.1		408		
AD-56688.1	A-115547.3		187	A-115549.7		408		
AD-56689.1	A-115535.4		187	A-115562.1		408		
AD-56690.1	A-115542.4		187	A-115576.1		408		
AD-56693.1	A-115520.4		187	A-115563.1		408		
AD-56694.1	A-115577.1		187	A-115578.1		408		
AD-53821.1	A-110696.1	UAGACCUGUUUUGCUUUUG UA	188	A-109547.2	UACAAAAGCAAAACAGGUCU AGA	409	3602	3624
AD-56660.1	A-115594.1	AGACCUGUUUUGCUUUUGU	189	A-115595.1	ACAAAAGCAAAACAGGUCUA	410	3603	3623
AD-56661.1	A-115580.2	Mesma	189	A-115610.1	G	410		
AD-56665.1	A-115580.1		189	A-115581.1	Mesma	410		
AD-56666.1	A-115596.1		189	A-115597.1		410		
AD-56667.1	A-115611.1	GACCUGUUUUGCUUUUGU	190	A-115612.1	ACAAAAGCAAAACAGGUCAU A	411	3603	3623
AD-56671.1	A-115582.1	AGACCUGUUUUGCUUUUGU	191	A-115583.1	ACAAAAGCAAAACAGGUCUA	412	3603	3623
AD-56672.1	A-115598.1		191	A-115599.1	G	412		

Nome do Dúplex	Nome do Oligo Senso	Seq de Trans Senso	SE Q ID NO:	Nome do Oligo Antissenso	Seq de Trans Antissenso	SE Q ID NO:	Começo em NM_174936. 3	Final em NM_174936. 3
AD-56676.1	A-115584.1	Mesma	191	A-115585.1	Mesma	412	Mesma	Mesma
AD-56677.1	A-115600.1	Mesma	191	A-115601.1	Mesma	412		
AD-56681.1	A-115586.1		191	A-115587.1		412		
AD-56682.1	A-115602.1		191	A-115603.1		412		
AD-56686.1	A-115588.1		191	A-115589.1		412		
AD-56687.1	A-115604.1		191	A-115605.1		412		
AD-56691.1	A-115590.1		191	A-115591.1		412		
AD-56692.1	A-115606.1		191	A-115607.1		412		
AD-56695.1	A-115592.1		191	A-115593.1		412		
AD-56696.1	A-115608.1		191	A-115609.1		412		
AD-53826.1	A-110697.1	UUUUGUAACUUGAAGAUU UU	192	A-109549.2	AAUAUUCUUCAGUUACAAA AGC	413	3616	3638
AD-53832.1	A-110698.1	UUUGUAACUUGAAGAUUU UA	193	A-109551.2	UAAUAUUCUUCAGUUACAA AAG	414	3617	3639
AD-53792.1	A-110699.1	UUGUAACUUGAAGAUUUU AU	194	A-109553.2	AUAAUAUUCUUCAGUUACA AAA	415	3618	3640
AD-53798.1	A-110700.1	UGUAACUUGAAGAUUUUA UU	195	A-109555.2	AAUAAUAUUCUUCAGUUAC AAA	416	3619	3641
AD-53819.1	A-110727.1	GUAACUUGAAGAUUUUAU UU	196	A-109609.2	AAAUAAUAUUCUUCAGUUA CAA	417	3620	3642
AD-53815.1		CUAGACCUGUUUUGCUUUU GU	197		ACAAAAGCAAAACAGGUCUA GAA	418	3601	

Nome do Dúplex	Nome do Oligo Senso	Seq de Trans Senso	SE Q ID NO:	Nome do Oligo Antissenso	Seq de Trans Antissenso	SE Q ID NO:	Começo em NM_174936.3	Final em NM_174936.3
AD-57928.40		Mesma Mesma	197		Mesma Mesma	418		
AD-59182.5			197			418		
AD-59184.3			197			418		
AD-59186.3			197			418		
AD-59171.13			197			418		
AD-59176.7			197			418		
AD-59170.7			197			418		
AD-59175.7			197			418		
AD-59179.7			197			418		
AD-59218.1			197			418		
AD-59222.1			197			418		
AD-59226.1			197			418		
AD-59230.1			197			418		
AD-59235.1			197			418		
AD-59207.1			197			418		
AD-59211.1			197			418		
AD-59215.1			197			418		
AD-59219.1			197			418		
AD-59223.1			197			418		
AD-59181.5			197			418		
AD-59172.5			197			418		
AD-59177.5			197			418		

Nome do Dúplex	Nome do Oligo Senso	Seq de Trans Senso	SE Q ID NO:	Nome do Oligo Antissenso	Seq de Trans Antissenso	SE Q ID NO:	Começo em NM_174936. 3	Final em NM_174936. 3
AD-59180.5			197			418		
AD-59183.5			197			418		
AD-59185.5			197			418		
AD-59173.5			197			418		
AD-59232.1		CUAGACCUGUUUUGCUUUU GU	198		ACAAAAGCAAAACAGGUCUA GAA	419	3600	
AD-59236.1		Mesma	198		Mesma	419	Mesma	
AD-59216.1			198			419		
AD-59220.1			198			419		
AD-59224.1			198			419		
AD-59228.1			198			419		
AD-59233.1			198			419		
AD-59237.1			198			419		
AD-59209.1			198			419		
AD-59208.1			198			419		
AD-59212.1		CUAGACCUGUUUUGCUUUU GU	199		ACAAAAGCAAAACAGGUCUA GAA	420	3600	
AD-59210.1		CUAGACCUGUUUUGCUUUU GU	200		ACAAAAGCAAAACAGGUCUA GAA	421	3601	
AD-59214.1		AGACCUGUUUUGCUUUUGU	201		ACAAAAGCAAAACAGGUCUA G	422	3603	
AD-59227.1			201			422		

Nome do Dúplex	Nome do Oligo Senso	Seq de Trans Senso	SE Q ID NO:	Nome do Oligo Antissenso	Seq de Trans Antissenso	SE Q ID NO:	Começo em NM_174936. 3	Final em NM_174936. 3
AD-59231.1		Mesma	201		Mesma	422		
AD-59198.3			201		Mesma	422		
AD-59200.3		Mesma	201			422		
AD-59203.3			201			422		
AD-59204.3			201			422		
AD-59188.3			201			422		
AD-59191.3			201			422		
AD-59213.1			201			422		
AD-59217.1			201			422		
AD-59221.1			201			422		
AD-59225.1			201			422		
AD-59229.1			201			422		
AD-59234.1			201			422		
AD-59238.1			201			422		
AD-59241.1			201			422		
AD-59245.1			201			422		
AD-59250.1			201			422		
AD-59246.1		CUAGACCUGUUUUGCUUUU GU	202		ACAAAAGCAAAACAGGUCUA GA	423	3602	
AD-59253.2		UAGACCUGUUUUGCUUUUG U	203		ACAAAAGCAAAACAGGUCUA GA	424	3602	

Nome do Dúplex	Nome do Oligo Senso	Seq de Trans Senso	SE Q ID NO:	Nome do Oligo Antissenso	Seq de Trans Antissenso	SE Q ID NO:	Começo em NM_174936. 3	Final em NM_174936. 3
AD-59242.1		AGACCUGUUUUGCUUUUGU	204		ACAAAAGCAAAACAGGUCUA GA	425	3602	
AD-59253.1		UAGACCUGUUUUGCUUUUG U	205		ACAAAAGCAAAACAGGUCUA GA	426	3602	
AD-59258.1		UAGACCUGUUUUGCUUUUG U	206		ACAAAAGCAAAACAGGUCUA GA	427	3602	
AD-59251.1		CUAGACCUGUUUUGCUUUU GU	207		ACAAAAGCAAAACAGGUCUA G	428	3603	
AD-59256.1		UAGACCUGUUUUGCUUUUG U	208		ACAAAAGCAAAACAGGUCUA	429	3604	
AD-59260.1		AGACCUGUUUUGCUUUUGU	209		ACAAAAGCAAAACAGGUCU	430	3605	
AD-59248.1		GACCUGUUUUGCUUUUGU	210		ACAAAAGCAAAACAGGUCU	431	3605	
AD-59247.1		GACCUGUUUUGCUUUUGU	211		ACAAAAGCAAAACAGGUCUA	432	3604	
AD-59252.1		AGACCUGUUUUGCUUUUGU	212		ACAAAAGCAAAACAGGUCUA	433	3604	
AD-59257.1		UAGACCUGUUUUGCUUUUG U	213		ACAAAAGCAAAACAGGUCUA	434	3604	
AD-59261.1		AGACCUGUUUUGCUUUUGU	214		ACAAAAGCAAAACAGGUCUA G	435	3603	
AD-59262.1		UAGACCUGUUUUGCUUUUG U	215		ACAAAAGCAAAACAGGUCUA G	436	3603	
AD-59265.1		CUAGACCUGUUUUGCUUUU GU	216		ACAAAAGCAAAACAGGUCUA G	437	3603	

Nome do Dúplex	Nome do Oligo Senso	Seq de Trans Senso	SE Q ID NO:	Nome do Oligo Antissenso	Seq de Trans Antissenso	SE Q ID NO:	Começo em NM_174936. 3	Final em NM_174936. 3
AD-59196.13		UAGACCUGUUUUGCUUUUGU	217		ACAAAAGCAAAACAGGUCUA GAA	438	3601	
AD-59189.11		AGACCUGUUUUGCUUUUGU	218		ACAAAAGCAAAACAGGUCUA GAA	439	3601	
AD-59190.3		UCUAGACCUGUUUUGCUUUUGU	219		ACAAAAGCAAAACAGGUCUA GAA	440	3601	
AD-59192.3		UUCUAGACCUGUUUUGCUUUUGU	220		ACAAAAGCAAAACAGGUCUA GAA	441	3601	
AD-59240.1		Mesma	220		Mesma	441	Mesma	
AD-59244.1			220			441		
AD-59202.7			220			441		
AD-59195.5			220			441		
AD-59249.1			220			441		
AD-59254.1			220			441		
AD-59259.1			220			441		
AD-59264.1			220			441		
AD-59264.2			220			441		
AD-59255.1			220			441		
AD-57928.1			220			441		
AD-58893.1			220			441		
AD-58894.1			220			441		
AD-58895.1			220			441		

205/277

Nome do Dúplex	Nome do Oligo Senso	Seq de Trans Senso	SE Q ID NO:	Nome do Oligo Antissenso	Seq de Trans Antissenso	SE Q ID NO:	Começo em NM_174936. 3	Final em NM_174936. 3
AD-58896.1			220			441		
AD-58897.1			220			441		
AD-58898.1			220			441		
AD-58899.1			220			441		
AD-58900.1		CAAGCAGACAUUUAUCUUU UU	221		AAAAAGAUAAAUGUCUGCUU GCU	442	N/A	
AD-58902.1		UUUUCUAGACCGUUUUUGC UU	222		AAGCAAAACAGGUCUAGAAA AGU	443	3597	
		AGACCUGUUUUGCUUUUGU	223		ACAAAAGCAAAACAGGUCUA G	444		
		AGACCUGUUUUGCUUUUGU	224		ACAAAAGCAAAACAGGUCUA G	445		
		AGACCUGUUUUGCUUUUGU	225		ACAAAAGCAAAACAGGUCUA G	446		
		AGACCUGUUUUGCUUUUGU	226		ACAAAAGCAAAACAGGUCUA G	447		
		AGACCUGUUUUGCUUUUGU	227		ACAAAAGCAAAACAGGUCUA G	448		
		AGACCUGUUUUGCUUUUGU	228		ACAAAAGCAAAACAGGUCUA G	449		
		CUAGACCUGUUUUGCUUUU GU	229		ACAAAAGCAAAACAGGUCUA GAA	450		
			229			450		

Nome do Dúplex	Nome do Oligo Senso	Seq de Trans Senso	SE Q ID NO:	Nome do Oligo Antissenso	Seq de Trans Antissenso	SE Q ID NO:	Começo em NM_174936.3	Final em NM_174936.3
		Mesma	229		Mesma	450		
			229			450		
			229			450		
			229			450		
			229			450		
			229			450		
			229			450		
			229			450		
			229			450		
			229			450		
			229			450		
			229			450		
			229			450		
			229			450		
			229			450		
		AGACCUGUUUUGCUUUUGU	230		ACAAAAGCAAAACAGGUCUAG	451		
		AGACCUGUUUUGCUUUUGU	231		ACAAAAGCAAAACAGGUCUAG	452		
		CUAGACCUGUUUUGCUUUU	232		ACAAAAGCAAAACAGGUCUAG	453		
		GU	232		GAA	453		
		Mesma	232		Mesma	453		
			232			453		
			232			453		
			232			453		
			232			453		
		CUAGACCUGUUUUGCUUUU	233		ACAAAAGCAAAACAGGUCUAG	454		
		GU	233		GAA	454		

[illegible]

Nome do Dúplex	Nome do Oligo Senso	Seq de Trans Senso	SE Q ID NO:	Nome do Oligo Antissenso	Seq de Trans Antissenso	SE Q ID NO:	Começo em NM_174936. 3	Final em NM_174936. 3
			233			454		
			233			454		
			233			454		
		Mesma	233		Mesma	454		
			233			454		
			233			454		
			233			454		
			233			454		
			233			454		
			233			454		
			233			454		
			233			454		
			233			454		
			233			454		
			233			454		
			233			454		
			233			454		
			233			454		
			233			454		
			233			454		
			233			454		
			233			454		
			233			454		

209/277

[illegible]

Tabela 2. Sequências modificadas - PCSK9

Nome do Dúplex	Nome do Oligo Senso	Sequência do Oligo Senso	SEQ ID NO:	Posição em relação a NM_174936.3	Nome do Oligo Antissenso	Sequência do Oligo Antissenso	SEQ ID NO:
AD-53649.1	A-110542.1	CfgAfgGfaCfGfCfGfaCfuAfcGfaGfgAfL96	455	461	A-109239.2	uCfcUfcGfuAfgUfcgcCfGfCfuCfGfsUfs	1006
AD-53650.1	A-110550.1	GfcCfGfGfGfaUfAfCfcUfcAfcCfaAfgAfL96	456	673	A-109255.2	uCfuUfgGfuGfaGfguaUfcCfcCfGfGfsGfsg	1007
AD-53651.1	A-110558.1	GfcCfcCfaUfgUfCfGfaCfuAfcAfuCfGfAfL96	457	773	A-109271.2	uCfGfAfuGfuAfgUfcgaCfaUfgGfGfGfsAfsc	1008
AD-53652.1	A-110566.1	CfcUfgGfuGfgAfGfGfuGfuAfuCfuCfcUfL96	458	896	A-109287.2	aGfgAfgAfuAfcAfccuCfcAfcCfaGfGfsCfsu	1009
AD-53653.1	A-110574.1	UfcCfuAfgAfcAfCfCfaGfcAfuAfcAfgAfL96	459	913	A-109303.2	uCfuGfuAfuGfcUfgguGfuCfuAfgGfasGfsa	1010
AD-53654.1	A-110582.1	GfcAfgGfgUfcAfUfGfgUfcAfcCfGfAfuL96	460	955	A-109319.2	aGfuCfGfGfuGfaCfcuGfaCfcCfuGfGfsCfsc	1011
AD-53696.1	A-110589.1	CfcUfgCfGfCfGfUfGfCfuCfaAfuUfgCfcAfL96	461	1109	A-109333.2	uGfgCfaGfuUfgAfgcaCfGfCfGfGfsCfsu	1012
AD-53697.1	A-110597.1	UfaGfgCfcUfgGfAfGfuUfuAfuUfcGfgAfL96	462	1159	A-109349.2	uCfcGfaAfuAfaAfcucCfaGfgCfcUfasUfsg	1013
AD-53698.1	A-110605.1	GfgGfaCfGfAfuGfCfCfuGfcCfuCfuAfuL96	463	1318	A-109365.2	aGfuAfgAfgGfcAfggcAfuCfGfCfGfsGfsg	1014
AD-53699.1	A-110613.1	GfcAfuUfgCfaGfCfCfaUfgAfuGfcUfgUfL96	464	1543	A-109381.2	aCfaGfcAfuCfaUfggcUfgCfaAfuGfGfsCfsa	1015
AD-53700.1	A-110621.1	GfgCfcUfgGfuUfCfCfcUfgAfgGfaCfcAfL96	465	1640	A-109397.2	uGfgUfcCfuCfaGfggaAfcCfaGfgCfGfsUfsc	1016
AD-53701.1	A-110629.1	CfGfCfuUfuUfgGfGfGfgUfgAfgGfgUfgUfL96	466	1901	A-109413.2	aCfaCfcCfuCfaCfcccCfaAfaAfgCfGfsUfs	1017
AD-48400.1	A-98247.2	UfuUfuCfuAfgAfcCfuGfuUfuUfgCfuUfL96	467		A-93455.4	aAfgCfaAfaAfcAfgGfuCfuAfgAfaAfasGfsu	1018
AD-53656.1	A-110551.1	CfcGfgGfgAfuAfcCfCfuCfaCfcAfaGfaUfL96	468	674	A-109257.2	aUfcUfuGfgUfgAfgguAfuCfcCfcGfGfsCfsg	1019
AD-53657.1	A-110559.1	CfcAfuGfuCfGfAfcCfUfaCfaUfcGfaGfgAfL96	469	776	A-109273.2	uCfcUfcGfaUfgUfaguCfGfAfcAfuGfGfsGfsg	1020
AD-53658.1	A-110567.1	CfuGfgUfgGfaGfGfUfgUfaUfcUfcCfuAfL96	470	897	A-109289.2	uAfgGfaGfaUfaCfaccUfcCfaCfcAfgGfsGfs	1021
AD-53659.1	A-110575.1	AfgAfcAfcCfaGfCfAfuAfcAfgAfgUfgAfL96	471	917	A-109305.2	uCfaCfuCfuGfuAfuGfGfgUfgGfuGfuCfusAfs	1022
AD-53660.1	A-110583.1	CfaGfgGfuCfaUfGfGfuCfaCfcGfaCfuUfL96	472	956	A-109321.2	aAfgUfcGfgUfgAfccaUfgAfcCfcUfgGfsCfsc	1023
AD-53702.1	A-110590.1	CfuGfcGfcGfuGfCfUfcAfaCfuGfcCfaAfL96	473	1110	A-109335.2	uUfgGfcAfgUfuGfagcAfcGfcGfcAfgGfsGfs	1024
AD-53703.1	A-110598.1	AfgGfcCfuGfgAfgGfUfuUfaUfuCfGfGfaAfL96	474	1160	A-109351.2	uUfcCfGfAfaUfaAfacuCfcAfgGfcCfusAfs	1025

Nome do Dúplex	Nome do Oligo Senso	Sequência do Oligo Senso	SEQ ID NO:	Posição em relação a Antissenso NM_174936.3	Nome do Oligo Antissenso	Sequência do Oligo Antissenso	SEQ ID NO:
						u	
AD-53704.1	A-110606.1	CfaAfcUfuUfgGfCfCfGfCfuGfuGfuGfgAfL96	475	1421	A-109367.2	uCfcAfcAfcAfgCfggcCfaAfaGfuUfGfGfs	1026
AD-53705.1	A-110614.1	GfuUfgAfgGfcAfGfAfgAfcUfgAfuCfcAfL96	476	1592	A-109383.2	uGfgAfuCfaGfuCfucuGfcCfuCfaAfcsUfsc	1027
AD-53706.1	A-110622.1	GfgUfaCfuGfaCfCfCfcCfaAfcCfuGfgUfL96	477	1664	A-109399.2	aCfcAfgGfuUfgGfgggUfcAfgUfaCfcsCfsg	1028
AD-53707.1	A-110630.1	CfuUfuUfgGfgGfGfUfgAfgGfgUfgUfcUfL96	478	1903	A-109415.2	aGfaCfaCfcCfuCfaccCfcCfaAfaAfgsCfsg	1029
AD-53661.1	A-110544.1	AfcCfGfCfuGfcGfCfCfaAfgGfaUfcCfGfUfL96	479	556	A-109243.2	aCfGfGfaUfcCfuUfggcGfcAfgCfGfGfGfsg	1030
AD-53663.1	A-110560.1	UfcGfaCfuAfcAfUfCfGfAfgGfaGfgAfcUfL96	480	781	A-109275.2	aGfuCfcUfcCfuCfGauGfuAfgUfcGfasCfsa	1031
AD-53664.1	A-110568.1	GfgUfgGfaGfgUfGfUfaUfcUfcCfuAfgAfL96	481	899	A-109291.2	uCfuAfgGfaGfaUfacaCfcUfcCfaCfcsAfsg	1032
AD-53665.1	A-110576.1	CfaCfcAfgCfaUfAfCfaGfaGfuGfaCfcAfL96	482	920	A-109307.2	uGfgUfcAfcUfcUfguaUfgCfuGfgUfGfUfsc	1033
AD-53666.1	A-110584.1	GfgUfcAfuGfgUfCfAfcCfGfAfcUfuCfGfAfL96	483	959	A-109323.2	uCfGfAfaGfuCfGfGfugaCfcAfuGfaCfcsCfsu	1034
AD-53708.1	A-110591.1	CfGfUfgCfuCfaAfCfUfgCfcAfaGfgGfaAfL96	484	1115	A-109337.2	uUfcCfcUfuGfgCfaguUfgAfgCfaCfGfCfsg	1035
AD-53709.1	A-110599.1	GfgCfcUfgGfaGfUfUfuAfuUfcGfgAfaAfL96	485	1161	A-109353.2	uUfuCfcGfaAfuAfaacUfcCfaGfgCfcsUfGfA	1036
AD-53710.1	A-110607.1	UfuGfgCfcGfcUfGfUfgUfgGfaCfcUfcUfL96	486	1426	A-109369.2	aGfaGfgUfcCfaCfacaGfcGfgCfcAfGfAfsg	1037
AD-53711.1	A-110615.1	UfgAfgGfcAfgAfGfAfcUfgAfuCfcAfcUfL96	487	1594	A-109385.2	aGfuGfgAfuCfaGfucuCfuGfcCfuCfasAfsc	1038
AD-53712.1	A-110623.1	GfuUfgGfcAfgCfUfGfuUfuUfgCfaGfgAfL96	488	1717	A-109401.2	uCfcUfgCfaAfaAfcagCfuGfcCfaAfcsCfs	1039
AD-53713.1	A-110631.1	UfuUfuGfgGfgGfUfGfaGfgGfuGfuCfuAfL96	489	1904	A-109417.2	uAfgAfcAfcCfcUfcacCfcCfcAfaAfGfGfsc	1040
AD-53667.1	A-110545.1	GfcUfgCfGfCfcAfAfGfgAfuCfcGfuGfgAfL96	490	559	A-109245.2	uCfcAfcGfgAfuCfcuuGfgCfGfCfaGfcsGfsg	1041
AD-53668.1	A-110553.1	AfuAfcCfuCfaCfCfAfaGfaUfcCfuGfcAfL96	491	680	A-109261.2	uGfcAfgGfaUfcUfuggUfgAfgGfuAfusCfsc	1042
AD-53669.1	A-110561.1	AfcUfaCfaUfcGfAfGfgAfgGfaCfuCfcUfL96	492	784	A-109277.2	aGfgAfgUfcCfuCfcucGfaUfgUfaGfGfGfsc	1043
AD-53670.1	A-110569.1	UfgGfaGfgUfgUfAfUfcUfcCfuAfgAfcAfL96	493	901	A-109293.2	uGfuCfuAfgGfaGfaaCfaCfcUfcCfasCfsc	1044
AD-53671.1	A-110577.1	UfaCfaGfaGfuGfAfCfcAfcCfGfgAfaAfL96	494	928	A-109309.2	uUfuCfcCfGfGfuGfgucAfcUfcUfgUfasUfsg	1045
AD-53672.1	A-110585.1	UfcAfuGfgUfcAfCfCfGfAfcUfuCfGfAfgAfL96	495	961	A-109325.2	uCfuCfGfAfaGfuCfGguGfaCfcAfuGfasCfsc	1046
AD-53714.1	A-110592.1	CfaCfcCfuCfaUfAfGfgCfcUfgGfaGfuUfL96	496	1151	A-109339.2	aAfcUfcCfaGfgCfcuaUfgAfgGfgUfGfGfsc	1047

Nome do Dúplex	Nome do Oligo Senso	Sequência do Oligo Senso	SEQ ID NO:	Posição em relação a NM_174936.3	Nome do Oligo Antissenso	Sequência do Oligo Antissenso	SEQ ID NO:
						c	
AD-53715.1	A-110600.1	GfcCfuGfgAfgUfUfUfaUfuCfGfGfaAfaAfL96	497	1162	A-109355.2	uUfuUfcCfGfAfaUfaaaCfuCfcAfgGfcsCfs	1048
AD-53716.1	A-110608.1	UfgGfcCfGfCfuGfUfGfuGfgAfcCfuCfuUfL96	498	1427	A-109371.2	aAfgAfgGfuCfcAfcacAfgCfGfCfasAfs	1049
AD-53717.1	A-110616.1	GfaGfgCfaGfaGfAfCfuGfaUfcCfaCfuUfL96	499	1595	A-109387.2	aAfgUfgGfaUfcAfgucUfcUfgCfcUfcsAfs	1050
AD-53718.1	A-110624.1	UfgGfcAfgCfuGfUfUfuUfgCfaGfgAfcUfL96	500	1719	A-109403.2	aGfuCfcUfgCfaAfaacAfgCfuGfcCfasAfs	1051
AD-53719.1	A-110632.1	GfgGfgUfgAfgGfGfUfgUfcUfaCfGfCfcAfL96	501	1909	A-109419.2	uGfgCfGfUfaGfaCfaccCfuCfaCfcCfcsCfsa	1052
AD-53674.1	A-110554.1	CfaCfcAfaGfaUfCfCfuGfaAfuGfuCfuUfL96	502	686	A-109263.2	aAfgAfcAfuGfcAfggaUfcUfuGfgUfGfAfs	1053
AD-53675.1	A-110562.1	UfaCfaUfcGfaGfGfAfgGfaCfuCfcUfcUfL96	503	786	A-109279.2	aGfaGfgAfgUfcCfuCfGfUfgUfasGfsu	1054
AD-53676.1	A-110570.1	AfgGfuGfuAfuCfUfCfcUfaGfaCfaCfcAfL96	504	904	A-109295.2	uGfgUfgUfcUfaGfggagAfuAfcAfcCfusCfsc	1055
AD-53677.1	A-110578.1	AfcAfgAfgUfgAfCfCfaCfcGfgGfaAfaUfL96	505	929	A-109311.2	aUfuUfcCfcGfgUfgguCfaCfuCfuGfusAfsu	1056
AD-53678.1	A-110586.1	AfgGfaCfGfGfAfCfCfcGfcUfuCfcAfcAfL96	506	994	A-109327.2	uGfuGfgAfaGfcGfgguCfcCfGfUfcCfusCfsc	1057
AD-53720.1	A-110593.1	AfcCfcUfcAfuAfGfGfcCfuGfgAfgUfuUfL96	507	1152	A-109341.2	aAfaCfuCfcAfgGfccuAfuGfaGfgGfusGfsc	1058
AD-53721.1	A-110601.1	GfgAfgUfuUfaUfUfCfGfGfaAfaAfgCfcAfL96	508	1166	A-109357.2	uGfgCfuUfuUfcCfGaaUfaAfaCfuCfcsAfs	1059
AD-53722.1	A-110609.1	GfgCfcGfcUfgUfGfUfgGfaCfcUfcUfuUfL96	509	1428	A-109373.2	aAfaGfaGfgUfcCfacaCfaGfcGfgCfcsAfsa	1060
AD-53723.1	A-110617.1	GfgCfaGfaGfaCfUfGfaUfcCfaCfuUfcUfL96	510	1597	A-109389.2	aGfaAfgUfgGfaUfcagUfcUfcUfgCfcsUfsc	1061
AD-53724.1	A-110625.1	GfcAfgCfuGfuUfUfUfgCfaGfgAfcUfgUfL96	511	1721	A-109405.2	aCfaGfuCfcUfgCfaaaAfcAfgCfuGfcsCfsa	1062
AD-53725.1	A-110633.1	GfgGfuGfaGfgGfUfGfuCfuAfcGfcCfaUfL96	512	1910	A-109421.2	aUfgGfcGfuAfgAfcacCfcUfcAfcCfcsCfsc	1063
AD-53679.1	A-110547.1	CfuAfcGfuGfgUfGfGfuGfcUfgAfaGfgAfL96	513	593	A-109249.2	uCfcUfuCfaGfcAfccaCfcAfcGfuAfgsGfsu	1064
AD-53680.1	A-110555.1	CfaAfgAfuCfcUfGfCfaUfgUfcUfuCfcAfL96	514	689	A-109265.2	uGfgAfaGfaCfaUfgcaGfgAfuCfuUfGfGfsu	1065
AD-53681.1	A-110563.1	UfcGfaGfgAfgGfAfCfuCfcUfcUfgUfcUfL96	515	790	A-109281.2	aGfaCfaGfaGfgAfgucCfuCfcUfcGfasUfsg	1066
AD-53682.1	A-110571.1	GfuAfuCfuCfcUfAfGfaCfaCfcAfgCfaUfL96	516	908	A-109297.2	aUfgCfuGfgUfgUfcuaGfgAfgAfuAfcAfs	1067

Nome do Dúplex	Nome do Oligo Senso	Sequência do Oligo Senso	SEQ ID NO:	Posição em relação a Antissenso NM_174936.3	Nome do Oligo Antissenso	Sequência do Oligo Antissenso	SEQ ID NO:
						c	
AD-53683.1	A-110579.1	GfaGfuGfaCfcAfCfCfGfGfAfaAfuCfGfAfL96	517	932	A-109313.2	uCfGfAfuUfuCfcCfGguGfGfUfcAfcUfcsUfs g	1068
AD-53684.1	A-110587.1	CfGfGfAfcCfcGfCfUfuCfcAfcAfgAfcAfL96	518	998	A-109329.2	uGfuCfuGfuGfGfAfgCfGfGfuCfcCfGfUfsc	1069
AD-53726.1	A-110594.1	CfcCfuCfaUfaGfGfCfcUfgGfaGfuUfuAfL96	519	1153	A-109343.2	uAfaAfcUfcCfaGfgccUfaUfgAfgGfGfUfs g	1070
AD-53727.1	A-110602.1	GfuUfuAfuUfcGfGfAfaAfaGfcCfaGfcUfL96	520	1169	A-109359.2	aGfcUfgGfcUfuUfuccGfaAfuAfaAfcUfs c	1071
AD-53728.1	A-110610.1	UfgUfgUfgGfaCfCfUfuUfgCfcCfcAfL96	521	1434	A-109375.2	uGfgGfgCfaAfaGfaggUfcCfaCfaCfasGfsc	1072
AD-53729.1	A-110618.1	CfaGfaGfaCfuGfAfUfcCfaCfuUfcUfcUfL96	522	1599	A-109391.2	aGfaGfaAfgUfgGfaucAfgUfcUfcUfGfCfsc	1073
AD-53730.1	A-110626.1	UfcUfgCfcGfgGfCfCfcAfaAfaCfGfCfuUfL96	523	1885	A-109407.2	aAfgCfGfUfuGfuGfggcCfcGfgCfaGfasCfsc	1074
AD-53731.1	A-110634.1	GfgUfgAfgGfgUfGfUfcUfaCfGfCfcAfuUfL96	524	1911	A-109423.2	aAfuGfgCfGfUfaGfacaCfcCfuCfaCfcsCfsc	1075
AD-53685.1	A-110548.1	CfcCfGfCfcGfgGfGfAfuAfcCfuCfaCfcAfL96	525	670	A-109251.2	uGfgUfgAfgGfuAfuuccCfcGfgCfGfGfGfCfsa	1076
AD-53687.1	A-110564.1	CfGfAfgGfaGfgAfCfUfcCfuCfuGfuCfuUfL96	526	791	A-109283.2	aAfgAfcAfgAfgGfaguCfcUfcCfuCfGfAfsu	1077
AD-53688.1	A-110572.1	UfaUfcUfcCfuAfGfAfcAfcCfaGfcAfuAfL96	527	909	A-109299.2	uAfuGfcUfgGfuGfucuAfgGfaGfaUfasCfsa	1078
AD-53689.1	A-110580.1	GfgAfaAfuCfGfAfGfGfgCfaGfgGfuCfaUfL96	528	944	A-109315.2	aUfgAfcCfcUfgCfccuCfGfAfuUfuCfcsCfsg	1079
AD-53690.1	A-110588.1	UfcCfaCfaGfaCfAfGfgCfcAfgCfaAfgUfL96	529	1009	A-109331.2	aCfuUfgCfuGfgCfcugUfcUfgUfgGfasAfsu	1080
AD-53732.1	A-110595.1	CfcUfcAfuAfgGfCfCfuGfgAfgUfuUfaUfL96	530	1154	A-109345.2	aUfaAfaCfuCfcAfggcCfuAfuGfaGfGfGfsu	1081
AD-53733.1	A-110603.1	GfgGfcUfgGfgGfUfCfGfUfgCfuGfgUfcAfL96	531	1279	A-109361.2	uGfaCfcAfgCfaCfGacCfcCfaGfcCfcsUfsc	1082
AD-53734.1	A-110611.1	GfgGfaGfgAfcAfUfcCfaUfuGfgUfgCfcUfL96	532	1456	A-109377.2	aGfgCfaCfcAfaUfgauGfuCfcUfcCfcsCfsu	1083
AD-53735.1	A-110619.1	AfcUfgAfuCfcAfcUfuCfuCfuGfcCfaAfL96	533	1604	A-109393.2	uUfgGfcAfgAfgAfguGfgAfuCfaGfGfCfsu	1084
AD-53736.1	A-110627.1	CfuGfcCfGfGfCfCfaCfaAfcGfcUfuUfL96	534	1886	A-109409.2	aAfaGfcGfuUfgUfgggCfcCfGfGfAfgfAfsu	1085
AD-53737.1	A-110635.1	AfgGfgUfgUfcUfAfCfGfCfcAfuUfgCfcAfL96	535	1915	A-109425.2	uGfgCfaAfuGfgCfGuaGfaCfaCfcCfGfGfGfsc	1086
AD-53691.1	A-110549.1	CfcGfcCfGfGfAfUfaCfcUfcAfcCfaAfL96	536	671	A-109253.2	uUfgGfuGfaGfgUfaucCfcCfGfGfGfGfGfsc	1087
AD-53692.1	A-110557.1	GfuUfgCfcCfcAfUfgUfgCfGfAfcUfaCfaUfL96	537	770	A-109269.2	aUfgUfaGfuCfGfAfcuGfgGfgCfaAfcUfsu	1088

Nome do Dúplex	Nome do Oligo Senso	Sequência do Oligo Senso	SEQ NO:	ID Posição em relação a Antissenso NM_174936.3	Nome do Oligo Antissenso	Sequência do Oligo Antissenso	SEQ ID NO:
AD-53693.1	A-110565.1	GfuAfcCfGfGfGfGfUfgAfaUfaCfcAfL96	538	857	A-109285.2	uGfgUfaUfuCfaUfccgCfcCfGfGfuAfcCfsg	1089
AD-53694.1	A-110573.1	UfcUfcCfuAfgAfCfAfcCfaGfcAfuAfcAfL96	539	911	A-109301.2	uGfuAfuGfcUfgGfuguCfuAfgGfaGfasUfsa	1090
AD-53695.1	A-110581.1	AfaUfcGfaGfgGfCfAfgGfgUfcAfuGfgUfL96	540	947	A-109317.2	aCfcAfuGfaCfcCfugcCfcUfcGfaUfusUfsc	1091
AD-53738.1	A-110596.1	CfuCfaUfaGfgCfCfUfgGfaGfuUfuAfuUfL96	541	1155	A-109347.2	aAfuAfaAfcUfcCfaggCfcUfaUfgAfgsGfsg	1092
AD-53739.1	A-110604.1	GfgUfcAfcCfGfUfGfcCfGfAfaCfuUfL96	542	1295	A-109363.2	aAfgUfuGfcCfGfGfcagCfGfuGfaCfcsAfsG	1093
AD-53740.1	A-110612.1	AfcUfgCfaGfcAfCfCfuGfcUfuUfgUfgUfL96	543	1483	A-109379.2	aCfaCfaAfaGfcAfgguGfcUfgCfaGfusCfsg	1094
AD-53741.1	A-110620.1	AfuCfcAfcUfuCfUfCfuGfcCfaAfaGfaUfL96	544	1608	A-109395.2	aUfcUfuUfgGfcAfgagAfaGfuGfgAfusCfsa	1095
AD-53742.1	A-110628.1	GfcCfcAfcAfaCfGfCfuUfuUfgGfgGfgUfL96	545	1893	A-109411.2	aCfcCfcCfaAfaAfgcgUfuGfuGfgGfcsCfsc	1096
AD-53743.1	A-110636.1	GfuGfuCfuAfcGfCfCfaUfuGfcCfaGfgUfL96	546	1918	A-109427.2	aCfcUfgGfcAfaUfggcGfuAfgAfcAfcCfsc	1097
AD-53744.1	A-110644.1	GfgAfaUfgCfaAfAfgCfuCfaAfgGfaGfcAfL96	547	2180	A-109443.2	uGfcUfcCfuUfgAfcuuUfgCfaUfuCfcsAfsG	1098
AD-53745.1	A-110652.1	UfgAfuGfgCfcCfUfCfaUfcUfcCfaGfcUfL96	548	2906	A-109459.2	aGfcUfgGfaGfaUfgagGfgCfcAfuCfasGfsc	1099
AD-53746.1	A-110660.1	CfuGfaAfgCfcAfAfgCfcCfuCfuUfuAfuL96	549	3300	A-109475.2	uAfaGfaAfgAfgGfcuuGfgCfuUfcAfgsAfsG	1100
AD-53747.1	A-110668.1	AfcUfgUfcCfcUfCfCfuUfgAfgCfaCfcAfL96	550	3511	A-109491.2	uGfgUfgCfuCfaAfggaGfgGfaCfaGfusUfsg	1101
AD-53748.1	A-110676.1	CfaAfgCfaAfgCfAfGfaCfaUfuUfaUfcUfL96	551	3540	A-109507.2	aGfaUfaAfaUfgUfcugCfuUfgCfuUfsgGfsg	1102
AD-53790.1	A-110683.1	UfaUfcUfuUfuGfGfGfuCfuGfuCfcUfcUfL96	552	3556	A-109521.2	aGfaGfgAfcAfgAfcacAfaAfaGfaUfasAfsa	1103
AD-53791.1	A-110691.1	UfgUfcCfuCfuCfUfGfuUfgCfcUfuUfuUfL96	553	3569	A-109537.2	aAfaAfaGfgCfaAfcagAfgAfgGfaCfasGfsa	1104
AD-53792.1	A-110699.1	UfuGfuAfaCfuUfGfAfaGfaUfaUfuUfaUfL96	554	3620	A-109553.2	aUfaAfaUfaUfcUfucaAfgUfuAfcAfasAfsa	1105
AD-53793.1	A-110707.1	CfuUfuAfcUfcUfGfCfuCfuAfuGfcCfaAfL96	555	3055	A-109569.2	uUfgGfcAfuAfgAfgcaGfaGfuAfaAfgsGfsu	1106
AD-53794.1	A-110715.1	AfgGfgGfaAfcAfCfAfgAfcCfaGfgAfaAfL96	556	3370	A-109585.2	uUfuCfcUfgGfuCfuguGfuUfcCfcCfusUfsc	1107
AD-53795.1	A-110723.1	UfuGfgGfuCfuGfUfCfcUfcUfcUfgUfuUfL96	557	3562	A-109601.2	aAfaCfaGfaGfaGfgacAfgAfcCfcAfasAfsa	1108
AD-53749.1	A-110637.1	UfgCfaGfcGfuCfCfAfcAfcAfgCfuCfcAfL96	558	1962	A-109429.2	uGfgAfgCfuGfuGfuggAfcGfcUfgCfasGfsu	1109
AD-53750.1	A-110645.1	AfaUfcCfcGfgCfCfCfcUfcAfgGfaGfcAfL96	559	2204	A-109445.2	uGfcUfcCfuGfaGfgggCfcGfgGfaUfusCfsc	1110
AD-53751.1	A-110653.1	UfuUfcUfgGfaUfGfGfcAfuCfuAfgCfcAfL96	560	2974	A-109461.2	uGfgCfuAfgAfuGfccaUfcCfaGfaAfasGfsc	1111
AD-53752.1	A-110661.1	GfaAfgCfcAfaGfCfCfuCfuUfcUfuAfcUfL96	561	3302	A-109477.2	aGfuAfaGfaAfgAfggcUfuGfgCfuUfcsAfsG	1112
AD-53753.1	A-110669.1	CfcAfgCfcCfcAfcCfCfaGfcAfaGfcAfL96	562	3529	A-109493.2	uGfcUfuGfcUfuGfgguGfgGfgCfuGfsgUfsg	1113

Nome do Dúplex	Nome do Oligo Senso	Sequência do Oligo Senso	SEQ NO:	ID Posição em relação a Antissenso NM_174936.3	Nome do Oligo Antissenso	Sequência do Oligo Antissenso	SEQ ID NO:
AD-53754.1	A-110677.1	AfaGfcAfaGfcAfGfAfcAfuUfuAfuCfuUfL96	563	3541	A-109509.2	aAfgAfuAfaAfuGfucuGfcUfuGfcUfusGfsg	1114
AD-53796.1	A-110684.1	UfcUfuUfuGfgGfUfCfuGfuCfcUfcUfcUfL96	564	3558	A-109523.2	aGfaGfaGfgAfcAfgacCfcAfaAfaGfasUfsa	1115
AD-53797.1	A-110692.1	GfuCfcUfcUfcUfGfUfuGfcCfuUfuUfuAfl96	565	3570	A-109539.2	uAfaAfaAfgGfcAfacaGfaGfaGfgAfcsAfs g	1116
AD-53798.1	A-110700.1	UfgUfaAfcUfuGfAfaAfgAfuAfuUfuAfuUfL96	566	3621	A-109555.2	aAfuAfaAfuAfuCfuucAfaGfuUfaCfasAfs a	1117
AD-53799.1	A-110708.1	UfuUfaCfuCfuGfCfUfcUfaUfgCfcAfgAfl96	567	3056	A-109571.2	uCfuGfgCfaUfaGfagcAfgAfgUfaAfasGfsg	1118
AD-53800.1	A-110716.1	CfcAfaGfcAfaGfCfAfaAfcAfuUfuAfuUfL96	568	3539	A-109587.2	aAfuAfaAfuGfuCfugcUfuGfcUfuGfgsGfsu	1119
AD-53801.1	A-110724.1	UfgGfgUfcUfgUfCfCfuCfuCfuGfuUfgAfl96	569	3563	A-109603.2	uCfaAfcAfgAfgAfggaCfaGfaCfcCfasAfs a	1120
AD-53755.1	A-110638.1	GfcAfuGfgGfgAfCfCfcGfuGfuCfcAfcUfL96	570	1996	A-109431.2	aGfuGfgAfcAfcGfgguCfcCfcAfuGfcsUfs g	1121
AD-53757.1	A-110654.1	UfcUfgGfaUfgGfCfAfuCfuAfgCfcAfgAfl96	571	2976	A-109463.2	uCfuGfgCfuAfgAfugcCfaUfcCfaGfasAfsa	1122
AD-53758.1	A-110662.1	AfaGfcCfaAfgCfCfUfcUfuCfuUfaCfuUfL96	572	3303	A-109479.2	aAfgUfaAfgAfaGfaggCfuUfgGfcUfusCfsa	1123
AD-53759.1	A-110670.1	CfcCfcAfcCfcAfAfGfcAfaGfcAfgAfcAfl96	573	3533	A-109495.2	uGfuCfuGfcUfuGfcuuGfgGfuGfgGfgsCfsu	1124
AD-53760.1	A-110678.1	AfgCfaAfgCfaGfAfCfaUfuUfaUfcUfuUfL96	574	3542	A-109511.2	aAfaGfaUfaAfaUfgucUfgCfuUfgCfusUfsg	1125
AD-53802.1	A-110685.1	UfuUfuGfgGfuCfUfGfuCfcUfcUfcUfgUfL96	575	3560	A-109525.2	aCfaGfaGfaGfgAfcagAfcCfcAfaAfasGfsa	1126
AD-53803.1	A-110693.1	UfuUfcUfaGfaCfCfUfgUfuUfuGfcUfuUfL96	576	3600	A-109541.2	aAfaGfcAfaAfaCfaggUfcUfaGfaAfasAfsa	1127
AD-53804.1	A-110701.1	AfcCfaAfgGfaGfGfCfaGfgAfuUfcUfuUfL96	577	2815	A-109557.2	aAfaGfaAfuCfcUfgccUfcCfuUfgGfusGfsg	1128
AD-53805.1	A-110709.1	UfcAfgCfcAfaCfCfCfGfuCfcAfcUfaAfl96	578	3161	A-109573.2	uUfaGfuGfgAfgCfgggUfuGfgCfuGfasGfsa	1129
AD-53806.1	A-110717.1	CfaAfgCfaGfaCfAfUfuUfaUfcUfuUfuUfL96	579	3544	A-109589.2	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1130
AD-53807.1	A-110725.1	GfgGfuCfuGfuCfCfUfcUfcUfgUfuGfcAfl96	580	3564	A-109605.2	uGfcAfaCfaGfaGfaggAfcAfgAfcCfcsAfs a	1131
AD-53761.1	A-110639.1	CfcCfaCfaAfgCfCfGfcCfuGfuGfcUfgAfl96	581	2080	A-109433.2	uCfaGfcAfcAfgGfcggCfuUfgUfgGfgsUfsg	1132
AD-53762.1	A-110647.1	GfcUfgGfgGfcUfGfAfgCfuUfuAfaAfaUfL96	582	2481	A-109449.2	aUfuUfuAfaAfgCfucaGfcCfcCfaGfcsCfsc	1133

Nome do Dúplex	Nome do Oligo Senso	Sequência do Oligo Senso	SEQ NO:	ID Posição em relação a Antissenso NM_174936.3	Nome do Oligo Antissenso	Sequência do Oligo Antissenso	SEQ ID NO:
AD-53763.1	A-110655.1	GfcUfcUfaUfgCfCfAfgGfcUfgUfgCfuAfl96	583	3064	A-109465.2	uAfgCfaCfaGfcCfuggCfaUfaGfaGfcsAfsG	1134
AD-53764.1	A-110663.1	GfuGfaGfgCfuGfGfGfaAfgGfgGfaAfcAfl96	584	3358	A-109481.2	uGfuUfcCfcCfuUfcccAfgCfcUfcAfcUfsg	1135
AD-53765.1	A-110671.1	CfcCfaCfcCfaAfGfCfaAfgCfaGfaCfaUfl96	585	3534	A-109497.2	aUfgUfcUfgCfuUfgcuUfgGfgUfgGfcsGfsc	1136
AD-53766.1	A-110679.1	GfcAfgAfcAfuUfUfAfuCfuUfuUfgGfgUfl96	586	3547	A-109513.2	aCfcCfaAfaAfgAfuaaAfuGfuCfuGfcsUfsu	1137
AD-53808.1	A-110686.1	UfuUfgGfgUfcUfGfUfcCfuCfuCfuUfl96	587	3561	A-109527.2	aAfcAfgAfgAfgGfacaGfaCfcCfaAfasAfsG	1138
AD-53809.1	A-110694.1	UfuCfuAfgAfcCfUfGfuUfuUfgCfuUfuUfl96	588	3601	A-109543.2	aAfaAfgCfaAfaAfcagGfuCfuAfgAfasAfsa	1139
AD-53810.1	A-110702.1	GfgAfgGfcAfgGfAfUfuCfuUfcCfcAfuUfl96	589	2820	A-109559.2	aAfuGfgGfaAfgAfaucCfuGfcCfuCfcsUfsu	1140
AD-53811.1	A-110710.1	CfcUfgCfcAfaGfCfUfcAfcAfcAfgCfaAfl96	590	3247	A-109575.2	uUfgCfuGfuGfuGfagCfuUfgGfgCfaGfcsCfsa	1141
AD-53812.1	A-110718.1	AfaGfcAfgAfcAfUfUfuAfuCfuUfuUfgAfl96	591	3545	A-109591.2	uCfaAfaAfgAfuAfaauGfuCfuGfcUfusGfsc	1142
AD-53813.1	A-110726.1	UfcUfaGfaCfcUfGfUfuUfuGfcUfuUfuUfl96	592	3602	A-109607.2	aAfaAfaGfcAfaAfacagGfuUfgUfaGfasAfsa	1143
AD-53767.1	A-110640.1	GfaGfgCfcAfcGfAfGfgUfcAfgCfcCfaAfl96	593	2099	A-109435.2	uUfgGfgCfuGfaCfcucGfuGfgCfcUfcsAfsG	1144
AD-53768.1	A-110648.1	GfgAfgGfuGfcCfAfGfgAfaGfcUfcCfcUfl96	594	2650	A-109451.2	aGfgGfaGfcUfuCfcugGfcAfcCfuCfcsAfsG	1145
AD-53769.1	A-110656.1	CfuCfaGfcCfaAfcCfCfcGfcUfcCfaCfuAfl96	595	3160	A-109467.2	uAfgUfgGfaGfcGfgguUfgGfcUfgAfgsAfsG	1146
AD-53770.1	A-110664.1	GfgCfuGfgGfaAfGfGfgGfaAfcAfcAfgAfl96	596	3362	A-109483.2	uCfuGfuGfuUfcCfcuUfcCfcAfgCfcsUfsc	1147
AD-53771.1	A-110672.1	CfcAfcCfcAfaGfCfAfaGfcAfgAfcAfuUfl96	597	3535	A-109499.2	aAfuGfuCfuGfcUfugCfuUfgGfuGfcsGfsg	1148
AD-53772.1	A-110680.1	AfgAfcAfuUfuAfUfCfuUfuUfgGfgUfcUfl96	598	3549	A-109515.2	aGfaCfcCfaAfaAfgauAfaAfuGfuCfusGfsc	1149
AD-53814.1	A-110687.1	GfgUfcUfgUfcCfUfCfuCfuGfuUfgCfcUfl96	599	3565	A-109529.2	aGfgCfaAfcAfgAfgagGfaCfaGfaCfcsCfsa	1150
AD-53815.1	A-110695.1	CfuAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfl96	600	3603	A-109545.2	aCfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsAfsa	1151
AD-53816.1	A-110703.1	GfaGfgCfaGfgAfUfUfcUfuCfcCfaUfgAfl96	601	2821	A-109561.2	uCfaUfgGfgAfaGfaauCfcUfgCfcUfcsCfsu	1152
AD-53817.1	A-110711.1	CfcAfaGfcUfcAfcAfcAfgCfaGfgAfaAfl96	602	3251	A-109577.2	uUfuCfcUfgCfuGfuguGfaGfcUfuGfcsCfsa	1153
AD-53818.1	A-110719.1	AfgCfaGfaCfaUfUfUfaUfcUfuUfuGfgAfl96	603	3546	A-109593.2	uCfcAfaAfaGfaUfaaaUfgUfcUfgCfusUfsg	1154
AD-53819.1	A-110727.1	GfuAfaCfuUfgAfAfGfaUfaUfuUfaUfuUfl96	604	3622	A-109609.2	aAfaUfaAfaUfaUfcuuCfaAfgUfuAfcAfsa	1155
AD-53773.1	A-110641.1	CfaCfgAfgGfuCfAfGfcCfcAfaCfcAfgUfl96	605	2104	A-109437.2	aCfuGfgUfuGfgGfcugAfcCfuCfgUfcsGfsc	1156
AD-53774.1	A-110649.1	AfcUfgUfgGfgGfCfAfuUfuCfaCfcAfuUfl96	606	2676	A-109453.2	aAfuGfgUfgAfaAfgucCfcCfaCfaGfusGfsa	1157
AD-53776.1	A-110665.1	GfaAfgGfgGfaAfcAfcAfgAfcCfaGfgAfl96	607	3368	A-109485.2	uCfcUfgGfuCfuGfuguUfcCfcCfuUfcsCfsc	1158

Nome do Dúplex	Nome do Oligo Senso	Sequência do Oligo Senso	SEQ NO:	ID Posição em relação a Antissenso NM_174936.3	Nome do Oligo Antissenso	Sequência do Oligo Antissenso	SEQ ID NO:
AD-53777.1	A-110673.1	CfaCfcCfaAfgCfAfAfgCfaGfaCfaUfuUfL96	608	3536	A-109501.2	aAfaUfgUfcUfgCfuugCfuUfgGfgUfgsGfsg	1159
AD-53778.1	A-110681.1	AfcAfuUfuAfuCfUfUfuUfgGfgUfcUfgUfL96	609	3551	A-109517.2	aCfaGfaCfcCfaAfaagAfuAfaUfuGfusCfsu	1160
AD-53820.1	A-110688.1	GfuCfuGfuCfcUfCfUfcUfgUfuGfcCfuUfL96	610	3566	A-109531.2	aAfgGfcAfaCfaGfagaGfgAfcAfgAfcsCfsc	1161
AD-53821.1	A-110696.1	UfaGfaCfcUfgUfUfUfuGfcUfuUfuGfuAfL96	611	3604	A-109547.2	uAfcAfaAfaGfcAfaaaCfaGfgUfcUfasGfsa	1162
AD-53822.1	A-110704.1	CfuUfuCfuGfgAfUfGfgCfaUfcUfaGfcAfL96	612	2973	A-109563.2	uGfcUfaGfaUfgCfcuUfcAfgAfaAfgsCfsu	1163
AD-53823.1	A-110712.1	AfaGfcUfcAfcAfCfAfgCfaGfgAfaCfuUfL96	613	3253	A-109579.2	aAfgUfuCfcUfgCfuguGfuGfaGfcUfusGfsg	1164
AD-53824.1	A-110720.1	GfaCfaUfuUfaUfCfUfuUfuGfgGfuCfuUfL96	614	3550	A-109595.2	aAfgAfcCfcAfaAfagaUfaAfaUfgUfcsUfsg	1165
AD-48400.4	A-98247.3	UfuUfuCfuAfgAfcCfuGfuUfuUfgCfuUfL96	615		A-93455.5	aAfgCfaAfaAfcAfgGfuCfuAfgAfaAfasGfsu	1166
AD-53779.1	A-110642.1	GfgGfaGfgCfcAfGfCfaUfcCfaCfgCfuUfL96	616	2137	A-109439.2	aAfgCfgUfgGfaUfgcuGfgCfcUfcCfcsUfsg	1167
AD-53780.1	A-110650.1	CfcAfcCfaAfgGfAfGfgCfaGfgAfuUfcUfL96	617	2813	A-109455.2	aGfaAfuCfcUfgCfcuUfcUfgGfuGfgsAfgs	1168
AD-53781.1	A-110658.1	GfcCfaAfgCfuCfAfCfaCfaGfcAfgGfaAfL96	618	3250	A-109471.2	uUfcCfuGfcUfgUfgugAfgCfuUfgGfcsAfgs	1169
AD-53782.1	A-110666.1	AfaGfgGfgAfaCfAfCfaGfaCfcAfgGfaAfL96	619	3369	A-109487.2	uUfcCfuGfgUfcUfgugUfuCfcCfcUfusCfsc	1170
AD-53783.1	A-110674.1	AfcCfcAfaGfcAfAfGfcAfgAfcAfuUfuAfL96	620	3537	A-109503.2	uAfaAfuGfuCfuGfcuUfcUfuGfgGfusGfsg	1171
AD-53784.1	A-110682.1	UfuUfaUfcUfuUfUfGfgGfuCfuGfuCfcUfL96	621	3554	A-109519.2	aGfgAfcAfgAfcCfaaAfaGfaUfaAfasUfsg	1172
AD-53825.1	A-110689.1	UfcUfgUfcCfuCfUfCfuGfuUfgCfcUfuUfL96	622	3567	A-109533.2	aAfaGfgCfaAfcAfgagAfgGfaCfaGfasCfsc	1173
AD-53826.1	A-110697.1	UfuUfuGfuAfaCfUfUfgAfaGfaUfaUfuUfL96	623	3618	A-109549.2	aAfaUfaUfcUfuCfaagUfuAfcAfaAfasGfs	1174
AD-53827.1	A-110705.1	UfuCfuGfgAfuGfGfCfaUfcUfaGfcCfaAfL96	624	2975	A-109565.2	uUfgGfcUfaGfaUfgccAfuCfcAfgAfasAfs	1175
AD-53828.1	A-110713.1	UfgAfaGfcCfaAfGfCfcUfcUfuCfuUfaAfL96	625	3301	A-109581.2	uUfaAfgAfaGfaGfgcuUfgGfcUfuCfasGfsa	1176
AD-53829.1	A-110721.1	UfuAfuCfuUfuUfGfGfgUfcUfgUfcCfuUfL96	626	3555	A-109597.2	aAfgGfaCfaGfaCfccaAfaAfgAfaAfasAfsu	1177
AD-53830.1	A-110872.1	UfuUfuCfuAfgAfcCfCfuGfuUfuUfgCfuUfL96	627		A-110873.1	aAfgCfaAfaAfcAfgguCfuAfgAfaAfasGfsu	1178
AD-53785.1	A-110643.1	AfuCfcAfcGfcUfUfCfcUfgCfuGfcCfaUfL96	628	2148	A-109441.2	aUfgGfcAfgCfaGfgaaGfcGfuGfgAfusGfsc	1179
AD-53786.1	A-110651.1	CfaCfcAfaGfgAfGfGfcAfgGfaUfuCfuUfL96	629	2814	A-109457.2	aAfgAfaUfcCfuGfcuUfcUfuGfgUfgsGfsa	1180
AD-53787.1	A-110659.1	CfaAfgCfuCfaCfAfCfaGfcAfgGfaAfuUfL96	630	3252	A-109473.2	aGfuUfcCfuGfcUfgugUfgAfgCfuUfgsGfsc	1181

Nome do Dúplex	Nome do Oligo Senso	Sequência do Oligo Senso	SEQ NO:	ID Posição em relação a Antissenso NM_174936.3	Nome do Oligo Antissenso	Sequência do Oligo Antissenso	SEQ ID NO:
AD-53788.1	A-110667.1	GfgGfaAfcAfcAfGfAfcCfaGfgAfaGfcUfL96	631	3372	A-109489.2	aGfcUfuCfcUfgGfucuGfuGfuUfcCfcsCfsu	1182
AD-53789.1	A-110675.1	CfcCfaAfgCfaAfGfCfaGfaCfaUfuUfaUfL96	632	3538	A-109505.2	aUfaAfaUfgUfcUfgcuUfgCfuUfgGfgsUfsg	1183
AD-53831.1	A-110690.1	CfuGfuCfcUfcUfCfUfgUfuGfcCfuUfuUfL96	633	3568	A-109535.2	aAfaAfgGfcAfaCfagaGfaGfgAfcAfgsAfsc	1184
AD-53832.1	A-110698.1	UfuUfgUfaAfcUfUfGfaAfgAfuAfuUfuAfL96	634	3619	A-109551.2	uAfaAfuAfuCfuUfcaaGfuUfaCfaAfasAfsg	1185
AD-53833.1	A-110706.1	CfuGfgAfuGfgCfAfUfuUfaGfcCfaGfaAfL96	635	2977	A-109567.2	uUfcUfgGfcUfaGfaugCfcAfuCfcAfgsAfsa	1186
AD-53834.1	A-110714.1	AfgUfgAfgGfcUfGfGfgAfaGfgGfgAfaAfL96	636	3357	A-109583.2	uUfuCfcCfcUfuCfccaGfcCfuCfaCfusGfsu	1187
AD-53835.1	A-110722.1	AfuCfuUfuUfgGfGfUfcUfgUfcCfuCfuUfL96	637	3557	A-109599.2	aAfgAfgGfaCfaGfaccCfaAfaAfgAfusAfsa	1188
AD-48399.1	A-100981.1	CfaCfuUfaCfGcfuGfaGfuAfcUfuCfGfAfL96	638		A-100982.1	uCfGfAfaGfuAfcUfcAfgCfGfUfaAfgUfGfAfsu	1189
AD-53815.5	A-110695.11	CfuAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	639	3603	A-109545.18	aCfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsAfsa	1190
AD-53815.4	A-110695.4	CfuAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	640	3603	A-109545.5	aCfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsAfsa	1191
AD-56633.1	A-115520.2	cuAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	641	3603	A-109545.6	aCfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsAfsa	1192
AD-56617.1	A-115535.1	CfuagAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	642	3603	A-109545.7	aCfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsAfsa	1193
AD-56623.1	A-115536.1	CfuagAfcCfuGfUfUfuUfgcuUfuUfguL96	643	3603	A-109545.8	aCfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsAfsa	1194
AD-56629.1	A-115537.1	CfuagAfccuGfUfUfuUfgcuUfuUfguL96	644	3603	A-109545.9	aCfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsAfsa	1195
AD-56635.1	A-115538.1	CfuagAfccuGfUfUfuugcuUfuugL96	645	3603	A-109545.10	aCfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsAfsa	1196
AD-56641.1	A-115539.1	CfuagaccuGfUfUfuugcuuuuL96	646	3603	A-109545.11	aCfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsAfsa	1197
AD-56625.1	A-115542.1	CfuAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	647	3603	A-109545.12	aCfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsAfsa	1198
AD-56631.1	A-115543.1	CfuAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	648	3603	A-109545.13	aCfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsAfsa	1199
AD-56637.1	A-115544.1	CfuAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	649	3603	A-109545.14	aCfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsAfsa	1200
AD-56643.1	A-115545.1	CfuAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	650	3603	A-109545.15	aCfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsAfsa	1201
AD-56649.1	A-115546.1	CfuAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	651	3603	A-109545.16	aCfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsAfsa	1202
AD-56655.1	A-115547.1	CfuAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	652	3603	A-109545.17	aCfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsAfsa	1203
AD-56615.1	A-110695.5	CfuAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	653	3603	A-115519.1	acaAfaAfgcaAfaacAfgGfuCfuAfgsAfsa	1204

Nome do Dúplex	Nome do Oligo Senso	Sequência do Oligo Senso	SEQ NO:	ID Posição em relação a Antissenso NM_174936.3	Nome do Oligo Antissenso	Sequência do Oligo Antissenso	SEQ ID NO:
AD-56621.1	A-115520.1	cuAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	654	3603	A-115519.2	acaAfaAfgcaAfaacAfgGfuCfuAfgsAfsa	1205
AD-56627.1	A-115521.1	cuAfgAfcCfuGfUfUfuugCfuUfuugUfL96	655	3603	A-115519.3	acaAfaAfgcaAfaacAfgGfuCfuAfgsAfsa	1206
AD-56639.1	A-115520.3	cuAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	656	3603	A-115522.1	ACfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsAfsa	1207
AD-56645.1	A-110695.6	CfuAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	657	3603	A-115522.2	ACfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsAfsa	1208
AD-56651.1	A-115523.1	(iC)uAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	658	3603	A-115524.1	(iA)CfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsAfs(iA)	1209
AD-56610.1	A-115523.2	(iC)uAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	659	3603	A-115525.1	aCfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsAfs(iA)	1210
AD-56616.1	A-115523.3	(iC)uAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	660	3603	A-115526.1	acaAfaAfgcaAfaacAfgGfuCfuAfgsAfs(iA)	1211
AD-56622.1	A-115527.1	(iC)uAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuugUfL96	661	3603	A-115526.2	acaAfaAfgcaAfaacAfgGfuCfuAfgsAfs(iA)	1212
AD-56628.1	A-115527.2	(iC)uAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuugUfL96	662	3603	A-115528.1	(iA)caAfaAfgcaAfaacAfgGfuCfuAfgsAfs(iA)	1213
AD-56634.1	A-115529.1	CbuAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	663	3603	A-115530.1	AbCfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsAfsAb	1214
AD-56640.1	A-115529.2	CbuAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	664	3603	A-115531.1	aCfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsAfsAb	1215
AD-56646.1	A-115529.3	CbuAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	665	3603	A-115532.1	acaAfaAfgcaAfaacAfgGfuCfuAfgsAfsAb	1216
AD-56652.1	A-115533.1	CbuAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuugUfL96	666	3603	A-115532.2	acaAfaAfgcaAfaacAfgGfuCfuAfgsAfsAb	1217
AD-56611.1	A-115533.2	CbuAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuugUfL96	667	3603	A-115534.1	(iA)caAfaAfgcaAfaacAfgGfuCfuAfgsAfsAb	1218
AD-56647.1	A-110695.7	CfuAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	668	3603	A-115540.1	aCfaaaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1219
AD-56653.1	A-115535.2	CfuagAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	669	3603	A-115540.2	aCfaaaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1220
AD-56612.1	A-115536.2	CfuagAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	670	3603	A-115540.3	aCfaaaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1221
AD-56618.1	A-115537.2	CfuagAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	671	3603	A-115540.4	aCfaaaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1222
AD-56624.1	A-115538.2	CfuagAfcCfuGfUfUfuugCfuUfuugUfL96	672	3603	A-115540.5	aCfaaaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1223
AD-56630.1	A-115539.2	CfuagaccuGfUfUfuugcuuuuguL96	673	3603	A-115540.6	aCfaaaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1224
AD-56636.1	A-110695.8	CfuAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	674	3603	A-115541.1	aCfaaaAfgCfaAfaacAfgguCfuAfgsasa	1225

Nome do Dúplex	Nome do Oligo Senso	Sequência do Oligo Senso	SEQ NO:	ID Posição em relação a Antissenso NM_174936.3	Nome do Oligo Antissenso	Sequência do Oligo Antissenso	SEQ ID NO:
AD-56642.1	A-115535.3	CfuagAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	675	3603	A-115541.2	aCfaaaAfgCfaAfaacAfgguCfuAfgsasa	1226
AD-56648.1	A-115536.3	CfuagAfcCfuGfUfUfuUfgcuUfuUfgUfL96	676	3603	A-115541.3	aCfaaaAfgCfaAfaacAfgguCfuAfgsasa	1227
AD-56654.1	A-115537.3	CfuagAfcuGfUfUfuUfgcuUfuUfgUfL96	677	3603	A-115541.4	aCfaaaAfgCfaAfaacAfgguCfuAfgsasa	1228
AD-56613.1	A-115538.3	CfuagAfcuGfUfUfuugcuUfuuguL96	678	3603	A-115541.5	aCfaaaAfgCfaAfaacAfgguCfuAfgsasa	1229
AD-56619.1	A-115539.3	CfuagaccuGfUfUfuugcuuuuguL96	679	3603	A-115541.6	aCfaaaAfgCfaAfaacAfgguCfuAfgsasa	1230
AD-56614.1	A-110695.9	CfuAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	680	3603	A-115548.1	aCfaAfAfAfgCfaAfaacAfgGfUfCfuAfgsAfsa	1231
AD-56620.1	A-115542.2	CfuAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	681	3603	A-115548.2	aCfaAfAfAfgCfaAfaacAfgGfUfCfuAfgsAfsa	1232
AD-56626.1	A-115543.2	CfuAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	682	3603	A-115548.3	aCfaAfAfAfgCfaAfaacAfgGfUfCfuAfgsAfsa	1233
AD-56632.1	A-115544.2	CfuAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	683	3603	A-115548.4	aCfaAfAfAfgCfaAfaacAfgGfUfCfuAfgsAfsa	1234
AD-56638.1	A-115545.2	CfuAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	684	3603	A-115548.5	aCfaAfAfAfgCfaAfaacAfgGfUfCfuAfgsAfsa	1235
AD-56644.1	A-115546.2	CfuAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	685	3603	A-115548.6	aCfaAfAfAfgCfaAfaacAfgGfUfCfuAfgsAfsa	1236
AD-56650.1	A-115547.2	CfuAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	686	3603	A-115548.7	aCfaAfAfAfgCfaAfaacAfgGfUfCfuAfgsAfsa	1237
AD-56656.1	A-110695.10	CfuAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	687	3603	A-115549.1	aCfaAfAfAfgCfaAfaacAfgGfUfCfuAfgsAfsa	1238
AD-56662.1	A-115542.3	CfuAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	688	3603	A-115549.2	aCfaAfAfAfgCfaAfaacAfgGfUfCfuAfgsAfsa	1239
AD-56668.1	A-115543.3	CfuAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	689	3603	A-115549.3	aCfaAfAfAfgCfaAfaacAfgGfUfCfuAfgsAfsa	1240
AD-56673.1	A-115544.3	CfuAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	690	3603	A-115549.4	aCfaAfAfAfgCfaAfaacAfgGfUfCfuAfgsAfsa	1241
AD-56678.1	A-115545.3	CfuAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	691	3603	A-115549.5	aCfaAfAfAfgCfaAfaacAfgGfUfCfuAfgsAfsa	1242
AD-56683.1	A-115546.3	CfuAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	692	3603	A-115549.6	aCfaAfAfAfgCfaAfaacAfgGfUfCfuAfgsAfsa	1243

Nome do Dúplex	Nome do Oligo Senso	Sequência do Oligo Senso	SEQ NO:	ID Posição em relação a Antissenso NM_174936.3	Nome do Oligo Antissenso	Sequência do Oligo Antissenso	SEQ ID NO:
AD-56688.1	A-115547.3	CfUfAfGfAfCfCfUfGfUfUfUfGfCfUfUfUfGfUfL96	693	3603	A-115549.7	aCfaAfAfAfGfCfaAfaacAfgGfUfCfuAfgsAfsa	1244
AD-56657.1	A-115550.1	CfuAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuugUfL96	694	3603	A-115551.1	aCfAfAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsAfsa	1245
AD-56663.1	A-115552.1	CfuAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuuuUfgUfL96	695	3603	A-115553.1	aCfaAfAfAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsAfsa	1246
AD-56669.1	A-115554.1	CfuAfgAfcCfuGfUfUfuUfgcuUfuUfgUfL96	696	3603	A-115555.1	aCfaAfaAfGfCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsAfsa	1247
AD-56674.1	A-115556.1	CfuAfgAfcCfuGfUfUfuugCfuUfuUfgUfL96	697	3603	A-115557.1	aCfaAfaAfgCfAfAfaacAfgGfuCfuAfgsAfsa	1248
AD-56679.1	A-115558.1	CfuAfgAfcuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	698	3603	A-115559.1	aCfaAfaAfgCfaAfaacAfGfGfuCfuAfgsAfsa	1249
AD-56684.1	A-115560.1	CfuAfgacCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	699	3603	A-115561.1	aCfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfUfCfuAfgsAfsa	1250
AD-56689.1	A-115535.4	CfuagAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	700	3603	A-115562.1	aCfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuUfAfgsAfsa	1251
AD-56693.1	A-115520.4	cuAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	701	3603	A-115563.1	aCfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsAfsa	1252
AD-56658.1	A-115564.1	CfuAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfUfUfgUfL96	702	3603	A-115565.1	aCfaaaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsAfsa	1253
AD-56664.1	A-115566.1	CfuAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfUfuUfgUfL96	703	3603	A-115567.1	aCfaAfaagCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsAfsa	1254
AD-56670.1	A-115568.1	CfuAfgAfcCfuGfUfUfuUfGfCfuUfuUfgUfL96	704	3603	A-115569.1	aCfaAfaAfgcaAfaacAfgGfuCfuAfgsAfsa	1255
AD-56680.1	A-115572.1	CfuAfgAfcCfUfGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	705	3603	A-115573.1	aCfaAfaAfgCfaAfaacagGfuCfuAfgsAfsa	1256
AD-56685.1	A-115574.1	CfuAfgAfCfCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	706	3603	A-115575.1	aCfaAfaAfgCfaAfaacAfgguCfuAfgsAfsa	1257
AD-56690.1	A-115542.4	CfuAfGfAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	707	3603	A-115576.1	aCfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfucuAfgsAfsa	1258
AD-56694.1	A-115577.1	CfUfAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	708	3603	A-115578.1	aCfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuagsAfsa	1259
AD-56659.1	A-110695.12	CfuAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	709	3603	A-115579.1	aCfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1260
AD-56665.1	A-115580.1	AfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	710	3605	A-115581.1	aCfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfusAfsa	1261
AD-56671.1	A-115582.1	AfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuugUfL96	711	3605	A-115583.1	aCfAfAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfusAfsa	1262
AD-56676.1	A-115584.1	AfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuuuUfgUfL96	712	3605	A-115585.1	aCfaAfAfAfgCfaAfaacAfgGfuCfusAfsa	1263
AD-56681.1	A-115586.1	AfgAfcCfuGfUfUfuUfgcuUfuUfgUfL96	713	3605	A-115587.1	aCfaAfaAfGfCfaAfaacAfgGfuCfusAfsa	1264
AD-56686.1	A-115588.1	AfgAfcCfuGfUfUfuugCfuUfuUfgUfL96	714	3605	A-115589.1	aCfaAfaAfgCfAfAfaacAfgGfuCfusAfsa	1265
AD-56691.1	A-115590.1	AfgAfcuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	715	3605	A-115591.1	aCfaAfaAfgCfaAfaacAfGfGfuCfusAfsa	1266
AD-56695.1	A-115592.1	AfgacCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	716	3605	A-115593.1	aCfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfUfCfusAfsa	1267

Nome do Dúplex	Nome do Oligo Senso	Sequência do Oligo Senso	SEQ NO:	ID Posição em relação a Antissenso NM_174936.3	Nome do Oligo Antissenso	Sequência do Oligo Antissenso	SEQ ID NO:
AD-56660.1	A-115594.1	agAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	717	3605	A-115595.1	aCfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuUfsAfsg	1268
AD-56666.1	A-115596.1	AfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfUfUfgUfL96	718	3605	A-115597.1	aCfaaaAfgCfaAfaacAfgGfuCfusAfsg	1269
AD-56672.1	A-115598.1	AfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfUfUfgUfL96	719	3605	A-115599.1	aCfaAfaagCfaAfaacAfgGfuCfusAfsg	1270
AD-56677.1	A-115600.1	AfgAfcCfuGfUfUfuUfGfCfuUfuUfgUfL96	720	3605	A-115601.1	aCfaAfaAfgcaAfaacAfgGfuCfusAfsg	1271
AD-56682.1	A-115602.1	AfgAfcCfuGfUfUfUfUfgCfuUfuUfgUfL96	721	3605	A-115603.1	aCfaAfaAfgCfaaaacAfgGfuCfusAfsg	1272
AD-56687.1	A-115604.1	AfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	722	3605	A-115605.1	aCfaAfaAfgCfaAfaacagGfuCfusAfsg	1273
AD-56692.1	A-115606.1	AfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	723	3605	A-115607.1	aCfaAfaAfgCfaAfaacAfgguCfusAfsg	1274
AD-56696.1	A-115608.1	AfGfAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	724	3605	A-115609.1	aCfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfucusAfsg	1275
AD-56661.1	A-115580.2	AfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	725	3605	A-115610.1	aCfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfusafsg	1276
AD-56667.1	A-115611.1	gAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	726	3605	A-115612.1	aCfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfausa	1277
AD-53806.11	A-110717.10	CfaAfgCfaGfaCfAfUfuUfaUfcUfuUfuUfL96	727	3544	A-109589.15	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1278
AD-53806.13	A-110717.11	CfaAfgCfaGfaCfAfUfuUfaUfcUfuUfuUfL96	728	3544	A-109589.10	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1279
AD-53806.12	A-110717.12	CfaAfgCfaGfaCfAfUfuUfaUfcUfuUfuUfL96	729	3544	A-109589.22	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1280
AD-53806.5	A-110717.4	CfaAfgCfaGfaCfAfUfuUfaUfcUfuUfuUfL96	730	3544	A-109589.5	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1281
AD-53806.6	A-110717.5	CfaAfgCfaGfaCfAfUfuUfaUfcUfuUfuUfL96	731	3544	A-109589.7	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1282
AD-53806.7	A-110717.6	CfaAfgCfaGfaCfAfUfuUfaUfcUfuUfuUfL96	732	3544	A-109589.8	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1283
AD-53806.8	A-110717.7	CfaAfgCfaGfaCfAfUfuUfaUfcUfuUfuUfL96	733	3544	A-109589.9	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1284
AD-53806.9	A-110717.8	CfaAfgCfaGfaCfAfUfuUfaUfcUfuUfuUfL96	734	3544	A-109589.9	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1285
AD-53806.10	A-110717.9	CfaAfgCfaGfaCfAfUfuUfaUfcUfuUfuUfL96	735	3544	A-109589.9	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1286
AD-56979.1	A-116393.1	caAfgCfaGfaCfAfUfuUfaUfcUfuUfuUfL96	736	3544	A-109589.6	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1287
AD-56979.2	A-116393.2	caAfgCfaGfaCfAfUfuUfaUfcUfuUfuUfL96	737	3544	A-109589.17	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1288
AD-56975.3	A-116394.1	(iC)aAfgCfaGfaCfAfUfuUfaUfcUfuUfuUfL96	738	3544	A-109589.9	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1289
AD-56975.4	A-116394.2	(iC)aAfgCfaGfaCfAfUfuUfaUfcUfuUfuUfL96	739	3544	A-109589.15	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1290
AD-56975.5	A-116394.3	(iC)aAfgCfaGfaCfAfUfuUfaUfcUfuUfuUfL96	740	3544	A-109589.22	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1291
AD-56975.1	A-116394.4	(iC)aAfgCfaGfaCfAfUfuUfaUfcUfuUfuUfL96	741	3544	A-109589.5	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1292

Nome do Dúplex	Nome do Oligo Senso	Sequência do Oligo Senso	SEQ NO:	ID Posição em relação a Antissenso NM_174936.3	Nome do Oligo Antissenso	Sequência do Oligo Antissenso	SEQ ID NO:
AD-56975.2	A-116394.5	(iC)aAfgCfaGfaCfAfUfuUfaUfcUfuUfuUfL96	742	3544	A-109589.6	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1293
AD-56983.1	A-116400.1	CbaAfgCfaGfaCfAfUfuUfaUfcUfuUfuUfL96	743	3544	A-109589.7	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1294
AD-56983.2	A-116400.2	CbaAfgCfaGfaCfAfUfuUfaUfcUfuUfuUfL96	744	3544	A-109589.8	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1295
AD-56983.3	A-116400.3	CbaAfgCfaGfaCfAfUfuUfaUfcUfuUfuUfL96	745	3544	A-109589.9	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1296
AD-56983.4	A-116400.4	CbaAfgCfaGfaCfAfUfuUfaUfcUfuUfuUfL96	746	3544	A-109589.9	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1297
AD-56983.5	A-116400.5	CbaAfgCfaGfaCfAfUfuUfaUfcUfuUfuUfL96	747	3544	A-109589.15	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1298
AD-56977.3	A-116406.1	CfaagCfaGfaCfAfUfuUfaUfcUfuUfuUfL96	748	3544	A-109589.10	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1299
AD-56977.1	A-116406.2	CfaagCfaGfaCfAfUfuUfaUfcUfuUfuUfL96	749	3544	A-109589.11	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1300
AD-56977.2	A-116406.3	CfaagCfaGfaCfAfUfuUfaUfcUfuUfuUfL96	750	3544	A-109589.18	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1301
AD-56976.1	A-116407.1	CfaagCfaGfaCfAfUfuUfaucUfuUfuUfL96	751	3544	A-109589.11	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1302
AD-56976.2	A-116407.2	CfaagCfaGfaCfAfUfuUfaucUfuUfuUfL96	752	3544	A-109589.12	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1303
AD-56980.1	A-116408.1	CfaagCfagaCfAfUfuUfaucUfuUfuUfL96	753	3544	A-109589.12	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1304
AD-56980.2	A-116408.2	CfaagCfagaCfAfUfuUfaucUfuUfuUfL96	754	3544	A-109589.13	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1305
AD-56984.1	A-116409.1	CfaagCfagaCfAfUfuUfaucUfuuuUfL96	755	3544	A-109589.13	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1306
AD-56984.2	A-116409.2	CfaagCfagaCfAfUfuUfaucUfuuuUfL96	756	3544	A-109589.14	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1307
AD-56987.1	A-116410.1	CfaagCfagaCfAfUfuUfaucUfuuuUfL96	757	3544	A-109589.14	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1308
AD-56987.2	A-116410.2	CfaagCfagaCfAfUfuUfaucUfuuuUfL96	758	3544	A-109589.9	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1309
AD-56991.1	A-116415.1	CfaagCfagaCfAfUfuUfaucuuuuUfL96	759	3544	A-109589.15	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1310
AD-56993.1	A-116416.1	CfaagcagaCfAfUfuUfaucuuuuUfL96	760	3544	A-109589.16	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1311
AD-56995.1	A-116417.1	CfaagcagaCfAfUfuuaucuuuuUfL96	761	3544	A-109589.17	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1312
AD-56978.1	A-116418.1	CfaAfGfCfaGfaCfAfUfuUfaUfcUfuUfuUfL96	762	3544	A-109589.18	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1313
AD-56978.2	A-116418.2	CfaAfGfCfaGfaCfAfUfuUfaUfcUfuUfuUfL96	763	3544	A-109589.17	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1314
AD-56981.1	A-116419.1	CfaAfGfCfaGfaCfAfUfuUfaUfcUfuUfuUfL96	764	3544	A-109589.19	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1315
AD-56985.1	A-116420.1	CfaAfGfCfaGfaCfAfUfuUfaUfcUfuUfuUfL96	765	3544	A-109589.20	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1316
AD-56988.1	A-116421.1	CfaAfGfCfAfGfaCfAfUfuUfaUfcUfuUfuUfL96	766	3544	A-109589.21	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1317

Nome do Dúplex	Nome do Oligo Senso	Sequência do Oligo Senso	SEQ NO:	ID Posição em relação a Antissenso NM_174936.3	Nome do Oligo Antissenso	Sequência do Oligo Antissenso	SEQ ID NO:
AD-56988.2	A-116421.2	CfaAfGfCfAfGfAfUfuUfAfUfCfUfuUfuUfL96	767	3544	A-109589.9	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1318
AD-56988.3	A-116421.3	CfaAfGfCfAfGfAfUfuUfAfUfCfUfuUfuUfL96	768	3544	A-109589.15	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1319
AD-56982.1	A-116426.1	CfaAfgcaGfaCfAfUfuUfaUfcUfuUfuUfL96	769	3544	A-109589.19	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1320
AD-56982.2	A-116426.2	CfaAfgcaGfaCfAfUfuUfaUfcUfuUfuUfL96	770	3544	A-109589.23	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1321
AD-56986.1	A-116428.1	CfaAfgCfagaCfAfUfuUfaUfcUfuUfuUfL96	771	3544	A-109589.20	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1322
AD-56986.2	A-116428.2	CfaAfgCfagaCfAfUfuUfaUfcUfuUfuUfL96	772	3544	A-109589.17	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1323
AD-56989.1	A-116430.1	CfaAfgCfaGfacAfUfuUfaUfcUfuUfuUfL96	773	3544	A-109589.21	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1324
AD-56990.1	A-116432.1	CfaAfgCfaGfaCfAfuuUfaUfcUfuUfuUfL96	774	3544	A-109589.9	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1325
AD-56992.1	A-116434.1	CfaAfgCfaGfaCfAfUfuUfaucUfuUfuUfL96	775	3544	A-109589.15	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1326
AD-56992.2	A-116434.2	CfaAfgCfaGfaCfAfUfuUfaucUfuUfuUfL96	776	3544	A-109589.17	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1327
AD-56994.1	A-116436.1	CfaAfgCfaGfaCfAfUfuUfaUfcUfuuuUfL96	777	3544	A-109589.22	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1328
AD-56994.2	A-116436.2	CfaAfgCfaGfaCfAfUfuUfaUfcUfuuuUfL96	778	3544	A-109589.23	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1329
AD-56996.1	A-116438.1	caagCfaGfaCfAfUfuUfaUfcUfuUfuUfL96	779	3544	A-109589.17	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1330
AD-57001.1	A-116440.1	CfaAfgcagaCfAfUfuUfaUfcUfuUfuUfL96	780	3544	A-109589.17	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1331
AD-57007.1	A-116442.1	CfaAfgCfaGfaCfAfuuuUfcUfuUfuUfL96	781	3544	A-109589.17	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1332
AD-57013.1	A-116444.1	CfaAfgCfaGfaCfAfUfuUfaucuuUfuUfL96	782	3544	A-109589.17	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1333
AD-57019.1	A-116446.1	CfaAfgCfaGfaCfAfUfuUfaUfcUfuuuUfL96	783	3544	A-109589.17	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1334
AD-57022.1	A-116448.1	CfaAfgCfaGfaCfAfUfuUfaUfcUfuUfuUfL96	784	3544	A-109589.23	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1335
AD-57025.1	A-116449.1	CfaAfgCfaGfaCfAfUfuUfaUfcUfuUfuUfL96	785	3544	A-109589.23	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1336
AD-56997.1	A-116450.1	CfaAfgCfaGfaCfAfUfuUfaUfcUfuUfuUfL96	786	3544	A-109589.17	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1337
AD-57002.1	A-116452.1	CfaAfgCfaGfaCfAfUfuUfaUfcUfuUfuUfL96	787	3544	A-109589.17	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1338
AD-57008.1	A-116453.1	CfaAfgCfaGfAfCfAfUfuUfaUfcUfuUfuUfL96	788	3544	A-109589.17	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1339
AD-57014.1	A-116454.1	CfaAfgCfAfGfAfCfAfUfuUfaUfcUfuUfuUfL96	789	3544	A-109589.17	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1340
AD-57020.1	A-116455.1	CfAfAfgCfaGfaCfAfUfuUfaUfcUfuUfuUfL96	790	3544	A-109589.23	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1341
AD-57020.2	A-116455.2	CfAfAfgCfaGfaCfAfUfuUfaUfcUfuUfuUfL96	791	3544	A-109589.23	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1342

Nome do Dúplex	Nome do Oligo Senso	Sequência do Oligo Senso	SEQ NO:	ID Posição em relação a Antissenso NM_174936.3	Nome do Oligo Antissenso	Sequência do Oligo Antissenso	SEQ ID NO:
AD-57026.1	A-116457.1	CfaAfgCfaGfaCfAfUfuUfaUfcuuUfuUfL96	792	3544	A-109589.23	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1343
AD-57003.1	A-116460.1	CfaAfgCfaGfaCfAfUfuuaUfcUfuUfuUfL96	793	3544	A-109589.17	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1344
AD-57009.1	A-116462.1	CfaAfgCfaGfaCfaUfuUfaUfcUfuUfuUfL96	794	3544	A-109589.17	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1345
AD-57015.1	A-116464.1	CfaAfgCfaGfacaUfuUfaUfcUfuUfuUfL96	795	3544	A-109589.17	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1346
AD-57023.1	A-116467.1	CfaAfgCfaGfaCfAfUfuUfaucUfUfUfuUfL96	796	3544	A-109589.23	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1347
AD-57027.1	A-116469.1	CfaAfgCfaGfaCfAfUfuuaUfcUfUfUfuUfL96	797	3544	A-109589.23	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1348
AD-56998.1	A-116471.1	CfaAfgCfagaCfAfUfuUfaUfcUfUfUfuUfL96	798	3544	A-109589.17	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1349
AD-57004.1	A-116473.1	CfaAfgcaGfaCfAfUfuUfaUfcUfUfUfuUfL96	799	3544	A-109589.17	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1350
AD-57010.1	A-116475.1	CfaagCfaGfaCfAfUfuUfaUfcUfUfUfuUfL96	800	3544	A-109589.17	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1351
AD-57016.1	A-116477.1	caAfgCfaGfaCfAfUfuUfaUfcUfUfUfuUfL96	801	3544	A-109589.17	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1352
AD-56999.2	A-116479.1	CfaAfgCfaGfaCfAfUfuUfAfUfcUfUfUfuUfL96	802	3544	A-109589.17	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1353
AD-56999.1	A-116479.2	CfaAfgCfaGfaCfAfUfuUfAfUfcUfUfUfuUfL96	803	3544	A-109589.17	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1354
AD-57021.1	A-116481.1	CfaAfgCfAfGfaCfAfUfuUfaUfcUfUfUfuUfL96	804	3544	A-109589.23	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1355
AD-57024.1	A-116483.1	CfaAfGfCfaGfaCfAfUfuUfaUfcUfUfUfuUfL96	805	3544	A-109589.23	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1356
AD-57005.1	A-116486.1	CfaAfgCfaGfaCfAfUfuUfaUfcUfUfuuuUfL96	806	3544	A-109589.17	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1357
AD-57011.1	A-116488.1	CfaAfgCfaGfaCfAfUfuuaUfCfUfuUfuUfL96	807	3544	A-109589.17	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1358
AD-57017.1	A-116490.1	CfaAfGfCfagaCfAfUfuUfaUfcUfuUfuUfL96	808	3544	A-109589.17	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1359
AD-57000.2	A-116492.1	Cf(Aeo)Af(Geo)CfaGfaCfAfUfuUfaUfcUf(Teo)Uf(Teo)UfL96	809	3544	A-109589.17	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1360
AD-57000.3	A-116492.2	Cf(Aeo)Af(Geo)CfaGfaCfAfUfuUfaUfcUf(Teo)Uf(Teo)UfL96	810	3544	A-109589.23	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1361
AD-57000.1	A-116492.3	Cf(Aeo)Af(Geo)CfaGfaCfAfUfuUfaUfcUf(Teo)Uf(Teo)UfL96	811	3544	A-109589.17	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1362
AD-57006.2	A-116494.1	Cf(Aeo)Af(Geo)CfaGfaCfAfUfuUf(Aeo)Uf(m5Ceo)Uf(Teo)Uf(Teo)UfL96	812	3544	A-109589.23	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1363

Nome do Dúplex	Nome do Oligo Senso	Sequência do Oligo Senso	SEQ ID NO:	Posição em relação a Antissenso	Nome do Oligo Antissenso	Sequência do Oligo Antissenso	SEQ ID NO:
				NM_174936.3			
AD-57006.3	A-116494.2	Cf(Aeo)Af(Geo)CfaGfaCfAfUfuUf(Aeo)Uf(m5Ceo)Uf(Teo)Uf(Teo)UfL96	813	3544	A-109589.23	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1364
AD-57006.1	A-116494.3	Cf(Aeo)Af(Geo)CfaGfaCfAfUfuUf(Aeo)Uf(m5Ceo)Uf(Teo)Uf(Teo)UfL96	814	3544	A-109589.17	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1365
AD-57012.1	A-116498.1	Cf(Aeo)Af(Geo)CfaGfaCfAfUfuUfaUfcUf(Teo)Uf(Teo)Ubl96	815	3544	A-109589.17	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1366
AD-57018.1	A-116500.1	Cf(Aeo)Af(Geo)CfaGfaCfAfUfuUf(Aeo)Uf(m5Ceo)Uf(Teo)Uf(Teo)Ubl96	816	3544	A-109589.17	aAfaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgsCfsu	1367
AD-53815.1		CfuAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	817	3601		aCfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsAfsa	1368
AD-57928.40		CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	818	3601		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1369
AD-59182.5		CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuugCfuuuuguL96	819	3601		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1370
AD-59184.3		CfsusAfgAfcCfuGfuUfuugCfuuuuguL96	820	3601		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1371
AD-59186.3		CfsusAfgAfcCfuGfUfuugCfuuuuguL96	821	3601		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1372
AD-59171.13		CfsusAfgAfcCfuGfuuuugCfuuuuguL96	822	3601		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1373
AD-59176.7		CfsusAfgAfcCfuGfuuuugcuuuuguL96	823	3601		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1374
AD-59170.7		CfsusagacCfuGfuuuugCfuuuuguL96	824	3601		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1375
AD-59175.7		CfsusagacCfuGfuuuugcuuuuguL96	825	3601		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1376
AD-59179.7		csusagacCfuGfuuuugcuuuuguL96	826	3601		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1377
AD-59218.1		CfsusAfgAfcCfuGfuuuugCfuuuuguL96	827	3601		asCfsaAfaAfgCfaAfAfAfcAfgGfuCfuAfgsasa	1378
AD-59222.1		CfsusAfgAfcCfuGfuuuugcuuuuguL96	828	3601		asCfsaAfaAfgCfaAfAfAfcAfgGfuCfuAfgsasa	1379
AD-59226.1		CfsusagacCfuGfuuuugCfuuuuguL96	829	3601		asCfsaAfaAfgCfaAfAfAfcAfgGfuCfuAfgsasa	1380
AD-59230.1		CfsusagacCfuGfuuuugcuuuuguL96	830	3601		asCfsaAfaAfgCfaAfAfAfcAfgGfuCfuAfgsasa	1381

Nome do Dúplex	Nome do Oligo Senso	Sequência do Oligo Senso	SEQ ID NO:	Posição em relação a Antissenso	Nome do Oligo Antissenso	Sequência do Oligo Antissenso	SEQ ID NO:
AD-59235.1		csusagacCfuGfuuuugcuuuuguL96	831	3601		asCfsaAfaAfgCfaAfaAfcAfgGfuCfuAfgsasa	1382
AD-59207.1		CfsusAfgAfcCfuGfuuuugCfuuuuguL96	832	3601		asCfsaAfaAfgCfaAfaAfcAfgGfuCfuagsasa	1383
AD-59211.1		CfsusAfgAfcCfuGfuuuugcuuuuguL96	833	3601		asCfsaAfaAfgCfaAfaAfcAfgGfuCfuagsasa	1384
AD-59215.1		CfsusagacCfuGfuuuugCfuuuuguL96	834	3601		asCfsaAfaAfgCfaAfaAfcAfgGfuCfuagsasa	1385
AD-59219.1		CfsusagacCfuGfuuuugcuuuuguL96	835	3601		asCfsaAfaAfgCfaAfaAfcAfgGfuCfuagsasa	1386
AD-59223.1		csusagacCfuGfuuuugcuuuuguL96	836	3601		asCfsaAfaAfgCfaAfaAfcAfgGfuCfuagsasa	1387
AD-59181.5		CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfsgsUfL96	837	3601		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1388
AD-59172.5		CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfsgsUfL96	838	3601		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1389
AD-59177.5		CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfsuUfsuUfsgsUfL96	839	3601		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1390
AD-59180.5		CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfsuUfsuUfsgsUfsL96	840	3601		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1391
AD-59183.5		CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfsgsUfsL96	841	3601		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1392
AD-59185.5		CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfsL96	842	3601		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1393
AD-59173.5		CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfsL96	843	3601		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1394
AD-59232.1		CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	844	3600		PasCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasasa	1395
AD-59236.1		CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	845	3601		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfsuAfgsasa	1396
AD-59216.1		CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfsgsUfL96	846	3601		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfsuAfgsasa	1397
AD-59220.1		CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfsgsUfL96	847	3601		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfsuAfgsasa	1398
AD-59224.1		CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfsuUfsuUfsgsUfL96	848	3601		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfsuAfgsasa	1399
AD-59228.1		CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfsuUfsuUfsgsUfsL96	849	3601		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfsuAfg	1400

Nome do Dúplex	Nome do Oligo Senso	Sequência do Oligo Senso	SEQ ID NO:	Posição em relação a Antissenso	Nome do Oligo Antissenso	Sequência do Oligo Antissenso	SEQ ID NO:
		6				sasa	
AD-59233.1		CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfsgsUfsL96	850	3601		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfsuAfgsasa	1401
AD-59237.1		CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfsL96	851	3601		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfsuAfgsasa	1402
AD-59209.1		CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuugCfuuuugsuL96	852	3601		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfsuAfgsasa	1403
AD-59208.1		CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	853	3601		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfsuAfgsasa	1404
AD-59212.1		CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	854	3600		PasCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfsuAfgsasa	1405
AD-59210.1		csusAGAccuGuuuuGcuuuuGuL96	855	3601		AscsAAAAGcAAAAcAGGucucAGsasa	1406
AD-59214.1		AsGsAccuGuuuuGcuuuuGuL96	856	3603		AscsAAAAGcAAAAcAGGucusAsG	1407
AD-59227.1		CfsusAfGfAfccuGfuuuuGfcuuuuGfuL96	857	3601		asCfsAfAfAfAfGfcAfAfAfAfGfGfucufGfsasa	1408
AD-59231.1		CfsusAfGfAfccuGfuuuuGfcuuuuGfuL96	858	3601		asCfsAfAfAfAfGfcAfAfaacAfGfGfucufGfsasa	1409
AD-59198.3		(C3m)usAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	859	3601		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1410
AD-59200.3		(C3m)(U3m)AfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	860	3601		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1411
AD-59203.3		(m5Cam)usAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	861	3601		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1412
AD-59204.3		(m5Cam)(Tam)AfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	862	3601		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1413
AD-59188.3		(m5Cams)(Tams)AfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	863	3601		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1414

Nome do Dúplex	Nome do Oligo Senso	Sequência do Oligo Senso	SEQ ID NO:	Posição em relação a NM_174936.3	Nome do Oligo Antissenso	Sequência do Oligo Antissenso	SEQ ID NO:
		UfgUfL96					
AD-59191.3		(m5Cams)usAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	864	3601		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1415
AD-59213.1		CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	865	3601		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgs(A3m)a	1416
AD-59217.1		CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	866	3601		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAf(G3m)(A3m)a	1417
AD-59221.1		CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	867	3601		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgs(Aam)a	1418
AD-59225.1		CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	868	3601		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAf(Gam)(Aam)a	1419
AD-59229.1		CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	869	3601		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgs(Aams)a	1420
AD-59234.1		CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	870	3601		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAf(Gams)(Aams)a	1421
AD-59238.1		CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	871	3601		(A3m)CfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1422
AD-59241.1		CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	872	3601		as(C3m)aAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1423
AD-59245.1		CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	873	3601		(Aam)CfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1424
AD-59250.1		CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	874	3601		as(m5Cam)aAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1425
AD-59246.1		CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	875	3602		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsgsa	1426
AD-59253.2		usAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	876	3602		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsgsa	1427
AD-59242.1		AfgsAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	877	3602		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsgsa	1428

Nome do Dúplex	Nome do Oligo Senso	Sequência do Oligo Senso	SEQ NO:	ID Posição em relação a Antissenso NM_174936.3	Nome do Oligo Antissenso	Sequência do Oligo Antissenso	SEQ ID NO:
AD-59253.1		usAfsgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	878	3602		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfsgsa	1429
AD-59258.1		usasgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	879	3602		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfsgsa	1430
AD-59251.1		CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	880	3603		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfusAfsg	1431
AD-59256.1		usAfsgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	881	3604		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfsusAf	1432
AD-59260.1		AfsgsAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	882	3605		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfusCfsu	1433
AD-59248.1		gsAfscCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	883	3605		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfusCfsu	1434
AD-59247.1		gsAfscCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	884	3604		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfsusa	1435
AD-59252.1		AfsgsAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	885	3604		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfsusa	1436
AD-59257.1		usAfsgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	886	3604		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfsusa	1437
AD-59261.1		AfsgsAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	887	3603		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfusasg	1438
AD-59262.1		usAfsgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	888	3603		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfusasg	1439
AD-59265.1		csusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	889	3603		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfusasg	1440
AD-59196.13		usAfsgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	890	3601		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1441
AD-59189.11		AfsgsAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	891	3601		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1442
AD-59190.3		usCfsuAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	892	3601		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1443
AD-59192.3		UfsusCfuAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	893	3601		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1444
AD-59240.1		CfsusAfgAfcCfuGfuuuugCfuuuuguL96	894	3601		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgs(A3m)a	1445
AD-59244.1		CfsusAfgAfcCfuGfuuuugCfuuuuguL96	895	3601		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1446
AD-59202.7		(C3m)usagaccuguuuugcuuuuguL96	896	3601		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1447
AD-59195.5		(C3m)usAfgAfcCfuGfuuuugCfuuuuguL96	897	3601		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1448
AD-59249.1		CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	898	3601		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgs(A3m)a	1449
AD-59254.1		CfsusAfgAfcCfuGfuuuugCfuuuuguL96	899	3601		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgs(A3m)a	1450

Nome do Dúplex	Nome do Oligo Senso	Sequência do Oligo Senso	SEQ NO:	ID Posição em relação a Antissenso NM_174936.3	Nome do Oligo Antissenso	Sequência do Oligo Antissenso	SEQ ID NO:
						A3m)a	
AD-59259.1		(C3m)usAfgAfcCfuGfuuuugCfuuuuguL96	900	3601		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgs(A3m)a	1451
AD-59264.1		(C3m)usagaccuguuuugcuuuuguL96	901	3601		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgs(A3m)a	1452
AD-59264.2		(C3m)usagaccuguuuugcuuuuguL96	902	3601		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgs(A3m)a	1453
AD-59255.1		CsusagaccuGfUfUfuugcuuuuguL96	903	3601		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgs(A3m)a	1454
AD-57928.1		CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	904	3601		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1455
AD-58893.1		CfsuAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	905	3601		asCfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgasa	1456
AD-58894.1		CfsuAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	906	3601		aCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsaa	1457
AD-58895.1		CfuAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	907	3601		asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1458
AD-58896.1		CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	908	3601		aCfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgaa	1459
AD-58897.1		CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	909	3601		asCfsasAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1460
AD-58898.1		CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	910	3601		asCfsaAfaAfgCfsaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1461
AD-58899.1		CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	911	3601		asCfsaAfaAfgCfsaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1462
AD-58900.1		CfsasAfgCfaGfaCfAfuUfaUfcUfuUfuUfL96	912	NA		asAfsaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgscsu	1463
AD-58902.1		UfsusUfuCfuAfgAfCfCfuGfuUfuUfgCfuUfL96	913	3597		asAfgCfaAfaAfcAfgguCfuAfgAfaAfasgsu	1464
		(A3mx)(G3mx)AfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	914			asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfusasg	1465
		(A3mx)(G3mx)AfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	915			(A3mx)CfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfusasg	1466

Nome do Dúplex	Nome do Oligo Senso	Sequência do Oligo Senso	SEQ ID NO:	Posição em relação a NM_174936.3	Nome do Oligo Antissenso	Sequência do Oligo Antissenso	SEQ ID NO:
		(A3mx)(G3mx)AfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	916			(A3mx)CfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfu(A3mx)g	1467
		(A3mx)gAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	917			asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfusasg	1468
		(A3mx)gAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	918			(A3mx)CfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfusasg	1469
		(A3mx)gAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	919			(A3mx)CfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfu(A3mx)g	1470
		(C3mx)(U3mx)AfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	920			asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1471
		(C3mx)(U3mx)AfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	921			(A3mx)CfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAf(G3mx)(A3mx)a	1472
		(C3mx)uAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	922			asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1473
		(C3mx)uAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	923			(A3mx)CfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1474
		(C3mx)uAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	924			(A3mx)CfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfg(A3mx)a	1475
		(C3mx)uAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	925			(A3mx)CfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAf(G3mx)(A3mx)a	1476
		(C3mx)usAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	926			asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1477
		(Chd)susAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	927			asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1478
		(phe)CfsuAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	928			asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1479
		(phe)CfuAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	929			asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1480
		(pshe)CfsuAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	930			asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1481
		(pshe)CfuAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	931			asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1482
		AfsgsAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	932			(A3mx)CfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfusasg	1483
		AfsgsAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	933			(A3mx)CfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfu(A	1484

Nome do Dúplex	Nome do Oligo Senso	Sequência do Oligo Senso	SEQ ID NO:	Posição em relação a Antissenso	Nome do Oligo Antissenso	Sequência do Oligo Antissenso	SEQ ID NO:
				NM_174936.3		3mx)g	
		Cfs(Uhd)sAfgAfcCfuGfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	934			asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1485
		CfsusAfgAf(Chd)CfuGfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	935			asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1486
		CfsusAfgAfc(Chd)uGfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	936			asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1487
		CfsusAfgAfcCf(Uhd)GfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	937			asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1488
		CfsusAfgAfcCfuGfUfUf(Uhd)UfgCfuUfuUfgUfL96	938			asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1489
		CfsusAfgAfcCfuGfUfUf(Ggn)CfuUfuUfgUfL96	939			asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1490
		CfsusAfgAfcCfuGfUfUfUfg(Cgn)uUfuUfgUfL96	940			asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1491
		CfsusAfgAfcCfuGfUfUfUfg(Chd)uUfuUfgUfL96	941			asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1492
		CfsusAfgAfcCfuGfUfUfUfgCf(Tgn)UfuUfgUfL96	942			asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1493
		CfsusAfgAfcCfuGfUfUfUfgCf(Uhd)UfuUfgUfL96	943			asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1494
		CfsusAfgAfcCfuGfUfUfUfgCfu(Tgn)uUfgUfL96	944			asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1495
		CfsusAfgAfcCfuGfUfUfUfgCfuUf(Tgn)UfgUfL96	945			asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1496
		CfsusAfgAfcCfuGfUfUfUfgCfuUf(Uhd)UfgUfL96	946			asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1497
		CfsusAfgAfcCfuGfUfUfUfgCfuUf(Tgn)gUfL96	947			asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1498
		CfsusAfgAfcCfuGfUfUfUfgCfuUf(Uhd)gUfL96	948			asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1499
		CfsusAfgAfcCfuGfUfUfUfgCfuUfUf(Ggn)UfL96	949			asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1500
		CfsusAfgAfcCfuGfUfUfUfgCfuUfUf(Tgn)L96	950			asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1501
		CfsusAfgAfcCfuGfUfUfUfgCfuUfUf(Uhd)L96	951			asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1502
		CfsusAfgAfcCfuGfUfUfUfgCfuUfUfUfL96	952			asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1503
		CfsusAfgAfcCfuGfUfUfUfgCfuUfUfUfL96	953			(Agn)CfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1504
		CfsusAfgAfcCfuGfUfUfUfgCfuUfUfUfL96	954			(Agn)CfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1505

Nome do Dúplex	Nome do Oligo Senso	Sequência do Oligo Senso	SEQ ID NO:	Posição em relação a NM_174936.3	Nome do Oligo Antissenso	Sequência do Oligo Antissenso	SEQ ID NO:
		CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	955			P(Agn)CfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1506
		CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	956			as(Cgn)aAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1507
		CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	957			asCfs(Agn)AfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1508
		CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	958			asCfsa(Agn)aAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1509
		CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	959			asCfsaAf(Agn)AfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1510
		CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	960			asCfsaAfa(Agn)gCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1511
		CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	961			asCfsaAfaAf(Ggn)CfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1512
		CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	962			asCfsaAfaAfg(Cgn)aAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1513
		CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	963			asCfsaAfaAfgCf(Agn)AfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1514
		CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	964			asCfsaAfaAfgCfa(Agn)aacAfgGfuCfuAfgsasa	1515
		CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	965			asCfsaAfaAfgCfaAf(Agn)acAfgGfuCfuAfgsasa	1516
		CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	966			asCfsaAfaAfgCfaAfa(Agn)cAfgGfuCfuAfgsasa	1517
		CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	967			asCfsaAfaAfgCfaAfaa(Cgn)AfgGfuCfuAfgsasa	1518

Nome do Dúplex	Nome do Oligo Senso	Sequência do Oligo Senso	SEQ ID NO:	Posição em relação a Antissenso	Nome do Oligo Antissenso	Sequência do Oligo Antissenso	SEQ ID NO:
		CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	968			asCfsaAfaAfiCfaAfaacAfiGfuCfuAfisasa	1519
		CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	969			asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfg(A3mx)a	1520
		CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	970			asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgs(A3mx)a	1521
		CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	971			asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAf(G3mx)(A3mx)a	1522
		CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	972			(A3mx)CfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1523
		CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	973			(A3mx)CfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1524
		CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	974			P(A3mx)CfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1525
		CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	975			a(C3mx)aAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1526
		CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	976			as(C3mx)aAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1527
		CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	977			(A3mx)(C3mx)aAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1528
		CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	978			(A3mx)CfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfg(A3mx)a	1529
		CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	979			(A3mx)CfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgs(A3mx)a	1530
		CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	980			(A3mx)CfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfg(G3mx)(A3mx)a	1531
		CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	981			asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgas	1532

Nome do Dúplex	Nome do Oligo Senso	Sequência do Oligo Senso	SEQ ID NO:	Posição em relação a NM_174936.3	Nome do Oligo Antissenso	Sequência do Oligo Antissenso	SEQ ID NO:
						as(phe)	
		CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	982			asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgaas(phe)	1533
		CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	983			asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgaas(phe)	1534
		CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	984			asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsaas(phe)	1535
		CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	985			asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgas(phe)	1536
		CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	986			asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfga(phe)	1537
		CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	987			asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGf(Uhd)CfuAfgsasa	1538
		CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	988			asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCf(Uhd)Afgsasa	1539
		CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	989			asCfsaAfaAfg(Chd)aAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1540
		CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	990			asCfsaAfaagCfaAfaacAfgGfucuAfgsasa	1541
		CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	991			asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1542
		CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	992			asCfsaAfaagCfaAfaacAfgGfucuAfgsasa	1543
		CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	993			asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1544
		CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	994			asCfsaAfaagCfaAfaacAfgGfucuAfgsasa	1545
		CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	995			asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1546
		CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	996			asCfsaAfaagCfaAfaacAfgGfucuAfgsasa	1547
		CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgcuuuugUfL96	997			asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1548
		CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgcuuuugUfL96	998			asCfsaAfaagCfaAfaacAfgGfucuAfgsasa	1549

Nome do Dúplex	Nome do Oligo Senso	Sequência do Oligo Senso	SEQ ID NO:	Posição em relação a NM_174936.3	Nome do Oligo Antissenso	Sequência do Oligo Antissenso	SEQ ID NO:
		CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgcuuuuguL96	999			asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1550
		CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgcuuuuguL96	1000			asCfsaAfaagCfaAfaacAfgGfucuAfgsasa	1551
		CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgUfuUfuUfgUfL96	1001			asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1552
		CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfiCfuUfuUfiUfL96	1002			asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1553
		CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfiCfuUfuUfiUfL96	1003			asCfsaAfaAfiCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1554
		CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfiCfuUfuUfiUfL96	1004			asCfsaAfaAfiCfaAfaacAfiGfuCfuAfisasa	1555
		CfsusAfiAfcCfuGfUfUfuUfiCfuUfuUfiUfL96	1005			asCfsaAfaAfiCfaAfaacAfiGfuCfuAfisasa	1556

Exemplo 2. Rastreio *in vitro* e *in vivo*.

[00567] Um subconjunto destes dúplexes foi avaliado quanto à eficácia em ensaios de captação livre de dose única em hepatócitos de macaco *Cynomolgus*. Brevemente, hepatócitos primários de *Cynomolgus* (PCH) foram tratados com os dúplexes de siRNA modificados conjugados a três concentrações, 500 nM, 100 nM e 10 nM. Os ensaios de captação livre a 100 nM e 10 nM foram realizados duas vezes e os dados são representados como mensagem restante média em relação ao controlo +/- o desvio padrão (SD). O rastreio a 500 nM foi realizado uma única vez. A Tabela 3 mostra os resultados destes ensaios.

Tabela 3. Rastreio da eficácia de PCSK9 por captação livre em hepatócitos primários de macacos *Cynomolgus*.

ID	DO	PCH	Média de	Média de	SD de PCH	SD de PCH
DÚPLEX		500 nM	PCH 100 nM	PCH 10 nM	100 nM	10 nM
AD-48399		1,08	1,03	0,98	0,09	0,02
AD-48399		0,97	0,95	1,10	0,03	0,09
AD-48399		0,89	0,98	1,02	0,06	0,06
AD-48399		1,04	1,00	1,01	0,02	0,08
AD-48399		0,92	1,03	0,96	0,02	0,09
AD-48399		1,13	1,03	0,96	0,05	0,01
AD-48400		0,48	0,63	0,90	0,04	0,00
AD-48400.4		0,65	0,78	0,89	0,14	0,13
AD-53649.1		0,96	0,96	1,14	0,02	0,07
AD-53650.1		0,97	0,92	1,15	0,01	0,06
AD-53651.1		1,02	0,98	1,15	0,13	0,10
AD-53652.1		0,83	0,89	1,14	0,20	0,05
AD-53653.1		0,85	0,95	1,26	0,04	0,07
AD-53654.1		0,84	0,93	1,19	0,02	0,13
AD-53656.1		0,92	0,92	1,07	0,05	0,03
AD-53657.1		0,92	0,89	1,02	0,05	0,03
AD-53658.1		0,89	0,83	0,97	0,04	0,14
AD-53659.1		0,79	0,82	1,05	0,06	0,13

ID DÚPLEX	DO PCH 500 nM	Média de PCH 100 nM	Média de PCH 10 nM	SD de PCH 100 nM	SD de PCH 10 nM
AD-53660.1	0,89	0,86	0,98	0,07	0,07
AD-53661.1	0,92	1,03	1,07	0,02	0,04
AD-53663.1	0,88	0,90	1,08	0,03	0,02
AD-53664.1	0,95	0,86	1,00	0,09	0,13
AD-53665.1	0,92	0,91	1,05	0,01	0,13
AD-53666.1	0,73	0,80	0,95	0,08	0,02
AD-53667.1	0,95	0,96	1,12	0,06	0,03
AD-53668.1	1,03	0,89	1,17	0,03	0,12
AD-53669.1	1,12	0,90	1,05	0,01	0,15
AD-53670.1	0,85	0,88	1,00	0,06	0,06
AD-53671.1	0,87	0,90	0,93	0,02	0,04
AD-53672.1	0,87	0,86	0,95	0,04	0,16
AD-53674.1	0,69	0,75	0,92	0,08	0,02
AD-53675.1	0,99	0,92	1,17	0,11	0,06
AD-53676.1	0,90	0,87	1,10	0,03	0,08
AD-53677.1	1,22	0,86	1,12	0,10	0,04
AD-53678.1	1,01	0,98	1,03	0,03	0,12
AD-53679.1	0,96	0,85	1,02	0,04	0,11
AD-53680.1	1,21	0,94	0,99	0,03	0,01
AD-53681.1	1,02	0,94	1,01	0,01	0,11
AD-53682.1	0,98	0,90	1,01	0,06	0,11
AD-53683.1	0,95	0,90	1,01	0,02	0,08
AD-53684.1	1,14	1,01	1,01	0,09	0,07
AD-53685.1	0,96	0,92	1,03	0,00	0,07
AD-53687.1	1,31	0,91	1,02	0,02	0,11
AD-53688.1	0,90	0,95	0,96	0,03	0,03
AD-53689.1	0,97	0,95	1,05	0,04	0,07
AD-53690.1	0,82	0,97	0,99	0,13	0,08
AD-53691.1	0,99	1,01	0,97	0,01	0,12
AD-53692.1	1,11	0,91	1,00	0,04	0,03
AD-53693.1	1,02	0,96	1,02	0,04	0,10
AD-53694.1	1,12	0,98	0,97	0,07	0,06
AD-53695.1	0,97	1,04	0,94	0,11	0,08

ID	DO	PCH	Média de	Média de	SD de PCH	SD de PCH
DÚPLEX		500 nM	PCH 100 nM	PCH 10 nM	100 nM	10 nM
AD-53696.1		0,85	0,91	1,23	0,10	0,01
AD-53697.1		0,89	0,91	1,06	0,03	0,00
AD-53698.1		0,90	0,86	1,15	0,06	0,01
AD-53699.1		0,84	0,85	1,07	0,00	0,03
AD-53700.1		0,93	1,02	1,21	0,02	0,15
AD-53701.1		1,01	0,96	1,12	0,00	0,17
AD-53702.1		0,95	0,94	1,06	0,05	0,15
AD-53703.1		0,82	0,85	1,04	0,07	0,13
AD-53704.1		0,92	0,97	0,94	0,04	0,02
AD-53705.1		0,96	0,98	1,00	0,11	0,15
AD-53706.1		0,90	0,97	1,03	0,01	0,20
AD-53707.1		0,86	0,98	1,11	0,14	0,24
AD-53708.1		1,10	0,94	1,05	0,02	0,15
AD-53709.1		0,79	0,84	1,08	0,01	0,18
AD-53710.1		1,03	0,91	1,06	0,01	0,09
AD-53711.1		0,90	0,90	0,99	0,00	0,28
AD-53712.1		0,97	0,92	0,97	0,00	0,12
AD-53713.1		0,98	0,93	1,07	0,01	0,16
AD-53714.1		1,09	0,86	0,99	0,03	0,09
AD-53715.1		1,04	0,83	0,94	0,06	0,06
AD-53716.1		0,82	0,85	1,02	0,05	0,14
AD-53717.1		0,98	0,94	0,98	0,11	0,12
AD-53718.1		0,89	1,04	1,01	0,18	0,01
AD-53719.1		0,98	1,05	1,05	0,06	0,17
AD-53720.1		1,02	0,88	1,08	0,01	0,15
AD-53721.1		0,88	0,95	1,03	0,07	0,11
AD-53722.1		0,98	0,95	1,01	0,06	0,12
AD-53723.1		0,89	0,89	1,02	0,10	0,06
AD-53724.1		0,98	0,93	1,00	0,13	0,01
AD-53725.1		1,04	1,05	1,09	0,19	0,11
AD-53726.1		0,87	0,88	0,88	0,00	0,02
AD-53727.1		0,82	0,92	1,02	0,05	0,13
AD-53728.1		0,86	0,93	1,06	0,03	0,08

ID DÚPLEX	DO PCH 500 nM	Média de PCH 100 nM	Média de PCH 10 nM	SD de PCH 100 nM	SD de PCH 10 nM
AD-53729.1	0,86	0,81	1,02	0,12	0,03
AD-53730.1	1,01	0,95	1,02	0,07	0,01
AD-53731.1	0,99	0,98	1,00	0,08	0,07
AD-53732.1	0,93	0,86	1,01	0,12	0,11
AD-53733.1	1,06	1,02	1,08	0,05	0,06
AD-53734.1	0,95	0,93	1,04	0,12	0,05
AD-53735.1	1,00	0,93	1,01	0,02	0,06
AD-53736.1	0,90	1,09	1,16	0,05	0,01
AD-53737.1	0,94	0,93	1,00	0,02	0,09
AD-53738.1	0,93	0,79	0,93	0,03	0,01
AD-53739.1	1,11	0,90	0,90	0,05	0,00
AD-53740.1	0,86	0,92	0,97	0,08	0,01
AD-53741.1	0,96	0,84	0,92	0,00	0,07
AD-53742.1	1,03	0,93	1,03	0,04	0,06
AD-53743.1	0,92	0,98	1,05	0,08	0,14
AD-53744.1	0,95	1,02	1,03	0,08	0,12
AD-53745.1	0,81	0,99	1,11	0,10	0,18
AD-53746.1	0,65	0,83	1,04	0,07	0,16
AD-53747.1	0,82	0,88	1,02	0,05	0,13
AD-53748.1	0,46	0,59	0,72	0,06	0,07
AD-53749.1	0,93	0,90	1,04	0,12	0,16
AD-53750.1	0,90	1,02	0,97	0,02	0,10
AD-53751.1	0,92	0,87	1,02	0,19	0,16
AD-53752.1	0,73	0,88	0,99	0,06	0,18
AD-53753.1	0,87	0,97	1,06	0,07	0,19
AD-53754.1	0,43	0,58	0,72	0,10	0,05
AD-53755.1	1,01	0,99	1,03	0,03	0,02
AD-53757.1	0,98	0,91	1,07	0,05	0,13
AD-53758.1	0,63	0,73	0,92	0,05	0,00
AD-53759.1	0,91	0,92	0,99	0,02	0,08
AD-53760.1	0,51	0,67	0,80	0,03	0,12
AD-53761.1	0,89	1,07	1,10	0,11	0,18
AD-53762.1	1,06	1,00	0,96	0,12	0,10

ID	DO	PCH	Média de	Média de	SD de PCH	SD de PCH
DÚPLEX		500 nM	PCH 100 nM	PCH 10 nM	100 nM	10 nM
AD-53763.1		0,95	1,10	1,00	0,07	0,09
AD-53764.1		0,99	0,94	0,99	0,05	0,16
AD-53765.1		0,92	0,87	0,86	0,09	0,11
AD-53766.1		0,75	0,78	0,86	0,09	0,14
AD-53767.1		1,01	1,02	0,97	0,05	0,18
AD-53768.1		0,89	1,07	0,97	0,09	0,15
AD-53769.1		0,89	1,11	0,95	0,05	0,11
AD-53770.1		0,76	1,01	0,98	0,01	0,12
AD-53771.1		0,70	0,74	0,84	0,06	0,12
AD-53772.1		0,72	0,83	0,85	0,04	0,11
AD-53773.1		0,96	1,00	0,98	0,05	0,07
AD-53774.1		0,75	0,92	1,01	0,06	0,14
AD-53776.1		0,78	0,94	0,97	0,11	0,08
AD-53777.1		0,67	0,68	0,74	0,11	0,01
AD-53778.1		0,74	0,73	0,92	0,13	0,14
AD-53779.1		1,00	0,98	0,95	0,14	0,04
AD-53780.1		0,90	0,92	0,98	0,12	0,05
AD-53781.1		0,84	0,95	1,00	0,17	0,06
AD-53782.1		0,87	0,92	0,90	0,11	0,02
AD-53783.1		0,71	0,79	0,78	0,14	0,03
AD-53784.1		0,68	0,82	0,86	0,10	0,10
AD-53785.1		1,10	0,96	0,96	0,09	0,07
AD-53786.1		0,98	0,89	0,95	0,20	0,14
AD-53787.1		1,23	0,93	1,00	0,11	0,21
AD-53788.1		0,95	0,90	0,94	0,17	0,08
AD-53789.1		0,55	0,60	0,78	0,09	0,08
AD-53790.1		0,70	0,91	1,04	0,08	0,16
AD-53791.1		0,47	0,67	0,92	0,12	0,09
AD-53792.1		0,52	0,75	0,89	0,06	0,04
AD-53793.1		0,88	1,03	1,07	0,20	0,09
AD-53794.1		0,85	1,00	1,09	0,17	0,22
AD-53795.1		0,58	0,71	1,00	0,10	0,12
AD-53796.1		0,62	0,78	0,96	0,07	0,12

ID DÚPLEX	DO PCH 500 nM	Média de PCH 100 nM	Média de PCH 10 nM	SD de PCH 100 nM	SD de PCH 10 nM
AD-53797.1	0,72	0,78	0,93	0,12	0,10
AD-53798.1	0,50	0,55	0,76	0,08	0,03
AD-53799.1	0,98	0,92	1,10	0,11	0,21
AD-53800.1	0,59	0,65	0,87	0,15	0,14
AD-53801.1	0,81	0,84	1,05	0,14	0,18
AD-53802.1	0,68	0,79	1,03	0,13	0,13
AD-53803.1	0,51	0,53	0,77	0,09	0,05
AD-53804.1	0,94	0,86	1,05	0,15	0,15
AD-53805.1	0,95	0,93	1,03	0,12	0,19
AD-53806.1	0,38	0,45	0,78	0,05	0,12
AD-53807.1	0,85	0,95	1,15	0,09	0,24
AD-53808.1	0,81	0,85	0,93	0,08	0,11
AD-53809.1	0,50	0,62	0,77	0,00	0,12
AD-53810.1	0,84	0,82	0,98	0,16	0,22
AD-53811.1	0,94	0,95	1,00	0,10	0,11
AD-53812.1	0,61	0,76	0,97	0,14	0,22
AD-53813.1	0,67	0,76	0,94	0,01	0,15
AD-53814.1	0,58	0,67	0,84	0,11	0,19
AD-53815.1	0,49	0,50	0,72	0,09	0,17
AD-53816.1	0,82	0,91	0,93	0,08	0,10
AD-53817.1	0,92	0,94	1,07	0,13	0,36
AD-53818.1	0,83	0,99	0,99	0,07	0,41
AD-53819.1	0,61	0,75	0,88	0,24	0,16
AD-53820.1	0,71	0,81	0,92	0,17	0,04
AD-53821.1	0,56	0,54	0,68	0,13	0,05
AD-53822.1	1,24	0,88	1,05	0,12	0,17
AD-53823.1	1,03	0,86	0,99	0,11	0,18
AD-53824.1	0,76	0,73	0,93	0,16	0,11
AD-53825.1	0,57	0,63	0,82	0,18	0,04
AD-53826.1	0,54	0,51	0,78	0,08	0,07
AD-53827.1	0,99	0,91	1,05	0,12	0,08
AD-53828.1	0,69	0,77	0,87	0,09	0,16
AD-53829.1	0,72	0,91	0,95	0,11	0,16

ID DO DÚPLEX	PCH 500 nM	Média de PCH 100 nM	Média de PCH 10 nM	SD de PCH 100 nM	SD de PCH 10 nM
AD-53830.1	0,48	0,73	0,76	0,11	0,01
AD-53831.1	0,97	0,92	1,00	0,22	0,25
AD-53832.1	0,68	0,63	0,81	0,15	0,02
AD-53833.1	0,92	0,90	0,84	0,20	0,03
AD-53834.1	1,15	0,93	0,86	0,16	0,02
AD-53835.1	0,88	0,79	0,81	0,18	0,03
PBS	0,90	1,02	0,99	0,04	0,15

[00568] Os dúplexes de siRNA de PCSK9 modificados e conjugados foram também avaliados quanto à eficácia por ensaios de transfecção em três linhas celulares humanas. siRNAs de PCSK9 foram transfectados em três diferentes linhas celulares humanas, HeLa, Hep3B e HepG2 em duas doses, 10 nM e 0,1 nM. Os resultados destes ensaios são mostrados na Tabela 4 e os dados são expressos como uma fração da mensagem restante em relação ao controle.

[00569] A Figura 1 mostra que existe uma reprodutibilidade geral na atividade de silenciamento dos dúplexes de PCSK9 entre os ensaios de captação livre e os ensaios de transfecção.

[00570] Os valores de IC₅₀ para dúplexes selecionados por captação livre em células de *Cynomologous* e por transfecção em células Hep3B são mostrados na Tabela 5.

Tabela 4. Rastreio da eficácia de PCSK9 por transfecção em linhas celulares humanas.

ID DO DÚPLEX	Hela, 10 nM	Hela, 0,1 nM	Hep3b, 10 nM	Hep3b, 0,1 nM	HepG2, 10 nM	HepG2, 0,1 nM
AD-48399	0,94	0,90	1,18	1,03	1,34	1,05
AD-48399	0,90	1,03	0,87	0,88	0,84	0,91
AD-48399	0,88	1,14	0,90	0,99	0,92	1,04
AD-48399	1,22	0,97	0,95	0,98	0,81	0,92
AD-48399	1,04	0,81	1,01	1,10	1,03	1,09
AD-48399	1,06	1,20	1,14	1,04	1,16	1,01
AD-48400	0,05	0,63	0,10	0,51	0,17	0,69

ID DO DÚPLEX	Hela, 10 nM	Hela, 0,1 nM	Hep3b, 10 nM	Hep3b, 0,1 nM	HepG2, 10 nM	HepG2, 0,1 nM
AD-48400,4	0,06	0,28	0,14	0,31	0,13	0,32
AD-53649,1	0,84	1,05	1,07	0,94	0,97	1,11
AD-53650,1	0,16	0,87	0,41	0,87	0,52	1,12
AD-53651,1	0,47	0,86	0,49	0,92	0,71	1,08
AD-53652,1	0,34	0,93	0,50	0,96	0,40	1,21
AD-53653,1	0,36	0,99	0,43	1,01	0,52	1,13
AD-53654,1	0,85	1,06	0,99	0,92	0,95	1,06
AD-53656,1	0,46	0,92	0,78	0,98	0,80	0,74
AD-53657,1	0,71	0,97	0,75	1,01	0,81	0,94
AD-53658,1	0,32	0,97	0,50	0,91	0,58	1,05
AD-53659,1	0,11	0,86	0,24	0,93	0,22	0,94
AD-53660,1	0,35	1,12	0,43	0,99	0,44	1,31
AD-53661,1	0,94	1,07	0,85	0,95	0,88	0,92
AD-53663,1	0,82	1,03	0,74	1,06	1,04	1,04
AD-53664,1	0,60	0,94	0,61	1,06	0,85	1,28
AD-53665,1	0,33	1,00	0,55	1,01	0,45	1,12
AD-53666,1	0,09	0,98	0,22	0,97	0,21	1,08
AD-53667,1	0,94	1,07	0,95	0,96	0,95	1,02
AD-53668,1	0,27	0,88	0,36	1,07	0,35	1,13
AD-53669,1	0,81	1,02	0,93	1,08	1,35	1,24
AD-53670,1	0,55	0,94	0,52	0,48	0,45	1,13
AD-53671,1	0,68	1,07	0,78	1,02	0,82	1,27
AD-53672,1	0,22	1,04	0,38	1,06	0,34	1,15
AD-53674,1	0,08	0,67	0,15	0,85	0,15	0,80
AD-53675,1	0,25	1,04	0,43	0,95	0,38	1,04
AD-53676,1	0,81	0,94	0,90	1,14	0,98	1,06
AD-53677,1	0,45	0,90	0,70	0,98	0,70	1,14
AD-53678,1	0,41	1,02	0,72	1,04	0,70	1,15
AD-53679,1	0,44	0,93	0,58	0,88	0,50	0,95
AD-53680,1	0,36	0,99	0,55	0,98	0,52	0,96
AD-53681,1	0,33	0,93	0,57	1,12	0,54	1,11
AD-53682,1	0,84	0,94	0,85	1,06	0,93	1,13
AD-53683,1	0,65	0,78	0,95	1,05	0,73	1,06
AD-53684,1	0,57	0,98	0,79	0,92	0,62	1,08
AD-53685,1	0,85	0,90	0,94	0,95	0,69	0,98
AD-53687,1	0,15	0,83	0,39	1,09	0,34	1,23

ID DO DÚPLEX	Hela, 10 nM	Hela, 0,1 nM	Hep3b, 10 nM	Hep3b, 0,1 nM	HepG2, 10 nM	HepG2, 0,1 nM
AD-53688,1	0,45	0,89	0,72	1,01	0,57	1,19
AD-53689,1	0,56	0,93	1,04	1,14	0,59	1,24
AD-53690,1	0,45	0,79	0,53	1,26	0,41	1,22
AD-53691,1	0,82	1,03	0,91	1,22	0,57	1,05
AD-53692,1	0,68	0,81	0,81	0,89	0,82	1,05
AD-53693,1	0,61	0,92	0,85	0,81	0,53	1,03
AD-53694,1	0,59	0,87	0,58	1,01	0,53	0,82
AD-53695,1	0,91	0,78	1,02	1,23	1,14	1,11
AD-53696,1	0,57	0,98	0,82	1,01	0,68	1,05
AD-53697,1	0,31	1,04	0,40	0,95	0,24	0,90
AD-53698,1	0,17	0,97	0,31	0,92	0,32	0,84
AD-53699,1	0,29	1,00	0,47	0,90	0,47	1,23
AD-53700,1	0,81	1,07	0,94	0,99	0,97	1,08
AD-53701,1	0,89	1,07	0,96	0,84	0,65	0,93
AD-53702,1	0,45	1,03	0,84	1,08	0,72	0,99
AD-53703,1	0,18	0,79	0,28	0,97	0,29	0,90
AD-53704,1	0,77	0,80	0,88	1,06	0,91	0,95
AD-53705,1	0,63	0,89	0,81	1,06	0,76	0,97
AD-53706,1	0,39	0,82	0,41	1,00	0,48	0,88
AD-53707,1	0,42	0,97	0,60	0,83	0,54	0,80
AD-53708,1	0,49	0,95	0,82	0,96	1,07	1,09
AD-53709,1	0,19	0,90	0,43	0,85	0,38	1,05
AD-53710,1	0,66	1,00	0,82	0,85	0,69	1,08
AD-53711,1	0,40	0,90	0,45	0,95	0,23	1,03
AD-53712,1	0,47	0,99	0,51	0,94	0,62	0,97
AD-53713,1	0,52	1,05	0,69	0,83	0,79	0,94
AD-53714,1	0,43	1,01	0,71	1,11	0,75	1,12
AD-53715,1	0,23	0,99	0,58	1,24	0,58	1,09
AD-53716,1	0,39	1,00	0,52	0,98	0,51	0,80
AD-53717,1	0,20	0,84	0,33	1,02	0,41	1,09
AD-53718,1	0,35	1,08	0,33	1,02	0,45	0,97
AD-53719,1	0,58	0,96	0,74	0,84	0,79	1,01
AD-53720,1	0,31	1,00	0,55	1,09	0,48	1,24
AD-53721,1	0,26	1,02	0,62	0,92	0,49	0,94
AD-53722,1	0,50	0,99	0,86	0,99	0,87	1,26
AD-53723,1	0,28	0,86	0,37	0,92	0,54	1,11

ID DO DÚPLEX	Hela, 10 nM	Hela, 0,1 nM	Hep3b, 10 nM	Hep3b, 0,1 nM	HepG2, 10 nM	HepG2, 0,1 nM
AD-53724,1	0,18	1,11	0,20	0,98	0,36	1,05
AD-53725,1	0,47	1,00	0,63	0,95	0,60	1,04
AD-53726,1	0,19	1,01	0,42	0,96	0,41	1,21
AD-53727,1	0,55	0,82	0,77	1,08	0,68	1,35
AD-53728,1	0,44	0,92	0,65	1,11	0,68	1,44
AD-53729,1	0,11	0,92	0,25	0,94	0,11	1,01
AD-53730,1	0,31	0,91	0,51	1,05	0,59	1,34
AD-53731,1	0,26	0,63	0,42	0,95	0,44	1,07
AD-53732,1	0,17	0,87	0,29	0,99	0,36	0,98
AD-53733,1	1,06	0,72	1,21	1,14	1,07	1,28
AD-53734,1	0,79	0,92	0,93	0,98	0,90	1,33
AD-53735,1	0,54	0,87	0,83	1,12	0,66	1,24
AD-53736,1	0,40	0,69	0,76	1,09	0,76	1,11
AD-53737,1	0,29	0,82	0,41	1,04	0,39	0,96
AD-53738,1	0,19	0,70	0,24	1,09	0,28	1,10
AD-53739,1	0,91	0,94	0,72	1,07	0,78	1,09
AD-53740,1	0,17	1,06	0,42	1,07	0,32	1,05
AD-53741,1	0,17	0,91	0,32	0,99	0,41	1,05
AD-53742,1	0,55	1,07	0,69	0,97	0,72	1,08
AD-53743,1	0,71	0,99	0,75	0,76	0,58	1,08
AD-53744,1	0,13	0,86	0,50	0,69	0,36	0,87
AD-53745,1	0,46	0,91	0,78	0,72	0,87	0,94
AD-53746,1	0,13	0,82	0,23	0,50	0,28	0,90
AD-53747,1	0,29	1,08	0,54	0,77	0,50	1,07
AD-53748,1	0,04	0,22	0,12	0,21	0,20	0,32
AD-53749,1	0,56	0,76	0,48	0,81	0,53	0,85
AD-53750,1	0,61	0,75	0,69	0,81	0,81	1,07
AD-53751,1	0,25	0,69	0,37	0,72	0,26	0,77
AD-53752,1	0,11	0,43	0,13	0,40	0,16	0,61
AD-53753,1	0,70	0,76	0,75	0,92	0,63	1,09
AD-53754,1	0,06	0,31	0,10	0,34	0,12	0,40
AD-53755,1	0,46	0,91	0,66	0,84	0,56	0,79
AD-53757,1	0,61	0,90	0,50	0,89	0,44	0,91
AD-53758,1	0,11	0,31	0,11	0,29	0,11	0,60
AD-53759,1	0,61	0,87	0,57	0,84	0,56	0,98
AD-53760,1	0,05	0,36	0,14	0,42	0,12	0,53

ID DO DÚPLEX	Hela, 10 nM	Hela, 0,1 nM	Hep3b, 10 nM	Hep3b, 0,1 nM	HepG2, 10 nM	HepG2, 0,1 nM
AD-53761,1	0,95	0,99	0,76	0,72	0,55	0,61
AD-53762,1	0,58	1,18	0,74	0,88	0,69	0,88
AD-53763,1	0,16	0,86	0,19	0,64	0,21	0,75
AD-53764,1	0,70	0,91	0,54	0,85	0,59	0,94
AD-53765,1	0,16	0,63	0,38	0,64	0,30	0,87
AD-53766,1	0,09	0,72	0,16	0,67	0,18	0,63
AD-53767,1	0,30	1,14	0,69	0,83	0,71	0,83
AD-53768,1	0,50	0,98	0,75	0,98	0,52	1,06
AD-53769,1	0,36	1,07	0,26	0,62	0,39	0,83
AD-53770,1	0,27	1,08	0,45	1,00	0,44	1,25
AD-53771,1	0,18	0,62	0,19	0,44	0,21	0,65
AD-53772,1	0,12	0,75	0,30	0,66	0,18	0,85
AD-53773,1	0,39	0,98	0,60	0,84	0,19	1,00
AD-53774,1	0,07	0,54	0,25	0,40	0,20	0,71
AD-53776,1	0,33	0,97	0,45	0,94	0,34	0,95
AD-53777,1	0,06	0,39	0,18	0,30	0,11	0,41
AD-53778,1	0,09	0,72	0,24	0,69	0,23	0,78
AD-53779,1	0,47	0,66	0,68	0,67	0,57	0,81
AD-53780,1	0,29	0,93	0,61	0,71	0,42	0,92
AD-53781,1	0,41	0,99	0,38	0,87	0,28	1,09
AD-53782,1	0,56	0,47	0,56	0,89	0,41	1,16
AD-53783,1	0,16	0,68	0,32	0,46	0,34	0,61
AD-53784,1	0,15	0,71	0,27	0,72	0,25	0,80
AD-53785,1	0,17	0,90	0,57	0,71	0,29	0,64
AD-53786,1	0,11	0,78	0,28	0,48	0,24	0,74
AD-53787,1	0,34	0,72	0,56	1,04	0,46	0,81
AD-53788,1	0,36	0,83	0,46	0,95	0,32	0,65
AD-53789,1	0,09	0,43	0,18	0,42	0,12	0,47
AD-53790,1	0,10	0,74	0,30	0,65	0,31	0,81
AD-53791,1	0,07	0,51	0,20	0,30	0,16	0,58
AD-53792,1	0,05	0,40	0,11	0,30	0,17	0,64
AD-53793,1	0,23	1,19	0,42	0,84	0,45	1,12
AD-53794,1	0,43	1,15	0,65	0,67	0,42	0,95
AD-53795,1	0,08	0,37	0,15	0,34	0,12	0,48
AD-53796,1	0,07	0,33	0,19	0,49	0,15	0,58
AD-53797,1	0,10	0,43	0,16	0,39	0,20	0,62

ID DO DÚPLEX	Hela, 10 nM	Hela, 0,1 nM	Hep3b, 10 nM	Hep3b, 0,1 nM	HepG2, 10 nM	HepG2, 0,1 nM
AD-53798,1	0,04	0,31	0,09	0,29	0,16	0,60
AD-53799,1	0,22	0,71	0,30	0,85	0,27	0,85
AD-53800,1	0,09	0,34	0,16	0,35	0,14	0,51
AD-53801,1	0,09	0,28	0,25	0,55	0,20	0,54
AD-53802,1	0,10	0,31	0,20	0,40	0,15	0,72
AD-53803,1	0,07	0,27	0,08	0,21	0,14	0,29
AD-53804,1	0,18	0,57	0,29	0,47	0,27	0,79
AD-53805,1	0,69	0,85	0,68	0,85	0,48	1,01
AD-53806,1	0,07	0,38	0,18	0,43	0,13	0,50
AD-53807,1	0,29	0,61	0,26	0,71	0,28	0,68
AD-53808,1	0,15	0,68	0,26	0,50	0,28	0,72
AD-53809,1	0,04	0,23	0,17	0,22	0,12	0,31
AD-53810,1	0,31	0,88	0,30	0,55	0,36	0,85
AD-53811,1	0,28	0,77	0,33	0,57	0,39	0,87
AD-53812,1	0,12	0,69	0,16	0,62	0,22	0,79
AD-53813,1	0,11	0,33	0,18	0,26	0,17	0,40
AD-53814,1	0,12	0,59	0,57	0,60	0,29	0,57
AD-53815,1	0,03	0,27	0,11	0,18	0,18	0,33
AD-53816,1	0,16	0,89	0,24	0,62	0,32	0,75
AD-53817,1	0,26	0,98	0,44	0,69	0,44	1,18
AD-53818,1	0,12	0,71	0,21	0,55	0,21	0,70
AD-53819,1	0,09	0,52	0,12	0,45	0,12	0,46
AD-53820,1	0,20	0,96	0,27	0,67	0,34	0,74
AD-53821,1	0,04	0,29	0,10	0,23	0,13	0,29
AD-53822,1	0,54	1,05	0,60	0,91	0,48	0,96
AD-53823,1	0,21	0,76	0,41	0,59	0,33	0,85
AD-53824,1	0,16	0,78	0,40	0,51	0,36	0,70
AD-53825,1	0,05	0,40	0,12	0,31	0,24	0,73
AD-53826,1	0,04	0,34	0,10	0,21	0,20	0,34
AD-53827,1	0,40	1,11	0,40	0,84	0,31	1,15
AD-53828,1	0,17	0,51	0,23	0,55	0,17	1,14
AD-53829,1	0,06	0,71	0,21	0,58	0,24	1,21
AD-53830,1	0,07	0,27	0,06	0,30	0,15	0,43
AD-53831,1	0,09	0,56	0,21	0,39	0,16	0,95
AD-53832,1	0,08	0,52	0,26	0,31	0,11	0,76
AD-53833,1	1,04	1,05	0,74	1,24	0,60	1,58

ID DO DÚPLEX	Hela, 10 nM	Hela, 0,1 nM	Hep3b, 10 nM	Hep3b, 0,1 nM	HepG2, 10 nM	HepG2, 0,1 nM
AD-53834,1	0,70	1,14	0,71	0,85	0,38	1,47
AD-53835,1	0,11	0,43	0,33	0,35	0,09	0,53
PBS	0,67	1,13	0,90	0,90	0,99	0,99

Tabela 5. Valores de IC₅₀ de PCSK9 para dúplexes selecionados por captação livre em células de macaco *Cynomologous* e por transfecção na linhagem celular humana Hep3B.

	Transfecção	Captação livre
Dúplex	IC ₅₀ , nM	IC ₅₀ , nM
AD-53806.1	0,07	18,00
AD-53748.1	0,06	16,88
AD-53815.1	0,05	39,21
AD-53809.1	0,05	571,00
AD-53821.1	0,05	55,41
AD-53830.1	0,08	ND
AD-53754.1	0,25	67,42
AD-53800.1	0,30	ND
AD-53798.1	0,04	ND
AD-53789.1	0,37	ND
AD-48400.4	0,23	ND

[00571] AD-48400 foi também avaliado quanto à eficácia *in vivo* em camundongos fêmeas transportando um transgene de PCSK9 de humano aleatoriamente inserido no genoma sem ruptura do gene de PCSK9 endógeno. Brevemente, os camundongos foram injetados subcutaneamente com uma única dose de 20 mg/kg ao Dia 0, uma única dose de 100 mg/kg ao Dia 0, e cinco doses de 20 mg/kg aos Dias 0, 1, 2, 3, 4, e 5. Foi coletado soro aos Dias -6, -3, 0, 1, 2, 3, 4, e 7 e a quantidade de proteína PCSK9 foi determinada por ensaio ELISA. Os resultados destas análises são ilustrados na Figura 2, e mostram que existe um efeito de resposta à dose com AD-48400 conjugado com GalNAc a todas as três dosagens testadas.

[00572] Os seis dúplexes mais eficazes identificados pelos rastreios *in vitro* descritos acima foram avaliados quanto à eficácia *in vivo* e duração da resposta. Camundongos com PCSK9 transgênica foram injetados aos Dias 0, 1, 2, 3, e 4 com 5 mg/kg ou 25 mg/kg de AD-48400, AD-53830, AD-53806, AD-53815, AD-53748, ou AD-53798. Os níveis de proteína PCSK9 no soro foram determinados por ELISA aos Dias -3, 0, 1, 2, 3, 4, 8, 11, 15, 18, 22, 26, 31, e 36. Os resultados são ilustrados nas Figuras 3A e 3B.

Exemplo 3. Otimização do Composto-Protótipo.

[00573] Com base nos ensaios de eficácia descritos no Exemplo 2 acima, siRNAs de PCSK9 siRNAs baseados nas sequências genitoras de AD-53815 e AD-53806 com uma variedade de modificações químicas foram avaliados quanto à eficácia em ensaios de captação livre em hepatócitos primários de macaco *Cynomolgous* (PCH) a 200 nM, 20 nM, 2 nM, e 0,2 nM. Para todas as doses sem ser dose de 0,2 nM, os ensaios foram realizados duas vezes e os dados são expressos como a mensagem fracional média restante em relação ao controle. A dose de 0,2 nM foi avaliada uma única vez. Os resultados destes ensaios são mostrados na Tabela 6.

Tabela 6. Rastreios de eficácia para otimização do composto-protótipo de AD-53815 e AD-53806 por captação livre em hepatócitos de macaco *Cynomolgous*.

Dúplex genitor	ID do Dúplex	Média de 200 nM	Média de 20 nM	Média de 2 nM	0,2 nM - 384	SD de 200 nM	SD de 20 nM	SD de 2 nM
AD-53815	AD-53815,5	0,45	0,48	0,74	0,95	0,05	0,00	0,05
AD-53815	AD-53815,4	0,43	0,54	0,84	0,83	0,00	0,04	0,10
AD-53815	AD-56633,1	0,33	0,52	0,82	0,88	0,04	0,01	0,10
AD-53815	AD-56617,1	0,40	0,65	0,91	1,06	0,03	0,02	0,03
AD-53815	AD-56623,1	0,52	0,61	0,87	1,05	0,03	0,04	0,21
AD-53815	AD-56629,1	0,50	0,62	0,87	1,05	0,04	0,13	0,17
AD-53815	AD-56635,1	0,45	0,71	0,92	1,03	0,03	0,02	0,03
AD-53815	AD-56641,1	0,47	0,73	0,84	1,04	0,04	0,00	0,17

Dúplex genitor	ID do Dúplex	Média de 200 nM	Média de 20 nM	Média de 2 nM	0,2 nM - 384	SD de 200 nM	SD de 20 nM	SD de 2 nM
AD-53815	AD-56625,1	0,49	0,55	0,82	1,12	0,01	0,16	0,16
AD-53815	AD-56631,1	0,48	0,57	0,82	1,05	0,04	0,11	0,06
AD-53815	AD-56637,1	0,48	0,58	0,76	1,01	0,01	0,14	0,13
AD-53815	AD-56643,1	0,59	0,77	0,93	1,04	0,05	0,01	0,04
AD-53815	AD-56649,1	0,76	0,87	0,95	1,06	0,02	0,07	0,14
AD-53815	AD-56655,1	0,73	0,86	0,85	0,96	0,01	0,04	0,11
AD-53815	AD-56615,1	0,58	0,70	0,92	0,98	0,00	0,02	0,03
AD-53815	AD-56621,1	0,71	0,76	0,93	0,95	0,18	0,07	0,07
AD-53815	AD-56627,1	0,58	0,72	0,93	0,94	0,01	0,08	0,02
AD-53815	AD-56639,1	0,52	0,57	0,72	0,94	0,16	0,00	0,04
AD-53815	AD-56645,1	0,32	0,49	0,74	0,88	0,03	0,03	0,14
AD-53815	AD-56651,1	0,71	0,94	0,88	0,88	0,08	0,29	0,12
AD-53815	AD-56610,1	0,31	0,57	0,82	0,93	0,02	0,01	0,04
AD-53815	AD-56616,1	0,47	0,68	0,70	1,01	0,06	0,08	0,34
AD-53815	AD-56622,1	0,47	0,66	0,88	0,95	0,06	0,10	0,10
AD-53815	AD-56628,1	1,02	1,15	1,04	0,99	0,00	0,12	0,02
AD-53815	AD-56634,1	0,75	0,90	0,97	1,03	0,11	0,04	0,07
AD-53815	AD-56640,1	0,58	0,76	0,81	1,01	0,10	0,05	0,12
AD-53815	AD-56646,1	0,77	0,94	0,82	0,99	0,09	0,12	0,14
AD-53815	AD-56652,1	0,61	0,74	0,78	0,89	0,00	0,00	0,03
AD-53815	AD-56611,1	0,93	1,02	1,16	0,89	0,05	0,15	0,05
AD-53815	AD-56647,1	0,38	0,58	0,79	0,94	0,05	0,08	0,00
AD-53815	AD-56653,1	0,47	0,46	0,63	0,84	0,12	0,04	0,04
AD-53815	AD-56612,1	0,41	0,61	0,88	0,85	0,03	0,09	0,09
AD-53815	AD-56618,1	0,64	0,60	1,03	1,08	0,21	0,09	0,01
AD-53815	AD-56624,1	0,46	0,61	0,85	1,05	0,04	0,17	0,15
AD-53815	AD-56630,1	0,49	0,69	0,87	1,01	0,01	0,00	0,15
AD-53815	AD-56636,1	0,49	0,57	0,82	1,13	0,01	0,05	0,03
AD-53815	AD-56642,1	0,43	0,55	0,82	1,09	0,00	0,08	0,03
AD-53815	AD-56648,1	0,48	0,66	0,80	0,96	0,00	0,04	0,08
AD-53815	AD-56654,1	0,43	0,53	0,72	0,84	0,01	0,00	0,07
AD-53815	AD-56613,1	0,54	0,61	0,81	0,91	0,16	0,08	0,19
AD-53815	AD-56619,1	0,55	0,67	1,02	1,06	0,04	0,07	0,07
AD-53815	AD-56614,1	0,42	0,56	0,86	0,90	0,05	0,04	0,10
AD-53815	AD-56620,1	0,41	0,52	0,85	0,84	0,01	0,12	0,08
AD-53815	AD-56626,1	0,59	0,68	0,90	1,12	0,01	0,03	0,10
AD-53815	AD-56632,1	0,60	0,73	0,91	1,05	0,04	0,09	0,10
AD-53815	AD-56638,1	0,68	0,89	0,94	1,19	0,03	0,03	0,18

Dúplex genitor	ID do Dúplex	Média de 200 nM	Média de 20 nM	Média de 2 nM	0,2 nM - 384	SD de 200 nM	SD de 20 nM	SD de 2 nM
AD-53815	AD-56644,1	0,84	0,89	1,09	1,09	0,08	0,08	0,06
AD-53815	AD-56650,1	0,86	0,95	1,05	1,05	0,10	0,01	0,10
AD-53815	AD-56656,1	0,53	0,64	0,92	0,88	0,09	0,04	0,14
AD-53815	AD-56662,1	0,55	0,61	0,96	1,03	0,02	0,09	0,01
AD-53815	AD-56668,1	0,76	0,79	0,99	1,10	0,07	0,11	0,06
AD-53815	AD-56673,1	0,81	0,87	1,12	1,09	0,01	0,15	0,13
AD-53815	AD-56678,1	0,84	0,76	1,12	1,05	0,04	0,24	0,05
AD-53815	AD-56683,1	0,88	0,93	1,08	1,06	0,05	0,10	0,06
AD-53815	AD-56688,1	0,80	0,86	0,93	0,99	0,10	0,11	0,19
AD-53815	AD-56657,1	0,45	0,63	0,84	0,88	0,20	0,04	0,09
AD-53815	AD-56663,1	0,35	0,49	0,77	1,03	0,00	0,07	0,04
AD-53815	AD-56669,1	0,53	0,68	0,99	1,11	0,00	0,18	0,03
AD-53815	AD-56674,1	0,44	0,64	0,84	1,03	0,06	0,01	0,17
AD-53815	AD-56679,1	0,52	0,67	0,77	1,01	0,01	0,06	0,14
AD-53815	AD-56684,1	0,43	0,59	0,84	1,08	0,01	0,03	0,04
AD-53815	AD-56689,1	0,55	0,57	0,73	0,95	0,09	0,01	0,11
AD-53815	AD-56693,1	0,45	0,48	0,65	0,84	0,04	0,02	0,11
AD-53815	AD-56658,1	0,46	0,55	0,85	0,84	0,21	0,09	0,07
AD-53815	AD-56664,1	0,35	0,60	0,80	0,91	0,13	0,03	0,14
AD-53815	AD-56670,1	0,62	0,61	0,90	1,11	0,17	0,06	0,00
AD-53815	AD-56680,1	0,74	0,90	1,00	0,91	0,05	0,01	0,05
AD-53815	AD-56685,1	0,64	0,64	0,77	1,07	0,15	0,01	0,15
AD-53815	AD-56690,1	0,39	0,61	0,75	0,97	0,13	0,03	0,08
AD-53815	AD-56694,1	0,41	0,53	0,67	0,94	0,01	0,00	0,04
AD-53815	AD-56659,1	0,57	0,58	0,84	0,95	0,25	0,09	0,05
AD-53815	AD-56665,1	0,38	0,51	0,78	1,01	0,05	0,07	0,17
AD-53815	AD-56671,1	0,32	0,45	0,78	0,94	0,03	0,05	0,01
AD-53815	AD-56676,1	0,31	0,55	0,81	1,02	0,03	0,13	0,02
AD-53815	AD-56681,1	0,54	0,75	0,88	1,02	0,02	0,07	0,11
AD-53815	AD-56686,1	0,50	0,74	0,86	1,03	0,01	0,10	0,10
AD-53815	AD-56691,1	0,44	0,56	0,79	1,03	0,01	0,00	0,05
AD-53815	AD-56695,1	0,37	0,70	0,67	0,89	0,01	0,29	0,11
AD-53815	AD-56660,1	0,36	0,73	0,83	0,93	0,02	0,22	0,10
AD-53815	AD-56666,1	0,39	0,47	0,74	0,94	0,02	0,05	0,13
AD-53815	AD-56672,1	0,63	0,55	0,87	1,03	0,25	0,10	0,04
AD-53815	AD-56677,1	0,54	0,70	0,85	0,99	0,24	0,11	0,00
AD-53815	AD-56682,1	0,48	0,57	0,90	0,96	0,11	0,09	0,05
AD-53815	AD-56687,1	0,81	0,94	1,06	1,08	0,07	0,02	0,05

Dúplex genitor	ID do Dúplex	Média de 200 nM	Média de 20 nM	Média de 2 nM	0,2 nM - 384	SD de 200 nM	SD de 20 nM	SD de 2 nM
AD-53815	AD-56692,1	0,45	0,64	0,73	0,95	0,03	0,13	0,05
AD-53815	AD-56696,1	0,40	0,48	0,66	0,95	0,01	0,04	0,06
AD-53815	AD-56661,1	0,52	0,54	0,75	0,98	0,22	0,06	0,04
AD-53815	AD-56667,1	0,40	0,68	0,87	1,03	0,03	0,03	0,11
AD-53806	AD-53806,11	0,28	0,44	0,74	0,98	0,05	0,01	0,13
AD-53806	AD-53806,13	0,31	0,36	0,65	0,92	0,01	0,08	0,06
AD-53806	AD-53806,12	0,53	0,56	0,70	1,04	0,00	0,01	0,15
AD-53806	AD-53806,5	0,34	0,54	0,85	0,87	0,01	0,00	0,10
AD-53806	AD-53806,6	0,41	0,51	0,77	0,91	0,05	0,04	0,08
AD-53806	AD-53806,7	0,39	0,58	0,75	0,97	0,02	0,16	0,14
AD-53806	AD-53806,8	0,35	0,49	0,69	0,91	0,06	0,03	0,09
AD-53806	AD-53806,9	0,36	0,55	0,77	1,01	0,04	0,07	0,13
AD-53806	AD-53806,10	0,29	0,44	0,73	0,93	0,04	0,10	0,14
AD-53806	AD-56979,1	0,43	0,50	0,78	0,96	0,01	0,03	0,11
AD-53806	AD-56979,2	0,32	0,47	0,65	1,02	0,02	0,11	0,05
AD-53806	AD-56975,3	0,27	0,57	0,72	0,83	0,01	0,16	0,08
AD-53806	AD-56975,4	0,55	0,67	0,81	0,92	0,11	0,10	0,04
AD-53806	AD-56975,5	0,34	0,54	0,71	0,94	0,04	0,22	0,10
AD-53806	AD-56975,1	0,38	0,53	0,74	0,93	0,13	0,14	0,02
AD-53806	AD-56975,2	0,50	0,62	0,82	0,98	0,09	0,16	0,11
AD-53806	AD-56983,1	0,49	0,72	0,89	1,11	0,10	0,09	0,21
AD-53806	AD-56983,2	0,74	0,89	1,14	1,16	0,10	0,06	0,02
AD-53806	AD-56983,3	0,91	1,05	1,02	1,04	0,09	0,10	0,08
AD-53806	AD-56983,4	0,40	0,57	0,83	1,05	0,03	0,02	0,08
AD-53806	AD-56983,5	0,33	0,51	0,83	0,90	0,03	0,04	0,03
AD-53806	AD-56977,3	0,44	0,49	0,62	0,95	0,17	0,16	0,06
AD-53806	AD-56977,1	0,27	0,58	0,81	0,88	0,06	0,07	0,08
AD-53806	AD-56977,2	0,41	0,60	0,81	0,90	0,01	0,07	0,12
AD-53806	AD-56976,1	0,40	0,64	0,85	0,90	0,14	0,21	0,01
AD-53806	AD-56976,2	0,37	0,47	0,70	1,01	0,09	0,10	0,13
AD-53806	AD-56980,1	0,47	0,54	0,83	0,97	0,12	0,02	0,14
AD-53806	AD-56980,2	0,44	0,55	0,81	1,08	0,15	0,11	0,08
AD-53806	AD-56984,1	0,41	0,63	0,81	1,08	0,04	0,07	0,14
AD-53806	AD-56984,2	0,32	0,58	0,86	1,04	0,02	0,17	0,07
AD-53806	AD-56987,1	0,37	0,63	0,82	1,11	0,08	0,08	0,05
AD-53806	AD-56987,2	0,33	0,59	0,79	1,02	0,05	0,05	0,13
AD-53806	AD-56991,1	0,36	0,57	0,73	1,08	0,01	0,07	0,18
AD-53806	AD-56993,1	0,41	0,54	0,75	0,99	0,12	0,09	0,06

Dúplex genitor	ID do Dúplex	Média de 200 nM	Média de 20 nM	Média de 2 nM	0,2 nM - 384	SD de 200 nM	SD de 20 nM	SD de 2 nM
AD-53806	AD-56995,1	0,35	0,45	0,67	1,00	0,07	0,02	0,12
AD-53806	AD-56978,1	0,35	0,67	0,88	0,91	0,04	0,22	0,05
AD-53806	AD-56978,2	0,47	0,55	0,78	1,12	0,03	0,01	0,07
AD-53806	AD-56981,1	0,45	0,65	0,86	1,08	0,01	0,16	0,15
AD-53806	AD-56985,1	0,53	0,61	1,08	1,14	0,02	0,09	0,07
AD-53806	AD-56988,1	0,62	0,81	0,91	1,13	0,01	0,05	0,20
AD-53806	AD-56988,2	0,76	0,94	0,85	1,14	0,17	0,10	0,11
AD-53806	AD-56988,3	0,55	0,79	0,86	1,19	0,04	0,05	0,16
AD-53806	AD-56982,1	0,40	0,65	0,84	1,07	0,04	0,10	0,09
AD-53806	AD-56982,2	0,38	0,50	0,70	1,01	0,03	0,03	0,08
AD-53806	AD-56986,1	0,45	0,57	0,80	1,12	0,02	0,11	0,15
AD-53806	AD-56986,2	0,49	0,59	0,79	1,04	0,01	0,05	0,17
AD-53806	AD-56989,1	0,69	0,84	0,95	1,12	0,08	0,06	0,12
AD-53806	AD-56990,1	0,49	0,56	0,79	1,08	0,03	0,02	0,13
AD-53806	AD-56992,1	0,61	0,70	0,90	1,14	0,01	0,04	0,14
AD-53806	AD-56992,2	0,48	0,63	0,87	0,99	0,05	0,10	0,07
AD-53806	AD-56994,1	0,88	0,89	0,97	1,11	0,02	0,06	0,13
AD-53806	AD-56994,2	0,34	0,42	0,73	0,98	0,01	0,05	0,05
AD-53806	AD-56996,1	0,50	0,59	0,77	0,95	0,07	0,12	0,10
AD-53806	AD-57001,1	0,44	0,54	0,77	1,08	0,01	0,05	0,12
AD-53806	AD-57007,1	0,62	0,68	0,91	1,11	0,04	0,02	0,19
AD-53806	AD-57013,1	0,65	0,78	0,94	1,17	0,05	0,04	0,22
AD-53806	AD-57019,1	0,57	0,74	0,87	1,14	0,01	0,09	0,13
AD-53806	AD-57022,1	0,46	0,48	0,72	0,98	0,14	0,01	0,17
AD-53806	AD-57025,1	0,37	0,47	0,68	0,92	0,04	0,11	0,06
AD-53806	AD-56997,1	0,41	0,56	0,77	0,88	0,00	0,10	0,09
AD-53806	AD-57002,1	0,46	0,58	0,81	1,04	0,03	0,03	0,08
AD-53806	AD-57008,1	0,68	0,75	0,91	1,13	0,02	0,03	0,15
AD-53806	AD-57014,1	0,80	0,82	0,99	1,17	0,02	0,01	0,12
AD-53806	AD-57020,1	0,51	0,53	0,81	1,07	0,17	0,03	0,07
AD-53806	AD-57020,2	0,37	0,46	0,68	1,02	0,04	0,07	0,13
AD-53806	AD-57026,1	0,34	0,51	0,68	0,97	0,01	0,08	0,06
AD-53806	AD-57003,1	0,76	0,90	0,94	1,11	0,02	0,16	0,11
AD-53806	AD-57009,1	0,81	0,88	0,93	0,98	0,01	0,03	0,10
AD-53806	AD-57015,1	0,72	0,92	0,90	1,04	0,01	0,05	0,15
AD-53806	AD-57023,1	0,41	0,50	0,75	1,00	0,08	0,07	0,06
AD-53806	AD-57027,1	0,38	0,46	0,68	0,93	0,11	0,00	0,07
AD-53806	AD-56998,1	0,45	0,57	0,94	0,98	0,01	0,06	0,11

Dúplex genitor	ID do Dúplex	Média de 200 nM	Média de 20 nM	Média de 2 nM	0,2 nM - 384	SD de 200 nM	SD de 20 nM	SD de 2 nM
AD-53806	AD-57004,1	0,39	0,61	0,80	1,13	0,03	0,04	0,13
AD-53806	AD-57010,1	0,43	0,64	0,81	1,00	0,01	0,07	0,15
AD-53806	AD-57016,1	0,44	0,71	0,80	0,97	0,01	0,25	0,05
AD-53806	AD-56999,2	0,49	0,60	0,69	1,04	0,04	0,02	0,16
AD-53806	AD-56999,1	0,39	0,55	0,68	0,96	0,01	0,09	0,10
AD-53806	AD-57021,1	0,40	0,58	0,71	1,02	0,03	0,03	0,11
AD-53806	AD-57024,1	0,41	0,49	0,68	1,02	0,14	0,00	0,10
AD-53806	AD-57005,1	0,45	0,56	0,87	1,06	0,03	0,03	0,20
AD-53806	AD-57011,1	0,53	0,63	0,92	1,02	0,02	0,07	0,10
AD-53806	AD-57017,1	0,48	0,60	0,81	1,07	0,00	0,01	0,12
AD-53806	AD-57000,2	0,50	0,60	0,74	0,93	0,04	0,01	0,02
AD-53806	AD-57000,3	0,54	0,49	0,72	0,97	0,22	0,08	0,00
AD-53806	AD-57000,1	0,70	0,76	0,80	0,95	0,02	0,05	0,04
AD-53806	AD-57006,2	0,48	0,75	0,76	0,94	0,00	0,31	0,12
AD-53806	AD-57006,3	0,45	0,57	0,71	0,98	0,08	0,09	0,12
AD-53806	AD-57006,1	0,64	0,76	0,84	0,97	0,00	0,11	0,10
AD-53806	AD-57012,1	0,53	0,83	0,79	0,93	0,04	0,42	0,02
AD-53806	AD-57018,1	0,67	0,73	0,72	0,93	0,07	0,04	0,03

[00574] siRNAs com uma variedade de modificações químicas baseados nas sequências genitoras de AD-53815 e AD-53806 foram também avaliados quanto à eficácia *in vitro* por transfecção em células Hep3B a 10 nM e 0,1 nM. Os resultados deste rastreio da relação estrutura-atividade são mostrados na Tabela 7, e são expressos como a mensagem fracional média restante em relação ao controle +/- SD.

Tabela 7. Rastreios de eficácia para otimização do composto-protótipo de AD-53815 e AD-53806 por transfecção em uma célula humana.

Dúplex genitor	ID do Dúplex	Média de 10 nM com Trans	SD de 10 nM com Trans	Média de 0,1 nM com Trans	SD de 0,1 nM com Trans
AD-53815	AD-53815,5	0,14	0,05	0,24	ND
AD-53815	AD-53815,4	0,18	0,07	0,38	ND
AD-53815	AD-56633,1	0,18	0,10	0,24	ND
AD-53815	AD-56617,1	0,13	0,06	0,25	ND
AD-53815	AD-56623,1	0,14	0,05	0,24	ND
AD-53815	AD-56629,1	0,14	0,02	0,17	ND

Dúplex genitor	ID do Dúplex	Média de 10 nM com Trans	SD de 10 nM com Trans	Média de 0,1 nM com Trans	SD de 0,1 nM com Trans
AD-53815	AD-56635,1	0,12	0,02	0,22	ND
AD-53815	AD-56641,1	0,15	0,01	0,16	ND
AD-53815	AD-56625,1	0,12	0,03	0,29	ND
AD-53815	AD-56631,1	0,13	0,01	0,20	ND
AD-53815	AD-56637,1	0,22	0,14	0,16	ND
AD-53815	AD-56643,1	0,18	0,08	0,16	ND
AD-53815	AD-56649,1	0,16	0,00	0,19	ND
AD-53815	AD-56655,1	0,24	0,11	0,24	ND
AD-53815	AD-56615,1	0,15	0,00	0,32	ND
AD-53815	AD-56621,1	0,20	0,07	0,41	ND
AD-53815	AD-56627,1	0,17	0,04	0,31	ND
AD-53815	AD-56639,1	0,19	0,08	0,24	ND
AD-53815	AD-56645,1	0,19	0,09	0,27	ND
AD-53815	AD-56651,1	0,29	0,09	0,68	ND
AD-53815	AD-56610,1	0,21	0,11	0,23	ND
AD-53815	AD-56616,1	0,16	0,04	0,29	ND
AD-53815	AD-56622,1	0,18	0,07	0,36	ND
AD-53815	AD-56628,1	0,28	0,07	0,60	ND
AD-53815	AD-56634,1	0,16	0,04	0,29	ND
AD-53815	AD-56640,1	0,21	0,09	0,26	ND
AD-53815	AD-56646,1	0,27	0,21	0,37	ND
AD-53815	AD-56652,1	0,26	0,08	0,29	ND
AD-53815	AD-56611,1	0,35	0,11	0,96	ND
AD-53815	AD-56647,1	0,17	0,09	0,13	ND
AD-53815	AD-56653,1	0,17	0,09	0,28	ND
AD-53815	AD-56612,1	0,17	0,07	0,24	ND
AD-53815	AD-56618,1	0,14	0,00	0,26	ND
AD-53815	AD-56624,1	0,15	0,02	0,27	ND
AD-53815	AD-56630,1	0,13	0,01	0,24	ND
AD-53815	AD-56636,1	0,17	0,08	0,22	ND
AD-53815	AD-56642,1	0,12	0,03	0,13	ND
AD-53815	AD-56648,1	0,15	0,05	0,21	ND
AD-53815	AD-56654,1	0,22	0,10	0,24	ND
AD-53815	AD-56613,1	0,17	0,07	0,40	ND
AD-53815	AD-56619,1	0,21	0,12	0,30	ND
AD-53815	AD-56614,1	0,12	0,01	0,23	ND
AD-53815	AD-56620,1	0,12	0,02	0,15	ND
AD-53815	AD-56626,1	0,14	0,03	0,20	ND
AD-53815	AD-56632,1	0,12	0,02	0,21	ND
AD-53815	AD-56638,1	0,15	0,10	0,23	ND

Dúplex genitor	ID do Dúplex	Média de 10 nM com Trans	SD de 10 nM com Trans	Média de 0,1 nM com Trans	SD de 0,1 nM com Trans
AD-53815	AD-56644,1	0,23	0,11	0,17	ND
AD-53815	AD-56650,1	0,13	0,03	0,20	ND
AD-53815	AD-56656,1	0,26	0,03	0,27	ND
AD-53815	AD-56662,1	0,13	0,06	0,18	ND
AD-53815	AD-56668,1	0,19	0,05	0,20	ND
AD-53815	AD-56673,1	0,18	0,05	0,21	ND
AD-53815	AD-56678,1	0,17	0,00	0,20	ND
AD-53815	AD-56683,1	0,29	0,22	0,27	ND
AD-53815	AD-56688,1	0,19	0,02	0,18	ND
AD-53815	AD-56657,1	0,18	0,14	0,34	ND
AD-53815	AD-56663,1	0,11	0,04	0,18	ND
AD-53815	AD-56669,1	0,11	0,02	0,31	ND
AD-53815	AD-56674,1	0,14	0,00	0,21	ND
AD-53815	AD-56679,1	0,14	0,05	0,19	ND
AD-53815	AD-56684,1	0,14	0,03	0,19	ND
AD-53815	AD-56689,1	0,18	0,09	0,18	ND
AD-53815	AD-56693,1	0,19	0,11	0,21	ND
AD-53815	AD-56658,1	0,19	0,13	0,30	ND
AD-53815	AD-56664,1	0,15	0,07	0,20	ND
AD-53815	AD-56670,1	0,18	0,10	0,26	ND
AD-53815	AD-56680,1	0,27	0,05	0,31	ND
AD-53815	AD-56685,1	0,14	0,02	0,28	ND
AD-53815	AD-56690,1	0,10	0,03	0,18	ND
AD-53815	AD-56694,1	0,15	0,06	0,17	ND
AD-53815	AD-56659,1	0,16	0,04	0,27	ND
AD-53815	AD-56665,1	0,14	0,06	0,26	ND
AD-53815	AD-56671,1	0,11	0,01	0,29	ND
AD-53815	AD-56676,1	0,14	0,06	0,20	ND
AD-53815	AD-56681,1	0,15	0,03	0,30	ND
AD-53815	AD-56686,1	0,15	0,03	0,26	ND
AD-53815	AD-56691,1	0,11	0,02	0,16	ND
AD-53815	AD-56695,1	0,14	0,06	0,24	ND
AD-53815	AD-56660,1	0,10	0,03	0,37	ND
AD-53815	AD-56666,1	0,18	0,13	0,22	ND
AD-53815	AD-56672,1	0,14	0,02	0,35	ND
AD-53815	AD-56677,1	0,15	0,04	0,23	ND
AD-53815	AD-56682,1	0,14	0,06	0,28	ND
AD-53815	AD-56687,1	0,24	0,01	0,53	ND
AD-53815	AD-56692,1	0,09	0,01	0,36	ND
AD-53815	AD-56696,1	0,16	0,09	0,26	ND

Dúplex genitor	ID do Dúplex	Média de 10 nM com Trans	SD de 10 nM com Trans	Média de 0,1 nM com Trans	SD de 0,1 nM com Trans
AD-53815	AD-56661,1	0,21	0,15	0,48	ND
AD-53815	AD-56667,1	0,22	0,16	0,26	ND
AD-53806	AD-53806,11	0,19	0,05	0,25	0,06
AD-53806	AD-53806,13	0,21	0,07	0,21	0,16
AD-53806	AD-53806,12	0,21	0,08	0,21	0,02
AD-53806	AD-53806,5	0,22	0,01	0,29	0,06
AD-53806	AD-53806,6	0,24	0,07	0,33	0,12
AD-53806	AD-53806,7	0,19	0,02	0,24	0,11
AD-53806	AD-53806,8	0,20	0,01	0,23	0,05
AD-53806	AD-53806,9	0,22	0,01	0,19	0,06
AD-53806	AD-53806,10	0,17	0,01	0,21	0,07
AD-53806	AD-56979,1	0,18	0,00	0,29	0,14
AD-53806	AD-56979,2	0,24	0,11	0,24	0,12
AD-53806	AD-56975,3	0,26	0,09	0,28	0,18
AD-53806	AD-56975,4	0,35	0,02	0,50	0,23
AD-53806	AD-56975,5	0,17	0,01	0,21	0,18
AD-53806	AD-56975,1	0,24	0,09	0,32	0,12
AD-53806	AD-56975,2	0,19	0,04	0,16	0,02
AD-53806	AD-56983,1	0,17	0,01	0,32	0,18
AD-53806	AD-56983,2	0,28	0,07	0,63	0,15
AD-53806	AD-56983,3	1,22	0,61	0,83	0,02
AD-53806	AD-56983,4	0,25	0,10	0,24	0,10
AD-53806	AD-56983,5	0,17	0,01	0,26	0,15
AD-53806	AD-56977,3	0,31	0,11	0,28	0,23
AD-53806	AD-56977,1	0,22	0,04	0,34	0,12
AD-53806	AD-56977,2	0,22	0,05	0,29	0,16
AD-53806	AD-56976,1	0,21	0,09	0,34	0,20
AD-53806	AD-56976,2	0,17	0,03	0,25	0,04
AD-53806	AD-56980,1	0,22	0,04	0,20	0,02
AD-53806	AD-56980,2	0,19	0,01	0,20	0,06
AD-53806	AD-56984,1	0,24	0,11	0,22	0,10
AD-53806	AD-56984,2	0,19	0,01	0,21	0,10
AD-53806	AD-56987,1	0,19	0,05	0,29	0,19
AD-53806	AD-56987,2	0,24	0,03	0,24	0,09
AD-53806	AD-56991,1	0,17	0,01	0,17	0,08
AD-53806	AD-56993,1	0,14	0,09	0,22	0,06
AD-53806	AD-56995,1	0,19	0,07	0,27	0,13
AD-53806	AD-56978,1	0,27	0,12	0,36	0,12
AD-53806	AD-56978,2	0,24	0,03	0,20	0,01
AD-53806	AD-56981,1	0,22	0,03	0,28	0,17

Dúplex genitor	ID do Dúplex	Média de 10 nM com Trans	SD de 10 nM com Trans	Média de 0,1 nM com Trans	SD de 0,1 nM com Trans
AD-53806	AD-56985,1	0,21	0,00	0,28	0,04
AD-53806	AD-56988,1	0,20	0,02	0,24	0,02
AD-53806	AD-56988,2	0,20	0,03	0,27	0,13
AD-53806	AD-56988,3	0,23	0,03	0,27	0,01
AD-53806	AD-56982,1	0,23	0,06	0,24	0,00
AD-53806	AD-56982,2	0,21	0,06	0,18	0,07
AD-53806	AD-56986,1	0,23	0,05	0,20	0,06
AD-53806	AD-56986,2	0,24	0,04	0,25	0,13
AD-53806	AD-56989,1	0,31	0,02	0,43	0,00
AD-53806	AD-56990,1	0,27	0,00	0,28	0,10
AD-53806	AD-56992,1	0,27	0,06	0,31	0,01
AD-53806	AD-56992,2	0,22	0,10	0,30	0,14
AD-53806	AD-56994,1	0,97	0,05	0,85	0,09
AD-53806	AD-56994,2	0,22	0,09	0,26	0,01
AD-53806	AD-56996,1	0,18	0,04	0,31	0,08
AD-53806	AD-57001,1	0,24	0,09	0,23	0,08
AD-53806	AD-57007,1	0,25	0,01	0,27	0,03
AD-53806	AD-57013,1	0,30	0,08	0,33	0,02
AD-53806	AD-57019,1	0,29	0,03	0,28	0,02
AD-53806	AD-57022,1	0,20	0,06	0,21	0,05
AD-53806	AD-57025,1	0,23	0,12	0,25	0,15
AD-53806	AD-56997,1	0,20	0,05	0,25	0,11
AD-53806	AD-57002,1	0,21	0,07	0,28	0,01
AD-53806	AD-57008,1	0,26	0,01	0,31	0,01
AD-53806	AD-57014,1	0,32	0,03	0,43	0,05
AD-53806	AD-57020,1	0,19	0,00	0,23	0,01
AD-53806	AD-57020,2	0,20	0,08	0,28	0,22
AD-53806	AD-57026,1	0,34	0,24	0,37	0,24
AD-53806	AD-57003,1	0,34	0,04	0,45	0,15
AD-53806	AD-57009,1	0,30	0,07	0,40	0,02
AD-53806	AD-57015,1	0,32	0,01	0,47	0,04
AD-53806	AD-57023,1	0,17	0,06	0,27	0,13
AD-53806	AD-57027,1	0,20	0,03	0,19	0,11
AD-53806	AD-56998,1	0,23	0,09	0,29	0,24
AD-53806	AD-57004,1	0,24	0,13	0,30	0,12
AD-53806	AD-57010,1	0,23	0,09	0,23	0,11
AD-53806	AD-57016,1	0,21	0,03	0,23	0,06
AD-53806	AD-56999,2	0,25	0,10	0,35	0,05
AD-53806	AD-56999,1	0,24	0,08	0,28	0,21
AD-53806	AD-57021,1	0,18	0,04	0,29	0,17

Dúplex genitor	ID do Dúplex	Média de 10 nM com Trans	SD de 10 nM com Trans	Média de 0,1 nM com Trans	SD de 0,1 nM com Trans
AD-53806	AD-57024,1	0,20	0,09	0,28	0,11
AD-53806	AD-57005,1	0,18	0,10	0,29	0,17
AD-53806	AD-57011,1	0,21	0,07	0,26	0,12
AD-53806	AD-57017,1	0,20	0,07	0,29	0,21
AD-53806	AD-57000,2	0,20	0,04	0,29	0,21
AD-53806	AD-57000,3	0,22	0,11	0,30	0,16
AD-53806	AD-57000,1	0,25	0,14	0,38	0,33
AD-53806	AD-57006,2	0,22	0,14	0,31	0,18
AD-53806	AD-57006,3	0,19	0,09	0,31	0,25
AD-53806	AD-57006,1	0,20	0,12	0,41	0,29
AD-53806	AD-57012,1	0,16	0,05	0,36	0,17
AD-53806	AD-57018,1	0,20	0,37	0,10	0,14

[00575] Para se determinar se qualquer um dos siRNAs do rastreio SAR *in vitro* é mais eficaz no silenciamento de PCSK9 do que o siRNA genitor (AD-53815), a camundongos com PCSK9 transgênica foi administrada uma dose única de 3 mg/kg dos siRNAs mostrados na Figura 4, e, 72 horas pós-dosagem, os níveis de proteína PCSK9 foram determinados por ensaio ELISA. Os resultados, mostrados na Figura 5, demonstram que AD-57928 é surpreendentemente eficaz no silenciamento de PCSK9. A Figura 6 mostra que não só uma dose única de AD-57928 silencia eficazmente a proteína PCSK9, mas existe também uma resposta à dose usando AD-57928.

Exemplo 4. Estudo de Divisão de Dosagem Usando AD-57928

[00576] A capacidade de AD-57928 de suprimir a expressão da proteína PCSK9 foi avaliada por medição dos níveis da proteína PCSK9 de humano (hPCSK9) no soro de camundongos com hPCSK9 transgênica após administração de AD-57928. AD-57928 foi administrado subcutaneamente usando seis diferentes programas de dosagem que incluíram uma "fase de carga" durante a primeira semana (uma dose de 0,5 mg/kg, 1 mg/kg ou 2 mg/kg diariamente durante 5 dias consecutivos), seguida por uma "fase de manutenção" (dosagem uma vez ou duas vezes semanalmente de 0,5 mg/kg, 1 mg/kg ou 2 mg/kg

durante 5 semanas), como é descrito na Tabela 8 em baixo. A última dose foi administrada ao dia 38. Cada programa de dosagem foi testada usando um grupo de 3 camundongos que inclui dois machos e uma fêmea. Um grupo de controle recebeu injeções com PBS.

Tabela 8. Esquemas de Dosagem para administração de AD-57928

Artigo de Teste	Semana 1		Semanas 2-6	
	Dose de Carga (mg/kg)	Dose Total (mg/kg)	Dose de manutenção (mg/kg)	Dose Semanal Total (mg/kg)
PBS	5x	0	2x	0
AD-57928	5x2	10	2x2	4
AD-57928	5x2	10	1x2	2
AD-57928	5x1	5	2x1	2
AD-57928	5x1	5	1x1	1
AD-57928	5x0,5	2,5	2x0,5	1
AD-57928	5x0,5	2,5	1x0,5	0,5

[00577] Foi coletado soro 3 dias antes da administração da primeira dose e aos dias 1, 4, 7, 10, 14, 17, 21, 24, 28, 31, 35, 38, 42, 45, 52, 59 e 65 após a primeira dose. Os níveis da proteína PCSK9 no soro foram avaliados por ensaio ELISA. Os resultados são mostrados nas Figuras 6, 7 e 8.

[00578] Níveis da proteína hPCSK9 no soro de reduzidos foram observados 72 horas após a primeira dose, e foram sustentados até ao dia 38. A administração de AD-57928 às cargas de dose de 5x2 mg/kg, 5x1 mg/kg e 5x0,5 mg/kg resultou em redução de ~90 %, ~70 % e ~60 % dos níveis da proteína hPCSK9 no soro, respectivamente (ver Figuras 6-8). No grupo doseado usando o programa de dosagem de manutenção 2x, os níveis reduzidos de hPCSK9 foram sustentados

durante 1 semana mais do que no grupo doseado usando o programa de dosagem de manutenção 1x, e regressaram à linha de base 4 semanas após a última dose (ver Figuras 6-8).

Exemplo 5. Titulação de Fosforotioato

[00579] De modo a se determinar o efeito do número e posição de modificações de fosforotioato na capacidade de dsRNA de inibir a expressão de PCSK9, um número de siRNAs baseados nas sequências genitoras de AD-57928, AD-53806 e AD-53830 como mostrado na Tabela 9 foi preparado e testado. Para se determinar se qualquer um dos siRNAs é mais eficaz no silenciamento de PCSK9 do que AD-57928, a camundongos com PCSK9 transgênica foi administrada uma dose única de 0,3 mg/kg do siRNA na Tabela 9, e, 72 horas pós-dosagem, os níveis de proteína PCSK9 foram determinados por ensaio ELISA. Os resultados, mostrados na Figura 9, demonstram que AD-57928 é surpreendentemente eficaz no silenciamento de PCSK9. AD-58893, AD-58894, AD-58896, AD-58897, AD-58898 e AD-58899 foram também capazes de silenciar PCSK9 em comparação com o controle.

Tabela 9. siRNAs usados na experiência de titulação de fosforiotioato

ID do Dúplex	Sequência Senso	SEQ ID NO:	Sequência Antissenso	SEQ ID NO:	Química
AD-57928	CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	1557	asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1567	TOFFEE com 6 PS, e 3OMe na extremidade 3' de AS
AD-58893	CfsuAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	1558	asCfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgasa	1568	TOFFEE com 3 PS exteriores
AD-58894	CfusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	1559	aCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsaa	1569	TOFFEE com 3 PS interiores
AD-58895	CfuAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	1560	asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1570	TOFFEE com apenas 4 PS antissenso
AD-	CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCf	1561	aCfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCf	1571	TOFFEE

ID do Dúplex	Sequência Senso	SEQ ID NO:	Sequência Antissenso	SEQ ID NO:	Química
58896	uUfuUfgUfL96		uAfgaa		com apenas 2 PS senso
AD-58897	CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	1562	asCfsasAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfggsasa	1572	TOFFEE com 9 PS
AD-58898	CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	1563	asCfsaAfaAfgCfsaAfaacAfgGfuCfuAfggsasa	1573	TOFFEE com 10 PS
AD-58899	CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	1564	asCfsaAfaAfgCfsaAfaacAfgGfuCfuAfggsasa	1574	TOFFEE com 11 PS
AD-58900	CfsasAfgCfaGfaCfAfUfuUfaUfcUfuUfuUfL96	1565	asAfsaAfaGfaUfaAfaugUfcUfgCfuUfgscsu	1575	Versão 6PS de AD-53806
AD-58902	UfsusUfuCfuAfgAfcCfuGfuUfuUfgCfuUfL96	1566	asAfgCfaAfaAfcAfgguCfuAfgAfaAfgsu	1576	Versão 6PS de AD-53830

Exemplo 6. Níveis de Fármaco no Fígado de AD-57928 e AD-58895

[00580] O objetivo deste estudo foi quantificar níveis de siRNA no fígado de camundongos de tipo selvagem de modo a se definir condições apropriadas para rastreamento do nível de fármaco. Os siRNAs usados na experiência foram AD-57928 e AD-58895 (que não produziram nenhuma diminuição no nível da proteína PCSK9 no Exemplo 5). AD-58895 foi usado como um comparador para definir pontos temporais aos quais é observável uma diferença no nível de fármaco que reflete a eficácia.

[00581] Um total de 33 camundongos fêmeas C57B6 foi usado na experiência (3 camundongos por grupo). A estes camundongos foi administrada uma dose subcutânea única de AD-57928, AD-58895 ou PBS como um controle. Os fígados foram coletados às 4, 24, 48, 72, 96 e 168 horas pós-dose. Alíquotas de tecido em duplicado por amostra foram coletadas, e a concentração de siRNA no fígado foi medida usando um ensaio de pRT-PCR específico quanto a sequências antissenso recém-desenhado. A quantidade medida de AD-57928 e AD-58895 por grama de fígado ao longo do tempo é mostrada na Figura 10, e a quantidade de AD-57928 e AD-58895 expressa como uma percentagem da dose teórica total é mostrada na Figura 11. O limite de

detecção (LOD) do ensaio de qRT-PCR foi ~1 ng/ g de fígado, e o ensaio mostrou bom desempenho e reproduz precisamente a reprodutibilidade. Os resultados indicam que AD-57928 é mais estável no fígado e AD-58895 é menos estável, e ambos podem ser detetados ao longo de todos os pontos temporais. Aos 7 dias pós-dose, o nível de AD-57928 está >100 vezes acima do LOD do ensaio de qRT-PCR, e o nível de AD-58895 está >10 acima do LOD. As concentrações de AD-57928 e AD-58895 diferem em média >10 vezes de acordo com a sua estabilidade prevista e a eficácia observada. O ponto temporal entre 72 e 120 horas pós-dose pode ser apropriado para rastreios baseados em silenciamento de siRNA.

Exemplo 7. Otimização de AD-57928

[00582] De modo a se intensificar a atividade e estabilidade *in vivo* de AD-57928, agentes de RNAi adicionais baseados nas sequências genitoras de AD-57928 foram preparados e testados (Tabela 10; as sequências "Senso" na Tabela 10 são divulgadas como SEQ ID NOS: 1653-1658, respectivamente, por ordem de aparecimento, e as sequências "Antissenso" são divulgadas como SEQ ID NOS: 1659-1664, respectivamente, por ordem de aparecimento; as mesmas sequências senso e antissenso divulgadas na Tabela 10 são também divulgadas na Figura 12A).

[00583] As sequências senso e antissenso não modificadas para AD-60121 são:

Senso – 5'- CUAGACCUGUTUUGCUUUUGU – 3' (A-122088.3; SEQ ID NO:1665); e

Antissenso – 5'- ACAAAGCAAAACAGGUCUAGAA - 3'(A-120190.19; SEQ ID NO:1666).

[00584] Em geral, estes compostos continham menos modificações de 2'-fluoro e as uridinas modificadas por flúor foram removidas. A potência *in vitro* destes dúplexes foi testada por transfecção de células

HeLa e Hep3b. Como mostrado na Figura 12B, AD-59849, AD-59228, e AD-60212 têm valores de IC₅₀ comparáveis ao genitor (AD-57928).

[00585] A capacidade destes dúplexes de persistirem *in vivo* no fígado foi também determinada por administração de 1 mg/kg de cada dúplex a camundongos de tipo selvagem e determinação do nível de siRNA por PCR quantitativa. Como ilustrado na Figura 13, todos os dúplexes mostram maior persistência no fígado do que o dúplex genitor começando no ponto temporal pós-120 horas de administração.

[00586] A capacidade destes dúplexes de suprimirem a expressão da proteína PCSK9 foi também avaliada *in vivo* por medição dos níveis da proteína PCSK9, LDL, HDL, colesterol total (Tc), triglicerídeos (Tgs), alanina transaminase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), e fosfatase alcalina (ALP) no soro de primatas não humanos (NHP). A presença de reação no local de injeção foi também monitorizada. Os dúplexes foram administrados usando um programa de dosagem que incluiu uma "fase de carga" durante a primeira semana (uma dose de 2 mg/kg diariamente durante 5 dias subsequentes, qdx5), seguida por uma "fase de manutenção" (três doses semanais de 2 mg/kg durante 3 semanas, qwx3), como é descrito na Tabela 11 abaixo.

Tabela 10. Agentes de RNAi Adicionais.

Dúplex	ID do Senso	Senso	ID do Antissenso	Antissenso
AD-57928 (parent)	A-117428	CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	A-117429	asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa
AD-59849	A-121244	CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgcuuuuguL96	A-121239	asCfsaAfaagCfaAfaacAfgGfucuAfgsasa
AD-60688	A-120188	csusagacCfuGfuuuugcuuuuguL96	A-121239	asCfsaAfaagCfaAfaacAfgGfucuAfgsasa
AD-59223	A-120188	csusagacCfuGfuuuugcuuuuguL96	A-120190	asCfsaAfAfAfgCfaAfaAfcAfgGfuCfuagsasa
AD-60212	A-122088	csusagacCfuGfudTuugcuuuuguL96	A-120190	asCfsaAfAfAfgCfaAfaAfcAfgGfuCfuagsasa
AD-59228	A-120197	CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfsuUfsuUfsgsUfsL96	A-120202	asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfsuAfgsasa

Tabela 11. Programas de Dosagem

Artigo de Teste	Número do Grupo	N	Nível da Dose (mg/kg)	Frequência da Dose	Dose cumulativa (mg/kg)
AD-57928	1	3 fêmeas	2	qdx5+qwx3, 8 doses	16
AD-59849	2		2	qdx5+qwx3, 8 doses	16
AD-60688	3		2	qdx5+qwx3, 8 doses	16
AD-59223	4		2	qdx5+qwx3, 8 doses	16
AD-60212	5		2	qdx5+qwx3, 8 doses	16
AD-59228	6		2	qdx5+qwx3, 8 doses	16
Sangue : Dias -9, -6, -3, 4, 7, 10, 14, 17, 21, 24, 28, 31, 35, 42, 49, 56, 63 (primeira dose, Dia 1)					
Observação no local de injeção: Sim					
Leituras: Proteína PCSK9, LDL, HDL, Tc, Trigs, ALT, AST, ALP					

[00587] Como mostrado nas Figuras 14A e 14B, todos os compostos exceto para AD-60688 alcançam silenciamento de PCSK9 maior do que 80 % e animais individuais no grupo de AD-60212 alcançam silenciamento de PCSK9 maior do que 90 %. A Figura 15 demonstra que, na ausência de estatinas, todos os compostos exceto para AD-60688 alcançam diminuição de colesterol LDL de 60 % e animais individuais no grupo de AD-59223 alcançam diminuição de colesterol LDL até 77 %. Surpreendentemente, e como ilustrado na Figura 18, os agentes indicados mantiveram diminuição de colesterol 46 dias após a última dose dos agentes indicados. Ainda mais surpreendentemente, e como ilustrado na Figura 19, AD-60212 e AD-59849 mantêm diminuição de colesterol LDL até 60 % até pelo menos o dia 120 (93 dias após a última dose), mais tempo do que qualquer efeito observado para um

agente de RNAi *in vivo*, indicando que, após uma fase de carga, estes compostos podem ser administrados a uma frequência de uma vez por mês, uma vez a cada dois meses, uma vez a cada três meses, uma vez a cada quatro meses, uma vez a cada cinco meses, ou uma vez a cada seis meses durante a fase de manutenção.

Exemplo 8. Preparação de Sequências de PCSK9 Baseadas em AD-57928 Adicionais

[00588] Agentes de RNAi adicionais baseados nas sequências genitoras de AD-57928 foram preparados (ver Tabela 12, em baixo) e testados *in vitro* quanto à potência para transfecção de células HeLa e Hep3B com estes agentes. Os valores de IC₅₀ para estes agentes são mostrados na Tabela 13.

Tabela 12. Sequências de PCSK9

ID do Dúplex	Fita senso	Senso (5' para 3')	SEQ NO:	ID	Antissenso	Antissenso (5' para 3')	SEQ NO:	ID
AD-57928.45	A-117428.1	CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	1577		A-117429.1	asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1605	
AD-60928.1	A-122701.2	CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgAfL96	1578		A-122702.2	usCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1606	
AD-60929.1	A-122703.2	GfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	1579		A-122704.2	asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfcusu	1607	
AD-60930.1	A-122705.2	GfsasAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	1580		A-122706.2	asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuUfcsusu	1608	
AD-60931.1	A-122707.3	GfsasUfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	1581		A-122708.2	asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfaUfcsusu	1609	
AD-60932.1	A-122707.4	GfsasUfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	1582		A-122709.2	asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfaUfcsasa	1610	
AD-60933.1	A-122710.2	CfsasUfcAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	1583		A-122711.2	asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuGfaUfgsasa	1611	
AD-60934.1	A-122712.2	CfsusUfcUfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	1584		A-122713.2	asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfaGfaAfgsasa	1612	
AD-60927.1	A-122714.2	CfsusAfcUfgCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	1585		A-122715.2	asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgCfaGfuAfgsasa	1613	
AD-57928.45	A-117428.1	CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	1586		A-117429.1	asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1614	
AD-60906.1	A-117428.1	CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	1587		A-122309.1	asCfsaAfaAfgCf(Ayh)AfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1615	
AD-60907.1	A-117428.1	CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	1588		A-122310.1	asCfsaAfaAfgCfa(Ayh)aacAfgGfuCfuAfgsasa	1616	
AD-60908.1	A-117428.1	CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	1589		A-122311.1	asCfsaAfaAfgCfaAf(Ayh)acAfgGfuCfuAfgsasa	1617	
AD-60909.1	A-117428.1	CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	1590		A-122312.1	asCfsaAfaAfgCfaAfa(Ayh)cAfgGfuCfuAfgsasa	1618	
AD-60910.1	A-117428.1	CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	1591		A-122313.1	asCfsaAfaAfgCf(Ayh)AfaacAf(Gyh)GfuCf(Uyh)Afgsasa	1619	
AD-60911.1	A-122307.1	Cfsus(Ayh)(Gyh)(Ayh)(Cyh)CfuGfUfUfuUf(Gyh)Cf(Uyh)Uf(Uyh)Uf(Gyh)UfL96	1592		A-117429.1	asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1620	
AD-60912.1	A-122308.1	(Cyh)u(Ayh)(Gyh)(Ayh)(Cyh)CfuGfUfUfuUf(Gyh)Cf(Uyh)Uf(Uyh)Uf(Gyh)UfL96	1593		A-117429.1	asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1621	
AD-60913.1	A-122307.1	Cfsus(Ayh)(Gyh)(Ayh)(Cyh)CfuGfUfUfuUf(Gyh)Cf(Uyh)Uf(Uyh)Uf(Gyh)UfL96	1594		A-122309.1	asCfsaAfaAfgCf(Ayh)AfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1622	
AD-60914.1	A-122307.1	Cfsus(Ayh)(Gyh)(Ayh)(Cyh)CfuGfUfUfuUf(Gyh)Cf(Uyh)Uf(Uyh)Uf(Gyh)UfL96	1595		A-122310.1	asCfsaAfaAfgCfa(Ayh)aacAfgGfuCfuAfgsasa	1623	

AD-60915.1	A-122307.1	Cfsus(Ayh)(Gyh)(Ayh)(Cyh)CfuGfUfUfuUf(Gyh)Cf(Uyh)Uf(Uyh)Uf(Gyh)UfL96	1596	A-122311.1	asCfsaAfaAfgCfaAf(Ayh)acAfgGfuCfuAfgsasa	1624
AD-57928.45	A-117428.1	CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	1597	A-117429.1	asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1625
AD-60916.1	A-122307.1	Cfsus(Ayh)(Gyh)(Ayh)(Cyh)CfuGfUfUfuUf(Gyh)Cf(Uyh)Uf(Uyh)Uf(Gyh)UfL96	1598	A-122312.1	asCfsaAfaAfgCfaAfa(Ayh)cAfgGfuCfuAfgsasa	1626
AD-60917.1	A-122307.1	Cfsus(Ayh)(Gyh)(Ayh)(Cyh)CfuGfUfUfuUf(Gyh)Cf(Uyh)Uf(Uyh)Uf(Gyh)UfL96	1599	A-122313.1	asCfsaAfaAfgCf(Ayh)AfaacAf(Gyh)GfuCf(Uyh)Afgsas a	1627
AD-60918.1	A-122308.1	(Cyh)u(Ayh)(Gyh)(Ayh)(Cyh)CfuGfUfUfuUf(Gyh)Cf(Uyh)Uf(Uyh)Uf(Gyh)UfL96	1600	A-122309.1	asCfsaAfaAfgCf(Ayh)AfaacAfgGfuCfuAfgsasa	1628
AD-60919.1	A-122308.1	(Cyh)u(Ayh)(Gyh)(Ayh)(Cyh)CfuGfUfUfuUf(Gyh)Cf(Uyh)Uf(Uyh)Uf(Gyh)UfL96	1601	A-122310.1	asCfsaAfaAfgCfa(Ayh)aacAfgGfuCfuAfgsasa	1629
AD-60920.1	A-122308.1	(Cyh)u(Ayh)(Gyh)(Ayh)(Cyh)CfuGfUfUfuUf(Gyh)Cf(Uyh)Uf(Uyh)Uf(Gyh)UfL96	1602	A-122311.1	asCfsaAfaAfgCfaAf(Ayh)acAfgGfuCfuAfgsasa	1630
AD-60921.1	A-122308.1	(Cyh)u(Ayh)(Gyh)(Ayh)(Cyh)CfuGfUfUfuUf(Gyh)Cf(Uyh)Uf(Uyh)Uf(Gyh)UfL96	1603	A-122312.1	asCfsaAfaAfgCfaAfa(Ayh)cAfgGfuCfuAfgsasa	1631
AD-60922.1	A-122308.1	(Cyh)u(Ayh)(Gyh)(Ayh)(Cyh)CfuGfUfUfuUf(Gyh)Cf(Uyh)Uf(Uyh)Uf(Gyh)UfL96	1604	A-122313.1	asCfsaAfaAfgCf(Ayh)AfaacAf(Gyh)GfuCf(Uyh)Afgsas a	1632

Tabela 13. Valores de IC₅₀ para os agentes de RNAi identificados na Tabela 12.

ID do Dúplex	IC ₅₀ (nM) de Hela	IC ₅₀ (nM) de Hep3B
AD-57928,47	0,0026	0,0005
AD-60928,1	0,0000	0,0009
AD-60929,1	0,0010	0,0027
AD-60930,1	0,0055	0,0019
AD-60931,1	0,0028	0,0019
AD-60932,1	0,0039	0,0036
AD-60933,1	0,0349	0,1518
AD-60934,1	0,2115	0,5420
AD-60927,1	>10	-
AD-57928,45	<3,57225e-005	0,0007
AD-60906,1	0,0048	0,0007
AD-60907,1	0,0001	<3,57225e-005
AD-60908,1	0,0003	0,0072
AD-60909,1	-	0,0142
AD-60910,1	0,0001	0,0030
AD-60911,1	0,0955	0,1935
AD-60912,1	0,1834	0,4106
AD-60913,1	0,2693	0,5715
AD-60914,1	0,2292	0,4319
AD-60915,1	0,2069	0,3185
AD-57928,45	0,0057	0,0027
AD-60916,1	0,0802	0,2040
AD-60917,1	0,1420	0,0976
AD-60918,1	0,4101	0,3268
AD-60919,1	0,3202	0,5143
AD-60920,1	0,5199	0,5978
AD-60921,1	0,7969	2,0875
AD-60922,1	1,1078	1,0307

Exemplo 9. Eficácia de Dose Repetida de AD-57928

[00589] A eficácia de dose repetida de AD-57928 na supressão da expressão da proteína PCSK9 foi avaliada *in vivo* por medição dos níveis da proteína PCSK9, LDL, HDL, colesterol total (Tc), triglicerídeos (Tgs), alanina transaminase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), e fosfatase alcalina (ALP) no soro de primatas não humanos (NHP). A presença de reação no local de injeção foi também monitorizada. Dúplexes de AD-57928 foram subcutaneamente administrados usando os programas de dosagem descritos na Tabela 14 em baixo. Os animais do grupo 5 foram redoseados com uma dose única de 25 mg/kg ao dia 92. A um grupo de animais adicional foi administrada uma dose única de 25 mg/kg. "2xw" é duas vezes por semana; "q2w" é uma vez a cada duas semanas; e "q1w" é uma vez por semana.

Tabela 14. Programas de Dosagem

Artigo de Teste	Número do Grupo	N	Nível da Dose (mg/kg)	Frequência da Dose	Dose cumulativa (mg/kg)
AD-57928	1	3 fêmeas	1	2xw, 12 doses	12
	2		2	2xw, 12 doses	24
	3		1	q2w, 6 doses	6
	4		2	q2w, 6 doses	12
	5		0,5	q1w, 6 doses	3
	6		1	q1w, 10 doses	10
	7		2	q1w, 10 doses	20

Artigo de Teste	Número do Grupo	N	Nível da Dose (mg/kg)	Frequência da Dose	Dose cumulativa (mg/kg)
Sangue : Dias -9, -6, -3, 1 (pré-sangramentos) 3-129 (sangramentos de eficácia) Observação no local de injeção: Sim Leituras: Proteína PCSK9, LDL, HDL, Tc, Trigs, ALT, AST, ALP					

[00590] Como ilustrado na Figura 16A, o regime mais eficaz para diminuição de LDL foi um regime duas vezes semanalmente (2xw) que alcançou uma redução de cerca de 60 % nos níveis de LDL. A mesma dose cumulativa administrada menos frequentemente foi menos eficaz do que o regime duas vezes por semana. A Figura 16B demonstra que o regime 2xw alcançou silenciamento de PCSK9 maior do que 80 %.

[00591] As Figuras 17A e 17B demonstram que uma dose única de 25 mg/kg de AD-57928 tem o mesmo início de diminuição de LDL e PCSK9, o mesmo nadir da diminuição de PCSK9 e LDL, e taxa equivalente de diminuição de LDL como uma dose múltipla mais baixa de 2 mg/kg de AD-57928 administrada duas vezes por semana (2xw). Estes gráficos demonstram também que existe uma tendência na direção de diminuição mais rápida de PCSK9 com a dose única de 25 mg/kg e que a recuperação de ambos os níveis de PCSK9 e níveis de LDL começa cerca de 20 dias após ser alcançado o nadir (dia 7) para a dose única de 25 mg/kg. O nadir para a dose única de 25 mg/kg é ao Dia 7.

Exemplo 10. Tolerabilidade de Agentes de RNAi de AD-57928 Otimizados

[00592] Os agentes de RNAi adicionais preparados com base nas sequências genitoras de AD-57928 descritas na Figura 12A (e Tabela 10) foram avaliados quanto à tolerabilidade em ratos. A ratos machos foram subcutaneamente administrados 225 mg/kg dos agentes de RNAi indicados aos dias 1, 8, e 15, e foram sacrificados e necropsiados ao dia 16 (ver Tabela 15). Os animais foram observados quanto a

quaisquer sintomas clínicos em uma base diária e os pesos corporais dos animais foram determinados pré-estudo e semanalmente durante o estudo. Ao dia 16, sangue dos animais foi avaliado hemotologicamente, quanto a coagulação e quanto a química do soro; o metabolismo do fármaco e farmacocinética dos agentes foram determinados usando amostras de fígado dos animais; e o coração, pulmões (insuflados), rins, fígado, baço, testículos, e primeiro e último locais de injeção foram analisados quanto a quaisquer mudanças. Não existiram nenhuma mudança nos sinais clínicos, observações visuais no local de injeção, química do soro, coagulação ou patologia microscópica do fígado, baço, pulmão, coração, ou testículos. A Tabela 16 proporciona um sumário dos pesos do fígado, dos pesos corporais finais, dos resultados das análises hematológicas e das pontuações de gravidade da patologia para os locais de injeção finais e rins para cada agente testado.

Tabela 15. Programas de Dosagem

Grupo da Dose	TA	Dose (mg/kg)	Vol. da Dose (mL/kg)	No. Machos	Programa de Dosagem	Nx Dia
1	PBS	0	5	3	SC aos Dias 1, 8, e 15	Dia 16
2	AD-57928 (genitor)	225		3		
3	AD-59849	225		3		
4	AD-59223	225		3		
5	AD-59228	225		3		

Grupo da Dose	TA	Dose (mg/kg)	Vol. da Dose (mL/kg)	No. Machos	Programa de Dosagem	Nx Dia
6	AD-60688	225		3		
7	AD-60212	225		3		

Tabela 16. Sumário da Tolerabilidade

	<u>AD-57928</u> <u>(genitor)</u>	<u>AD-59849</u>	<u>AD-59223</u>	<u>AD-59228</u>	<u>AD-60688</u>	<u>AD-60212</u>
<u>No. PS</u>	<u>6</u>	<u>6</u>	<u>6</u>	<u>13</u>	<u>6</u>	<u>6</u>
<u>No. 2°F</u>	<u>21</u>	<u>15</u>	<u>12</u>	<u>21</u>	<u>9</u>	<u>12</u>
<u>No. dT</u>	<u>0</u>	<u>0</u>	<u>0</u>	<u>0</u>	<u>0</u>	<u>1</u>
<u>[Fígado]</u> <u>(µg/g)</u>	<u>907 ± 62</u>	<u>1139 ± 160</u>	<u>1277 ± 231</u>	<u>1999 ± 424</u>	<u>1624 ± 147</u>	<u>1258 ± 286</u>
<u>BW Final</u> <u>(% do controle)</u>	<u>-2,1 %</u>	<u>-4,6 %</u>	<u>-2,1 %</u>	<u>-6,8 %</u>	<u>-0,5 %</u>	<u>-2,9 %</u>
<u>Dia 16</u> <u>Hematologia</u>	<u>Nenhuma</u> <u>Mudança</u>	<u>Nenhuma</u> <u>Mudança</u>	<u>↑WBC,</u> <u>↑LYM,</u> <u>hemólise</u>	<u>Nenhuma</u> <u>Mudança</u>	<u>Nenhuma</u> <u>Mudança</u>	<u>Nenhuma</u> <u>Mudança</u>

	<u>AD-57928</u> <u>(genitor)</u>	<u>AD-59849</u>	<u>AD-59223</u>	<u>AD-59228</u>	<u>AD-60688</u>	<u>AD-60212</u>
<u>Dia</u> 16 <u>Inflamação do</u> <u>Local de Inj.</u> <u>Final</u>	<u>3/3 (1,7)</u>	<u>3/3 (1,3)</u>	<u>2/3 (1,5)</u>	<u>3/3 (2,3)</u>	<u>2/3 (1,0)</u>	<u>3/3 (1,3)</u>
<u>Dia</u> 16 <u>Grânulos</u> <u>Basofílicos,</u> <u>Rim</u>	<u>3/3 (2,0)</u>	<u>3/3 (2,3)</u>	<u>3/3 (1,0)</u>	<u>3/3 (2,0)</u>	<u>3/3 (1,3)</u>	<u>3/3 (1,3)</u>

_Pontuação de Gravidade da Patologia: 1 = mínima; 2 = ligeira; 3 = moderada

BW = Peso Corporal

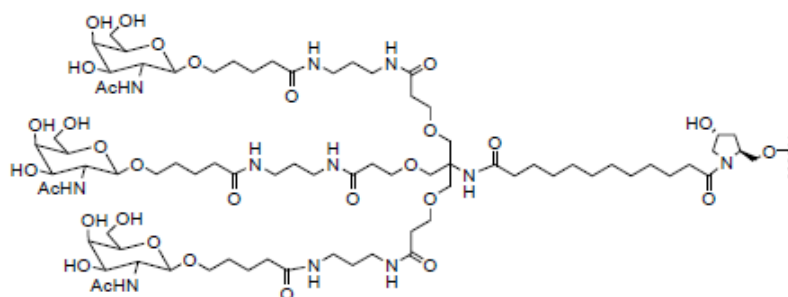
WBC = Glóbulos Brancos

LYM = Linfócitos

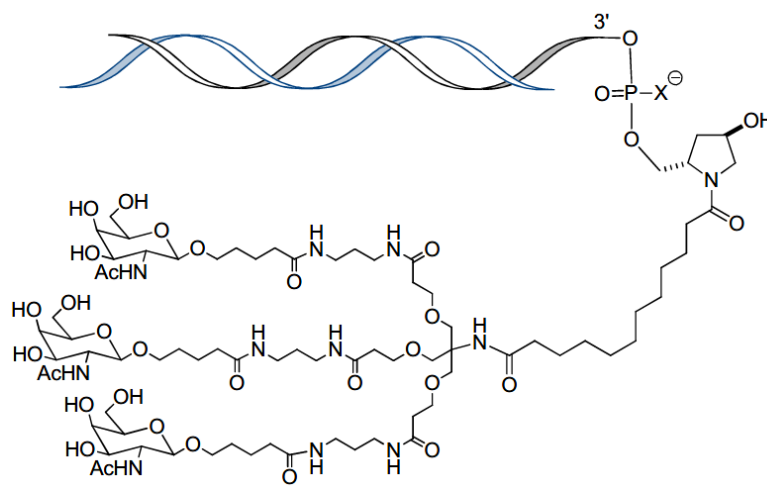
REIVINDICAÇÕES

1. Agente de RNAi de fita dupla, caracterizado pelo fato de que compreende uma fita senso e uma fita antissenso que formam uma região de dupla fita, em que a sequência de nucleotídeo da fita antissenso compreende 5'- asCfsaAfAfAfgCfaAfaAfcAfgGfuCfuagsasa - 3' (SEQ ID NO: 1663), e a sequência de nucleotídeo da fita senso compreende 5'- csusagacCfuGfudTuugcuuuuguL96-3' (SEQ ID NO: 1657),

em que a, c, g e u são nucleotídeos A, C, G e U modificados com 2'-O-metila (2'-OMe), respectivamente; Af, Cf, Gf e Uf são nucleotídeos A, C, G e U modificados com 2'-flúor, respectivamente; s é uma ligação fosforotioato; dT é 2'-desoxitimidina; e L96 é



em que L96 é conjugado à extremidade 3' da fita senso, como mostrado no seguinte esquema:

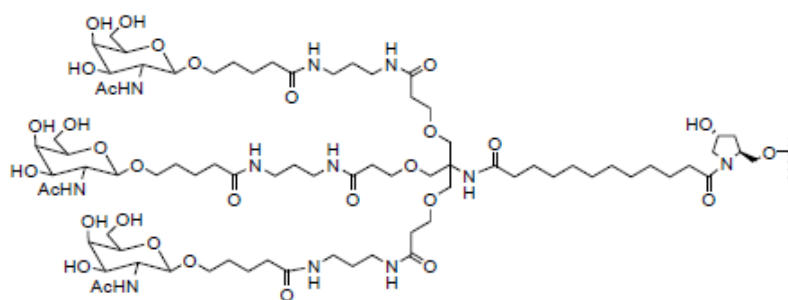


em que X é O.

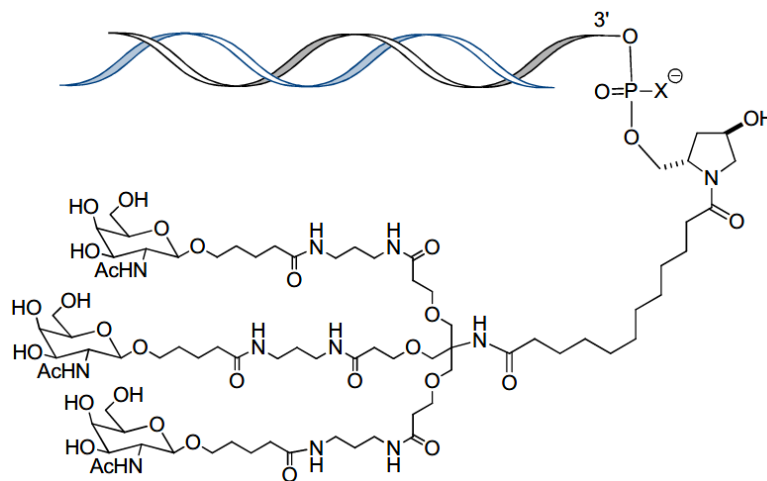
2. Agente de RNAi de fita dupla, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a fita senso consiste na

sequência de nucleotídeos de 5'-csusagacCfuGfudTuugcuuuuguL96-3' (SEQ ID NO: 1657) e a fita antissenso consiste na sequência de nucleotídeos de 5'-asCfsaAfAfAfgCfaAfaAfcAfgGfuCfuagsasa - 3' (SEQ ID NO: 1663),

em que a, c, g e u são nucleotídeos A, C, G e U modificados com 2'-O-metila (2'-OMe), respectivamente; Af, Cf, Gf e Uf são nucleotídeos A, C, G e U modificados com 2'-flúor, respectivamente; s é uma ligação fosforotioato; dT é 2'-desoxitimidina; e L96 é



em que L96 é conjugado à extremidade 3' da fita senso, como mostrado no seguinte esquema:



em que X é O.

3. Composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de que compreende o agente de RNAi de fita dupla, como definido na reivindicação 1 ou 2, e um veículo farmacêuticamente aceitável.

4. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 3, caracterizada pelo fato de que o agente de RNAi de dupla

fita está presente em uma solução não tamponada, preferencialmente em que a referida solução não tamponada é solução salina ou água.

5. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 3, caracterizada pelo fato de que o referido agente de siRNA de dupla fita está presente em uma solução tampão, preferencialmente em que a referida solução tampão compreende acetato, citrato, prolamina, carbonato, ou fosfato ou qualquer combinação dos mesmos, mais preferencialmente em que a referida solução tampão é solução salina tamponada com fosfato (PBS).

6. Método de inibição da expressão de PCSK9 em uma célula *in vitro*, caracterizado pelo fato de que compreende:

(a) contato da célula com o agente de RNAi de fita dupla, como definido na reivindicação 1 ou 2, ou uma composição farmacêutica, como definida em qualquer uma das reivindicações 3 a 5; e

(b) manutenção da célula produzida na etapa (a) durante um tempo suficiente para se obter degradação do transcrito RNAm de um gene de PCSK9, inibindo deste modo a expressão do gene de PCSK9 na célula.

7. Uso do agente de RNAi de fita dupla, como definido na reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que é para a fabricação de uma composição farmacêutica, como definida em qualquer uma das reivindicações 3 a 5, para o tratamento de uma lipídemia em um indivíduo.

8. Uso de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que o indivíduo é um humano, preferencialmente em que o humano tem hipercolesterolemia.

9. Uso de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que o agente de RNAi de fita dupla é administrado

subcutaneamente.

10. Uso do agente de RNAi de fita dupla, como definido na reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que é para a fabricação de uma composição farmacêutica, como definida em qualquer uma das reivindicações 3 a 5, para o tratamento de hipercolesterolemia em um indivíduo.

11. Uso de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de que o indivíduo é um humano.

12. Uso de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de que o agente de RNAi de fita dupla é administrado subcutaneamente.

13. Uso de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo fato de que compreende ainda a determinação de um genótipo ou fenótipo de LDLR do indivíduo.

14. Uso de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de que compreende ainda a determinação do nível de colesterol no soro do indivíduo.

15. Uso de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que o agente de RNAi de fita dupla é administrado por via intravenosa.

16. Uso de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que o agente de RNAi de fita dupla é administrado em duas ou mais doses.

17. Uso de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que o agente de RNAi de fita dupla é administrado em um regime de dosagem que inclui uma fase de carregamento seguida de uma fase de manutenção.

18. Uso, de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de que o agente de RNAi de fita dupla é administrado em duas ou mais doses.

19. Uso de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de que o agente de RNAi de fita dupla é administrado em um regime de dosagem que inclui uma fase de carregamento seguida de uma fase de manutenção.

20. Uso de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de que o agente de RNAi de fita dupla é administrado intravenosamente.

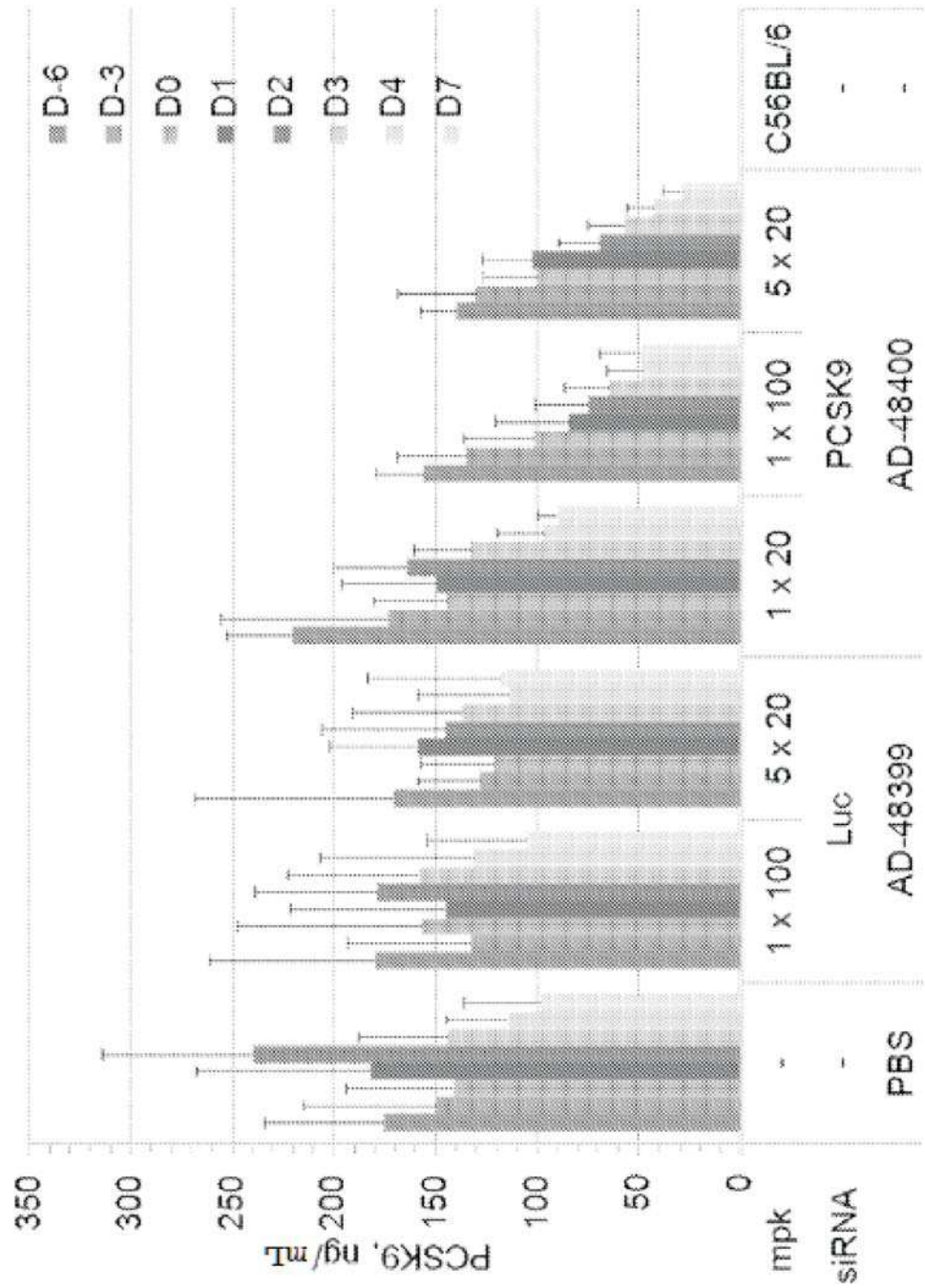


Figura 1

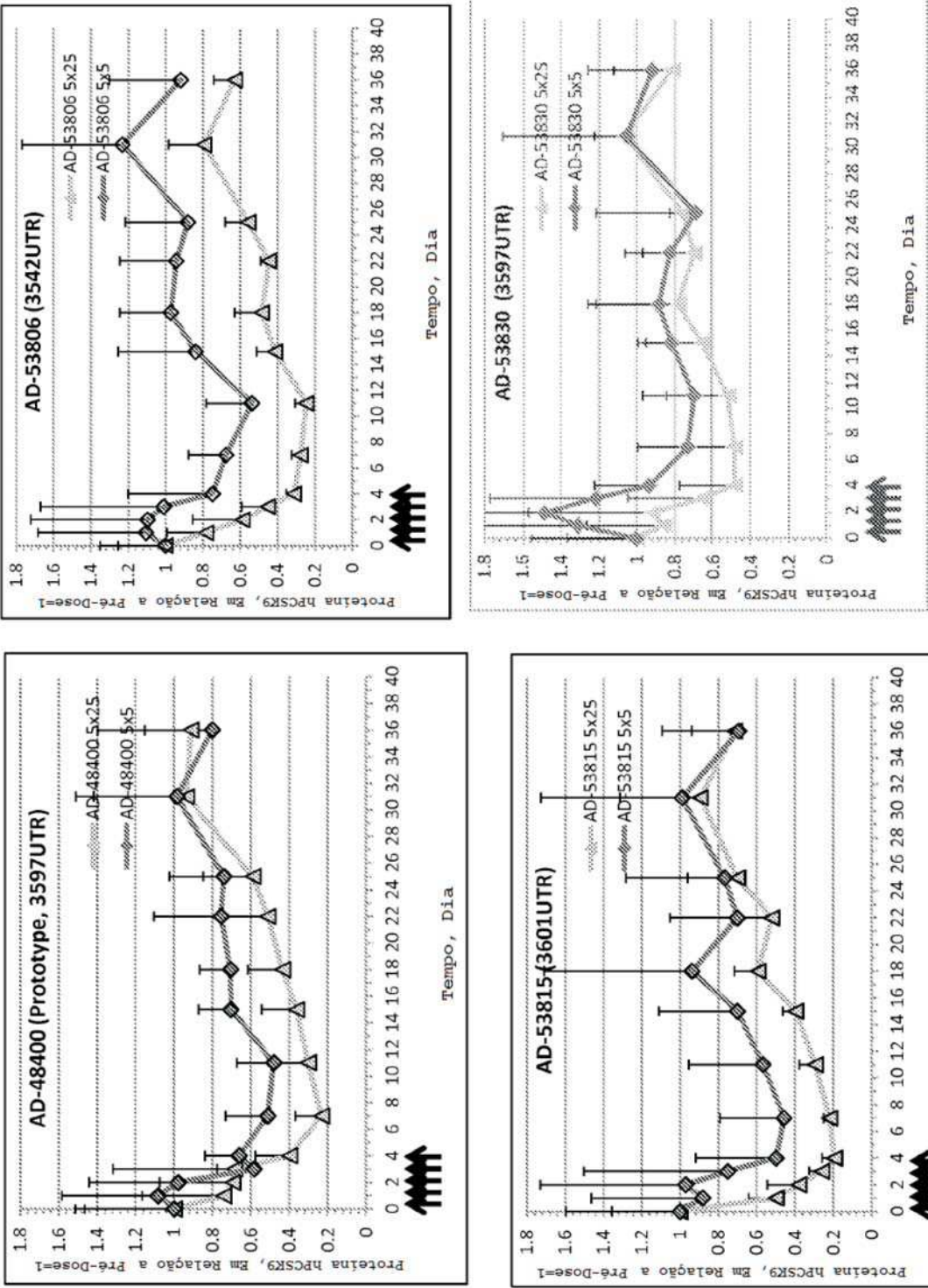


Figura 2A

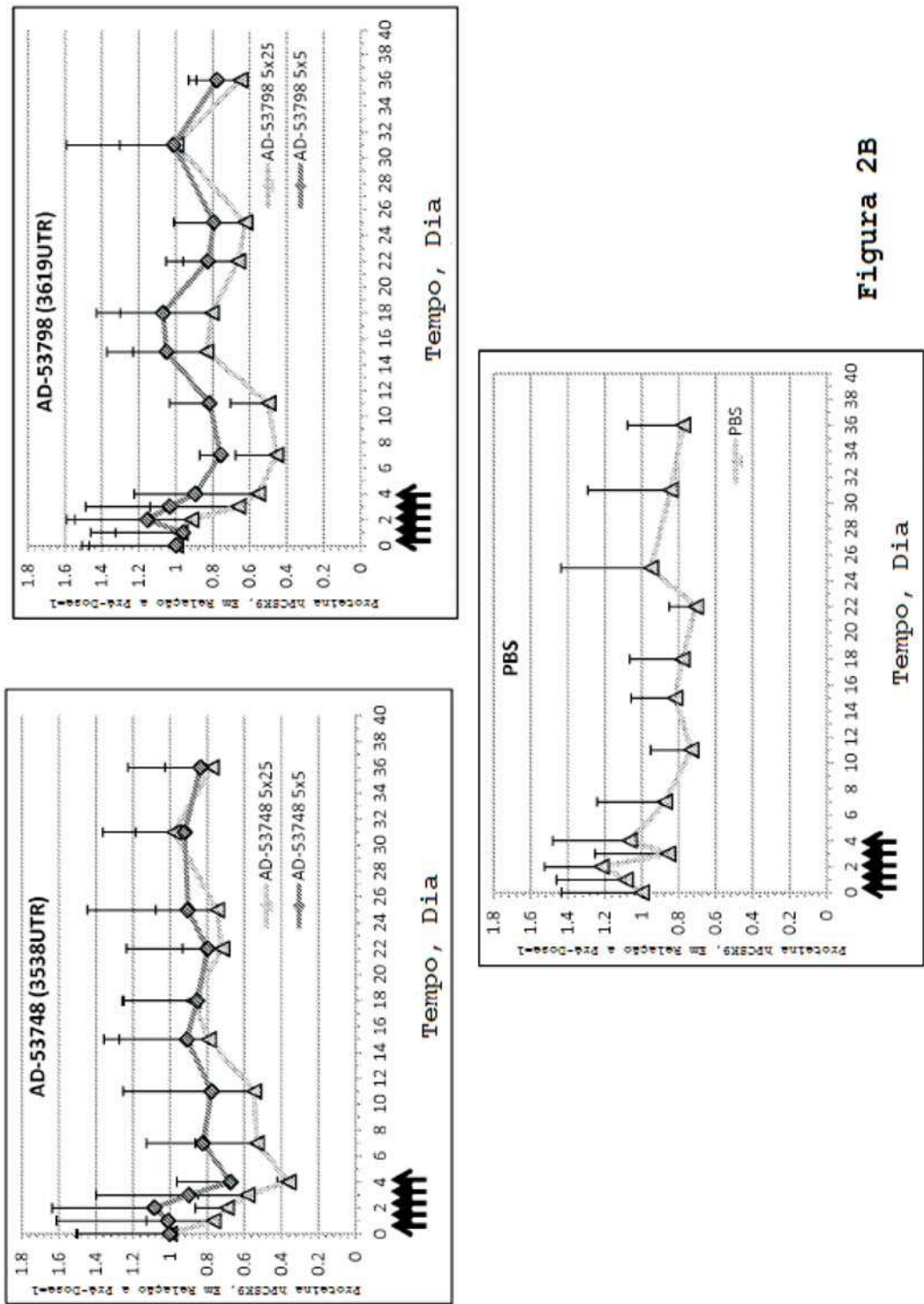


Figura 2B

Dúplex	Senso		AS		Química
AD-53815.5	A-110695.11	CfuAfgAfcCfuGfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	A-109545.18	aCfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsAfsa	21/23 (Genitor)
AD-56651.1	A-115523.1	(iC)uAfgAfcCfuGfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	A-115524.1	(iA)CfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsAfs(iA)	21/23 + base invertida
AD-56610.1	A-115523.2	(iC)uAfgAfcCfuGfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	A-115525.1	aCfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsAfs(iA)	21/23 + base invertida
AD-56634.1	A-115529.1	CbuAfgAfcCfuGfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	A-115530.1	AbCfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsAfsAb	21/23 + L- Açúcar
AD-56652.1	A-115533.1	CbuAfgAfcCfuGfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	A-115532.2	acaAfaAfgcaAfaacAfgGfuCfuAfgsAfsAb	21/23 + L- Açúcar
AD-56663.1	A-115552.1	CfuAfgAfcCfuGfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	A-115553.1	aCfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsAfsa	21/23
AD-56658.1	A-115564.1	CfuAfgAfcCfuGfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	A-115565.1	aCfaaaaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsAfsa	21/23
AD-56676.1	A-115584.1	AfgAfcCfuGfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	A-115585.1	aCfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfusAfs	19/21
AD-56666.1	A-115596.1	AfgAfcCfuGfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	A-115597.1	aCfaaaaAfgCfaAfaacAfgGfuCfusAfs	19/21
AD-57928	A-117428	CfsusAfgAfcCfuGfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	A-117429	asCfaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa	Verado com 6 PB do genitor

Figura 3

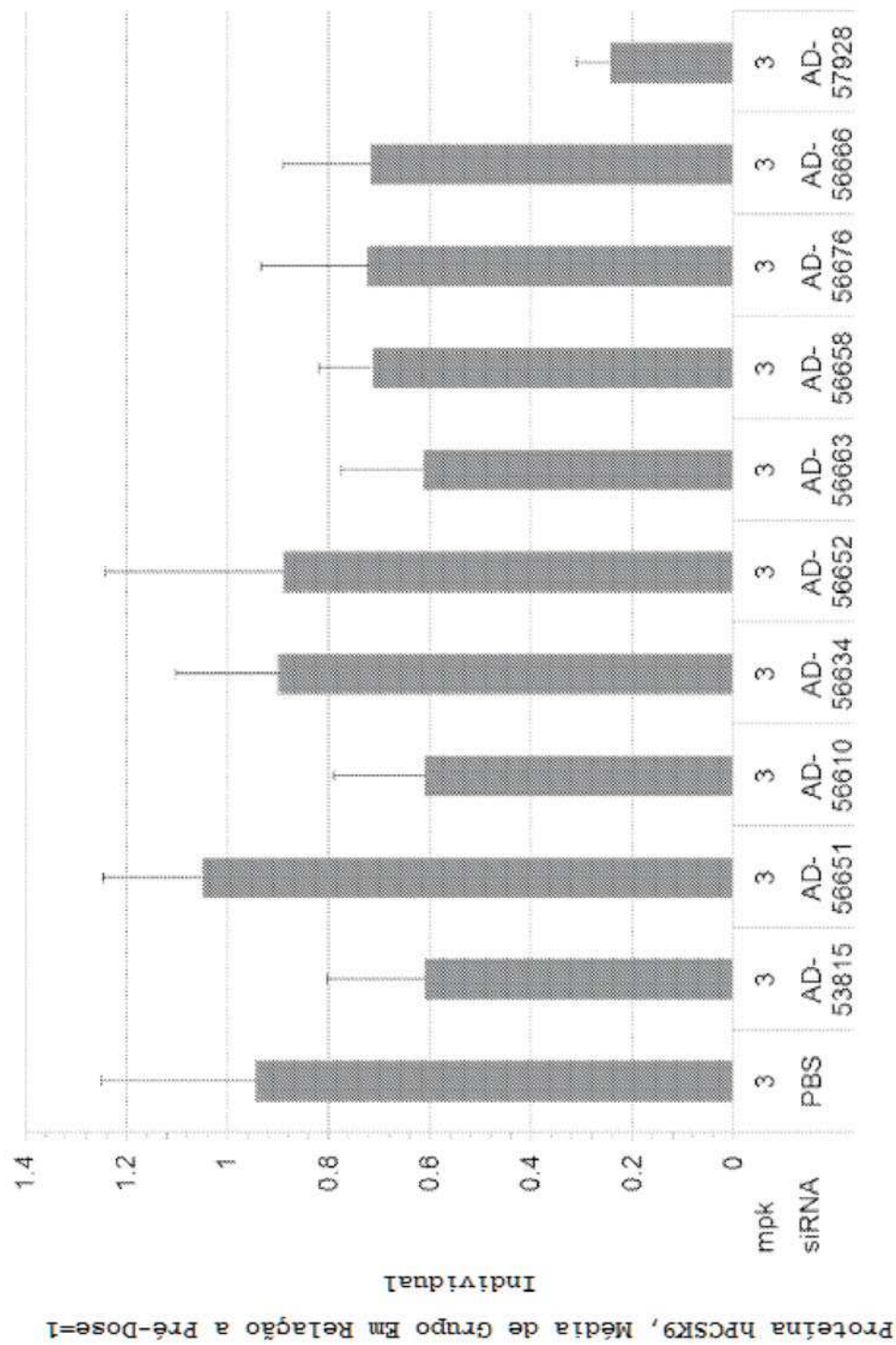


Figura 4

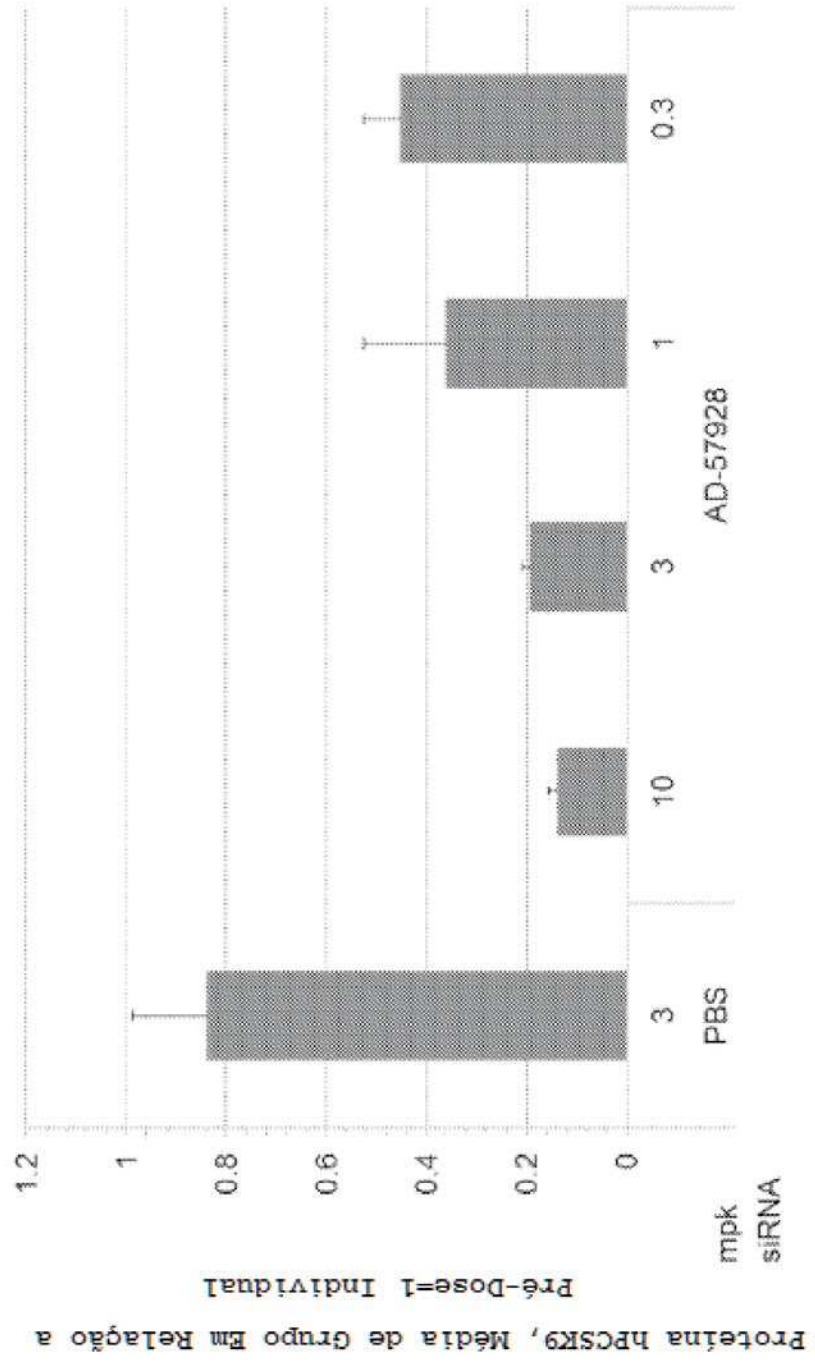


Figura 5

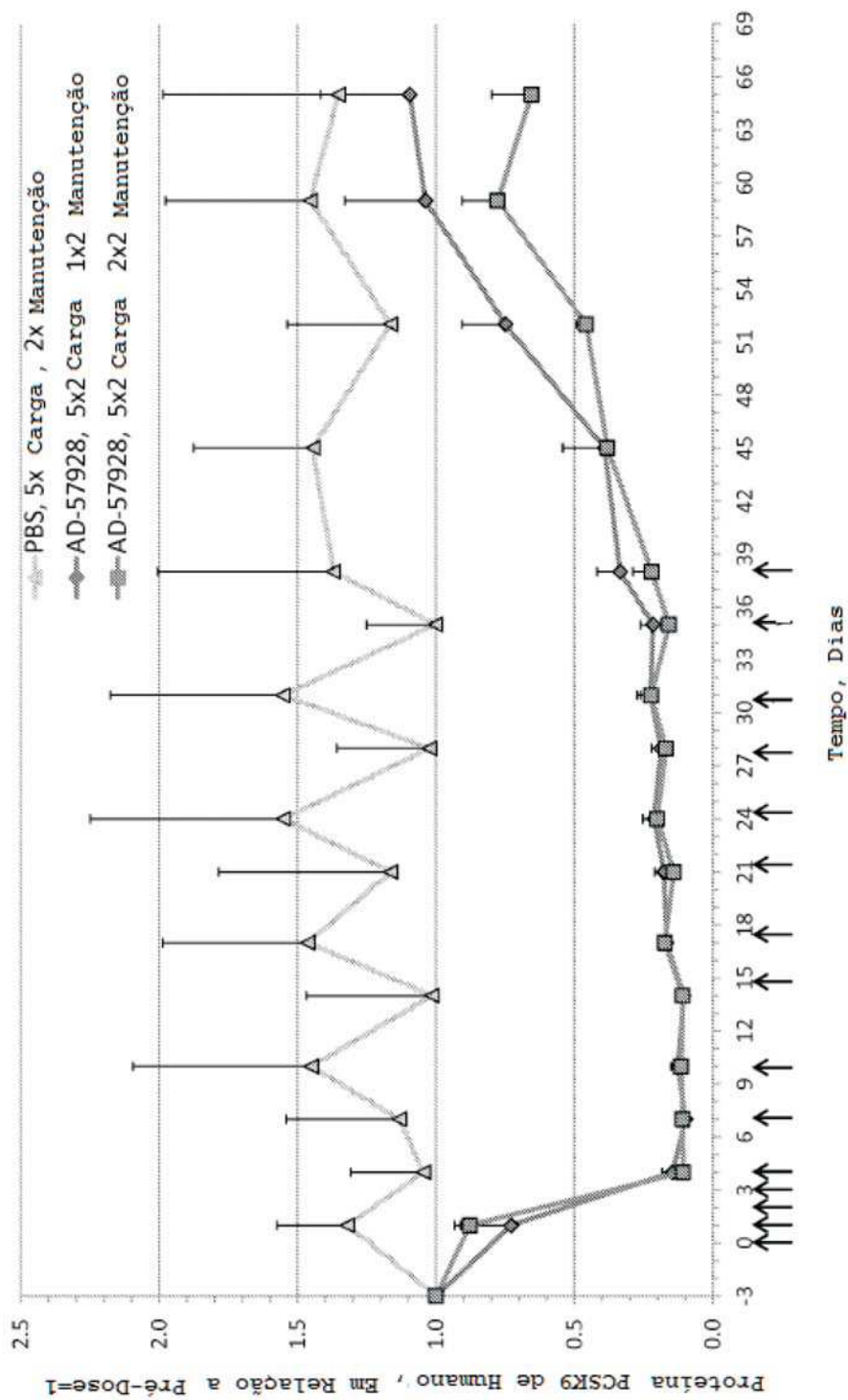


Figura 6

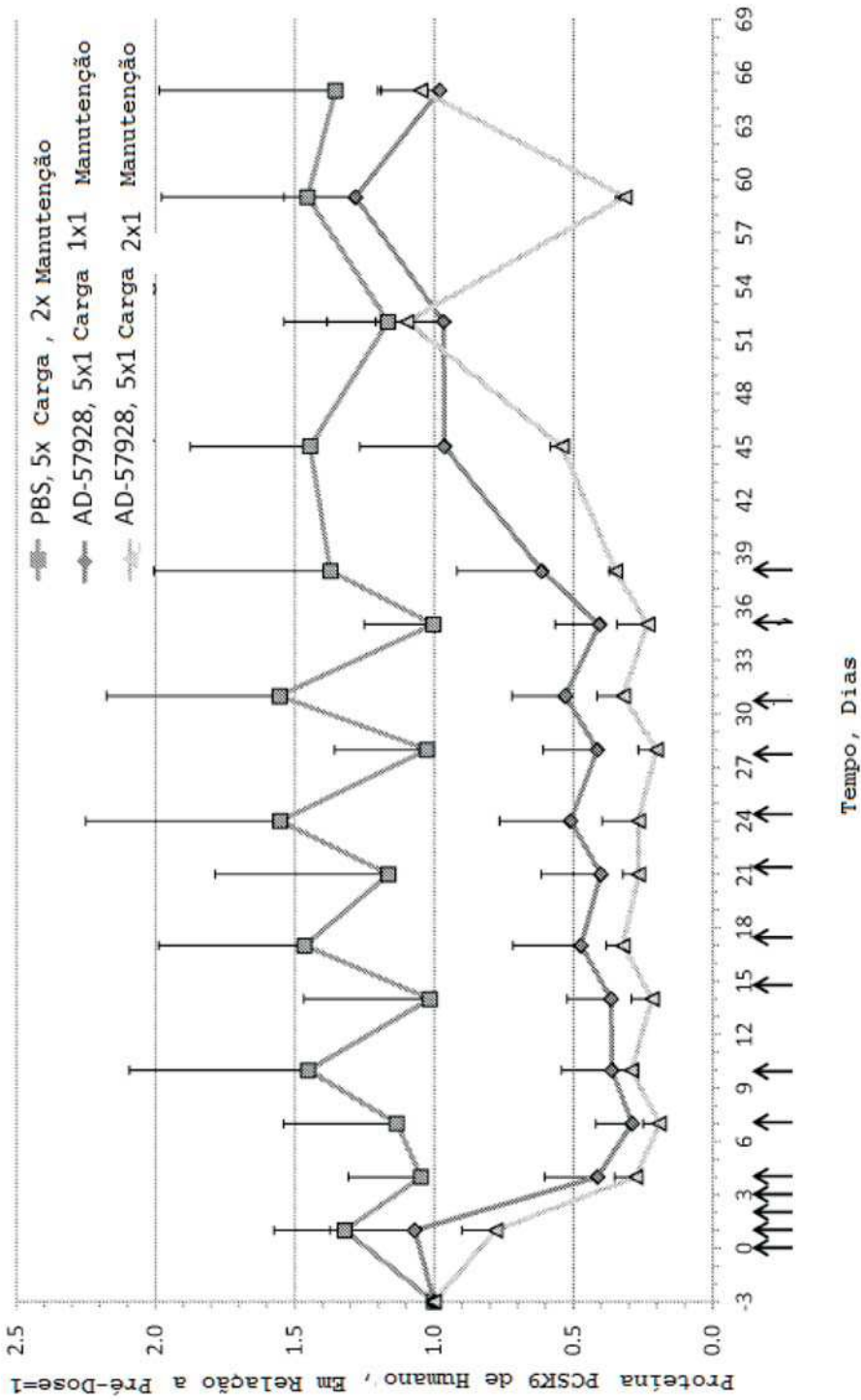


Figura 7

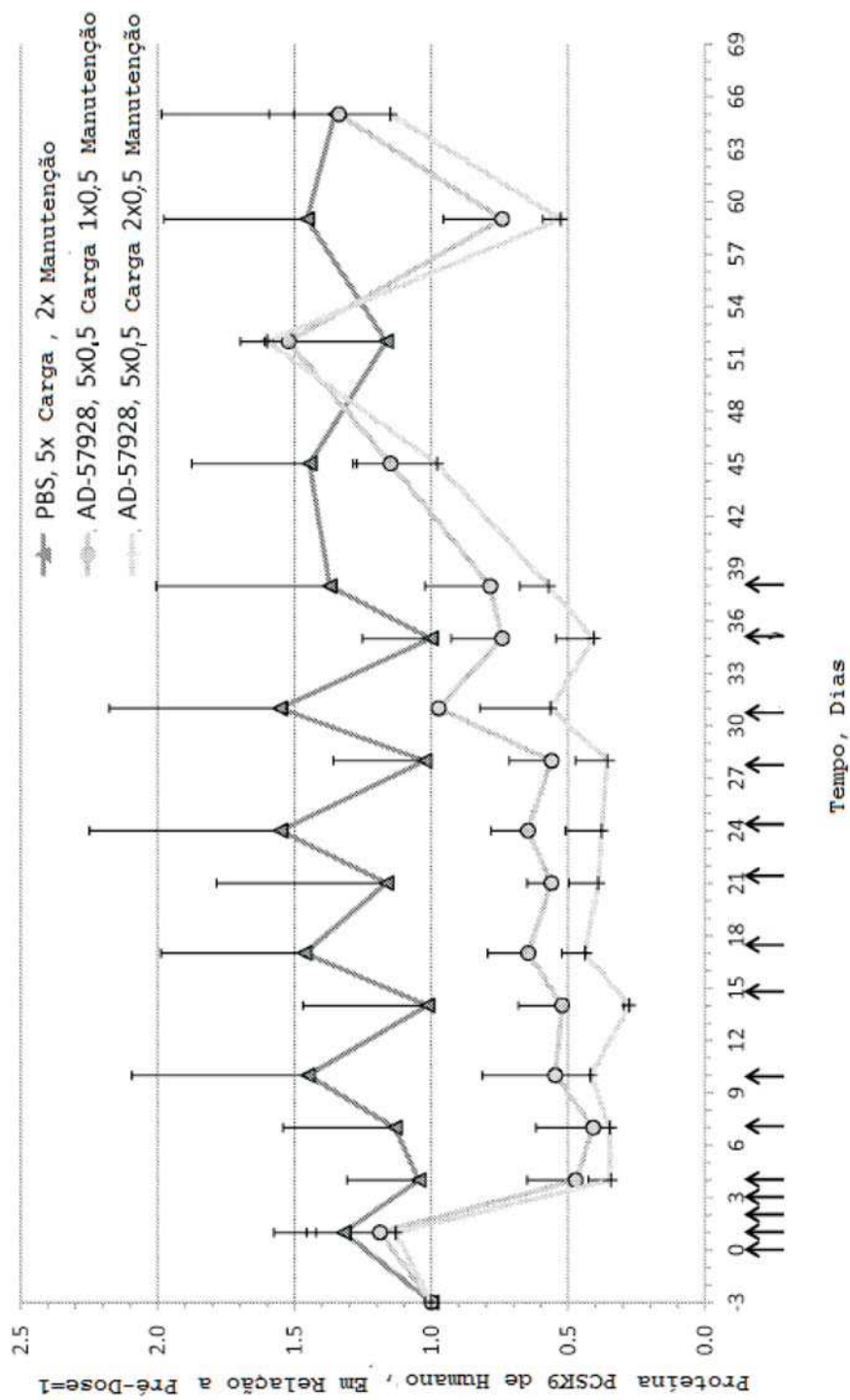


Figura 8

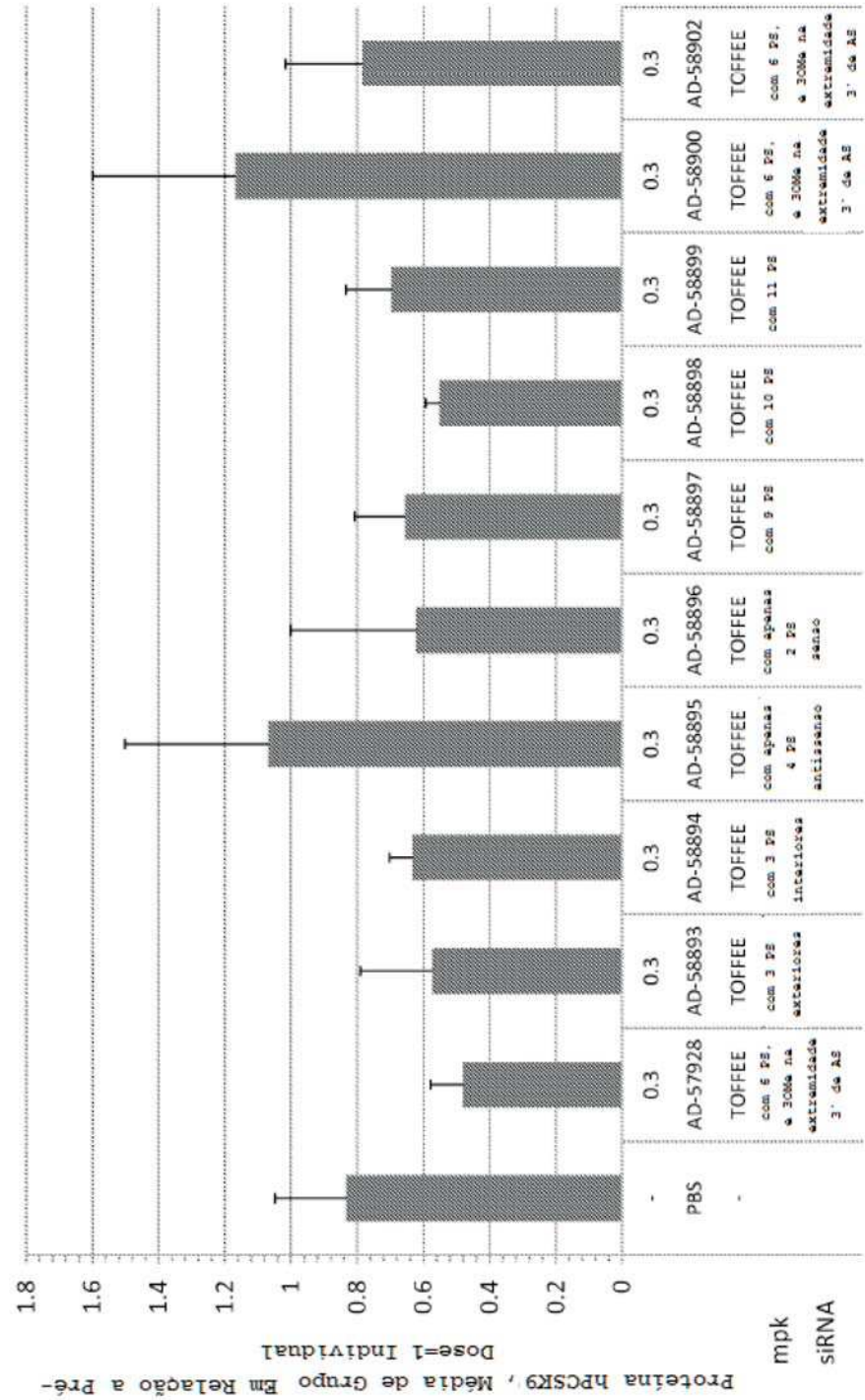


Figura 9

Concentração de siRNA no fígado
(média de grupo)

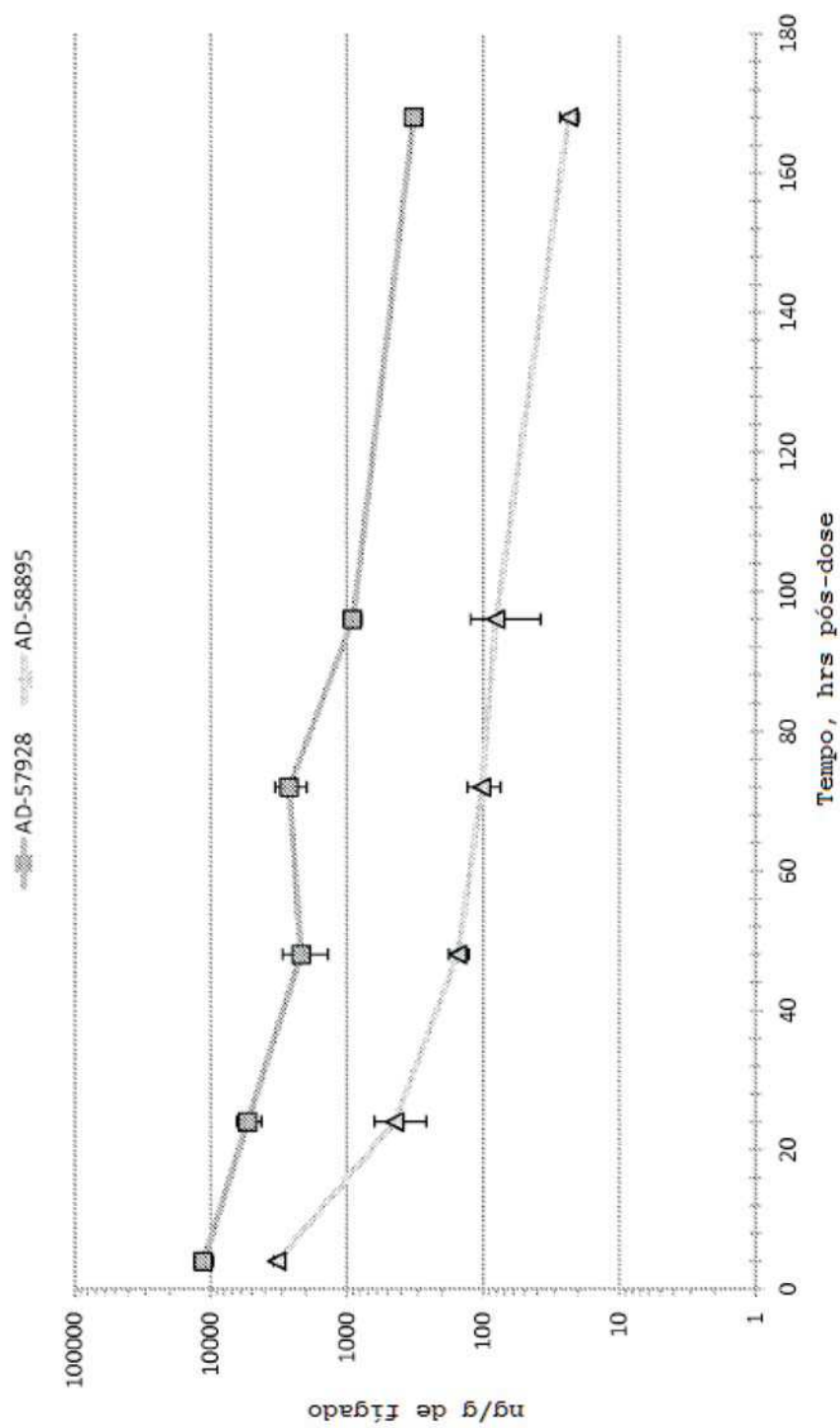


Figura 10

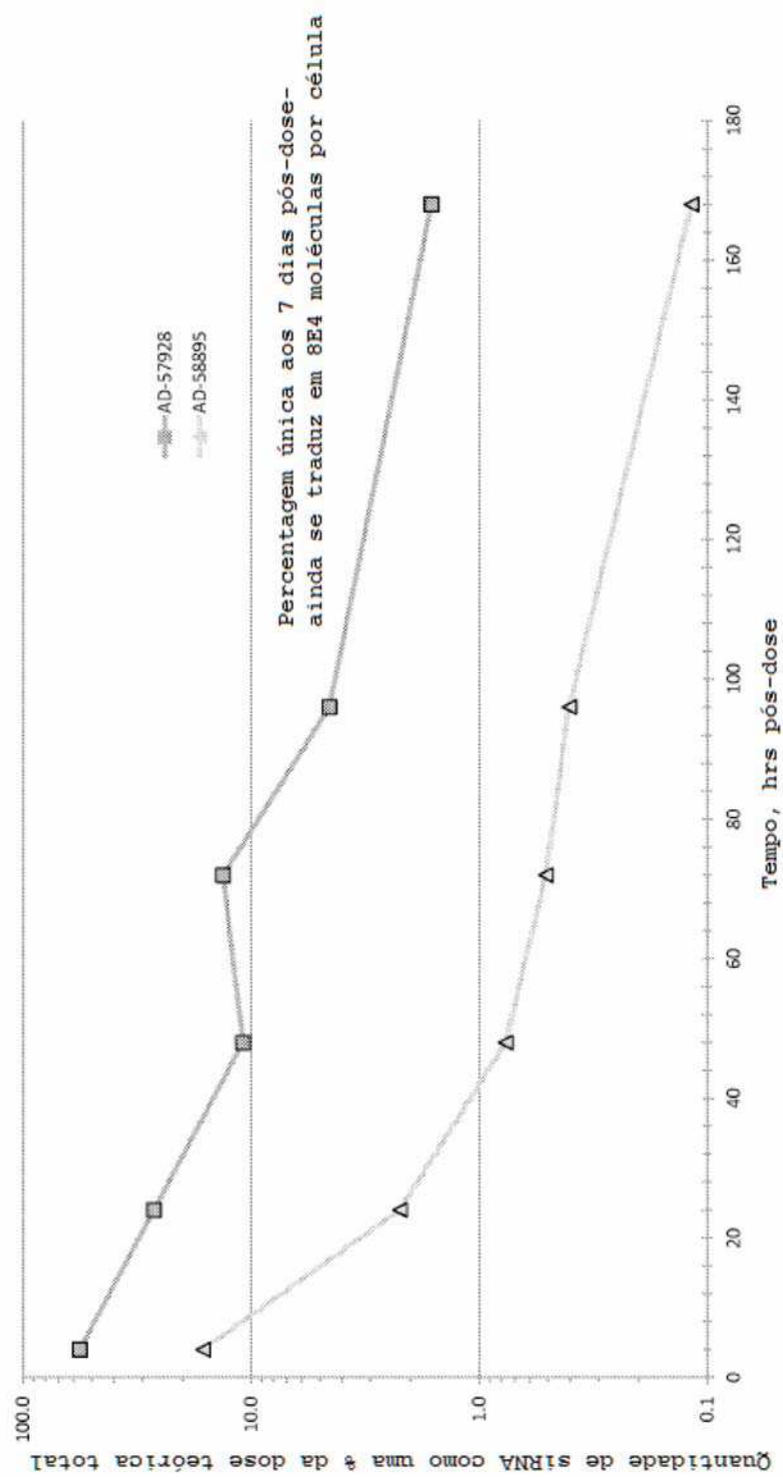


Figura 11

A.

Dúplex	ID do Senso	Senso	ID do AS	Antissenso
AD-57928 (genitor)	A-117428	CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfuUfuUfgUfL96	A-117429	asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfuAfgsasa
AD-59849	A-121244	CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgcuuuugul96	A-121239	asCfsaAfaagCfaAfaacAfgGfucuAfgsasa
AD-60688	A-120188	csusagacCfuGfuuuugcuuuugul96	A-121239	asCfsaAfaagCfaAfaacAfgGfucuAfgsasa
AD-59223	A-120188	csusagacCfuGfuuuugcuuuugul96	A-120190	asCfsaAfaAfgCfaAfaAfcAfgGfuCfuagsasa
AD-60212	A-122088	csusagacCfuGfudTuugcuuuugul96	A-120190	asCfsaAfaAfgCfaAfaAfcAfgGfuCfuagsasa
AD-59228	A-120197	CfsusAfgAfcCfuGfUfUfuUfgCfsuUfsuUfsgsUfL96	A-120202	asCfsaAfaAfgCfaAfaacAfgGfuCfsuAfgsasa

B.

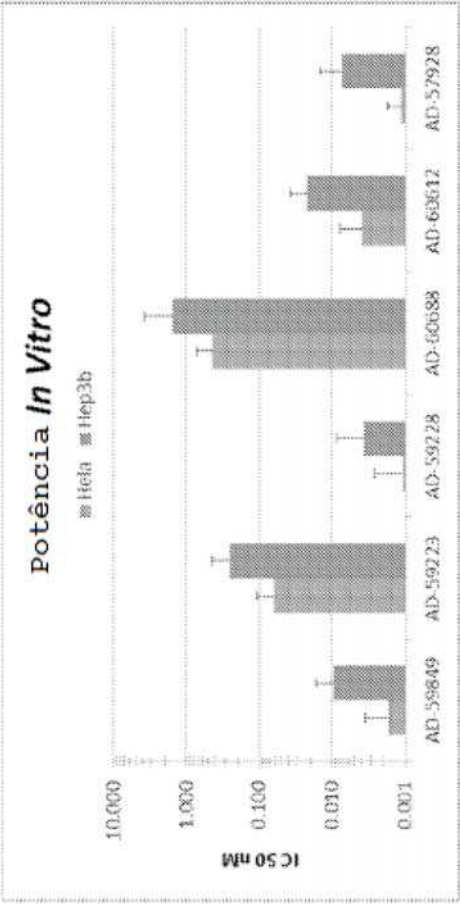


Figura 12

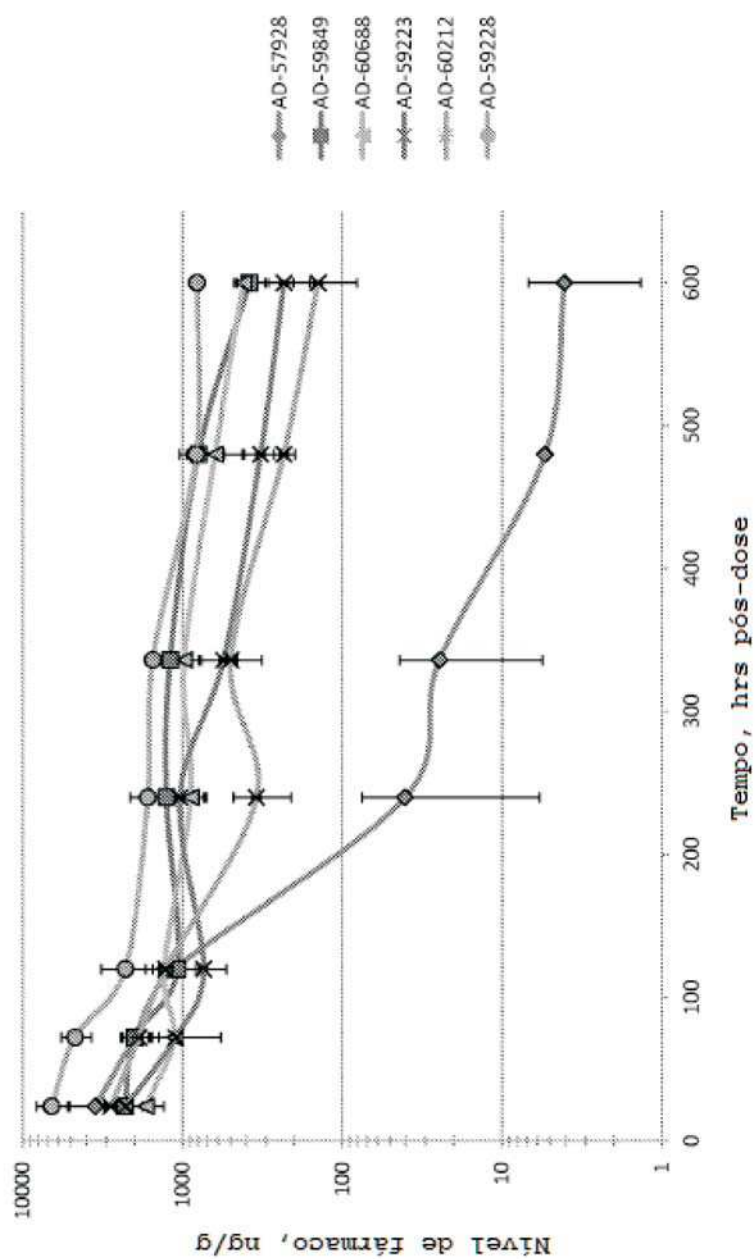
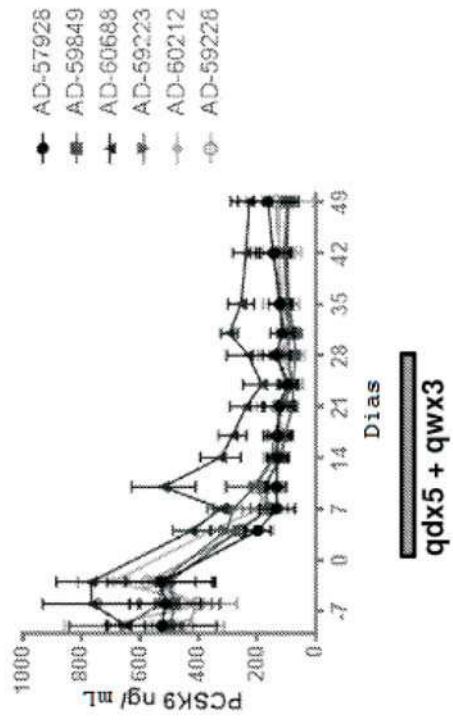


Figura 13

B.



A.

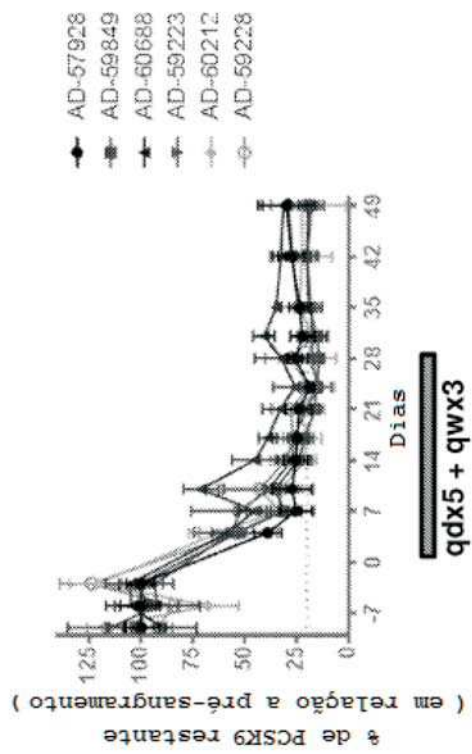


Figura 14

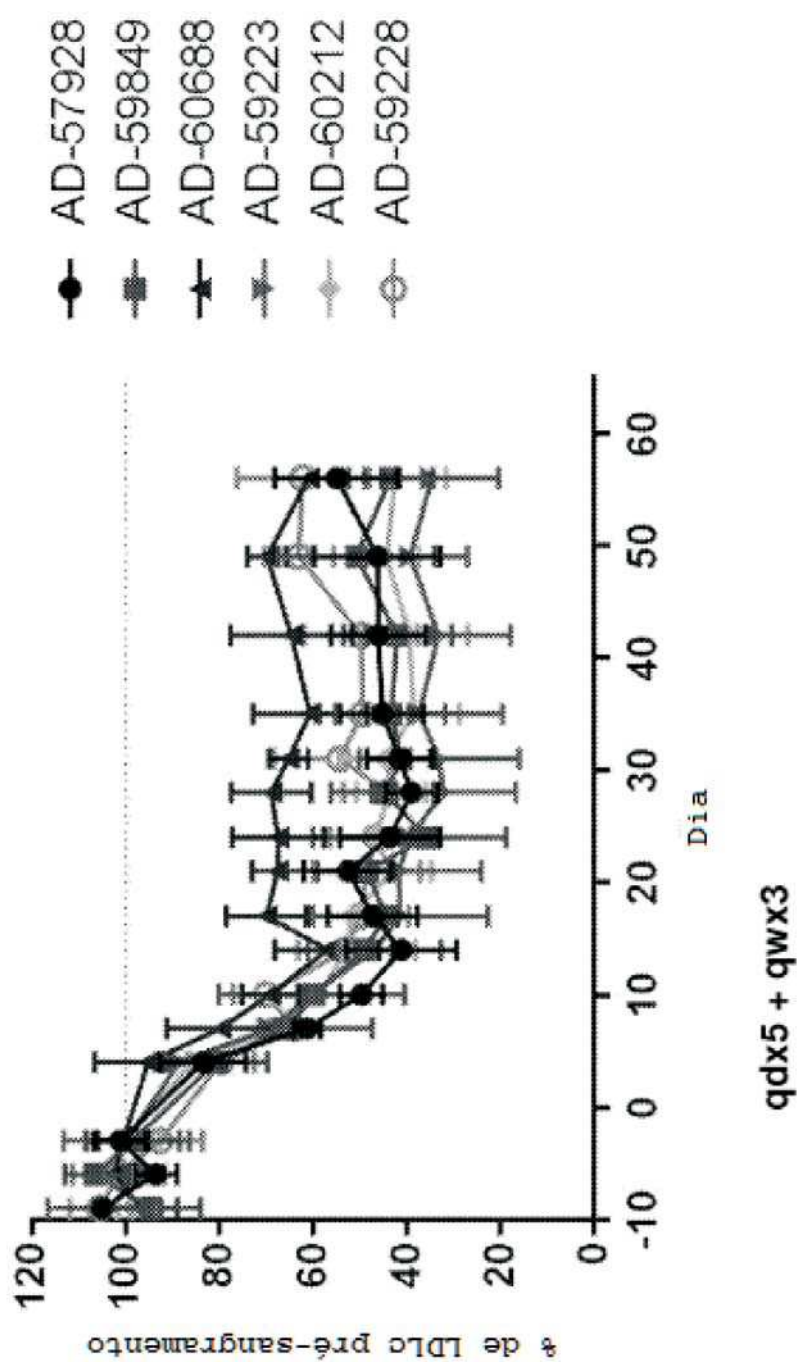


Figura 15

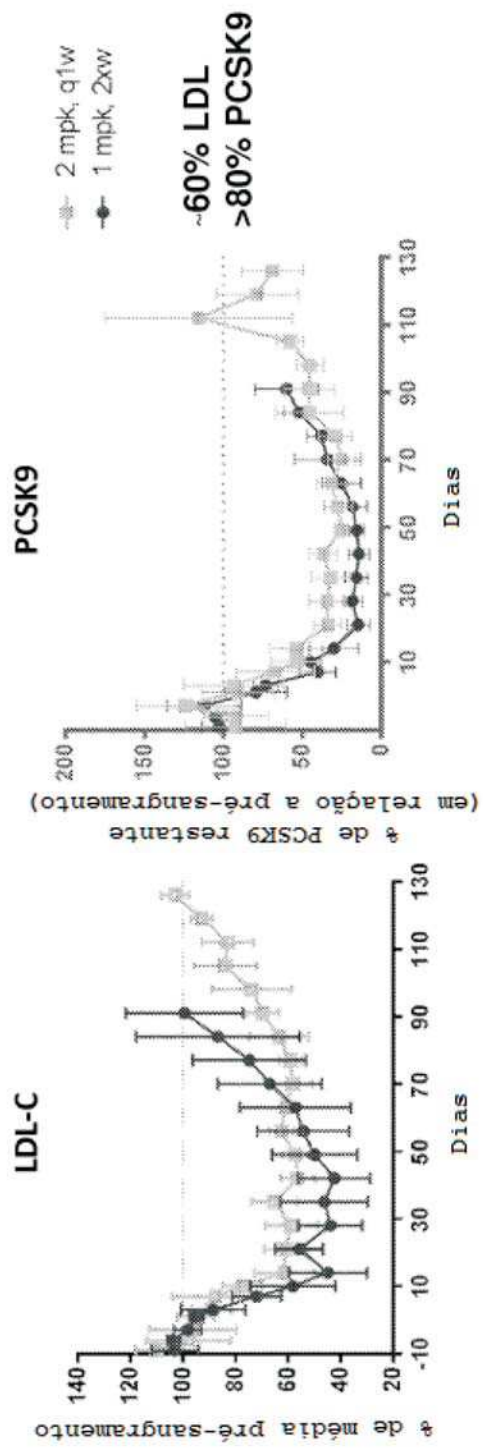


Figura 16

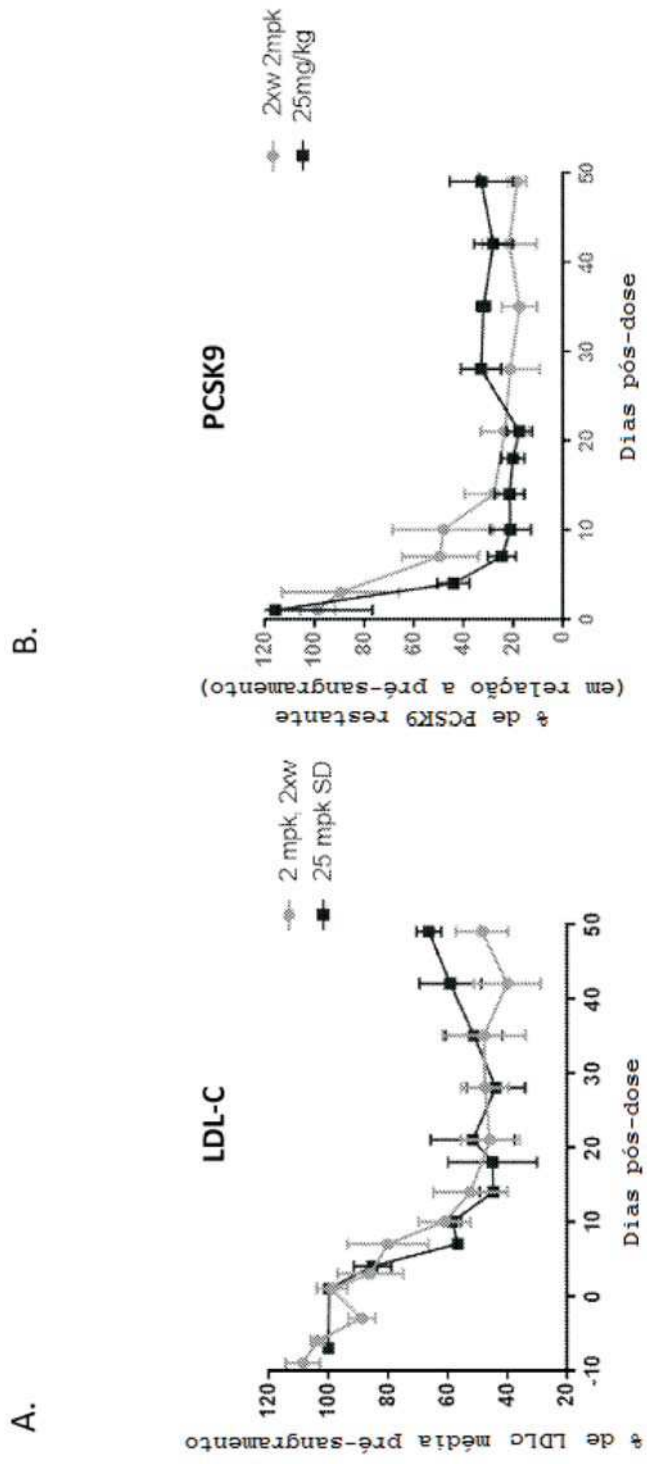


Figura 17

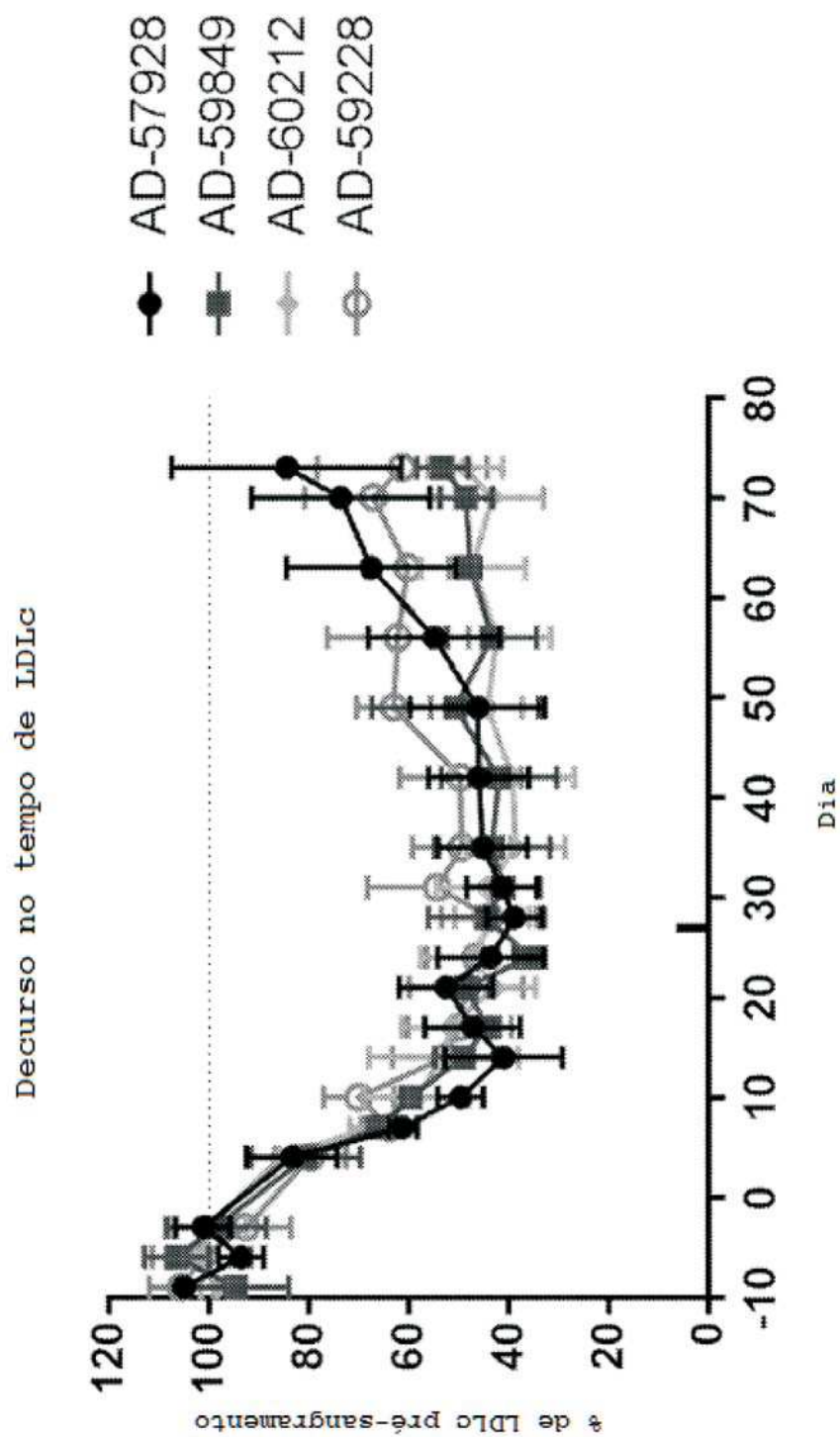


Figura 18

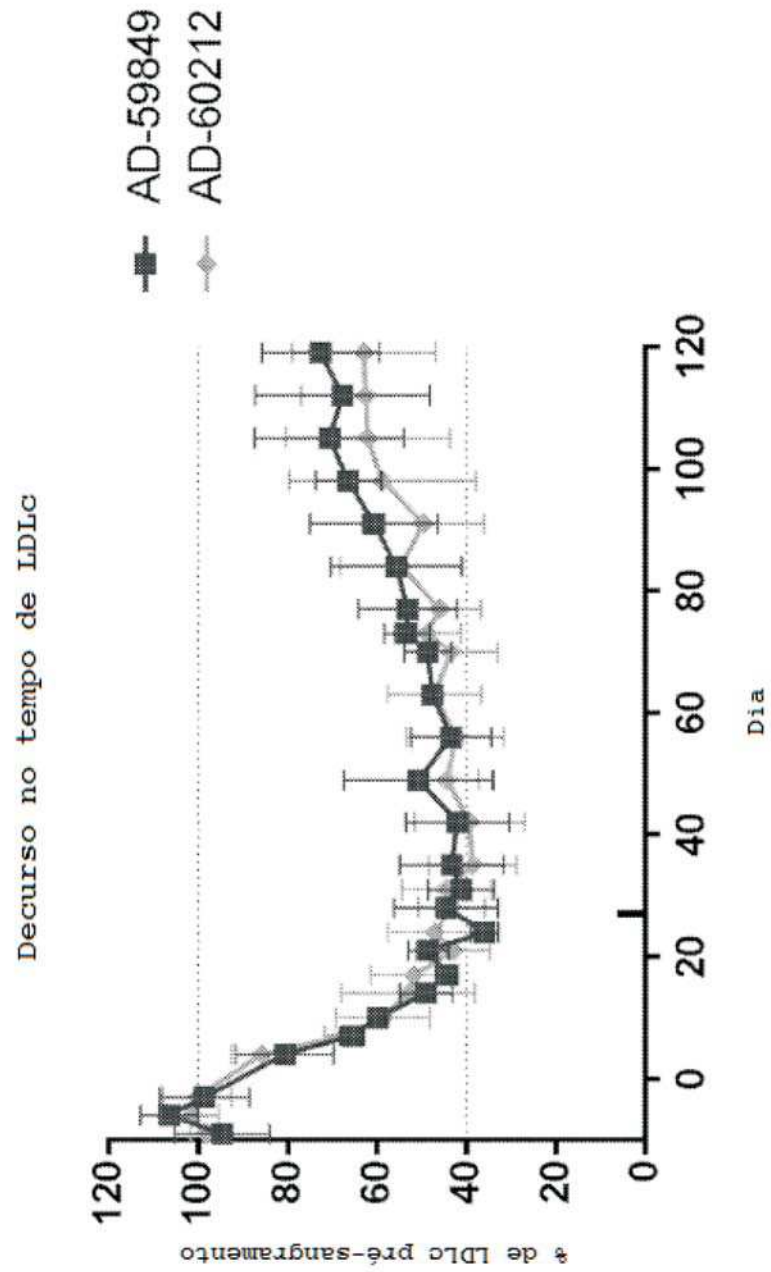


Figura 19