



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

(21) BR 112021012516-7 A2



(22) Data do Depósito: 20/12/2019

(43) Data da Publicação Nacional: 14/09/2021

(54) Título: COMPOSIÇÕES E MÉTODOS PARA INIBIR A EXPRESSÃO DE HMGB1

(51) Int. Cl.: A61K 31/7088; C07H 21/04; C12N 15/11; C12N 15/113.

(30) Prioridade Unionista: 03/01/2019 US 62/788,111; 28/12/2018 US 62/786,287; 31/12/2018 US 62/787,038.

(71) Depositante(es): DICERNA PHARMACEUTICALS, INC..

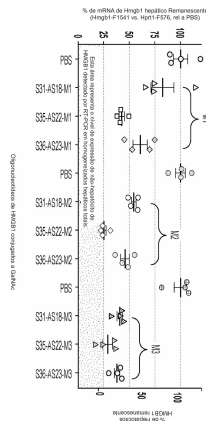
(72) Inventor(es): MARC ABRAMS; GIRISH CHOPDA; JIHYE PARK.

(86) Pedido PCT: PCT US2019067883 de 20/12/2019

(87) Publicação PCT: WO 2020/139764 de 02/07/2020

(85) Data da Fase Nacional: 24/06/2021

(57) Resumo: COMPOSIÇÕES E MÉTODOS PARA INIBIR A EXPRESSÃO DE HMGB1. A presente invenção refere-se a oligonucleotídeos, composições e métodos úteis para reduzir a expressão de HMGB1, particularmente em hepatócitos. Os oligonucleotídeos revelados para a redução da expressão de HMGB1 podem ser de filamento duplo ou de filamento único e podem ser modificados para características melhoradas tais como resistência mais forte a nucleases e imunogenicidade mais baixa. Os oligonucleotídeos revelados para a redução da expressão de HMGB1 também podem ser designados como incluindo ligantes de alveamento para alvejar uma célula ou órgão particulares, tais como os hepatócitos do fígado, e podem ser usados para tratar fibrose hepática e condições relacionadas.



Relatório Descritivo da Patente de Invenção para:  
**“COMPOSIÇÕES E MÉTODOS PARA INIBIR A EXPRESSÃO DE HMGB1”.**

REFERÊNCIA CRUZADA AOS PEDIDOS RELACIONADOS

[001] Este pedido reivindica o benefício sob 35 U.S.C. § 119(e) do Pedido Provisório dos EUA nº 62/786.287, depositado em 28 de dezembro de 2018, Pedido Provisório dos EUA nº 62/787.038, depositado em 31 de dezembro de 2018, e Pedido Provisório dos EUA nº 62/788.111, depositado em 3 de janeiro de 2019, os conteúdos inteiros de cada um dos quais são aqui incorporados por referência.

REFERÊNCIA À LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS, TABELA OU PROGRAMA DE COMPUTADOR

[002] A cópia oficial da Listagem de Sequências é apresentada simultaneamente com o relatório descritivo como um arquivo de texto em formato ASCII por intermédio de EFS-Web, com um nome de arquivo de “400930-014WO\_ST25.txt,” uma data de criação de 12 de dezembro de 2019, e um tamanho de 306 kilobytes. A Listagem de Sequências depositada por intermédio de EFS-Web é parte do relatório descritivo e é por meio deste incorporada em sua totalidade aqui por referência.

CAMPO DA INVENÇÃO

[003] A presente invenção refere-se a oligonucleotídeos e usos dos mesmo, particularmente usos se referindo ao tratamento de condições envolvendo fibrose.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

[004] Fibrose tecidual é uma condição caracterizada por um acúmulo anormal da matriz extracelular e fatores inflamatórios que resultam em cicatrizes e promovem lesão crônica de órgão. No fígado, a fibrose é uma resposta multicelular à lesão hepática que pode levar à cirrose e câncer hepatocelular. A resposta é frequentemente

desencadeada por lesão hepática associada com condições tais como alcoolismo, hepatite viral, doenças metabólicas, e doenças hepáticas, como doença hepática colestática, doença hepática gordurosa não alcoólica (NAFLD) e esteato-hepatite não alcoólica (NASH). Estudos implicaram na proteína da caixa de grupo de alta mobilidade 1 (HMGB1) como tendo um papel pró-fibrótico na fibrose hepática (ver, por exemplo, Li L-C, *et al.*, J. Cell. Mol. Med., 2014, 18(12):2331 - 39). HMGB1 é uma proteína nuclear liberada de células lesadas que funciona como um mediador pró-inflamatório e mostrou recrutar células estreladas hepáticas e células endoteliais hepáticas a sítios de lesão hepática (Seo *et al.*, Am J Physiol Gastrointest Fígado Physiol., 2013, 305:G838-G848). Acredita-se que células estreladas hepáticas desempenhem um papel central na progressão de fibrose hepática através de sua transformação em células miofibroblásticas proliferativas que promovem a atividade fibrogênica no fígado (ver, Kao YH, *et al.*, Transplant Proc., 2008, 40:2704-5).

#### BREVE SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[005] Os aspectos da revelação se referem a composições e métodos para tratar fibrose (por exemplo, fibrose hepática) em um indivíduo usando oligonucleotídeos que seletivamente inibem a expressão de HMGB1. Em algumas modalidades, oligonucleotídeos de RNAi potentes foram desenvolvidos para inibir seletivamente a expressão de HMGB1. Consequentemente, em algumas modalidades, os oligonucleotídeos de RNAi fornecidos nesta invenção são úteis para reduzir a expressão de HMGB1, particularmente em hepatócitos, e desse modo, diminuir ou prevenir a fibrose. Em algumas modalidades, os oligonucleotídeos de RNAi que incorporam estruturas de tetraloop com corte são conjugados a porções GalNAc para facilitar a liberação a hepatócitos hepáticos para inibir a expressão de HMGB1 para o tratamento de fibrose hepática (ver, por exemplo, os Exemplos 3 e 4,

avaliando os oligonucleotídeos de HMGB1 conjugados a GalNAc em hepatócitos primários de macaco ou humanos). Em algumas modalidades, métodos são fornecidos nesta invenção envolvendo o uso de oligonucleotídeos de RNAi para tratar indivíduos tendo ou suspeitos de terem condições hepáticas tais como, for exemplo, doença hepática colestática, doença hepática gordurosa não alcoólica (NAFLD) e esteato-hepatite não alcoólica (NASH). Em modalidades adicionais, a revelação é baseada em uma identificação de sequências chave de alvejamento de mRNA de HMGB1 que são particularmente suscetíveis a provocar o knockdown de mRNA usando abordagens com base em oligonucleotídeo de RNAi. Além disso, oligonucleotídeos de RNAi tendo padrões de modificação particulares são desenvolvidos nesta invenção (como esboçado na Tabela 2) e que são particularmente úteis para reduzir o nível de expressão de mRNA de HMGB1 *in vivo* são fornecidos nesta invenção.

[006] Alguns aspectos da presente revelação fornecem oligonucleotídeos para reduzir a expressão de HMGB1, o oligonucleotídeo compreendendo um filamento de sentido de 15 a 50 nucleotídeos em comprimento e um filamento anti-sentido de 15 a 30 nucleotídeos em comprimento, em que o filamento de sentido forma uma região duplex com o filamento anti-sentido, em que o filamento de sentido compreende uma sequência como apresentado em qualquer uma das SEQ ID NOs.: 1 a 13 e em que o filamento anti-sentido compreende uma sequência complementar selecionada a partir das SEQ ID NOs: 14 a 26.

[007] Em algumas modalidades, a sequência de filamento de sentido compreende ou consiste em uma sequência como apresentado em qualquer uma das SEQ ID NOs: 27 a 39. Em algumas modalidades, a sequência de filamento anti-sentido consiste em uma sequência como apresentado em qualquer uma das SEQ ID NOs: 14 a 26.

[008] Em algumas modalidades, a sequência de filamento de sentido compreende uma sequência como apresentado na SEQ ID NO: 27 e a sequência de filamento anti-sentido compreende uma sequência como apresentado na SEQ ID NO: 14.

[009] Em algumas modalidades, a sequência de filamento de sentido compreende uma sequência como apresentado na SEQ ID NO: 28 e a sequência de filamento anti-sentido compreende uma sequência como apresentado na SEQ ID NO: 15.

[010] Em algumas modalidades, a sequência de filamento de sentido compreende uma sequência como apresentado na SEQ ID NO: 29 e a sequência de filamento anti-sentido compreende uma sequência como apresentado na SEQ ID NO: 16.

[011] Em algumas modalidades, a sequência de filamento de sentido compreende uma sequência como apresentado na SEQ ID NO: 30 e a sequência de filamento anti-sentido compreende uma sequência como apresentado na SEQ ID NO: 17.

[012] Em algumas modalidades, a sequência de filamento de sentido compreende uma sequência como apresentado na SEQ ID NO: 31 e a sequência de filamento anti-sentido compreende uma sequência como apresentado na SEQ ID NO: 18.

[013] Em algumas modalidades, a sequência de filamento de sentido compreende uma sequência como apresentado na SEQ ID NO: 32 e a sequência de filamento anti-sentido compreende uma sequência como apresentado na SEQ ID NO: 19.

[014] Em algumas modalidades, a sequência de filamento de sentido compreende uma sequência como apresentado na SEQ ID NO: 33 e a sequência de filamento anti-sentido compreende uma sequência como apresentado na SEQ ID NO: 20.

[015] Em algumas modalidades, a sequência de filamento de sentido compreende uma sequência como apresentado na SEQ ID NO:

34 e a sequência de filamento anti-sentido compreende uma sequência como apresentado na SEQ ID NO: 21.

[016] Em algumas modalidades, a sequência de filamento de sentido compreende uma sequência como apresentado na SEQ ID NO: 35 e a sequência de filamento anti-sentido compreende uma sequência como apresentado na SEQ ID NO: 22.

[017] Em algumas modalidades, a sequência de filamento de sentido compreende uma sequência como apresentado na SEQ ID NO: 36 e a sequência de filamento anti-sentido compreende uma sequência como apresentado na SEQ ID NO: 23.

[018] Em algumas modalidades, a sequência de filamento de sentido compreende uma sequência como apresentado na SEQ ID NO: 37 e a sequência de filamento anti-sentido compreende uma sequência como apresentado na SEQ ID NO: 24.

[019] Em algumas modalidades, a sequência de filamento de sentido compreende uma sequência como apresentado na SEQ ID NO: 38 e a sequência de filamento anti-sentido compreende uma sequência como apresentado na SEQ ID NO: 25.

[020] Em algumas modalidades, a sequência de filamento de sentido compreende uma sequência como apresentado na SEQ ID NO: 39 e a sequência de filamento anti-sentido compreende uma sequência como apresentado na SEQ ID NO: 26.

[021] Em algumas modalidades, o oligonucleotídeo compreende pelo menos um nucleotídeo modificado.

[022] Em algumas modalidades, todos os nucleotídeos do oligonucleotídeo aqui descrito são modificados. Em algumas modalidades, o nucleotídeo modificado compreende uma 2'-modificação. Em algumas modalidades, a 2'-modificação é um 2'-fluoro ou 2'-O-metila.

[023] Em algumas modalidades, uma ou mais das posições 1, 2,

4, 6, 7, 12, 14, 16, 18 a 27, e 31 a 36 do filamento de sentido, e/ou uma ou mais das posições 1, 4, 6, 8, 9, 11, 13, 15, 18, e 20 a 22 do filamento anti-sentido são modificadas com uma 2'-O-metila. Em algumas modalidades, todas as posições 1, 2, 4, 6, 7, 12, 14, 16, 18 a 27, e 31 a 36 do filamento de sentido, e todas as posições 1, 4, 6, 8, 9, 11, 13, 15, 18, e 20 a 22 do filamento anti-sentido são modificadas com uma 2'-O-metila. Em algumas modalidades, uma ou mais das posições 3, 5, 8 a 11, 13, 15, e 17 do filamento de sentido, e/ou uma ou mais das posições 2, 3, 5, 7, 10, 12, 14, 16, 17, e 19 do filamento anti-sentido são modificadas com um 2'-fluoro. Em algumas modalidades, todas as posições 3, 5, 8 a 11, 13, 15, e 17 do filamento de sentido, e todas as posições 2, 3, 5, 7, 10, 12, 14, 16, 17, e 19 do filamento anti-sentido são modificadas com um 2'-fluoro.

[024] Em algumas modalidades, uma ou mais das posições 1 a 7, 12 a 27, e 31 a 36 do filamento de sentido, e/ou uma ou mais das posições 1, 4, 6, 8, 9, 11 a 13, e 15 a 22 do filamento anti-sentido são modificadas com uma 2'-O-metila. Em algumas modalidades, todas as posições 1 a 7, 12 a 27, e 31 a 36 do filamento de sentido, e todas as posições 1, 4, 6, 8, 9, 11 a 13, e 15 a 22 do filamento anti-sentido são modificadas com uma 2'-O-metila. Em algumas modalidades, uma ou mais das posições 8 a 11 do filamento de sentido, e/ou uma ou mais das posições 2, 3, 5, 7, 10, e 14 do filamento anti-sentido são modificadas com um 2'-fluoro. Em algumas modalidades, todas as posições 8 a 11 do filamento de sentido, e todas as posições 2, 3, 5, 7, 10, e 14 do filamento anti-sentido são modificadas com um 2'-fluoro.

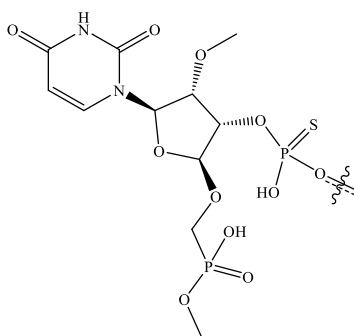
[025] Em algumas modalidades, uma ou mais das posições 1, 2, 4 a 7, 9, 11, 14 a 16, 18 a 27, e 31 a 36 do filamento de sentido, e/ou uma ou mais das posições 1, 6, 8, 9, 11, 13, 15, 18, e 20 a 22 do filamento anti-sentido são modificadas com uma 2'-O-metila. Em algumas modalidades, todas as posições 1, 2, 4 a 7, 9, 11, 14 a 16, 18 a 27, e 31

a 36 do filamento de sentido, e todas as posições 1, 6, 8, 9, 11, 13, 15, 18, e 20 a 22 do filamento anti-sentido são modificadas com uma 2'-O-metila. Em algumas modalidades, uma ou mais das posições 3, 8, 10, 12, 13, e 17 do filamento de sentido, e/ou uma ou mais das posições 2 a 5, 7, 10, 12, 14, 16, 17, e 19 do filamento anti-sentido são modificadas com um 2'-fluoro. Em algumas modalidades, todas as posições 3, 8, 10, 12, 13, e 17 do filamento de sentido, e todas as posições 2 a 5, 7, 10, 12, 14, 16, 17, e 19 do filamento anti-sentido são modificadas com um 2'-fluoro.

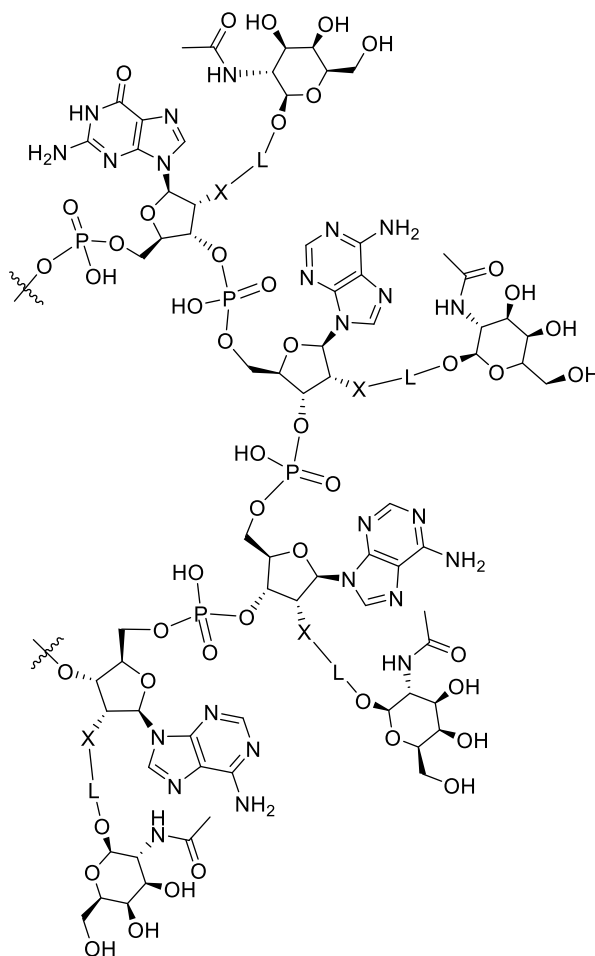
[026] Em algumas modalidades, o oligonucleotídeo compreende pelo menos uma ligação internucleotídica modificada. Em algumas modalidades, a pelo menos uma ligação internucleotídica modificada é uma ligação fosforotioato.

[027] Em algumas modalidades, o oligonucleotídeo tem uma ligação fosforotioato entre uma ou mais das: posições 1 e 2 do filamento de sentido, posições 1 e 2 do filamento anti-sentido, posições 2 e 3 do filamento anti-sentido, posições 3 e 4 do filamento anti-sentido, posições 20 e 21 do filamento anti-sentido, e posições 21 e 22 do filamento anti-sentido. Em algumas modalidades, o oligonucleotídeo tem uma ligação fosforotioato entre cada uma das: posições 1 e 2 do filamento de sentido, posições 1 e 2 do filamento anti-sentido, posições 2 e 3 do filamento anti-sentido, posições 20 e 21 do filamento anti-sentido, e posições 21 e 22 do filamento anti-sentido.

[028] Em algumas modalidades, a uridina na primeira posição do filamento anti-sentido compreende um análogo de fosfato. Em algumas modalidades, o oligonucleotídeo compreende a estrutura seguinte na posição 1 do filamento anti-sentido:



[029] Em algumas modalidades, um ou mais dos nucleotídeos da sequência -AAA- nas posições 28 a 30 no filamento de sentido são conjugados a uma porção GalNAc monovalente. Em algumas modalidades, cada um dos nucleotídeos da sequência -AAA- nas posições 28 a 30 no filamento de sentido é conjugado a uma porção GalNAc monovalente. Em algumas modalidades, o motivo -AAA- nas posições 28 a 30 no filamento de sentido compreende a estrutura:



[030] em que:



[034] Outros aspectos da presente revelação fornecem oligonucleotídeos para reduzir a expressão de HMGB1, o oligonucleotídeo compreendendo um filamento anti-sentido de 15 a 30 nucleotídeos em comprimento, em que o filamento anti-sentido tem uma região de complementaridade à HMGB1 que é complementar a pelo menos 15 nucleotídeos contíguos de uma sequência como apresentado em qualquer uma das SEQ ID NOs: 1 a 13.

[035] Em algumas modalidades, o filamento anti-sentido é 19 a 27 nucleotídeos em comprimento. Em algumas modalidades, o filamento anti-sentido é de 22 nucleotídeos em comprimento. Em algumas modalidades, o oligonucleotídeo compreende ainda um filamento de sentido de 15 a 50 nucleotídeos em comprimento, em que o filamento de sentido forma uma região duplex com o filamento anti-sentido. Em algumas modalidades, o filamento de sentido é de 19 a 50 nucleotídeos em comprimento. Em algumas modalidades, a região duplex é de 20 nucleotídeos em comprimento.

[036] Em algumas modalidades, o oligonucleotídeo para reduzir a expressão de HMGB1 compreendendo um filamento de sentido e um filamento anti-sentido, em que:

[037] (a) o filamento de sentido compreende uma sequência como apresentado na SEQ ID NO: 788 e o filamento anti-sentido compreende uma sequência como apresentado na SEQ ID NO: 814;

[038] (b) o filamento de sentido compreende uma sequência como apresentado na SEQ ID NO: 789 e o filamento anti-sentido compreende uma sequência como apresentado na SEQ ID NO: 815;

[039] (c) o filamento de sentido compreende uma sequência como apresentado na SEQ ID NO: 790 e o filamento anti-sentido compreende uma sequência como apresentado na SEQ ID NO: 816;

[040] (d) o filamento de sentido compreende uma sequência como apresentado na SEQ ID NO: 791 e o filamento anti-sentido compreende

uma sequência como apresentado na SEQ ID NO: 817;

[041] (e) o filamento de sentido compreende uma sequência como apresentado na SEQ ID NO: 792 e o filamento anti-sentido compreende uma sequência como apresentado na SEQ ID NO: 818;

[042] (f) o filamento de sentido compreende uma sequência como apresentado na SEQ ID NO: 793 e o filamento anti-sentido compreende uma sequência como apresentado na SEQ ID NO: 819;

[043] (g) o filamento de sentido compreende uma sequência como apresentado na SEQ ID NO: 794 e o filamento anti-sentido compreende uma sequência como apresentado na SEQ ID NO: 820;

[044] (h) o filamento de sentido compreende uma sequência como apresentado na SEQ ID NO: 795 e o filamento anti-sentido compreende uma sequência como apresentado na SEQ ID NO: 821;

[045] (i) o filamento de sentido compreende uma sequência como apresentado na SEQ ID NO: 796 e o filamento anti-sentido compreende uma sequência como apresentado na SEQ ID NO: 822;

[046] (j) o filamento de sentido compreende uma sequência como apresentado na SEQ ID NO: 797 e o filamento anti-sentido compreende uma sequência como apresentado na SEQ ID NO: 823;

[047] (k) o filamento de sentido compreende uma sequência como apresentado na SEQ ID NO: 798 e o filamento anti-sentido compreende uma sequência como apresentado na SEQ ID NO: 824;

[048] (l) o filamento de sentido compreende uma sequência como apresentado na SEQ ID NO: 799 e o filamento anti-sentido compreende uma sequência como apresentado na SEQ ID NO: 825;

[049] (m) o filamento de sentido compreende uma sequência como apresentado na SEQ ID NO: 800 e o filamento anti-sentido compreende uma sequência como apresentado na SEQ ID NO: 826;

[050] (n) o filamento de sentido compreende uma sequência como apresentado na SEQ ID NO: 801 e o filamento anti-sentido compreende

uma sequência como apresentado na SEQ ID NO: 827;

[051] (o) o filamento de sentido compreende uma sequência como apresentado na SEQ ID NO: 802 e o filamento anti-sentido compreende uma sequência como apresentado na SEQ ID NO: 828;

[052] (p) o filamento de sentido compreende uma sequência como apresentado na SEQ ID NO: 803 e o filamento anti-sentido compreende uma sequência como apresentado na SEQ ID NO: 829;

[053] (q) o filamento de sentido compreende uma sequência como apresentado na SEQ ID NO: 804 e o filamento anti-sentido compreende uma sequência como apresentado na SEQ ID NO: 830;

[054] (r) o filamento de sentido compreende uma sequência como apresentado na SEQ ID NO: 805 e o filamento anti-sentido compreende uma sequência como apresentado na SEQ ID NO: 831;

[055] (s) o filamento de sentido compreende uma sequência como apresentado na SEQ ID NO: 806 e o filamento anti-sentido compreende uma sequência como apresentado na SEQ ID NO: 832;

[056] (t) o filamento de sentido compreende uma sequência como apresentado na SEQ ID NO: 807 e o filamento anti-sentido compreende uma sequência como apresentado na SEQ ID NO: 833;

[057] (u) o filamento de sentido compreende uma sequência como apresentado na SEQ ID NO: 808 e o filamento anti-sentido compreende uma sequência como apresentado na SEQ ID NO: 834;

[058] (v) o filamento de sentido compreende uma sequência como apresentado na SEQ ID NO: 809 e o filamento anti-sentido compreende uma sequência como apresentado na SEQ ID NO: 835;

[059] (w) o filamento de sentido compreende uma sequência como apresentado na SEQ ID NO: 810 e o filamento anti-sentido compreende uma sequência como apresentado na SEQ ID NO: 836;

[060] (x) o filamento de sentido compreende uma sequência como apresentado na SEQ ID NO: 811 e o filamento anti-sentido compreende

uma sequência como apresentado na SEQ ID NO: 837;

[061] (y) o filamento de sentido compreende uma sequência como apresentado na SEQ ID NO:812 e o filamento anti-sentido compreende uma sequência como apresentado na SEQ ID NO: 838; ou

[062] (z) o filamento de sentido compreende uma sequência como apresentado na SEQ ID NO: 813 e o filamento anti-sentido compreende uma sequência como apresentado na SEQ ID NO: 839.

[063] Ainda fornecidas nesta invenção são composições compreendendo qualquer um dos oligonucleotídeos aqui descritos e um excipiente.

[064] Ainda fornecido nesta invenção são métodos de liberar um oligonucleotídeo a um indivíduo, o método compreendendo administrar a composição compreendendo qualquer um dos oligonucleotídeos aqui descritos ao indivíduo.

[065] Em algumas modalidades, o indivíduo tem ou está em risco de ter fibrose hepática. Em algumas modalidades, o indivíduo tem doença hepática colestática ou autoimune. Em algumas modalidades, a expressão da proteína HMGB1 é reduzida administrando-se ao indivíduo o oligonucleotídeo.

[066] Ainda fornecidos nesta invenção são métodos para tratar um indivíduo tendo ou em risco de ter fibrose hepática, o método compreendendo administrar ao indivíduo qualquer um dos oligonucleotídeos aqui descritos. Em algumas modalidades, o indivíduo tem doença hepática colestática ou autoimune. Em algumas modalidades, o indivíduo tem esteato-hepatite não alcoólica (NASH). Em algumas modalidades, o oligonucleotídeo é administrado antes da exposição do indivíduo a um agente hepatotóxico. Em algumas modalidades, o oligonucleotídeo é administrado subsequente à exposição do indivíduo a um agente hepatotóxico. Em algumas modalidades, o oligonucleotídeo é administrado simultaneamente com

a exposição do indivíduo a um agente hepatotóxico. Em algumas modalidades, a administração resulta em uma redução nos níveis hepáticos de HMGB1. Em algumas modalidades, a administração resulta em uma redução nos níveis séricos de HMGB1.

[067] Ainda fornecido nesta invenção é o uso de qualquer um dos oligonucleotídeos aqui descritos para tratar um indivíduo tendo ou em risco de ter fibrose hepática. Em algumas modalidades, o indivíduo tem doença hepática colestática ou autoimune. Em algumas modalidades, o indivíduo tem esteato-hepatite não alcoólica (NASH).

#### BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[068] Os desenhos anexos, que são incorporados e constituem uma parte deste relatório descritivo, ilustram certas modalidades, e junto com a descrição por escrito, servem para fornecer exemplos não limitantes de certos aspectos das composições e métodos aqui revelados.

[069] FIGURA 1A e FIGURA 1B: Avaliação da atividade *in vivo* de 3 oligonucleotídeos de HMGB1 conjugados a GalNAc (FIGURA 1A) com 3 padrões de modificação diferentes (FIGURA 1B). Números de localização NM\_002128.5 foram usados no eixo x.

[070] FIGURA 2: Avaliação da atividade *in vivo* de 3 oligonucleotídeos de HMGB1 conjugados a GalNAc em três concentrações diferentes. Números de localização NM\_002128.5 foram usados no eixo x.

[071] FIGURA 3: Avaliação da atividade *in vivo* de três oligonucleotídeos de HMGB1 conjugados a GalNAc em 4 pontos no tempo diferentes. Números de localização NM\_002128.5 foram usados no eixo x.

[072] Figuras 4A a 4F: Triagem de 288 oligonucleotídeos de HMGB1 de RNAi triplos comuns em células Huh-7 (fígado humano). A posição do nucleotídeo em NM\_002128.5 que corresponde à

extremidade 3' do filamento de sentido de cada siRNA é indicada no eixo x. A porcentagem de mRNA remanescente é mostrada para cada um do ensaio em 5' (vermelho) e do ensaio em 3' (azul).

[073] FIGURA 5: Avaliação da atividade *in vivo* de 22 oligonucleotídeos de HMGB1 de RNAi identificados na triagem das Figuras 4A a 4F. Os 22 oligonucleotídeos de HMGB1 são conjugados a GalNAc com 2 padrões de modificação diferentes (M2 e M3, ver a FIGURA 1B para padrões de modificação). Números de localização NM\_002128.5 foram usados no eixo x.

[074] FIGURA 6: Avaliação da atividade *in vivo* dos principais oligonucleotídeos de HMGB1 conjugados a GalNAc 21 dias depois da administração. Números de localização NM\_002128.5 foram usados no eixo x.

[075] FIGURA 7: Oligonucleotídeos de HMGB1 conjugados a GalNAc que foram testados em hepatócitos primários de macaco/humanos. A seta indica que o oligonucleotídeo também é selecionado para ser testado na triagem de primata não humano.

[076] Figuras 8A a 8D: Atividade dos 6 oligonucleotídeos de HMGB1 conjugados a GalNAc em hepatócitos primários de macaco (cinomolgo) e humanos mostrados pela curva de IC50. (FIGURA 8A) Hepatócito de cyno #1. (FIGURA 8B) Hepatócito de cyno #2. (FIGURA 8C) Hepatócito humano #1. (FIGURA 8D) Oligonucleotídeo de LDHA conjugado a GalNAc de controle positivo.

[077] Figuras 9A a 9B: Avaliação da atividade *in vivo* de oligonucleotídeos de HMGB1 conjugados a GalNAc em primatas não humanos. (FIGURA 9A) 4 mg/kg, uma dose. (FIGURA 9B) Dosagem de 2 mg/kg, 4 doses repetidas.

[078] Figuras 10A a 10F: Triagem de 6 oligonucleotídeos de HMGB1 de RNAi em 3 concentrações diferentes (0,03 nM, 0,1 nM e 1 nM) em linhagens celulares de camundongo, macaco e humanas.

(FIGURA 10A) Linhagem celular de camundongo, ensaio em 5'. (FIGURA 10B) Linhagem celular de camundongo, ensaio em 3'. (FIGURA 10C) Linhagem celular de macaco, ensaio em 5'. (FIGURA 10D) Linhagem celular de macaco, ensaio em 3'. (FIGURA 10E) Linhagem celular humana, ensaio em 5'. (FIGURA 10F) Linhagem celular humana, ensaio em 3'.

[079] Figuras 11A a 11C: Atividade de 4 oligonucleotídeos de HMGB1 conjugados a GalNAc em células Huh-7 por curva de IC50. Curvas de IC50 de HMGB1 (FIGURA 11A), HMGB2 (FIGURA 11B) e HMGB3 (FIGURA 11C), normalizadas para simular.

#### DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[080] De acordo com alguns aspectos, a revelação fornece oligonucleotídeos que alvejam mRNA de HMGB1 que são eficazes para reduzir a expressão de HMGB1 em células, particularmente células hepáticas (por exemplo, hepatócitos) para o tratamento de fibrose hepática. Consequentemente, em aspectos relacionados, a revelação fornece métodos para tratar fibrose que envolvem seletivamente reduzir a expressão do gene HMGB1 no fígado. Em certas modalidades, os oligonucleotídeos de alvejamento de HMGB1 fornecidos nesta invenção são designados para liberação a células selecionadas de tecidos alvos (por exemplo, hepatócitos hepáticos) para tratar fibrose nestes tecidos. Oligonucleotídeos de RNAi tendo padrões de modificação particulares são aqui revelados (como esboçado na Tabela 2) que são particularmente úteis para o knocking down de mRNA de HMGB1 *in vivo*.

[081] Os aspectos adicionais da revelação, incluindo uma descrição dos termos definidos, são fornecidos abaixo.

#### Definições

[082] **Aproximadamente:** Tal como aqui utilizado, o termo “aproximadamente” ou “cerca de,” como aplicado a um ou mais valores

de interesse, se refere a um valor que é similar a um valor de referência estabelecido. Em certas modalidades, o termo “aproximadamente” ou “cerca de” se refere a uma faixa de valores que caem dentro de 25 %, 20 %, 19 %, 18 %, 17 %, 16 %, 15 %, 14 %, 13 %, 12 %, 11 %, 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 %, ou menos em qualquer direção (maior ou menor) do valor de referência estabelecido a menos que de outro modo estabelecido ou de outro modo evidente a partir do contexto (exceto onde tal número excederia 100 % de um valor possível).

[083] **Administração:** Tal como aqui utilizado, os termos “administrando” ou “administração” significam fornecer uma substância (por exemplo, um oligonucleotídeo) a um indivíduo em uma maneira que seja farmacologicamente útil (por exemplo, para tratar uma condição no indivíduo).

[084] **Receptor de Asialoglicoproteína (ASGPR):** Tal como aqui utilizado, o termo “receptor de Asialoglicoproteína” ou “ASGPR” se refere a uma lectina do tipo C bipartida formada por uma subunidade maior de 48 kDa (ASGPR-1) e menor de 40 kDa (ASGPR-2). ASGPR é principalmente expressada na superfície sinusoidal de hepatócitos, e tem um principal papel na ligação, internalização, e depuração subsequente de glicoproteínas circulantes que contêm resíduos terminais de galactose ou N-acetilgalactosamina (asialoglicoproteínas).

[085] **Atenua:** Tal como aqui utilizado, o termo “atenua” significa reduz ou eficazmente para. Como um exemplo não limitante, um ou mais dos tratamentos fornecidos nesta invenção podem reduzir ou eficazmente parar o início ou progressão de fibrose hepática ou inflamação hepática em um indivíduo. Esta atenuação pode ser exemplificada por, por exemplo, uma diminuição em um ou mais aspectos (por exemplo, sintomas, características teciduais, e atividade celular, inflamatória ou imunológica, etc.) de fibrose hepática ou

inflamação hepática, nenhuma progressão detectável (piora) de um ou mais aspectos de fibrose hepática ou inflamação hepática, ou nenhum aspecto detectável de fibrose hepática ou inflamação hepática em um indivíduo quando eles poderiam ser de outro modo esperados.

[086] **Complementar:** Tal como aqui utilizado, o termo “complementar” se refere a uma relação estrutural entre dois nucleotídeos (por exemplo, em dois ácidos nucleicos opostos ou em regiões opostas de um único filamento de ácido nucleico) que permite que os dois nucleotídeos formem pares de base entre si. Por exemplo, um nucleotídeo de purina de um ácido nucleico que é complementar a um nucleotídeo de pirimidina de um ácido nucleico oposto pode formar par de base formando-se ligações hidrogênio entre si. Em algumas modalidades, nucleotídeos complementares podem formar par de base na maneira de Watson-Crick ou em qualquer outra maneira que leva em consideração a formação de duplexes estáveis. Em algumas modalidades, dois ácidos nucleicos podem ter regiões de nucleotídeos múltiplos que são complementares entre si de modo a formar regiões de complementaridade, como aqui descrito.

[087] **Desoxirribonucleotídeo:** Tal como aqui utilizado, o termo “desoxirribonucleotídeo” se refere a um nucleotídeo tendo um hidrogênio no lugar de uma hidroxila na posição 2’ de seu açúcar pentose em comparação a um ribonucleotídeo. Um desoxirribonucleotídeo modificado é um desoxirribonucleotídeo tendo uma ou mais modificações ou substituições de átomos exceto na posição 2’, incluindo modificações ou substituições no açúcar, grupo fosfato ou base ou modificações ou substituições dos mesmos.

[088] **Oligonucleotídeo de filamento duplo:** Tal como aqui utilizado, o termo “oligonucleotídeo de filamento duplo” se refere a um oligonucleotídeo que está substancialmente em uma forma de duplex. Em algumas modalidades, o pareamento de base complementar de

região(ões) duplex de um oligonucleotídeo de filamento duplo é formado entre sequências antiparalelas de nucleotídeos de filamentos de ácido nucleico covalentemente separados. Em algumas modalidades, o pareamento de base complementar de região(ões) duplex de um oligonucleotídeo de filamento duplo é formado entre sequências antiparalelas de nucleotídeos de filamentos de ácido nucleico que são covalentemente ligados. Em algumas modalidades, o pareamento de base complementar de região(ões) duplex de um oligonucleotídeo de filamento duplo é formado a partir de filamento único de ácido nucleico que é enovelado (por exemplo, por intermédio de um grampo de cabelo) para fornecer sequências antiparalelas de nucleotídeos complementares que formam pares de base entre si. Em algumas modalidades, um oligonucleotídeo de filamento duplo compreende dois filamentos de ácido nucleico covalentemente separados que são completamente duplexados entre si. Entretanto, em algumas modalidades, um oligonucleotídeo de filamento duplo compreende dois filamentos de ácido nucleico covalentemente separados que são parcialmente duplexados, por exemplo, tendo saliências em uma ou ambas as extremidades. Em algumas modalidades, um oligonucleotídeo de filamento duplo compreende sequências antiparalelas de nucleotídeos que são parcialmente complementares, e assim, podem ter uma ou mais incompatibilidades, que podem incluir incompatibilidades internas ou incompatibilidades de extremidade.

[089] **Duplex:** Tal como aqui utilizado, o termo “duplex”, em referência a ácidos nucleicos (por exemplo, oligonucleotídeos), refere-se a uma estrutura formada por meio de emparelhamento de bases complementares de duas sequências antiparalelas de nucleotídeos..

[090] **Excipiente:** Tal como aqui utilizado, o termo “excipiente” se refere a um agente não terapêutico que pode ser incluído em uma composição, por exemplo, para fornecer ou contribuir para uma

consistência desejada ou efeito estabilizador.

[091] **Hepatócito:** Tal como aqui utilizado, o termo “hepatócito” ou “hepatócitos” refere-se a células dos tecidos parenquimatosos do fígado. Essas células constituem aproximadamente 70-85 % da massa do fígado e fabricam albumina sérica, fibrinogênio e o grupo protrombina de fatores de coagulação (exceto para os Fatores 3 e 4). Os marcadores para células da linhagem de hepatócitos podem incluir, mas não estão limitados a: transtirretina (Ttr), glutamina sintetase (Glul), fator nuclear de hepatócitos 1a (Hnf1a) e fator nuclear de hepatócitos 4a (Hnf4a). Os marcadores para hepatócitos maduros podem incluir, mas não estão limitados a: citocromo P450 (Cyp3a11), fumarilacetoacetato hidrolase (Fah), glicose 6-fosfato (G6p), albumina (Alb) e OC2-2F8 (ver, por exemplo, Huch *et al.*, Nature, 2013, 494 (7436): 247-250, cujos conteúdos relativos a marcadores de hepatócitos são aqui incorporados por referência.

[092] **Agente hepatotóxico:** Tal como aqui utilizado, um “agente hepatotóxico” é um composto químico, vírus ou outra substância que é tóxica para o fígado ou pode ser processada para formar um metabólito que é tóxico para o fígado. Os agentes hepatotóxicos podem incluir, mas não estão limitados a, tetracloreto de carbono (CCl<sub>4</sub>), acetaminofeno (paracetamol), cloreto de vinil, arsênico, clorofórmio e anti-inflamatórios não esteroides (como aspirina e fenilbutazona).

[093] **Inflamação hepática:** Tal como aqui utilizado, o termo “inflamação do fígado” ou “hepatite” refere-se a uma condição física em que o fígado fica inchado, disfuncional e/ou dolorido, especialmente como resultado de lesão ou infecção, que pode ser causada pela exposição a um agente hepatotóxico. Os sintomas podem incluir icterícia (amarelecimento da pele ou dos olhos), fadiga, fraqueza, náuseas, vômitos, redução do apetite e perda de peso. A inflamação do fígado, se não tratada, pode progredir para fibrose, cirrose, insuficiência

hepática ou câncer de fígado.

[094] **Fibrose hepática:** Tal como aqui utilizado, o termo “fibrose hepática” ou “fibrose hepática” refere-se a um acúmulo excessivo no fígado de proteínas da matriz extracelular, que podem incluir colágenos (I, III e IV), fibronectina, undulina, elastina, laminina, hialuronano e proteoglicanos resultantes de inflamação e morte de células hepáticas. A fibrose hepática, se não tratada, pode progredir para cirrose, insuficiência hepática ou câncer de fígado.

[095] **Alça:** Tal como aqui utilizado, o termo “alça” refere-se a uma região desemparelhada de um ácido nucleico (por exemplo, oligonucleotídeo) que é flanqueada por duas regiões antiparalelas do ácido nucleico que são suficientemente complementares entre si, de modo que sob condições de hibridização apropriadas (por exemplo, em um tampão de fosfato, em uma célula), as duas regiões antiparalelas, que flanqueiam a região desemparelhada, hibridizam para formar um duplex (referido como uma “haste”).

[096] **Ligação internucleotídica modificada:** Tal como aqui utilizado, o termo “ligação internucleotídica modificada” refere-se a uma ligação internucleotídica tendo uma ou mais modificações químicas em comparação com uma ligação internucleotídica de referência compreendendo uma ligação fosfodiéster. Em algumas modalidades, um nucleotídeo modificado é uma ligação de ocorrência não natural. Normalmente, uma ligação internucleotídica modificada confere uma ou mais propriedades desejáveis a um ácido nucleico em que a ligação internucleotídica modificada está presente. Por exemplo, um nucleotídeo modificado pode melhorar a estabilidade térmica, resistência à degradação, resistência de nuclease, solubilidade, biodisponibilidade, bioatividade, imunogenicidade reduzida, etc.

[097] **Nucleotídeo modificado:** Tal como aqui utilizado, o termo “nucleotídeo modificado” refere-se a um nucleotídeo com uma ou mais

modificações químicas em comparação com um nucleotídeo de referência correspondente selecionado a partir de: ribonucleotídeo de adenina, ribonucleotídeo de guanina, ribonucleotídeo de citosina, ribonucleotídeo de uracila, desoxirribonucleotídeo de adenina, desoxirribonucleotídeo de guanina e timidina desoxirribonucleotídeo. Em algumas modalidades, um nucleotídeo modificado é um nucleotídeo de ocorrência não natural. Em algumas modalidades, um nucleotídeo modificado tem uma ou mais modificações químicas em seu açúcar, nucleobase e/ou grupo fosfato. Em algumas modalidades, um nucleotídeo modificado tem uma ou mais frações químicas conjugadas a um nucleotídeo de referência correspondente. Normalmente, um nucleotídeo modificado confere uma ou mais propriedades desejáveis a um ácido nucleico no qual o nucleotídeo modificado está presente. Por exemplo, um nucleotídeo modificado pode melhorar a estabilidade térmica, resistência à degradação, resistência de nuclease, solubilidade, biodisponibilidade, bioatividade, imunogenicidade reduzida, etc.

[098] **Estrutura de tetraloop com corte:** Uma “estrutura de tetraloop com corte” é uma estrutura de um oligonucleotídeo de RNAi caracterizada pela presença de filamentos de sentido (passageiro) e anti-sentido (guia) separados, em que o filamento de sentido tem uma região de complementaridade com o filamento anti-sentido, e na qual pelo menos um dos filamentos, geralmente o filamento de sentido, tem um tetraloop configurado para estabilizar uma região de haste adjacente formada dentro de pelo menos um filamento.

[099] **Oligonucleotídeo:** Tal como aqui utilizado, o termo “oligonucleotídeo” refere-se a um ácido nucleico curto, por exemplo, com menos de 100 nucleotídeos de comprimento. Um oligonucleotídeo pode ser de filamento único ou duplo. Um oligonucleotídeo pode ou não ter regiões duplex. Como um conjunto de exemplos não limitativos, um

oligonucleotídeo pode ser, mas não está limitado a, um pequeno RNA interferente (siRNA), microRNA (miRNA), RNA em gancho curto (shRNA), RNA interferente do substrato dicer (dsiRNA), oligonucleotídeo anti-sentido, siRNA curto ou siRNA de filamento único. Em algumas modalidades, um oligonucleotídeo de filamento duplo é um oligonucleotídeo de RNAi.

[0100] **Saliência:** Como usado neste documento, o termo “saliência” refere-se a nucleotídeo(s) de emparelhamento sem base terminal resultante de um filamento ou região que se estende além do término de um filamento complementar com a qual o filamento ou região formam um duplex. Em algumas modalidades, uma saliência compreende um ou mais nucleotídeos desemparelhados que se estendem de uma região duplex no terminal 5’ ou terminal 3’ de um oligonucleotídeo de filamento duplo. Em certas modalidades, a saliência é uma saliência de 3’ ou 5’ na filamento anti-sentido ou filamento de sentido de um oligonucleotídeos de filamento duplo.

[0101] **Análogo de fosfato:** Tal como aqui utilizado, o termo “análogo de fosfato” se refere a uma fração química que imita as propriedades eletrostáticas e/ou estéricas de um grupo fosfato. Em algumas modalidades, um análogo de fosfato é posicionado no nucleotídeo terminal 5’ de um oligonucleotídeo no lugar de um fosfato 5’, que muitas vezes é suscetível à remoção enzimática. Em algumas modalidades, os análogos de fosfato 5’ contêm uma ligação resistente à fosfatase. Exemplos de análogos de fosfato incluem 5’ fosfonatos, tais como 5’ metilenofosfonato (5’-MP) e 5’-(E)-vinilfosfonato (5’-VP). Em algumas modalidades, um oligonucleotídeo tem um análogo de fosfato em uma posição de carbono 4’ do açúcar (referido como um “análogo de fosfato 4’”) em um nucleotídeo de terminal 5’. Um exemplo de um análogo de 4’-fosfato é oximetilfosfonato, em que o átomo de oxigênio do grupo oximetil está ligado à fração de açúcar (por exemplo, em seu

carbono 4') ou análogo deste (ver, por exemplo, publicação de patente internacional WO/2018/045317, cujo conteúdo relacionado a análogos de fosfato é aqui incorporado por referência. Outras modificações foram desenvolvidas para a extremidade 5' dos oligonucleotídeos (ver, por exemplo, WO 2011/133871; Patente U.S. Nº 8.927.513; e Prakash *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 2015, 43(6):2993 - 3011, os conteúdos de cada dos quais se referindo a análogos de fosfato são aqui incorporados por referência).

[0102] **Expressão reduzida:** Tal como aqui utilizado, o termo “expressão reduzida” de um gene refere-se a uma diminuição na quantidade de transcrito de RNA ou proteína codificada pelo gene e/ou uma diminuição na quantidade de atividade do gene em um célula ou indivíduo, em comparação com uma célula ou indivíduo de referência apropriado. Por exemplo, o ato de tratar uma célula com um oligonucleotídeo de filamento duplo (por exemplo, um tendo um filamento anti-sentido que é complementar à sequência de mRNA de HMGB1) pode resultar em uma diminuição na quantidade de RNA transcrito, proteína e/ou atividade (por exemplo, codificado pelo gene HMGB1) em comparação com uma célula que não é tratada com o oligonucleotídeo de filamento duplo. Da mesma forma, “redução da expressão”, tal como aqui utilizado, refere-se a um ato que resulta na expressão reduzida de um gene (por exemplo, HMGB1).

[0103] **Região de complementaridade:** Tal como aqui utilizado, o termo “região de complementaridade” se refere a uma sequência de nucleotídeos de um ácido nucleico (por exemplo, um oligonucleotídeo de filamento duplo) que é suficientemente complementar a uma sequência antiparalela de nucleotídeos para permitir a hibridização entre as duas sequências de nucleotídeos sob condições de hibridização apropriadas, por exemplo, em um tampão de fosfato, em uma célula, etc.

[0104] **Ribonucleotídeo:** Tal como aqui utilizado, o termo “ribonucleotídeo” se refere a um nucleotídeo tendo uma ribose como seu açúcar pentose, que contém um grupo hidroxila em sua posição 2'. Um ribonucleotídeo modificado é um ribonucleotídeo com uma ou mais modificações ou substituições de átomos diferentes da posição 2', incluindo modificações ou substituições na ou da ribose, grupo fosfato ou base.

[0105] **Oligonucleotídeo de RNAi:** Tal como aqui utilizado, o termo “oligonucleotídeo de RNAi” refere-se a (a) um oligonucleotídeo de filamento duplo tendo um filamento de sentido (passageiro) e um filamento anti-sentido (guia), em que o filamento anti-sentido ou parte do filamento anti-sentido é usada pela endonuclease Argonaute 2 (Ago2) na clivagem de um mRNA alvo ou (b) um oligonucleotídeo de filamento único com um único filamento anti-sentido, onde esse filamento anti-sentido (ou parte desse filamento anti-sentido) é usado pela endonuclease Ago2 na clivagem de um mRNA alvo.

[0106] **Filamento:** Tal como aqui utilizado, o termo “filamento” refere-se a uma única sequência contígua de nucleotídeos ligados entre si através de ligações internucleotídicas (por exemplo, ligações fosfodiéster, ligações fosforotioato). Em algumas modalidades, um fio tem duas extremidades livres, por exemplo, uma extremidade 5' e uma extremidade 3'.

[0107] **Indivíduo:** Tal como aqui utilizado, o termo “indivíduo” significa qualquer mamífero, incluindo camundongos, coelhos, e humanos. Em algumas modalidades, o indivíduo é um primata humano ou não humano. Os termos “indivíduo” ou “paciente” podem ser usados permutavelmente com “indivíduo”.

[0108] **Sintético:** Tal como aqui utilizado, o termo “sintético” refere-se a um ácido nucleico ou outra molécula que é sintetizada artificialmente (por exemplo, usando uma máquina (por exemplo, um

sintetizador de ácido nucleico de estado sólido)) ou que de outra forma não é derivado de uma fonte natural ( por exemplo, uma célula ou organismo) que normalmente produz a molécula.

[0109] **Ligante de alvejamento:** Tal como aqui utilizado, o termo “ligante de alvejamento” se refere a uma molécula (por exemplo, um carboidrato, amino açúcar, colesterol, polipeptídeo ou lipídio) que se liga seletivamente a uma molécula cognata (por exemplo, um receptor) de um tecido ou célula de interesse e que é conjugável a outra substância para fins de alvejamento da outra substância ao tecido ou célula de interesse. Por exemplo, em algumas modalidades, um ligante de alvejamento pode ser conjugado a um oligonucleotídeo para fins de alvejamento do oligonucleotídeo a um tecido específico ou célula de interesse. Em algumas modalidades, um ligante de alvejamento se liga seletivamente a um receptor de superfície celular. Por conseguinte, em algumas modalidades, um ligante de alvejamento quando conjugado a um oligonucleotídeo facilita a liberação do oligonucleotídeo em uma célula particular através da ligação seletiva a um receptor expresso na superfície da célula e internalização endossômica pela célula do complexo que compreende o oligonucleotídeo, alvejamento ligando e receptor. Em algumas modalidades, um ligante de alvejamento é conjugado a um oligonucleotídeo por meio de um ligante que é clivado após ou durante a internalização celular de modo que o oligonucleotídeo seja liberado do ligante de alvejamento na célula.

[0110] **Tetra-loop:** Tal como aqui utilizado, o termo “tetraloop” se refere a uma alça que aumenta a estabilidade de um duplex adjacente formado por hibridização de sequências de flaqueamento de nucleotídeos. O aumento na estabilidade é detectável como um aumento na temperatura de fusão ( $T_m$ ) de um duplex de haste adjacente que é maior do que a  $T_m$  do duplex de haste adjacente esperado, em média, de um conjunto de alças de comprimento comparável

consistindo em sequências selecionadas aleatoriamente de nucleotídeos. Por exemplo, um tetraloop pode conferir uma temperatura de fusão de pelo menos 50 °C, pelo menos 55 °C, pelo menos 56 °C, pelo menos 58 °C, pelo menos 60 °C, pelo menos 65 °C ou pelo menos 75 °C em NaHPO<sub>4</sub> 10 mM para um grampo de cabelo compreendendo um duplex de pelo menos 2 pares de bases de comprimento. Em algumas modalidades, um tetraloop pode estabilizar um par de bases em um duplex de haste adjacente por meio de interações de empilhamento. Além disso, as interações entre os nucleotídeos em um tetraloop incluem, mas não estão limitadas a, emparelhamento de bases não Watson-Crick, interações de empilhamento, ligações de hidrogênio e interações de contato (Cheong *et al.*, *Nature*, 1990, 346 (6285): 680-2; Heus e Pardi, *Science*, 1991, 253 (5016): 191-4). Em algumas modalidades, um tetraloop compreende ou consiste em 3 a 6 nucleotídeos e é tipicamente de 4 a 5 nucleotídeos. Em certas modalidades, um tetraloop compreende ou consiste em três, quatro, cinco ou seis nucleotídeos, que podem ou não ser modificados (por exemplo, que podem ou não ser conjugados a uma fração de alvejamento). Em uma modalidade, um tetraloop consiste em quatro nucleotídeos. Qualquer nucleotídeo pode ser usado no tetraloop e símbolos IUPAC-IUB padrão para tais nucleotídeos podem ser usados, como descrito em Cornish-Bowden, *Nucleic Acids Res.*, 1985, 13: 3021-3030. Por exemplo, a letra “N” pode ser usada para significar que qualquer base pode estar nessa posição, a letra “R” pode ser usada para mostrar que A (adenina) ou G (guanina) pode estar nessa posição, e “B” pode ser usado para mostrar que C (citosina), G (guanina) ou T (timina) podem estar nessa posição. Exemplos de tetraloops incluem a família UNCG de tetraloops (por exemplo, UUCG), a família GNRA de tetraloops (por exemplo, GAAA) e o tetraloops CUUG (Woese *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA.*, 1990, 87 (21): 8467-71; Antao *et al.*, *Nucleic*

Acids Res., 1991, 19 (21): 5901-5). Exemplos de tetraloops de DNA incluem a família d (GNNA) de tetraloops (por exemplo, d (GTTA), a família d (GNRA)) de tetraloops, a família d (GNAB) de tetraloops, a família d (CNNG) de tetraloops, e a família d (TNCG) de tetraloops (por exemplo, d (TTCG)). Ver, por exemplo, Nakano *et al.*, Biochemistry, 2002, 41 (48): 14281-14292; Shinji *et al.*, Nippon Kagakkai Koen Yokoshu, 2000, 78 (2): 731; que são incorporados por referência neste documento para suas revelações relevantes. Em algumas modalidades, o tetraloop está contido dentro de uma estrutura tetraloop com corte.

[0111] **Tratar:** Tal como aqui utilizado, o termo “tratar” refere-se ao ato de fornecer cuidados a um indivíduo em necessidade, por exemplo, através da administração de um agente terapêutico (por exemplo, um oligonucleotídeo) ao indivíduo, com o objetivo de melhorar a saúde e/ou bem-estar do indivíduo com relação a uma condição existente (por exemplo, uma doença, transtorno) ou para prevenir ou diminuir a probabilidade de ocorrência de uma condição. Em algumas modalidades, o tratamento envolve a redução da frequência ou gravidade de pelo menos um sinal, sintoma ou fator contribuinte de uma condição (por exemplo, doença, transtorno) experimentada por um indivíduo.

## II. Inibidores com base em oligonucleotídeo da expressão de HMGB1

### Sequências Alvos de HMGB1

[0112] Em algumas modalidades, inibidores com base em oligonucleotídeo da expressão de HMGB1 são fornecidos nesta invenção que podem ser usados para obter um benefício terapêutico. Através de examinação do mRNA de HMGB1, incluindo mRNAs de múltiplas espécies diferentes (humano, macaco-reso, e camundongo (ver, por exemplo, o Exemplo 1) e testes *in vitro* e *in vivo*, foi descoberto que certas sequências de mRNA de HMGB1 são úteis como sequências de alvejamento porque elas são mais acessíveis do que outras à

inibição com base em oligonucleotídeo. Em algumas modalidades, uma sequência alvo de HMGB1 compreende, ou consiste em, uma sequência como apresentado em qualquer uma das SEQ ID NOs: 1 a 13. Estas regiões de mRNA de HMGB1 podem ser alvejadas usando oligonucleotídeos como discutido nesta invenção para propósitos de inibir a expressão de mRNA de HMGB1.

[0113] Conseqüentemente, em algumas modalidades, os oligonucleotídeos fornecidos nesta invenção são designados de modo a terem regiões de complementaridade a mRNA de HMGB1 (por exemplo, dentro de uma sequência alvo de mRNA de HMGB1) para os propósitos de alvejar o mRNA em células e inibir sua expressão. A região de complementaridade é geralmente de um comprimento e conteúdo de base adequados para permitir o recozimento do oligonucleotídeo (ou um filamento do mesmo) ao mRNA de HMGB1 para os propósitos de inibir sua expressão. Em algumas modalidades, a região de complementaridade é de pelo menos 12, pelo menos 13, pelo menos 14, pelo menos 15, pelo menos 16, pelo menos 17, pelo menos 18, pelo menos 19 ou pelo menos 20 nucleotídeos em comprimento. Em algumas modalidades, um oligonucleotídeo fornecido nesta invenção tem uma região de complementaridade à HMGB1 que está na faixa de 12 a 30 (por exemplo, 12 a 30, 12 a 22, 15 a 25, 17 a 21, 18 a 27, 19 a 27, ou 15 a 30) nucleotídeos em comprimento. Em algumas modalidades, um oligonucleotídeo fornecido nesta invenção tem uma região de complementaridade à HMGB1 que é de 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 ou 30 nucleotídeos em comprimento.

[0114] Em algumas modalidades, um oligonucleotídeo aqui revelado compreende uma região de complementaridade (por exemplo, em um filamento anti-sentido de um oligonucleotídeo de filamento duplo) que é pelo menos parcialmente complementar a uma sequência como

apresentado em qualquer uma das SEQ ID NOs: 1 a 13. Em algumas modalidades, um oligonucleotídeo aqui revelado compreende uma região de complementaridade (por exemplo, em um filamento anti-sentido de um oligonucleotídeo de filamento duplo) que é completamente complementar a uma sequência como apresentado em qualquer uma das SEQ ID NOs: 1 a 13. Em algumas modalidades, uma região de complementaridade de um oligonucleotídeo (por exemplo, em um filamento anti-sentido de um oligonucleotídeo de filamento duplo) é complementar a uma sequência contígua de nucleotídeos de uma sequência como apresentado em qualquer uma das SEQ ID NOs: 1 a 13 que está na faixa de 12 a 20 nucleotídeos (por exemplo, 12 a 20, 12 a 18, 12 a 16, 12 a 14, 14 a 20, 14 a 18, 14 a 16, 16 a 20, 16 a 18, ou 18 a 20) em comprimento. Em algumas modalidades, uma região de complementaridade de um oligonucleotídeo (por exemplo, em um filamento anti-sentido de um oligonucleotídeo de filamento duplo) é complementar a uma sequência contígua de nucleotídeos de uma sequência como apresentado em qualquer uma das SEQ ID NOs: 11 a 13 que é de 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, ou 20 nucleotídeos contíguos em comprimento.

[0115] Em algumas modalidades, uma região de complementaridade de um oligonucleotídeo que é complementar aos nucleotídeos contíguos de uma sequência como apresentado em qualquer uma das SEQ ID NOs: 1 a 13 transpõe o comprimento inteiro de um filamento anti-sentido. Em algumas modalidades, uma região de complementaridade de um oligonucleotídeo que é complementar a nucleotídeos contíguos de uma sequência como apresentado em qualquer uma das SEQ ID NOs: 1 a 13 transpõe uma porção do comprimento inteiro de um filamento anti-sentido. Em algumas modalidades, um oligonucleotídeo aqui revelado compreende uma região de complementaridade (por exemplo, em um filamento anti-

sentido de um oligonucleotídeo de filamento duplo) que é pelo menos parcialmente (por exemplo, completamente) complementar a um estiramento contíguo de nucleotídeos transpondo os nucleotídeos 1 a 20 de uma sequência como apresentado em qualquer uma das SEQ ID NOs: 1 a 13.

[0116] Em algumas modalidades, uma região de complementaridade à HMGB1 pode ter uma ou mais incompatibilidades em comparação a uma sequência correspondente de mRNA de HMGB1. Uma região de complementaridade em um oligonucleotídeo pode ter até 1, até 2, até 3, até 4, até 5, etc. incompatibilidades contanto que ela mantenha a capacidade de formar pares de base complementares com mRNA de HMGB1 sob condições de hibridização apropriadas. Alternativamente, uma região de complementaridade em um oligonucleotídeo pode ter não mais do que 1, não mais do que 2, não mais do que 3, não mais do que 4, ou não mais do que 5 incompatibilidades contanto que ela mantenha a capacidade de formar pares de base complementares com mRNA de HMGB1 sob condições de hibridização apropriadas. Em algumas modalidades, se existirem mais do que uma incompatibilidade em uma região de complementaridade, elas podem ser posicionadas consecutivamente (por exemplo, 2, 3, 4, ou mais em uma fila), ou intercaladas por toda a região de complementaridade contanto que o oligonucleotídeo mantenha a capacidade de formar pares de base complementares com mRNA de HMGB1 sob condições de hibridização apropriadas.

#### ii. Tipos de Oligonucleotídeos

[0117] Existe uma variedade de estruturas de oligonucleotídeos que são úteis para alvejar HMGB1 nos métodos da presente revelação, incluindo RNAi, anti-sentido, miRNA, etc. Qualquer uma das estruturas descritas aqui ou em outra parte pode ser usada como uma estrutura para incorporar ou alvejar uma sequência aqui descrita (por exemplo,

uma sequência “hotpot” de HMGB1 tais como aquelas ilustradas nas SEQ ID NOs: 1 a 13).

[0118] Em algumas modalidades, os oligonucleotídeos para reduzir a expressão da expressão de HMGB1 envolvem vias de interferência de RNA (RNAi) a montante ou a jusante do envolvimento de dicer. Por exemplo, oligonucleotídeos de RNAi foram desenvolvidos com cada filamento tendo tamanhos de 19 a 25 nucleotídeos com pelo menos um saliência em 3' de 1 a 5 nucleotídeos (ver, por exemplo, Patente U.S. Nº 8.372.968). Oligonucleotídeos mais longos também foram desenvolvidos que são processados por Dicer para gerar produtos ativos de RNAi (ver, por exemplo, Patente U.S. Nº 8.883.996). Trabalhos adicionais produziram oligonucleotídeos de filamento duplo estendidos onde pelo menos uma extremidade de pelo menos um filamento é estendida além de uma região de alvejamento duplex, incluindo estruturas onde um dos filamentos inclui uma estrutura tretraloop de estabilização termodinâmica (ver, por exemplo, Patentes U.S. Nºs 8.513.207 e 8.927.705, bem como a Publicação de Patente Internacional WO2010033225, que são incorporadas aqui por referência para sua revelação das estruturas e forma destes oligonucleotídeos). Tais estruturas podem incluir extensões de filamento único (em um ou ambos os lados da molécula) bem como extensões de filamento duplo.

[0119] Em algumas modalidades, os oligonucleotídeos fornecidos nesta invenção são designados para se envolverem na via de interferência de RNA a jusante do envolvimento de dicer (por exemplo, clivagem de dicer). Tais oligonucleotídeos podem ter uma saliência (por exemplo, de 1, 2, ou 3 nucleotídeos em comprimento) na extremidade 3' do filamento de sentido. Tais oligonucleotídeos (por exemplo, siRNAs) podem compreender um filamento guia de 21 nucleotídeos que é anti-sentido a um RNA alvo e um filamento passageiro complementar, em que ambos os filamentos recozem para formar um duplex de 19 pb e

saliências de 2 nucleotídeos em qualquer uma ou ambas as extremidades 3'. Projetos de oligonucleotídeo mais longo também estão disponíveis incluindo oligonucleotídeos tendo um filamento guia de 23 nucleotídeos e um filamento passageiro de 21 nucleotídeos, onde existe uma extremidade cega no lado direito da molécula (extremidade 3' de filamento passageiro/extremidade 5' de filamento guia) e uma saliência no filamento guia 3' de dois nucleotídeos no lado esquerdo da molécula (extremidade 5' do filamento passageiro/extremidade 3' do filamento guia). Em tais moléculas, existe uma região duplex de 21 pares de base. Ver, por exemplo, Patentes U.S. N<sup>os</sup> 9.012.138; 9.012.621; e 9.193.753, cada uma das quais é aqui incorporada para suas revelações relevantes.

[0120] Em algumas modalidades, oligonucleotídeos como aqui revelado podem compreender filamentos de sentido e anti-sentido que estão ambos na faixa de 17 a 26 (por exemplo, 17 a 26, 20 a 25, ou 21 a 23) nucleotídeos em comprimento. Em algumas modalidades, um oligonucleotídeo como aqui revelado compreende um filamento de sentido e anti-sentido que estão ambos na faixa de 19 a 22 nucleotídeo em comprimento. Em algumas modalidades, os filamentos de sentido e anti-sentido são de comprimento igual. Em algumas modalidades, um oligonucleotídeo compreende filamentos de sentido e anti-sentido, tal que exista uma saliência em 3' no filamento de sentido ou no filamento anti-sentido, ou tanto no filamento de sentido quanto anti-sentido. Em algumas modalidades, para oligonucleotídeos que têm filamentos de sentido e anti-sentido que estão ambos na faixa de 21 a 23 nucleotídeos em comprimento, uma saliência em 3' nos filamentos de sentido, anti-sentido, ou tanto de sentido quanto anti-sentido é de 1 ou 2 nucleotídeos em comprimento. Em algumas modalidades, o oligonucleotídeo tem um filamento guia de 22 nucleotídeos e um filamento passageiro de 20 nucleotídeos, onde existe uma extremidade cega no lado direito da

molécula (extremidade 3' de filamento passageiro/extremidade 5' de filamento guia) e uma saliência no filamento guia 3' de dois nucleotídeos no lado esquerdo da molécula (extremidade 5' do filamento passageiro/extremidade 3' do filamento guia). Em tais moléculas, existe uma região duplex de 20 pares de base.

[0121] Outros projetos de oligonucleotídeos para o uso com as composições e métodos aqui revelados incluem: 16-mer siRNAs (ver, por exemplo, *Nucleic Acids in Chemistry and Biology*, Blackburn (ed.), Royal Society of Chemistry, 2006), shRNAs (por exemplo, tendo 19 pb ou hastes mais curtas; ver, por exemplo, Moore *et al.* *Methods Mol. Biol.*, 2010, 629:141 - 158), siRNAs cegos (por exemplo, de 19 pb em comprimento; ver, por exemplo, Kraynack e Baker, *RNA*, 2006, 12:163 - 176), siRNAs assimétricos (aiRNA; ver, por exemplo, Sun *et al.*, *Nat. Biotechnol.*, 2008, 26:1379 - 1382), siRNA assimétrico de duplex mais curto (ver, por exemplo, Chang *et al.*, *Mol Ther.*, 2009, 17(4):725 - 32), siRNAs bifurcados (ver, por exemplo, Hohjoh, *FEBS Letters*, 2004, 557(1 - 3):193 - 198), siRNAs de filamento único (Elsner, *Nature Biotechnology*, 2012, 30:1063), siRNAs circulares em forma de haltere (ver, por exemplo, Abe *et al.*, *J Am Chem Soc.*, 2007, 129:15108 - 15109), e RNA de interferência pequeno internamente segmentado (siRNA; ver, por exemplo, Bramsen *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 2007, 35(17):5886-5897). Cada uma das referências precedentes é incorporada por referência em sua totalidade para as revelações relacionadas nesta invenção. Outros exemplos não limitantes de estruturas de oligonucleotídeo que podem ser usados em algumas modalidades para reduzir ou inibir a expressão de HMGB1 são microRNA (miRNA), RNA grampo de cabelo curto (shRNA), e siRNA curto (ver, por exemplo, Hamilton *et al.*, *EMBO J.*, 2002, 21(17):4671 - 4679; ver também a Publicação de Patente U.S. nº 20090099115).

[0122] Ainda assim, em algumas modalidades, um oligonucleotídeo

para reduzir a expressão de HMGB1 como aqui descrito é de filamento único. Tais estruturas podem incluir, mas não estão limitadas a moléculas de RNAi de filamento único. Esforços recentes demonstraram a atividade de moléculas de RNAi de filamento único (ver, por exemplo, Matsui *et al.*, *Molecular Therapy*, 2016, 24 (5): 946-955). No entanto, em algumas modalidades, os oligonucleotídeos fornecidos neste documento são oligonucleotídeos anti-sentido (ASOs). Um oligonucleotídeo anti-sentido é um oligonucleotídeo de filamento único que tem uma sequência de nucleobase que, quando escrita na direção 5' para 3', compreende o complemento reverso de um segmento alvejado de um ácido nucleico particular e é adequadamente modificado (por exemplo, como um gapmer) de modo a induzir a clivagem mediada por RNaseH de seu RNA alvo em células ou (por exemplo, como um mixmer) de modo a inibir a tradução do mRNA alvo em células. Os oligonucleotídeos anti-sentido para uso na presente revelação podem ser modificados de qualquer maneira adequada conhecida na técnica incluindo, por exemplo, como mostrado na Patente US No. 9.567.587, que é incorporada por referência neste documento para sua revelação em relação à modificação de oligonucleotídeos anti-sentido (incluindo, por exemplo, comprimento, frações de açúcar da nucleobase (pirimidina, purina) e alterações da porção heterocíclica da nucleobase). Além disso, as moléculas anti-sentido têm sido usadas há décadas para reduzir a expressão de genes alvo específicos (ver, por exemplo, Bennett *et al.*, "Pharmacology of Anti-sentido Drugs", *Ann Rev Pharmacol Toxicol.*, 2017, 57: 81-105).

### iii. Oligonucleotídeos de filamento duplo

[0123] Os oligonucleotídeos de filamento duplo para alvejar a expressão de HMGB1 (por exemplo, através da via de RNAi) geralmente têm um filamento de sentido e um filamento anti-sentido que formam um duplex entre si. Em algumas modalidades, os filamentos

de sentido e anti-sentido não estão ligadas covalentemente. No entanto, em algumas modalidades, as filamentos de sentido e anti-sentido estão ligadas covalentemente. Em algumas modalidades, um duplex formado entre uma filamento de sentido e anti-sentido é de pelo menos 15 (por exemplo, pelo menos 15, pelo menos 16, pelo menos 17, pelo menos 18, pelo menos 19, pelo menos 20 ou pelo menos 21) nucleotídeos em comprimento. Em algumas modalidades, um duplex formado entre uma filamento de sentido e anti-sentido está na faixa de 15-30 nucleotídeos de comprimento (por exemplo, 15 a 30, 15 a 27, 15 a 22, 18 a 22, 18 a 25, 18 a 27, 18 a 30 ou 21 a 30 nucleotídeos de comprimento). Em algumas modalidades, um duplex formado entre uma filamento de sentido e anti-sentido tem 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 ou 30 nucleotídeos de comprimento. Em algumas modalidades, a região duplex tem 20 nucleotídeos de comprimento. Em algumas modalidades, um duplex formado entre uma filamento de sentido e anti-sentido não abrange todo o comprimento da filamento de sentido e/ou anti-sentido. Em algumas modalidades, um duplex entre uma filamento de sentido e anti-sentido abrange todo o comprimento das filamentos de sentido ou anti-sentido. Em certas modalidades, um duplex entre uma filamento de sentido e anti-sentido se estende por todo o comprimento da filamento de sentido e da filamento anti-sentido.

[0124] Em algumas modalidades, um oligonucleotídeo fornecido nesta invenção compreende um filamento de sentido tendo uma sequência como apresentado em qualquer uma das SEQ ID NOs: 1 a 13 e um filamento anti-sentido compreendendo uma sequência complementar selecionada a partir de SEQ ID NOs: 14 a 26, como é arranjado na Tabela 1.

[0125] Em algumas modalidades, o filamento de sentido compreende uma sequência como apresentado na SEQ ID NO: 1 e o filamento anti-sentido compreende uma sequência como apresentado

na SEQ ID NO: 14. Em algumas modalidades, o filamento de sentido compreende uma sequência como apresentado na SEQ ID NO: 2 e o filamento anti-sentido compreende uma sequência como apresentado na SEQ ID NO: 15. Em algumas modalidades, o filamento de sentido compreende uma sequência como apresentado na SEQ ID NO: 3 e o filamento anti-sentido compreende uma sequência como apresentado na SEQ ID NO: 16. Em algumas modalidades, o filamento de sentido compreende uma sequência como apresentado na SEQ ID NO: 4 e o filamento anti-sentido compreende uma sequência como apresentado na SEQ ID NO: 17. Em algumas modalidades, o filamento de sentido compreende uma sequência como apresentado na SEQ ID NO: 5 e o filamento anti-sentido compreende uma sequência como apresentado na SEQ ID NO: 18. Em algumas modalidades, o filamento de sentido compreende uma sequência como apresentado na SEQ ID NO: 6 e o filamento anti-sentido compreende uma sequência como apresentado na SEQ ID NO: 19. Em algumas modalidades, o filamento de sentido compreende uma sequência como apresentado na SEQ ID NO: 7 e o filamento anti-sentido compreende uma sequência como apresentado na SEQ ID NO: 20. Em algumas modalidades, o filamento de sentido compreende uma sequência como apresentado na SEQ ID NO: 8 e o filamento anti-sentido compreende uma sequência como apresentado na SEQ ID NO: 21. Em algumas modalidades, o filamento de sentido compreende uma sequência como apresentado na SEQ ID NO: 9 e o filamento anti-sentido compreende uma sequência como apresentado na SEQ ID NO: 22. Em algumas modalidades, o filamento de sentido compreende uma sequência como apresentado na SEQ ID NO: 10 e o filamento anti-sentido compreende uma sequência como apresentado na SEQ ID NO: 23. Em algumas modalidades, o filamento de sentido compreende uma sequência como apresentado na SEQ ID NO: 11 e o filamento anti-sentido compreende uma sequência como apresentado

na SEQ ID NO: 24. Em algumas modalidades, o filamento de sentido compreende uma sequência como apresentado na SEQ ID NO: 12 e o filamento anti-sentido compreende uma sequência como apresentado na SEQ ID NO: 25. Em algumas modalidades, o filamento de sentido compreende uma sequência como apresentado na SEQ ID NO: 13 e o filamento anti-sentido compreende uma sequência como apresentado na SEQ ID NO: 26.

[0126] Em algumas modalidades, um oligonucleotídeo fornecido nesta invenção compreende um filamento de sentido compreendendo uma sequência como apresentado em qualquer uma das SEQ ID NOs: 27 a 39 e um filamento anti-sentido compreendendo uma sequência complementar selecionada a partir de SEQ ID NOs: 14 a 26, como também é arranjado na Tabela 2, incluindo modificações à sequência de sentido e sequências anti-sentido. Em algumas modalidades, o filamento de sentido compreende uma sequência como apresentado na SEQ ID NO: 27 e o filamento anti-sentido compreende uma sequência como apresentado na SEQ ID NO: 14. Em algumas modalidades, o filamento de sentido compreende uma sequência como apresentado na SEQ ID NO: 28 e o filamento anti-sentido compreende uma sequência como apresentado na SEQ ID NO: 15. Em algumas modalidades, o filamento de sentido compreende uma sequência como apresentado na SEQ ID NO: 29 e o filamento anti-sentido compreende uma sequência como apresentado na SEQ ID NO: 16. Em algumas modalidades, o filamento de sentido compreende uma sequência como apresentado na SEQ ID NO: 30 e o filamento anti-sentido compreende uma sequência como apresentado na SEQ ID NO: 17. Em algumas modalidades, o filamento de sentido compreende uma sequência como apresentado na SEQ ID NO: 31 e o filamento anti-sentido compreende uma sequência como apresentado na SEQ ID NO: 18. Em algumas modalidades, o filamento de sentido compreende uma sequência como apresentado na

SEQ ID NO: 32 e o filamento anti-sentido compreende uma sequência como apresentado na SEQ ID NO: 19. Em algumas modalidades, o filamento de sentido compreende uma sequência como apresentado na SEQ ID NO: 33 e o filamento anti-sentido compreende uma sequência como apresentado na SEQ ID NO: 20. Em algumas modalidades, o filamento de sentido compreende uma sequência como apresentado na SEQ ID NO: 34 e o filamento anti-sentido compreende uma sequência como apresentado na SEQ ID NO: 21. Em algumas modalidades, o filamento de sentido compreende uma sequência como apresentado na SEQ ID NO: 35 e o filamento anti-sentido compreende uma sequência como apresentado na SEQ ID NO: 22. Em algumas modalidades, o filamento de sentido compreende uma sequência como apresentado na SEQ ID NO: 36 e o filamento anti-sentido compreende uma sequência como apresentado na SEQ ID NO: 23. Em algumas modalidades, o filamento de sentido compreende uma sequência como apresentado na SEQ ID NO: 37 e o filamento anti-sentido compreende uma sequência como apresentado na SEQ ID NO: 24. Em algumas modalidades, o filamento de sentido compreende uma sequência como apresentado na SEQ ID NO: 38 e o filamento anti-sentido compreende uma sequência como apresentado na SEQ ID NO: 25. Em algumas modalidades, o filamento de sentido compreende uma sequência como apresentado na SEQ ID NO: 39 e o filamento anti-sentido compreende uma sequência como apresentado na SEQ ID NO: 26.

[0127] Deve ser avaliado que, em algumas modalidades, as sequências apresentadas na listagem de sequência podem ser referidas na descrição da estrutura de um oligonucleotídeo ou outro ácido nucleico. Em tais modalidades, o oligonucleotídeo real ou outro ácido nucleico pode ter um ou mais nucleotídeos alternativos (por exemplo, uma contraparte de RNA de um nucleotídeo de DNA ou uma contraparte de DNA de um nucleotídeo de RNA) e/ou um ou mais

nucleotídeos modificados e/ou um ou mais ligações internucleotídicas modificadas e/ou uma ou mais outras modificações em comparação com a sequência especificada, embora mantendo essencialmente as mesmas propriedades complementares ou semelhantes à sequência especificada.

[0128] Em algumas modalidades, um oligonucleotídeo de filamento duplo compreende um filamento de sentido de 25 nucleotídeos e um filamento anti-sentido de 27 nucleotídeos que, quando atuada por uma enzima dicer, resulta em um filamento anti-sentido que é incorporada ao RISC maduro. Em algumas modalidades, um filamento de sentido de um oligonucleotídeo tem mais de 27 nucleotídeos (por exemplo, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 ou 40 nucleotídeos). Em algumas modalidades, um filamento de sentido de um oligonucleotídeo tem mais de 25 nucleotídeos (por exemplo, 26, 27, 28, 29 ou 30 nucleotídeos).

[0129] Em algumas modalidades, o comprimento de um duplex formado entre um filamento de sentido e anti-sentido de um oligonucleotídeo pode ser de 12 a 30 nucleotídeos (por exemplo, 12 a 30, 12 a 27, 15 a 25, 18 a 30 ou 19 a 30 nucleotídeos) de comprimento. Em algumas modalidades, o comprimento de um duplex formado entre um filamento de sentido e anti-sentido de um oligonucleotídeo tem pelo menos 12 nucleotídeos de comprimento (por exemplo, pelo menos 12, pelo menos 15, pelo menos 20 ou pelo menos 25 nucleotídeos de comprimento). Em algumas modalidades, o comprimento de um duplex formado entre um filamento de sentido e anti-sentido de um oligonucleotídeo é 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 ou 30 nucleotídeos de comprimento.

[0130] Em algumas modalidades, os oligonucleotídeos fornecidos neste documento têm uma extremidade 5' que é termodinamicamente menos estável em comparação com a outra extremidade 5'. Em

algumas modalidades, é fornecido um oligonucleotídeo de assimetria que inclui uma extremidade cega na extremidade 3' de um filamento em sentido e uma saliência na extremidade 3' de um filamento anti-sentido. Em algumas modalidades, uma saliência 3' em um filamento anti-sentido tem 1-8 nucleotídeos de comprimento (por exemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 ou 8 nucleotídeos de comprimento). Normalmente, um oligonucleotídeo para RNAi tem uma saliência de dois nucleotídeos na extremidade 3' do filamento anti-sentido (guia). No entanto, outras saliências são possíveis. Em algumas modalidades, uma saliência é uma saliência 3' compreendendo um comprimento de entre um e seis nucleotídeos, opcionalmente, um a cinco, um a quatro, um a três, um a dois, dois a seis, dois a cinco, dois a quatro, dois a três, três a seis, três a cinco, três a quatro, quatro a seis, quatro a cinco, cinco a seis nucleotídeos, ou um, dois, três, quatro, cinco ou seis nucleotídeos. No entanto, em algumas modalidades, a saliência é uma saliência em 5' compreendendo um comprimento de entre um e seis nucleotídeos, opcionalmente, um a cinco, um a quatro, um a três, um a dois, dois a seis, dois a cinco, dois a quatro, dois a três, três a seis, três a cinco, três a quatro, quatro a seis, quatro a cinco, cinco a seis nucleotídeos, ou um, dois, três, quatro, cinco ou seis nucleotídeos.

[0131] Em algumas modalidades, dois nucleotídeos terminais na extremidade 3' de um filamento anti-sentido são modificados. Em algumas modalidades, os dois nucleotídeos terminais na extremidade 3' do filamento anti-sentido são complementares com o alvo. Em algumas modalidades, os dois nucleotídeos terminais na extremidade 3' do filamento anti-sentido não são complementares com o alvo. Em algumas modalidades, dois nucleotídeos terminais em cada extremidade 3' de um oligonucleotídeo na estrutura de tetraloop com corte são GG. Normalmente, um ou ambos os nucleotídeos GG terminais em cada extremidade 3' de um oligonucleotídeo não são complementares com o alvo.

[0132] Em algumas modalidades, há uma ou mais (por exemplo, 1, 2, 3, 4, 5) incompatibilidades entre um filamento com sentido e anti-sentido. Se houver mais de uma incompatibilidade entre uma filamento de sentido e anti-sentido, elas podem ser posicionadas consecutivamente (por exemplo, 2, 3 ou mais em uma linha) ou intercaladas em toda a região de complementaridade. Em algumas modalidades, o terminal 3' da filamento de sentido contém uma ou mais incompatibilidades. Em uma modalidade, duas incompatibilidades são incorporadas no terminal 3' da filamento de sentido. Em algumas modalidades, incompatibilidades de base ou desestabilização de segmentos na extremidade 3' da filamento de sentido do oligonucleotídeo melhorou a potência de duplexes sintéticos em RNAi, possivelmente através da facilitação do processamento por Dicer.

#### Filamentos Anti-sentido

[0133] Em algumas modalidades, uma filamento anti-sentido de um oligonucleotídeo pode ser referida como um “filamento guia”. Por exemplo, se uma filamento anti-sentido pode se envolver com o complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC) e se ligar a uma proteína Argonata, ou se envolver ou se ligar a um ou mais fatores semelhantes e silenciar direto de um gene alvo, pode ser referido como como um fio guia. Em algumas modalidades, um fio de sentido complementar com um fio guia pode ser referido como um “fio passageiro”.

[0134] Em algumas modalidades, um oligonucleotídeo fornecido nesta invenção compreende um filamento anti-sentido que é de até 50 nucleotídeos em comprimento (por exemplo, até 30, até 27, até 25, até 21, ou até 19 nucleotídeos em comprimento). Em algumas modalidades, um oligonucleotídeo fornecido nesta invenção compreende um filamento anti-sentido que é de pelo menos 12 nucleotídeos em comprimento (por exemplo, pelo menos 12, pelo menos 15, pelo menos

19, pelo menos 21, pelo menos 25, ou pelo menos 27 nucleotídeos em comprimento). Em algumas modalidades, um filamento anti-sentido de um oligonucleotídeo aqui revelado está na faixa de 12 a 50 ou 12 a 30 (por exemplo, 12 a 30, 11 a 27, 11 a 25, 15 a 21, 15 a 27, 17 a 21, 17 a 25, 19 a 27, ou 19 a 30) nucleotídeos em comprimento. Em algumas modalidades, um filamento anti-sentido de qualquer um dos oligonucleotídeos aqui revelados é de 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, ou 50 nucleotídeos em comprimento.

[0135] Em algumas modalidades um oligonucleotídeo aqui revelado compreende um filamento anti-sentido compreendendo uma sequência como apresentado em qualquer uma das SEQ ID NOs: 14 a 26. Em algumas modalidades, um oligonucleotídeo compreende um filamento anti-sentido compreendendo uma sequência contígua de nucleotídeos que está na faixa de 12 a 20 nucleotídeos (por exemplo, 12 a 20, 12 a 18, 12 a 16, 12 a 14, 14 a 20, 14 a 18, 14 a 16, 16 a 20, 16 a 18, ou 18 a 20 nucleotídeos) em comprimento de qualquer uma das sequências como apresentado em qualquer uma das SEQ ID NOs: 14 a 26. Em algumas modalidades, um oligonucleotídeo compreende um filamento anti-sentido compreendendo uma sequência contígua de nucleotídeos de uma sequência como apresentado em qualquer uma das SEQ ID NOs: 14 a 26 que é de 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, ou 20 nucleotídeos contíguos em comprimento. Em algumas modalidades, um oligonucleotídeo compreende um filamento anti-sentido que consiste em uma sequência como apresentado em qualquer uma das SEQ ID NOs: 14 a 26.

#### b. Filamentos de sentido

[0136] Em algumas modalidades, um oligonucleotídeo de filamento duplo pode ter um filamento de sentido de até 40 nucleotídeos em

comprimento (por exemplo, até 40, até 35, até 30, até 27, até 25, até 21, até 19 até 17, ou até 12 nucleotídeos em comprimento). Em algumas modalidades, um oligonucleotídeo pode ter um filamento de sentido de pelo menos 12 nucleotídeos em comprimento (por exemplo, pelo menos 12, pelo menos 15, pelo menos 19, pelo menos 21, pelo menos 25, pelo menos 27, pelo menos 30, pelo menos 35, ou pelo menos 38 nucleotídeos em comprimento). Em algumas modalidades, um oligonucleotídeo pode ter um filamento de sentido em uma faixa de 12 a 50 (por exemplo, 12 a 40, 12 a 36, 12 a 32, 12 a 28, 15 a 40, 15 a 36, 15 a 32, 15 a 28, 17 a 21, 17 a 25, 19 a 27, 19 a 30, 20 a 40, 22 a 40, 25 a 40, ou 32 a 40) nucleotídeos em comprimento. Em algumas modalidades, um oligonucleotídeo pode ter um filamento de sentido de 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, ou 40 nucleotídeos em comprimento. Em algumas modalidades, um filamento de sentido de um oligonucleotídeo é mais longo do que 27 nucleotídeos (por exemplo, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 ou 40 nucleotídeos). Em algumas modalidades, um filamento de sentido de um oligonucleotídeo é mais longo do que 25 nucleotídeos (por exemplo, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, ou 36 nucleotídeos). Em algumas modalidades, o filamento de sentido é de 20 nucleotídeos em comprimento. Em algumas modalidades, o filamento de sentido é 36 nucleotídeos em comprimento.

[0137] Em algumas modalidades, um oligonucleotídeo aqui revelado compreende uma sequência de filamento de sentido como apresentado em qualquer uma das SEQ ID NOs: 1 a 13 e 27 a 39. Em algumas modalidades, um oligonucleotídeo tem um filamento de sentido que compreende pelo menos 12 (por exemplo, pelo menos 13, pelo menos 14, pelo menos 15, pelo menos 16, pelo menos 17, pelo menos 18, pelo menos 19, pelo menos 20, pelo menos 21, pelo menos 22, ou

pelo menos 23) nucleotídeos contíguos de uma sequência como apresentado em qualquer uma das SEQ ID NOs: 1 a 13 e 27 a 39. Em algumas modalidades, um oligonucleotídeo tem um filamento de sentido que compreende uma sequência contígua de nucleotídeos que está na faixa de 7 a 36 nucleotídeos (por exemplo, 12 a 30, 12 a 27, 12 a 22, 15 a 25, 17 a 21, 18 a 27, 19 a 27, 20 a 36, ou 15 a 36 nucleotídeos) em comprimento de qualquer uma das sequências como apresentado em qualquer uma das SEQ ID NOs: 1 a 13 e 27 a 39. Em algumas modalidades, um oligonucleotídeo tem um filamento de sentido que compreende uma sequência contígua de nucleotídeos de uma sequência como apresentado em qualquer uma das SEQ ID NOs: 1 a 13 e 27 a 39 que é de 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, ou 36 nucleotídeos em comprimento. Em algumas modalidades, um oligonucleotídeo tem um filamento de sentido que consiste em uma sequência como apresentado em qualquer uma das SEQ ID NOs: 1 a 13 e 27 a 39.

[0138] Em algumas modalidades, um filamento de sentido compreende uma haste-alça em sua extremidade 3'. Em algumas modalidades, um filamento de sentido compreende uma haste-alça em sua extremidade 5'. Em algumas modalidades, um filamento compreendendo uma haste-alça está na faixa de 2 a 66 nucleotídeos de comprimento (por exemplo, 2 a 66, 10 a 52, 14 a 40, 2 a 30, 4 a 26, 8 a 22, 12 a 18, 10 a 22, 14 a 26, ou 14 a 30 nucleotídeos de comprimento). Em algumas modalidades, um filamento compreendendo uma haste-alça é de 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, ou 30 nucleotídeos em comprimento. Em algumas modalidades, uma haste compreende um duplex de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, ou 14 nucleotídeos em comprimento. Em algumas modalidades, uma haste-alça fornece a melhor proteção contra degradação à molécula (por exemplo, degradação enzimática) e facilita

as características de alvejamento para liberação a uma célula alvo. Por exemplo, em algumas modalidades, uma alça fornece nucleotídeos adicionados nos quais a modificação pode ser feita sem substancialmente afetar a atividade de inibição de expressão gênica de um oligonucleotídeo. Em certas modalidades, um oligonucleotídeo é fornecido nesta invenção em que o filamento de sentido compreende (por exemplo, em sua extremidade 3') uma haste-alça apresentado como:  $S_1$ -L- $S_2$ , em que  $S_1$  é complementar a  $S_2$ , e em que L forma uma alça entre  $S_1$  e  $S_2$  de até 10 nucleotídeos em comprimento (por exemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, ou 10 nucleotídeos em comprimento).

[0139] Em algumas modalidades, uma alça (L) de uma haste-alça é um tetraloop (por exemplo, dentro de uma estrutura de tetraloop com corte). Um tetraloop pode conter ribonucleotídeos, desoxirribonucleotídeos, nucleotídeos modificados, e combinações dos mesmos. Tipicamente, um tetraloop tem 4 a 5 nucleotídeos. Entretanto, em algumas modalidades, um tetraloop compreende ou consiste em 3 a 6 nucleotídeos, e tipicamente consiste em 4 a 5 nucleotídeos. Em certas modalidades, um tetraloop compreende ou consiste em três, quatro, cinco, ou seis nucleotídeos.

#### iv. Modificações de Oligonucleotídeo

[0140] Os oligonucleotídeos podem ser modificados de várias maneiras para melhorar ou controlar a especificidade, estabilidade, liberação, biodisponibilidade, resistência da degradação de nucleases, imunogenicidade, propriedades de pareamento de base, distribuição de RNA e absorção celular e outras características relevantes para uso terapêutico ou de pesquisa (ver, por exemplo, Bramsen et al., *Nucleic Acids Res.*, 2009, 37: 2867-2881; Bramsen e Kjems, *Frontiers in Genetics*, 2012, 3: 1-22). Por conseguinte, em algumas modalidades, os oligonucleotídeos da presente revelação podem incluir uma ou mais modificações adequadas. Em algumas modalidades, um nucleotídeo

modificado tem uma modificação em sua base (ou nucleobase), o açúcar (por exemplo, ribose, desoxirribose) ou o grupo fosfato.

[0141] O número de modificações em um oligonucleotídeo e as posições dessas modificações de nucleotídeo podem influenciar as propriedades de um oligonucleotídeo. Por exemplo, os oligonucleotídeos podem ser entregues in vivo, conjugando-os ou englobando-os em uma nanopartícula lipídica (LNP) ou transportador semelhante. No entanto, quando um oligonucleotídeo não é protegido por um LNP ou transportador semelhante, pode ser vantajoso que pelo menos alguns dos nucleotídeos sejam modificados. Por conseguinte, em certas modalidades de qualquer um dos oligonucleotídeos aqui fornecidos, todos ou substancialmente todos os nucleotídeos de um oligonucleotídeo são modificados. Em certas modalidades, mais da metade dos nucleotídeos são modificados. Em certas modalidades, menos da metade dos nucleotídeos são modificados. Normalmente, com liberação simples, todo açúcar é modificado na posição 2'. Essas modificações podem ser reversíveis ou irreversíveis. Em algumas modalidades, um oligonucleotídeo conforme revelado neste documento tem um número e tipo de nucleotídeos modificados suficientes para causar a característica desejada (por exemplo, proteção contra degradação enzimática, capacidade de alvejar uma célula desejada após administração in vivo e/ou estabilidade termodinâmica).

#### Modificações de Açúcar

[0142] Em algumas modalidades, um açúcar modificado (também referido aqui como um análogo de açúcar) inclui uma desoxirribose modificada ou fração de ribose, por exemplo, em que uma ou mais modificações ocorrem na posição 2', 3', 4' e/ou 5' de carbono do açúcar. Em algumas modalidades, um açúcar modificado também pode incluir estruturas de carbono alternativas não naturais, como aquelas presentes em ácidos nucleicos bloqueados ("LNA") (ver, por exemplo,

Koshkin et al., Tetrahedron, 1998, 54: 3607-3630), ácidos nucleicos desbloqueados (“UNA”) (ver, por exemplo, Snead et al., Molecular Therapy - Nucleic Acids, 2013, 2, e103) e ácidos nucleicos em ponte (“BNA”) (ver, por exemplo, Imanishi e Obika, The Royal Society of Chemistry, Chem. Commun., 2002, 16: 1653-1659). Koshkin et al., Snead et al., E Imanishi e Obika são incorporados neste documento por referência para suas revelações relacionadas a modificações de açúcar.

[0143] Em algumas modalidades, uma modificação de nucleotídeo em um açúcar compreende uma 2'-modificação. Uma 2'-modificação pode ser 2'-aminoetila, 2'-fluoro, 2'-O-metila, 2'-O-metoxietila, e ácido 2'-desóxi-2'-fluoro- $\beta$ -D-arabinonucleico. Tipicamente, a modificação é 2'-fluoro, 2'-O-metila, ou 2'-O-metoxietila. Em algumas modalidades uma modificação em um açúcar compreende uma modificação do anel de açúcar, que pode compreender a modificação de um ou mais carbonos do anel de açúcar. Por exemplo, uma modificação de um açúcar de um nucleotídeo pode compreender um 2'-oxigênio de um açúcar que é ligado a um 1'-carbono ou 4'-carbono do açúcar, ou um 2'-oxigênio que é ligado ao 1'-carbono ou 4'-carbono por intermédio de uma ponte etileno ou metileno. Em algumas modalidades, um nucleotídeo modificado tem um açúcar acíclico que carece de uma ligação 2'-carbono a 3'-carbono. Em algumas modalidades, um nucleotídeo modificado tem um grupo tiol, por exemplo, na posição 4' do açúcar.

[0144] Em algumas modalidades, o oligonucleotídeo aqui descrito compreende pelo menos um nucleotídeo modificado (por exemplo, pelo menos 1, pelo menos 5, pelo menos 10, pelo menos 15, pelo menos 20, pelo menos 25, pelo menos 30, pelo menos 35, pelo menos 40, pelo menos 45, pelo menos 50, pelo menos 55, pelo menos 60, ou mais). Em algumas modalidades, o filamento de sentido do oligonucleotídeo compreende pelo menos um nucleotídeo modificado (por exemplo, pelo

menos 1, pelo menos 5, pelo menos 10, pelo menos 15, pelo menos 20, pelo menos 25, pelo menos 30, pelo menos 35, ou mais). Em algumas modalidades, o filamento anti-sentido do oligonucleotídeo compreende pelo menos um nucleotídeo modificado (por exemplo, pelo menos 1, pelo menos 5, pelo menos 10, pelo menos 15, pelo menos 20, ou mais).

[0145] Em algumas modalidades, todos os nucleotídeos do filamento de sentido do oligonucleotídeo são modificados. Em algumas modalidades, todos os nucleotídeos do filamento anti-sentido do oligonucleotídeo são modificados. Em algumas modalidades, todos os nucleotídeos do oligonucleotídeo (isto é, tanto o filamento de sentido quanto o filamento anti-sentido) são modificados. Em algumas modalidades, o nucleotídeo modificado compreende uma 2'-modificação (por exemplo, um 2'-fluoro ou 2'-O-metila).

[0146] A presente revelação fornece oligonucleotídeos tendo padrões de modificação diferentes. Em algumas modalidades, os oligonucleotídeos modificados compreendem uma sequência de filamento de sentido tendo uma sequência como apresentado em qualquer uma das SEQ ID NOs: 27 a 39, e uma sequência de filamento anti-sentido tendo uma sequência como apresentado em qualquer uma das SEQ ID NOs: 14 a 26. Em algumas modalidades, para estes oligonucleotídeos, uma ou mais das posições 1, 2, 4, 6, 7, 12, 14, 16, 18 a 27, e 31 a 36 do filamento de sentido, e/ou uma ou mais das posições 1, 4, 6, 8, 9, 11, 13, 15, 18, e 20 a 22 do filamento anti-sentido são modificadas com uma 2'-O-metila. Em algumas modalidades, todas as posições 1, 2, 4, 6, 7, 12, 14, 16, 18 a 27, e 31 a 36 do filamento de sentido, e todas as posições 1, 4, 6, 8, 9, 11, 13, 15, 18, e 20 a 22 do filamento anti-sentido são modificadas com uma 2'-O-metila. Em algumas modalidades, uma ou mais das posições 3, 5, 8 a 11, 13, 15, e 17 do filamento de sentido, e/ou uma ou mais das posições 2, 3, 5, 7, 10, 12, 14, 16, 17, e 19 do filamento anti-sentido são modificadas com

um 2'-fluoro. Em algumas modalidades, todas as posições 3, 5, 8 a 11, 13, 15, e 17 do filamento de sentido, e todas as posições 2, 3, 5, 7, 10, 12, 14, 16, 17, e 19 do filamento anti-sentido são modificadas com um 2'-fluoro. Em algumas modalidades, todas as posições 1, 2, 4, 6, 7, 12, 14, 16, 18 a 27, e 31 a 36 do filamento de sentido, todas as posições 1, 4, 6, 8, 9, 11, 13, 15, 18, e 20 a 22 do filamento anti-sentido são modificadas com uma 2'-O-metila, todas as posições 3, 5, 8 a 11, 13, 15, e 17 do filamento de sentido, e todas as posições 2, 3, 5, 7, 10, 12, 14, 16, 17, e 19 do filamento anti-sentido são modificadas com um 2'-fluoro.

[0147] Em algumas modalidades, para oligonucleotídeos compreendendo um filamento de sentido tendo uma sequência como apresentado em qualquer uma das SEQ ID NOs: 27 a 39, e um filamento anti-sentido tendo uma sequência como apresentado em qualquer uma das SEQ ID NOs: 14 a 26, uma ou mais das posições 1 a 7, 12 a 27, e 31 a 36 do filamento de sentido, e/ou uma ou mais das posições 1, 4, 6, 8, 9, 11 a 13, e 15 a 22 do filamento anti-sentido são modificadas com uma 2'-O-metila. Em algumas modalidades, todas as posições 1 a 7, 12 a 27, e 31 a 36 do filamento de sentido, e todas as posições 1, 4, 6, 8, 9, 11 a 13, e 15 a 22 do filamento anti-sentido são modificadas com uma 2'-O-metila. Em algumas modalidades, uma ou mais das posições 8 a 11 do filamento de sentido, e/ou uma ou mais das posições 2, 3, 5, 7, 10, e 14 do filamento anti-sentido são modificadas com um 2'-fluoro. Em algumas modalidades, todas as posições 8 a 11 do filamento de sentido, e todas as posições 2, 3, 5, 7, 10, e 14 do filamento anti-sentido são modificadas com um 2'-fluoro. Em algumas modalidades, todas as posições 1 a 7, 12 a 27, e 31 a 36 do filamento de sentido, todas as posições 1, 4, 6, 8, 9, 11 a 13, e 15 a 22 do filamento anti-sentido são modificadas com uma 2'-O-metila, todas as posições 8 a 11 do filamento de sentido, e todas as posições 2, 3, 5, 7, 10, e 14 do filamento anti-

sentido são modificadas com um 2'-fluoro.

[0148] Em algumas modalidades, para oligonucleotídeos compreendendo um filamento de sentido tendo uma sequência como apresentado em qualquer uma das SEQ ID NOs: 27 a 39, e um filamento anti-sentido tendo uma sequência como apresentado em qualquer uma das SEQ ID NOs: 14 a 26, uma ou mais das posições 1, 2, 4 a 7, 9, 11, 14 a 16, 18 a 27, e 31 a 36 do filamento de sentido, e/ou uma ou mais das posições 1, 6, 8, 9, 11, 13, 15, 18, e 20 a 22 do filamento anti-sentido são modificadas com uma 2'-O-metila. Em algumas modalidades, todas as posições 1, 2, 4 a 7, 9, 11, 14 a 16, 18 a 27, e 31 a 36 do filamento de sentido, e todas as posições 1, 6, 8, 9, 11, 13, 15, 18, e 20 a 22 do filamento anti-sentido são modificadas com uma 2'-O-metila. Em algumas modalidades, uma ou mais das posições 3, 8, 10, 12, 13, e 17 do filamento de sentido, e/ou uma ou mais das posições 2 a 5, 7, 10, 12, 14, 16, 17, e 19 do filamento anti-sentido são modificadas com um 2'-fluoro. Em algumas modalidades, todas as posições 3, 8, 10, 12, 13, e 17 do filamento de sentido, e todas as posições 2 a 5, 7, 10, 12, 14, 16, 17, e 19 do filamento anti-sentido são modificadas com um 2'-fluoro.

[0149] Em algumas modalidades, o grupo final 3' terminal (por exemplo, uma 3'-hidroxila) com um grupo fosfato ou outro grupo, que pode ser usado, por exemplo, para fixar ligantes, adaptadores ou rótulos ou para a ligação direta de um oligonucleotídeo a um outro ácido nucleico.

#### b. Fosfatos 5' Terminais

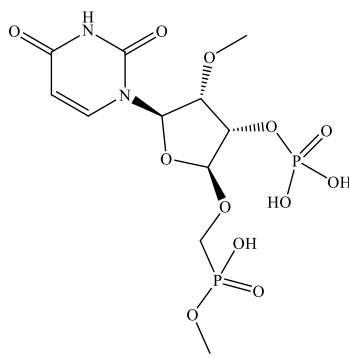
[0150] Em algumas modalidades, grupos fosfatos 5'-terminais de oligonucleotídeos realçam a interação com Argonaute 2. Entretanto, oligonucleotídeos compreendendo um grupo 5'-fosfato podem ser suscetíveis à degradação por intermédio de fosfatases ou outras enzimas, que podem limitar sua biodisponibilidade *in vivo*. Em algumas modalidades, oligonucleotídeos incluem análogos de 5' fosfatos que são

resistentes a tal degradação. Em algumas modalidades, um análogo de fosfato pode ser oximetilfosfonato, vinilfosfonato, ou malonilfosfonato. Em certas modalidades, a extremidade 5' de um filamento de oligonucleotídeo é ligada à porção química que imita as propriedades eletrostáticas e estéricas de um grupo 5'-fosfato natural (“mimético de fosfato”) (ver, por exemplo, Prakash *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 2015, 43(6):2993-3011, os conteúdos do qual se referindo a análogos de fosfato são aqui incorporados por referência). Muitos miméticos de fosfato foram desenvolvidos que podem ser ligados à extremidade 5' (ver, por exemplo, Patente U.S. Nº 8.927.513, os conteúdos da qual se referindo à análogos de fosfato são aqui incorporados por referência). Outras modificações foram desenvolvidas para a extremidade 5' de oligonucleotídeos (ver, por exemplo, Publicação de Patente Internacional WO2011133871, os conteúdos da qual se referindo a análogos de fosfato são aqui incorporados por referência). Em certas modalidades, um grupo hidroxila é ligado à extremidade 5' do oligonucleotídeo.

[0151] Em algumas modalidades, um oligonucleotídeo tem um análogo de fosfato em uma posição 4'-carbono do açúcar (referido como um “análogo 4'-fosfato”) (ver, por exemplo, a publicação de patente internacional WO2018045317, intitulada 4'-Análogos de fosfato e oligonucleotídeos que compreendem o mesmo, cujo conteúdo relacionado a análogos de fosfato é aqui incorporado por referência). Em algumas modalidades, um oligonucleotídeo fornecido aqui compreende um análogo de fosfato 4' em um nucleotídeo terminal 5'. Em algumas modalidades, um análogo de fosfato é um oximetilfosfonato em que o átomo de oxigênio do grupo oximetil está ligado à fração de açúcar (por exemplo, em seu carbono 4') ou análogo deste. Em outras modalidades, um análogo de 4'-fosfato é um tiometilfosfonato ou um aminometilfosfonato em que o átomo de enxofre do grupo tiometil ou o

átomo de nitrogênio do grupo aminometil está ligado ao carbono 4' da fração de açúcar ou análogo do mesmo. Em certas modalidades, um análogo de 4'-fosfato é um oximetilfosfonato. Em algumas modalidades, um oximetilfosfonato é representado pela fórmula  $-O-CH_2-PO(OH)_2$  ou  $-O-CH_2-PO(OR)_2$ , em que R é independentemente selecionado a partir de H, CH<sub>3</sub>, um grupo alquila, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CN, CH<sub>2</sub>OCOC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Si(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>, ou um grupo de proteção. Em certas modalidades, o grupo alquila é CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>. Mais tipicamente, R é independentemente selecionado a partir de H, CH<sub>3</sub>, ou CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>.

[0152] Em certas modalidades, um análogo de fosfato ligado ao oligonucleotídeo é um metóxi fosfonato (MOP). Em certas modalidades, um análogo de fosfato ligado ao oligonucleotídeo é um MOP protegido por 5' mono-metila. Em algumas modalidades, o nucleotídeo uridina seguinte compreendendo um análogo de fosfato pode ser usado, por exemplo, na primeira posição de um filamento guia (anti-sentido):



[0153] nucleotídeo modificado este que é referido como [MeFosfonato-4O-mU] ou 5'-Metóxi, Fosfonato-4' óxi-2'-O-metiluridina.

[0154] c. Ligações Intranucleotídicas Modificadas

[0155] Em algumas modalidades, modificações ou substituições de fosfato podem resultar em um oligonucleotídeo compreendendo pelo menos uma (por exemplo, pelo menos 1, pelo menos 2, pelo menos 3 ou pelo menos 5) ligação internucleotídica modificada. Em algumas modalidades, qualquer um dos oligonucleotídeos aqui revelados compreende 1 a 10 (por exemplo, 1 a 10, 2 a 8, 4 a 6, 3 a 10, 5 a 10, 1

a 5, 1 a 3 ou 1 a 2) ligações internucleotídicas modificadas. Em algumas modalidades, qualquer um dos oligonucleotídeos aqui revelados compreende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, ou 10 ligações internucleotídicas modificadas.

[0156] Uma ligação internucleotídica modificada pode ser uma ligação fosforoditioato, uma ligação fosforotioato, uma ligação fosfotriéster, uma ligação tionalquifosfonato, uma ligação tionalquifosfotriéster, uma ligação fosforamidita, uma ligação fosfonato ou uma ligação boranofosfato. Em algumas modalidades, pelo menos uma ligação internucleotídica modificada de qualquer um dos oligonucleotídeos como aqui revelado é uma ligação fosforotioato.

[0157] Em algumas modalidades, o oligonucleotídeo aqui descrito tem uma ligação fosforotioato entre uma ou mais das: posições 1 e 2 do filamento de sentido, posições 1 e 2 do filamento anti-sentido, posições 2 e 3 do filamento anti-sentido, posições 3 e 4 do filamento anti-sentido, posições 20 e 21 do filamento anti-sentido, e posições 21 e 22 do filamento anti-sentido. Em algumas modalidades, o oligonucleotídeo aqui descrito tem uma ligação fosforotioato entre cada uma das: posições 1 e 2 do filamento de sentido, posições 1 e 2 do filamento anti-sentido, posições 2 e 3 do filamento anti-sentido, posições 20 e 21 do filamento anti-sentido, e posições 21 e 22 do filamento anti-sentido.

#### d. Modificações de base

[0158] Em algumas modalidades, os oligonucleotídeos fornecidos nesta invenção têm uma ou mais nucleobases modificadas. Em algumas modalidades, nucleobases modificadas (também referidas nesta invenção como análogos de base) são ligadas na 1' posição de uma porção açúcar de nucleotídeo. Em certas modalidades, uma nucleobase modificada é uma base nitrogenosa. Em certas modalidades, uma nucleobase modificada não contém átomo de nitrogênio (ver, por exemplo, Publicação de Patente U.S.

20080274462). Em algumas modalidades, um nucleotídeo modificado compreende uma base universal. Entretanto, em certas modalidades, um nucleotídeo modificado não contém uma nucleobase (abásico).

[0159] Em algumas modalidades, uma base universal é uma fração heterocíclica localizada na posição 1' de uma fração de açúcar de nucleotídeo em um nucleotídeo modificado, ou a posição equivalente em uma substituição de fração de açúcar de nucleotídeo, que, quando presente em um duplex, pode ser posicionada oposta a mais de um tipo de base sem alterar substancialmente a estrutura do duplex. Em algumas modalidades, em comparação com um ácido nucleico de filamento único de referência (por exemplo, oligonucleotídeo) que é totalmente complementar a um ácido nucleico alvo, um ácido nucleico de filamento único contendo uma base universal forma um duplex com o ácido nucleico alvo que tem uma  $T_m$  mais baixa do que um duplex formado com o ácido nucleico complementar. No entanto, em algumas modalidades, em comparação com um ácido nucleico de filamento único de referência em que a base universal foi substituída por uma base para gerar uma única incompatibilidade, o ácido nucleico de filamento único contendo a base universal forma um duplex com o ácido nucleico alvo que tem uma  $T_m$  mais alta do que um duplex formado com o ácido nucleico compreendendo a base incompatível.

[0160] Exemplos não limitativos de nucleotídeos de ligação universal incluem inosina, 1- $\beta$ -D-ribofuranosil-5-nitroindol e/ou 1- $\beta$ -D-ribofuranosil-3-nitropirrol (Publicação de Patente U.S. no 20070254362; Van Aerschot et al., *Nucleic Acids Res.* 1995, 23(21):4363 - 70; Loakes et al., *Nucleic Acids Res.* 1995, 23(13):2361 - 6; Loakes e Brown, *Nucleic Acids Res.*, 1994, 22(20):4039 - 43. Cada um dos precedentes é incorporado aqui por referência para suas revelações se referindo às modificações de base).

e. Modificações Reversíveis

[0161] Embora certas modificações para proteger um oligonucleotídeo do ambiente in vivo antes de atingir as células alvo possam ser feitas, elas podem reduzir a potência ou atividade do oligonucleotídeo uma vez que ele atinge o citosol da célula alvo. Modificações reversíveis podem ser feitas de modo que a molécula retenha propriedades desejáveis fora da célula, que são então removidas ao entrar no ambiente citosólico da célula. A modificação reversível pode ser removida, por exemplo, pela ação de uma enzima intracelular ou pelas condições químicas dentro de uma célula (por exemplo, através da redução pela glutathione intracelular)

[0162] Em algumas modalidades, um nucleotídeo modificado reversivelmente compreende uma fração sensível à glutathione. Normalmente, as moléculas de ácido nucleico foram quimicamente modificadas com porções de dissulfeto cíclico para mascarar a carga negativa criada pelas ligações difosfato de internucleotídeo e melhorar a absorção celular e a resistência de nucleases (ver, por exemplo, publicação de patente US 20110294869, publicação de patente internacional WO2015188197; Meade et al., *Nature Biotechnology*, 2014, 32: 1256-1263; Publicação de patente internacional WO2014088920; cada um dos quais são incorporados por referência para suas revelações de tais modificações). Esta modificação reversível das ligações difosfato de internucleotídeo é projetada para ser clivada intracelularmente pelo ambiente redutor do citosol (por exemplo, glutathione). Os exemplos anteriores incluem modificações neutralizantes de fosfotriéster que foram relatadas como sendo cliváveis dentro das células (Dellinger et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, 125: 940-950).

[0163] Em algumas modalidades, tal modificação reversível permite proteção durante a administração in vivo (por exemplo, trânsito através do sangue e/ou compartimentos lisossômicos/endossômicos de uma

célula), onde o oligonucleotídeo será exposto a nucleases e outras condições ambientais adversas (por exemplo,, pH). Quando liberado no citosol de uma célula onde os níveis de glutathione são maiores em comparação com o espaço extracelular, a modificação é revertida e o resultado é um oligonucleotídeo clivado. Usando frações reversíveis sensíveis à glutathione, é possível introduzir grupos químicos estericamente maiores no oligonucleotídeo de interesse em comparação com as opções disponíveis usando modificações químicas irreversíveis. Isso ocorre porque esses grupos químicos maiores serão removidos no citosol e, portanto, não devem interferir na atividade biológica dos oligonucleotídeos dentro do citosol de uma célula. Como resultado, esses grupos químicos maiores podem ser projetados para conferir várias vantagens ao nucleotídeo ou oligonucleotídeo, como resistência de nuclease, lipofilicidade, carga, estabilidade térmica, especificidade e imunogenicidade reduzida. Em algumas modalidades, a estrutura da fração sensível à glutathione pode ser projetada para modificar a cinética de sua liberação.

[0164] Em algumas modalidades, uma fração sensível à glutathione é ligada ao açúcar do nucleotídeo. Em algumas modalidades, uma fração sensível à glutathione é ligada ao carbono 2' do açúcar de um nucleotídeo modificado. Em algumas modalidades, a porção sensível à glutathione está localizada no carbono 5' de um açúcar, particularmente quando o nucleotídeo modificado é o nucleotídeo do terminal 5' do oligonucleotídeo. Em algumas modalidades, a porção sensível à glutathione está localizada no carbono 3' do açúcar, particularmente quando o nucleotídeo modificado é o nucleotídeo do terminal 3' do oligonucleotídeo. Em algumas modalidades, a fração sensível à glutathione compreende um grupo sulfonil (ver, por exemplo, publicação de patente internacional WO2018039364, cujo conteúdo é aqui incorporado por referência para suas revelações relevantes).

#### v. Ligantes de Alvejamento

[0165] Em algumas modalidades, pode ser desejável alvejar os oligonucleotídeos da revelação para uma ou mais células ou um ou mais órgãos. Tal estratégia pode ajudar a evitar efeitos indesejáveis em outros órgãos ou pode evitar a perda indevida do oligonucleotídeo para células, tecidos ou órgãos que não seriam benéficos para o oligonucleotídeo. Por conseguinte, em algumas modalidades, os oligonucleotídeos aqui revelados podem ser modificados para facilitar o alvejamento de um determinado tecido, célula ou órgão, por exemplo, para facilitar a liberação do oligonucleotídeo ao fígado. Em certas modalidades, os oligonucleotídeos aqui revelados podem ser modificados para facilitar a liberação do oligonucleotídeo aos hepatócitos do fígado. Em algumas modalidades, um oligonucleotídeo compreende um nucleotídeo que é conjugado a um ou mais ligantes de alvejamento.

[0166] Um ligante de alvejamento pode compreender um carboidrato, amino açúcar, colesterol, peptídeo, polipeptídeo, proteína ou parte de uma proteína (por exemplo, um anticorpo ou fragmento de anticorpo) ou lipídeo. Em algumas modalidades, um ligante de alvejamento é um aptâmero. Por exemplo, um ligante de alvejamento pode ser um peptídeo RGD que é usado para alvejar a vasculatura tumoral ou células de glioma, o peptídeo CREKA para alvejar a vasculatura tumoral ou estoma, transferência, lactoferrina ou um aptâmero para alvejar os receptores de transferrina expressos na vasculatura do SNC, ou um anti-EGFR anticorpo para alvejar EGFR em células de glioma. Em certas modalidades, o ligante de alvejamento é uma ou mais frações GalNAc.

[0167] Em algumas modalidades, 1 ou mais (por exemplo, 1, 2, 3, 4, 5 ou 6) nucleotídeos de um oligonucleotídeo são cada um conjugado a um ligante de alvejamento separado. Em algumas modalidades, 2 a 4

nucleotídeos de um oligonucleotídeo são, cada um, conjugados a um ligante de alvejamento separado. Em algumas modalidades, os ligantes de alvejamento são conjugados a 2 a 4 nucleotídeos em ambas as extremidades da filamento de sentido ou anti-sentido (por exemplo, os ligantes são conjugados a uma saliência ou extensão de 2 a 4 nucleotídeos na extremidade 5' ou 3' da filamento de sentido ou filamento anti-sentido) de modo que os ligantes de alvejamento se assemelham a cerdas de uma escova de dentes e o oligonucleotídeo se assemelha a uma escova de dentes. Por exemplo, um oligonucleotídeo pode compreender uma haste-alça na extremidade 5' ou 3' da filamento de sentido e 1, 2, 3 ou 4 nucleotídeos de haste-alça podem ser conjugados individualmente a um ligante de alvejamento.

[0168] Em algumas modalidades, é desejável alvejar um oligonucleotídeo que reduz a expressão de HMGB1 aos hepatócitos do fígado do indivíduo. Qualquer porção adequada de alvejamento de hepatócito pode ser usada para este propósito.

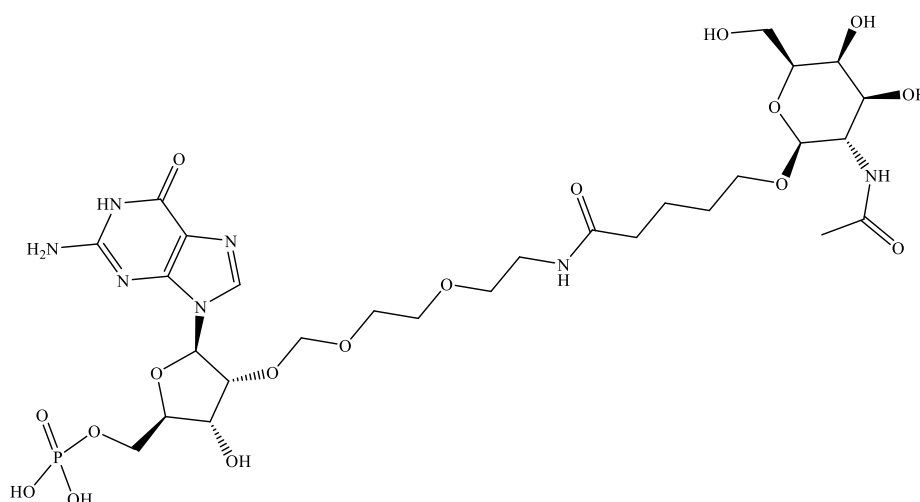
[0169] GalNAc é um ligante de alta afinidade para o receptor de asialoglicoproteína (ASGPR), que é principalmente expresso na superfície sinusoidal de hepatócitos e tem um papel importante na ligação, internalização e eliminação subsequente de glicoproteínas circulantes que contêm galactose terminal ou N- resíduos de acetilgalactosamina (asialoglicoproteínas). A conjugação (indireta ou direta) de frações GalNAc para oligonucleotídeos da presente revelação pode ser usada para alvejar esses oligonucleotídeos para o ASGPR expresso nesses hepatócitos.

[0170] Em algumas modalidades, um oligonucleotídeo da presente revelação é conjugado diretamente ou indiretamente a um GalNAc monovalente. Em algumas modalidades, o oligonucleotídeo é conjugado diretamente ou indiretamente a mais do que um GalNAc monovalente (por exemplo, é conjugado a 2, 3, ou 4 porções GalNAc

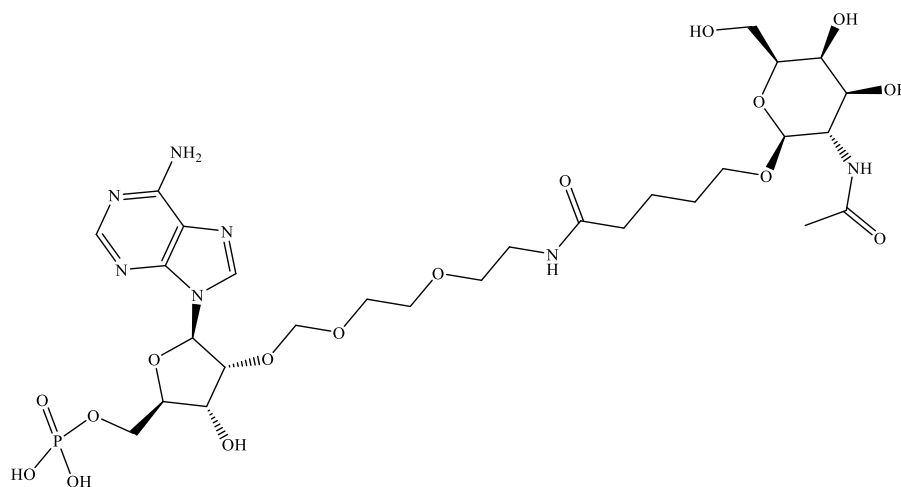
monovalente, e é tipicamente conjugado a 3 ou 4 porções GalNAc monovalente). Em algumas modalidades, um oligonucleotídeo da presente revelação é conjugado a uma ou mais porções GalNAc bivalente, GalNAc trivalente, ou GalNAc tetravalente.

[0171] Em algumas modalidades, 1 ou mais (por exemplo, 1, 2, 3, 4, 5 ou 6) nucleotídeos de um oligonucleotídeo são, cada um, conjugados a uma fração GalNAc. Em algumas modalidades, 2 a 4 nucleotídeos da alça (L) da haste-alça são, cada um, conjugados a um GalNAc separado. Em algumas modalidades, os ligantes de alveamento são conjugados a 2 a 4 nucleotídeos em ambas as extremidades da filamento de sentido ou anti-sentido (por exemplo, os ligantes são conjugados a uma saliência ou extensão de 2 a 4 nucleotídeos na extremidade 5' ou 3' da filamento de sentido ou filamento anti-sentido) de modo que as porções GalNAc se assemelhem às cerdas de uma escova de dentes e o oligonucleotídeo se assemelhe a uma escova de dentes. Por exemplo, um oligonucleotídeo pode compreender uma haste-alça na extremidade 5' ou 3' do filamento de sentido e 1, 2, 3 ou 4 nucleotídeos da haste-alça podem ser individualmente conjugados a uma fração GalNAc. Em algumas modalidades, as frações GalNAc são conjugadas a um nucleotídeo da filamento de sentido. Por exemplo, quatro frações GalNAc podem ser conjugadas a nucleotídeos no tetraloop da filamento de sentido, onde cada fração GalNAc é conjugada a um nucleotídeo.

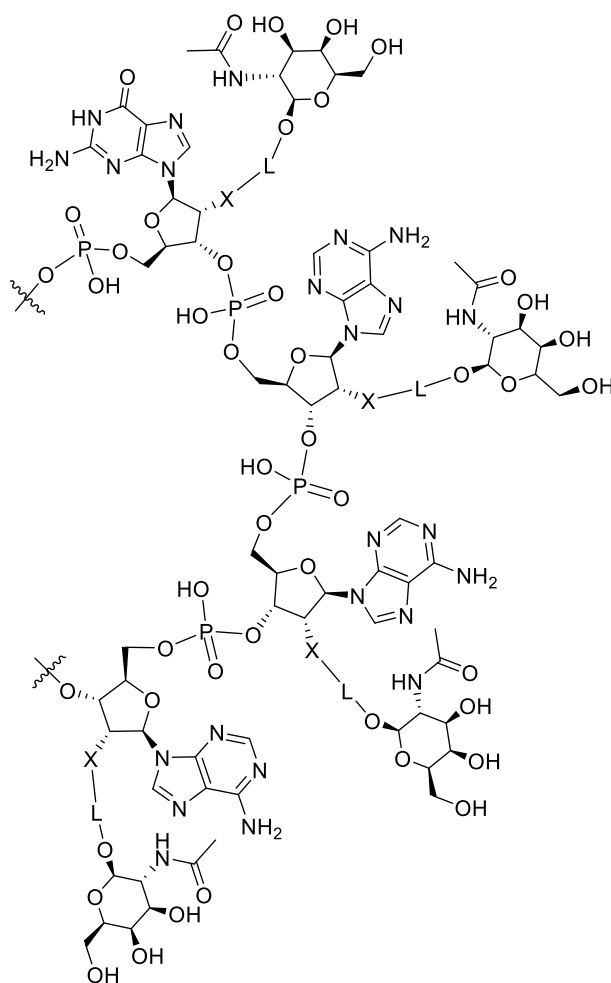
[0172] Em algumas modalidades, um oligonucleotídeo nesta invenção compreende um GalNAc monovalente ligado a um nucleotídeo de Guanidina, referido como [ademG-GalNAc] ou 2'-aminodietoximetanol-Guanidina-GalNAc, como representado abaixo:



[0173] Em algumas modalidades, um oligonucleotídeo nesta invenção compreende um GalNAc monovalente ligado a um nucleotídeo de adenina, referido como [ademA-GalNAc] ou 2'-aminodietoximetanol-Adenina-GalNAc, como representado abaixo.

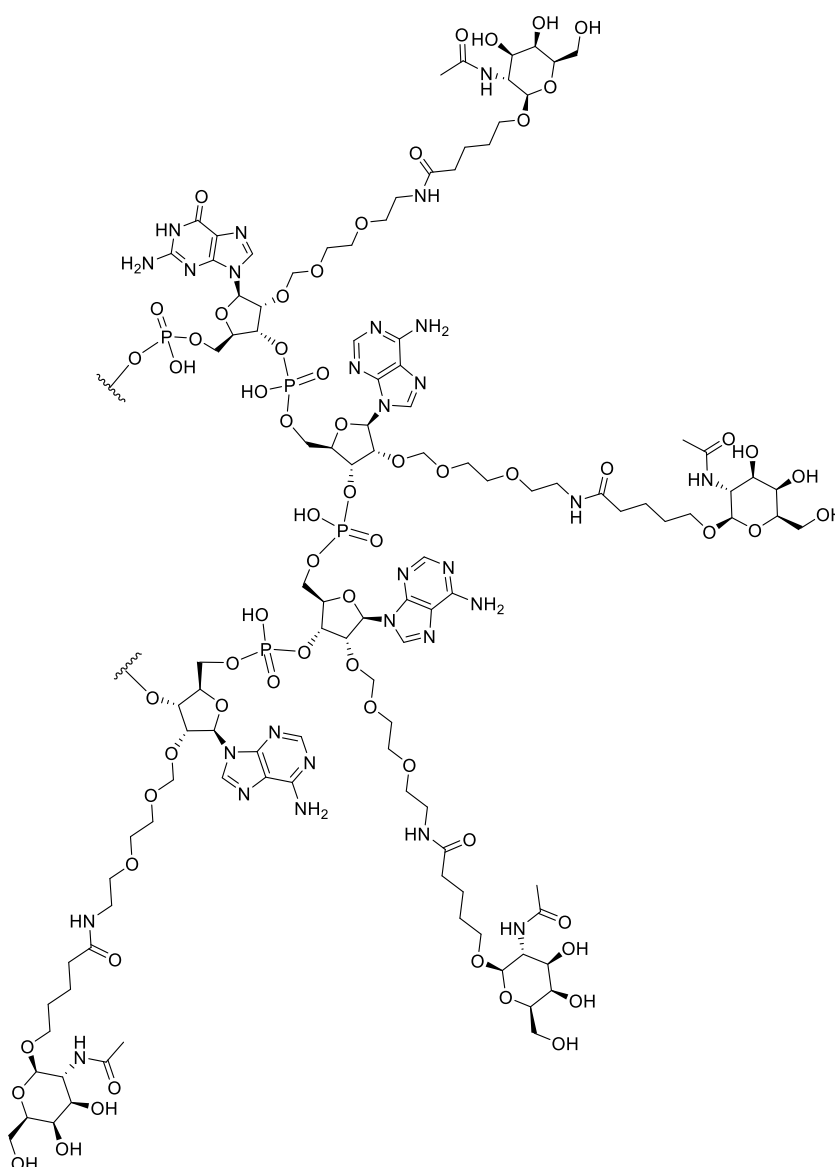


[0174] Um exemplo de tal conjugação é mostrado abaixo para uma alça compreendendo de 5' a 3' da sequência de nucleotídeo GAAA (L = ligante, X = heteroátomo) pontos de fixação de haste são mostrados. Uma tal alça pode estar presente, por exemplo, nas posições 27 a 30 das moléculas mostradas na FIGURA 1B. Na fórmula química,  $\frac{3}{2}$  é usado para descrever um ponto de fixação ao filamento de oligonucleotídeo.



[0175] Métodos ou química apropriados (por exemplo, química de clique) podem ser usados para ligar um ligante de alvejamento a um nucleotídeo. Em algumas modalidades, um ligante de alvejamento é conjugado a um nucleotídeo usando um ligante de clique. Em algumas modalidades, um ligante à base de acetal é usado para conjugar um ligante de alvejamento a um nucleotídeo de qualquer um dos oligonucleotídeos aqui descritos. Os ligantes à base de acetal são revelados, por exemplo, na publicação de patente internacional WO2016100401, cujos conteúdos relacionados a tais ligantes são aqui incorporados por referência. Em algumas modalidades, o ligante é um ligante lábil. No entanto, em outras modalidades, o ligante é estável. Um “ligante lábil” refere-se a um ligante que pode ser clivado, por exemplo, por pH ácido. Um “ligante estável” se refere a um ligante que não pode ser clivado.

[0176] Um exemplo é mostrado abaixo para uma alça compreendendo de 5' a 3' dos nucleotídeos GAAA, em que porções GalNAc são ligadas aos nucleotídeos da alça usando um ligante de acetal. Uma tal alça pode estar presente, por exemplo, nas posições 27 a 30 das moléculas descritas na FIGURA 10. Na formula química, ~~é~~ é um ponto de fixação ao filamento de oligonucleotídeo.



[0177] Qualquer método ou química apropriados (por exemplo, química de clique) pode ser usado para ligar um ligante de alveamento a um nucleotídeo. Em algumas modalidades, um ligante de alveamento é conjugado a um nucleotídeo usando um ligante de clique. Em algumas

modalidades, um ligante à base de acetal é usado para conjugar um ligante de alvejamento a um nucleotídeo de qualquer um dos oligonucleotídeos aqui descritos. Os ligantes à base de acetal são revelados, por exemplo, na publicação de patente internacional WO2016100401, cujos conteúdos relacionados a tais ligantes são aqui incorporados por referência. Em algumas modalidades, o ligante é um ligante lábil. Em outras modalidades, o ligante é estável.

[0178] Em algumas modalidades, uma extensão de duplex (por exemplo, de até 3, 4, 5, ou 6 pares de base em comprimento) é fornecida entre um ligante de alvejamento (por exemplo, uma porção GalNAc) e um oligonucleotídeo de filamento duplo.

#### Formulações

[0179] Várias formulações foram desenvolvidas para facilitar o uso de oligonucleotídeos. Por exemplo, os oligonucleotídeos podem ser entregues a um indivíduo ou um ambiente celular usando uma formulação que minimiza a degradação, facilita a liberação e/ou absorção, ou fornece outra propriedade benéfica para os oligonucleotídeos na formulação. Em algumas modalidades, são fornecidas aqui composições compreendendo oligonucleotídeos (por exemplo, oligonucleotídeos de filamento único ou duplo) para reduzir a expressão de HMGB1. Essas composições podem ser adequadamente formuladas de modo que, quando administradas a um indivíduo, seja no ambiente imediato de uma célula alvo ou sistemicamente, uma porção suficiente dos oligonucleotídeos entre na célula para reduzir a expressão de HMGB1. Qualquer uma de uma variedade de formulações de oligonucleotídeos adequadas pode ser usada para liberar oligonucleotídeos para a redução de HMGB1 como aqui revelado. Em algumas modalidades, um oligonucleotídeo é formulado em soluções tampão, como soluções salinas tamponadas com fosfato, lipossomas, estruturas micelares e capsídeos.

[0180] As formulações de oligonucleotídeos com lipídeos catiônicos podem ser utilizadas para facilitar a transfecção dos oligonucleotídeos em células. Por exemplo, lipídios catiônicos, tais como lipofectina, derivados catiônicos de glicerol e moléculas policatiônicas (por exemplo, polilisina, podem ser usados. Os lipídios adequados incluem Oligofectamina, Lipofectamine (Life Technologies), NC388 (Ribozyme Pharmaceuticals, Inc., Boulder, Colorado.), ou FuGene 6 (Roche), todos os quais podem ser usados de acordo com as instruções do fabricante.

[0181] Por conseguinte, em algumas modalidades, uma formulação compreende uma nanopartícula de lipídeo. Em algumas modalidades, um excipiente compreende um lipossoma, um lipídio, um complexo lipídico, uma microesfera, uma micropartícula, uma nanosfera ou uma nanopartícula, ou pode ser formulado de outra forma para administração às células, tecidos, órgãos ou corpo de um indivíduo em necessidade (ver, por exemplo, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 22nd Ed., Pharmaceutical Press, 2013).

[0182] Em algumas modalidades, as formulações aqui reveladas compreendem um excipiente. Em algumas modalidades, um excipiente confere a uma composição estabilidade aprimorada, absorção aprimorada, solubilidade aprimorada e/ou aprimoramento terapêutico do ingrediente ativo. Em algumas modalidades, um excipiente é um agente tamponante (por exemplo, citrato de sódio, fosfato de sódio, uma base tris ou hidróxido de sódio) ou um veículo (por exemplo, uma solução tamponada, vaselina, dimetilsulfóxido ou óleo mineral). Em algumas modalidades, um oligonucleotídeo é liofilizado para estender sua vida útil e, em seguida, transformado em uma solução antes do uso (por exemplo, administração a um indivíduo). Consequentemente, um excipiente em uma composição compreendendo qualquer um dos oligonucleotídeos aqui descritos pode ser um lioprotetor (por exemplo, manitol, lactose, polietilenoglicol ou polivinilpirolidona) ou um

modificador de temperatura de colapso (por exemplo, dextrano, ficoll ou gelatina).

[0183] Em algumas modalidades, uma composição farmacêutica é formulada para ser compatível com sua via de administração intencionada. Exemplos de vias de administração incluem administração parenteral, por exemplo, intravenosa, intradérmica, subcutânea, oral (por exemplo, inalação), transdérmica (tópica), transmucosa, e retal.

[0184] Composições farmacêuticas adequadas para As composições farmacêuticas adequadas para uso injetável incluem soluções aquosas estéreis (quando solúveis em água) ou dispersões e pós estéreis para a preparação extemporânea de soluções ou dispersões injetáveis estéreis. Para administração intravenosa, os veículos adequados incluem soro fisiológico, água bacteriostática, Cremophor EL.TM. (BASF, Parsippany, N.J., EUA) ou solução salina tamponada com fosfato (PBS). O transportador pode ser um solvente ou meio de dispersão contendo, por exemplo, água, etanol, poliol (por exemplo, glicerol, propilenoglicol e polietilenoglicol líquido e semelhantes) e suas misturas adequadas. Em muitos casos, será preferível incluir agentes isotônicos, por exemplo, açúcares, poliálcoois, tais como manitol, sorbitol, cloreto de sódio na composição. As soluções injetáveis estéreis podem ser preparadas incorporando os oligonucleotídeos em uma quantidade necessária em um solvente selecionado com um ou uma combinação dos ingredientes enumerados acima, conforme necessário, seguido por esterilização por filtração.

[0185] Em algumas modalidades, uma composição pode conter pelo menos cerca de 0,1 % do agente terapêutico (por exemplo, um oligonucleotídeo para reduzir a expressão de HMGB1) ou mais, embora a porcentagem do(s) ingrediente(s) ativo(s) possa ser cerca de 1 % a cerca 80 % ou mais do peso ou volume da composição total. Fatores

como solubilidade, biodisponibilidade, meia-vida biológica, via de administração, prazo de validade do produto, bem como outras considerações farmacológicas, serão contemplados por um versado na técnica de preparação de tais formulações farmacêuticas e, como tal, uma variedade de dosagens e regimes de tratamento podem ser desejáveis.

[0186] Ainda que várias modalidades sejam dirigidas à liberação alvejada no fígado de qualquer um dos oligonucleotídeos aqui revelados, o alvejamento de outros tecidos também é considerado.

#### IV. Métodos de Uso

##### Redução da Expressão de HMGB1 em Células

[0187] Em algumas modalidades, métodos são fornecidos para liberar a uma célula uma quantidade eficaz de qualquer um dos oligonucleotídeos aqui revelados para fins de redução da expressão de HMGB1 na célula. Os métodos fornecidos neste documento são úteis em qualquer tipo de célula apropriado. Em algumas modalidades, uma célula é qualquer célula que expressa HMGB1 (por exemplo, hepatócitos, macrófagos, células derivadas de monócitos, células de câncer de próstata, células do cérebro, tecido endócrino, medula óssea, nódulos linfáticos, pulmão, vesícula biliar, fígado, duodeno, intestino delgado, pâncreas, rim, trato gastrointestinal, bexiga, tecido adiposo e mole e pele). Em algumas modalidades, a célula é uma célula primária que foi obtida de um indivíduo e que pode ter passado por um número limitado de passagens, de modo que a célula mantenha substancialmente suas propriedades fenotípicas naturais. Em algumas modalidades, uma célula à qual o oligonucleotídeo é entregue é ex vivo ou in vitro (por exemplo, pode ser entregue a uma célula em cultura ou a um organismo no qual a célula reside). Em modalidades específicas, são fornecidos métodos para liberar a uma célula uma quantidade eficaz de qualquer um dos oligonucleotídeos aqui revelados para fins de

redução da expressão de HMGB1 apenas em hepatócitos.

[0188] Em algumas modalidades, os oligonucleotídeos aqui revelados podem ser introduzidos usando métodos de liberação de ácido nucleico apropriados, incluindo injeção de uma solução contendo os oligonucleotídeos, bombardeio por partículas cobertas pelos oligonucleotídeos, expondo a célula ou organismo a uma solução contendo os oligonucleotídeos ou eletroporação de membranas celulares na presença dos oligonucleotídeos. Outros métodos apropriados para a liberação de oligonucleotídeos às células podem ser usados, tais como transporte de carreadores mediados por lipídios, transporte mediado por produtos químicos e transfecção de lipossomas catiônicos, tais como fosfato de cálcio e outros.

[0189] As consequências da inibição podem ser confirmadas por um ensaio apropriado para avaliar uma ou mais propriedades de uma célula ou indivíduo, ou por técnicas bioquímicas que avaliam moléculas indicativas de expressão de HMGB1 (por exemplo, RNA, proteína). Em algumas modalidades, a extensão em que um oligonucleotídeo fornecido neste documento reduz os níveis de expressão de HMGB1 é avaliada comparando os níveis de expressão (por exemplo, mRNA ou níveis de proteína de HMGB1 a um controle apropriado (por exemplo, um nível de expressão de HMGB1 em uma célula ou população de células para as quais um oligonucleotídeo não foi entregue ou para as quais um controle negativo foi entregue). Em algumas modalidades, um nível de controle apropriado da expressão de HMGB1 pode ser um nível ou valor predeterminado, de modo que um nível de controle não precise ser medido a cada tempo. O nível ou valor predeterminado pode assumir uma variedade de formas. Em algumas modalidades, um nível ou valor predeterminado pode ser um valor de corte único, como uma mediana ou média.

[0190] Em algumas modalidades, a administração de um

oligonucleotídeo como aqui descrito resulta em uma redução no nível de expressão de HMGB1 em uma célula. Em algumas modalidades, a redução em níveis de expressão de HMGB1 pode ser uma redução para 1 % ou mais baixo, 5 % ou mais baixo, 10 % ou mais baixo, 15 % ou mais baixo, 20 % ou mais baixo, 25 % ou mais baixo, 30 % ou mais baixo, 35 % ou mais baixo, 40 % ou mais baixo, 45 % ou mais baixo, 50 % ou mais baixo, 55 % ou mais baixo, 60 % ou mais baixo, 70 % ou mais baixo, 80 % ou mais baixo, ou 90 % ou mais baixo em comparação a um nível de controle apropriado de HMGB1. O nível de controle apropriado pode ser um nível de expressão de HMGB1 em uma célula ou população de células que foi contatada com um oligonucleotídeo como aqui descrito. Em algumas modalidades, o efeito de liberação de um oligonucleotídeo a uma célula de acordo com um método aqui revelado é avaliado depois de um período de tempo finito. Por exemplo, níveis de HMGB1 podem ser analisados em uma célula pelo menos 8 horas, 12 horas, 18 horas, 24 horas; ou pelo menos um, dois, três, quatro, cinco, seis, sete, ou quatorze dias depois de introdução do oligonucleotídeo na célula.

[0191] Em algumas modalidades, um oligonucleotídeo é entregue na forma de um transgene que é projetado para expressar em uma célula os oligonucleotídeos (por exemplo, suas filamentos de sentido e anti-sentido). Em algumas modalidades, um oligonucleotídeo é entregue usando um transgene que é projetado para expressar qualquer oligonucleotídeo aqui revelado. Os transgenes podem ser entregues usando vetores virais (por exemplo, adenovírus, retrovírus, vírus vaccinia, poxvírus, vírus adeno-associado ou vírus herpes simplex) ou vetores não virais (por exemplo, plasmídeos ou mRNAs sintéticos). Em algumas modalidades, os transgenes podem ser injetados diretamente em um indivíduo.

Métodos de Tratamento

[0192] Aspectos da revelação se referem a métodos para reduzir a expressão de HMGB1 para atenuar o início ou progressão da fibrose hepática em um indivíduo. Em algumas modalidades, os métodos podem compreender a administração a um indivíduo em necessidade de uma quantidade eficaz de qualquer um dos oligonucleotídeos aqui revelados. Esses tratamentos podem ser usados, por exemplo, para retardar ou interromper qualquer tipo de fibrose hepática. A presente revelação fornece métodos profiláticos e terapêuticos de tratamento de um indivíduo em risco de (ou suscetível a) uma doença ou transtorno associado a fibrose hepática e/ou inflamação hepática.

[0193] Os compostos da invenção têm como alvo seletivo o mRNA de HMGB1 exclusivamente no fígado. Em comparação com outras terapias NASH, espera-se que esta seletividade aumente a potência dos inibidores de HMGB1 das invenções enquanto diminui as interações fora do alvo e os efeitos colaterais potenciais.

[0194] Em certos aspectos, a revelação fornece um método para prevenir, em um indivíduo, uma doença ou transtorno, conforme descrito neste documento, pela administração ao indivíduo de um agente terapêutico (por exemplo, um oligonucleotídeo ou vetor ou transgene que codifica o mesmo). Em algumas modalidades, o indivíduo a ser tratado é um indivíduo que se beneficiará terapeuticamente de uma redução na quantidade de proteína HMGB1, por exemplo, no fígado. Os indivíduos em risco para a doença ou transtorno podem ser identificados por, por exemplo, um ou uma combinação de ensaios de diagnóstico ou prognóstico conhecidos na técnica (por exemplo, identificação de fibrose hepática e/ou inflamação hepática). A administração de um agente profilático pode ocorrer antes da detecção ou da manifestação de sintomas característicos da doença ou transtorno, de modo que a doença ou transtorno seja prevenido ou, alternativamente, retardado em sua progressão.

[0195] Em algumas modalidades, a revelação fornece métodos para usar oligonucleotídeos de RNAi da invenção para tratar indivíduos tendo ou suspeitos de terem condições hepáticas tais como, por exemplo, doença hepática colestática, doença hepática gordurosa não alcoólica (NAFLD) e esteato-hepatite não alcoólica (NASH).

[0196] Em algumas modalidades, a revelação fornece oligonucleotídeos de RNAi aqui descritos para o uso no tratamento de indivíduos tendo ou suspeitos de terem condições hepáticas tais como, por exemplo, doença hepática colestática, NAFLD e NASH.

[0197] Em algumas modalidades, a revelação fornece RNAi para a preparação de um medicamento para o tratamento de indivíduos tendo ou suspeitos de terem condições hepáticas tais como, por exemplo, doença hepática colestática, NAFLD e esteato-hepatite não alcoólica NASH.

[0198] Os métodos aqui descritos envolvem tipicamente a administração a um indivíduo de uma quantidade eficaz de um oligonucleotídeo, isto é, uma quantidade capaz de produzir um resultado terapêutico desejável. Uma quantidade terapeuticamente aceitável pode ser uma quantidade que é capaz de tratar uma doença ou transtorno. A dosagem apropriada para qualquer indivíduo dependerá de certos fatores, incluindo o tamanho do indivíduo, área de superfície corporal, idade, a composição particular a ser administrada, o(s) ingrediente(s) ativo(s) na composição, tempo e via de administração, saúde geral, e outras drogas sendo administradas simultaneamente.

[0199] Em algumas modalidades, um indivíduo é administrado com qualquer uma das composições aqui reveladas, quer entericamente (por exemplo, oralmente, por tubo de alimentação gástrica, por tubo de alimentação duodenal, via gastrostomia ou retal), parenteralmente (por exemplo, injeção subcutânea, injeção intravenosa ou infusão, injeção intra-arterial ou infusão, infusão intraóssea, injeção intramuscular,

injeção intracerebral, injeção intracerebroventricular, intratecal), topicamente (por exemplo, epicutânea, inalatória, via colírio ou através de uma membrana mucosa), ou por injeção direta em um órgão-alvo (por exemplo, o fígado de um indivíduo). Normalmente, os oligonucleotídeos aqui revelados são administrados por via intravenosa ou subcutânea.

[0200] Como um conjunto não limitativo de exemplos, os oligonucleotídeos da presente revelação seriam tipicamente administrados trimestralmente (uma vez a cada três meses), bimestral (uma vez a cada dois meses), mensalmente ou semanalmente. Por exemplo, os oligonucleotídeos podem ser administrados todas as semanas ou em intervalos de duas ou três semanas. Em algumas modalidades, os oligonucleotídeos podem ser administrados diariamente.

[0201] Em algumas modalidades, o indivíduo a ser tratado é um indivíduo humano ou de primata não humano ou outro mamífero. Outros indivíduos exemplares incluem animais domesticados tais como cães e gatos; animais de criação tais como cavalos, gado, porcos, ovelha, cabras, e galinhas; e animais tais como camundongos, ratos, porquinhos-da-índia, e hamsters.

## EXEMPLOS

Exemplo 1: Atividade in vivo de oligonucleotídeos de HMGB1 conjugados a GalNAc

[0202] Os oligonucleotídeos de HMGB1 usados neste exemplo foram projetados para se ligar a sequências conservadas identificadas pelo algoritmo em sequências humanas, de macaco (ambos rhesus) e de camundongo (sequências “triplos comuns”). Neste estudo, três sequências de oligonucleotídeos triplos comuns (S31-AS18, S35-AS22 e S36-AS23) foram testadas em 3 padrões de modificação diferentes (M1, M2 e M3, ver Figuras 1A e 1B). Os oligonucleotídeos foram

administrados por via subcutânea a camundongos CD-1 a 1 mg/kg e os camundongos foram sacrificados no dia 5 após a administração. Amostras de fígado foram obtidas e o RNA foi extraído para avaliar os níveis de mRNA de HMGB1 por qPCR (normalizado para HPRT1-F576 (gene de manutenção)). Os níveis de mRNA de HMGB1 remanescentes foram interrogados usando ensaios de qPCR baseados em TAQMAN®.

[0203] A qPCR foi realizada usando dois iniciadores diferentes específicos para diferentes regiões no mRNA de HMGB1. A qPCR realizada usando o iniciador na extremidade 5' em relação ao outro iniciador foi designada "qPCR 5'". Da mesma forma, a qPCR realizada usando o iniciador na extremidade 3' em relação ao outro iniciador foi designada "qPCR 3'". Neste experimento, um ensaio de qPCR 3' (usando o iniciador MmHMGB1-F1541) foi usado. Os dados mostraram que todos os oligonucleotídeos de HMGB1 testados eram potentes em HMGB1 knockdown 5 dias após a administração, conforme indicado pela quantidade reduzida de mRNA de HMGB1 remanescente no fígado de camundongos (normalizado para um tratamento de controle de PBS) (FIGURA 1A).

[0204] Dois oligonucleotídeos de HMGB1 conjugados a GalNAc com diferentes padrões de modificação (S31-AS18-M3 e S35-AS22-M2) foram ainda testados em uma análise de resposta à dose, usando o composto de ferramenta S36-AS23-M2 como controle. Os três oligonucleotídeos foram administrados por via subcutânea a camundongos CD-1 em três dosagens diferentes (0,5 mg/kg, 1 mg/kg e 2 mg/kg). Os camundongos foram sacrificados no dia 5 após a administração. Amostras de fígado foram obtidas e o RNA foi extraído para avaliar os níveis de mRNA de HMGB1 por qPCR (normalizado para HPRT1-F576 (gene de manutenção)). Os níveis de mRNA de HMGB1 remanescentes foram interrogados usando ensaios de qPCR baseados em TAQMAN® (um ensaio 3', conforme descrito acima foi utilizado). Os

resultados mostram que os dois oligonucleotídeos de HMGB1 conjugados a GalNAc testados, em ambos os padrões de modificação, reduziram o nível de mRNA de HMGB1 do fígado no fígado de camundongos (FIGURA 2). Todos os oligonucleotídeos mostraram ED50s de ~ 0,5-1,0 mg/kg, especialmente se o ' piso' não hepatócito for considerado.

[0205] Os dois oligonucleotídeos de HMGB1 conjugados a GalNAc com diferentes padrões de modificação (S31-AS18-M3 e S35-AS22-M2) foram então testados in vivo em um estudo de duração para avaliar sua atividade na inibição da expressão de HMGB1 em camundongos. PBS foi usado como controle negativo, e o composto de ferramenta S36-AS23-M2 foi usado como controle positivo neste experimento. Os oligonucleotídeos foram administrados por via subcutânea a camundongos CD-1 a 1 mg/kg e os camundongos foram sacrificados nos dias 7, 14, 21 e 28 após a administração. Amostras de fígado foram obtidas e o RNA foi extraído para avaliar os níveis de mRNA de HMGB1 por qPCR (normalizado para o gene de manutenção HPRT1-F576). Um ensaio 3' conforme descrito acima foi usado. Os dados mostraram que todos os oligonucleotídeos de HMGB1 testados foram potentes em knockdown HMGB1 3 semanas após a injeção, mesmo com 1 mg/kg de dose única, conforme indicado pela quantidade reduzida de mRNA de HMGB1 remanescente no fígado de camundongos nos dias 7, 14, 21 e 28 (normalizado para um tratamento de controle de PBS) (FIGURA 3).

Exemplo 2: Triagem in vitro adicional de novas sequências de oligonucleotídeos de HMGB1 de RNAi para identificar oligonucleotídeos de RNAi adicionais que inibem a expressão de HMGB1

[0206] 288 oligonucleotídeos de HMGB1 de RNAi triplos comuns adicionais (ver Tabela 4 para sequências) foram triados em um ensaio de atividade in vitro para identificar sequências de oligonucleotídeos de RNAi adicionais que são eficazes em inibir a expressão de HMGB1

(Figuras 4A a 4F). Neste ensaio, células Huh-7 foram transfectadas com os oligonucleotídeos indicados. As células foram mantidas por 24 h após a transfecção, os RNAs foram isolados usando o tampão de preparação de amostra RT-qPCR iScript. mRNA de HMGB1 foram interrogados usando ensaios de qPCR com base em TAQMAN®. Dois ensaios de qPCR, um ensaio em 5' e um ensaio em 3', foram usados para determinar os níveis de mRNA como medido por HEX (gene housekeeping - HPRT-F576/SFRS9-F594) e sondas de FAM, respectivamente.

[0207] A porcentagem de mRNA remanescente é mostrada para cada um do ensaio em 5' (vermelho) e do ensaio em 3' (azul). Oligonucleotídeos com a porcentagem mais baixa de mRNA remanescente em comparação a controles de transfecção simulada foram considerados hits. Oligonucleotídeos com baixa complementaridade ao genoma humano foram usados como controles negativos.

[0208] Vinte e duas (22) novas sequências identificadas na triagem foram feitas em oligonucleotídeos tetraloop conjugados a GalNAc (ver Tabela 2 e Tabela 5 para sequências) com dois padrões de modificação diferentes (M2 e M3, respectivamente) e suas atividades in vivo em reduzir o nível de mRNA de HMGB1 do fígado foram testados. PBS foi usado como controle negativo, e o composto de ferramenta em dois padrões de modificação diferentes (S36-AS23-M2 e S36-AS23-M3) foram usados como controle positivo neste experimento. Os oligonucleotídeos foram administrados por via subcutânea a camundongos CD-1 a 1 mg/kg, e os camundongos foram sacrificados no dia 5 após a administração. Amostras de fígado foram obtidas e o RNA foi extraído para avaliar os níveis de mRNA de HMGB1 por qPCR (normalizado para HPRT1-F576 (gene Housekeeping)). Os níveis de mRNA de HMGB1 remanescentes foram interrogados usando ensaios

de qPCR baseados em TAQMAN® (foi usado o ensaio 3). os resultados mostram que os novos oligonucleotídeos conjugados a GalNAc tinham diferentes níveis de atividade na inibição de HMGB1 do fígado e 7 novos oligonucleotídeos de HMGB1 conjugados a GalNAc (conforme indicado pela seta, S27-AS14, S28-AS15, S29-AS16, S30-AS17, S32 -AS19, S33-AS20 e S34-AS21) foram selecionados para serem incluídos no estudo de duração de knockdown, se pelo menos 50 % de supressão de mRNA de HMGB1 for alcançada 3 semanas após uma dose única de 3 a 5 mg/kg em camundongos (FIGURA 5).

[0209] Para o ensaio de duração de knockdown, os 7 novos oligonucleotídeos de HMGB1 conjugados a GalNAc (S27-AS14, S28-AS15, S29-AS16, S30-AS17, S32-AS19, S33-AS20 e S34-AS21) com modificações diferentes padrões (M2 ou M3) foram testados e comparados com dois oligonucleotídeos de HMGB1 conjugados a GalNAc previamente identificados (S31-AS18-M3 e S35-AS22-M2). PBS foi usado como controle negativo e o composto de ferramenta S36-AS23-M2 foi usado como controle positivo. Os oligonucleotídeos foram administrados por via subcutânea a camundongos CD-1 a 4 mg/kg e os camundongos foram sacrificados no dia 21 após a administração. Amostras de fígado foram obtidas e o RNA foi extraído para avaliar os níveis de mRNA de HMGB1 por qPCR (normalizado para HPRT1-F576 (gene Housekeeping)). Os níveis de mRNA de HMGB1 remanescentes foram interrogados usando ensaios de qPCR baseados em TAQMAN® (ensaio 3' foi usado). a porcentagem de mRNA de HMGB1 remanescente no fígado 21 dias após a administração dos oligonucleotídeos, normalizados para tratamento de controle de PBS, é mostrado na FIGURA 6. Todos os oligonucleotídeos de HMGB1 testados foram potentes em knockdown HMGB1 3 semanas após a injeção.

Exemplo 3: Teste de oligonucleotídeos de HMGB1 conjugados a

GalNAc em hepatócitos primários de macaco ou humanos

[0210] Os oligonucleotídeos de HMGB1 conjugados a GalNAc testados nesta experiência foram mostrados na FIGURA 7. Também mostrado na FIGURA 7 é um oligonucleotídeo LDHA conjugado a GalNAc para uso como controle positivo. Neste ensaio, os oligonucleotídeos de HMGB1 de conjugados de GalNAc foram entregues por captação mediada pelo receptor ASGPR nas células do hepatócito primário de macaco (Figuras 8A e 8B) ou nas hepatócitos humanos (FIGURA 8C).

[0211] As células foram mantidas por 24 horas após a liberação dos oligonucleotídeos. O RNA foi extraído para avaliar os níveis de mRNA de HMGB1 por qPCR (normalizado para RhPPIB (gene Housekeeping) para hepatócitos de macaco e HPRT1-F576 (gene Housekeeping) para hepatócitos humanos). Os níveis de mRNA de HMGB1 remanescentes foram interrogados usando ensaios de qPCR baseados em TAQMAN®. Ensaio de qPCR RhMHGB1-F457 (Figuras 8A e 8B) e ensaio HsHMGB1-F81 (FIGURA 8C) foram usados. O oligonucleotídeo LDHA-1360 conjugado a GalNAc foi usado como controle do ensaio (FIGURA 8D) e o nível de mRNA de LDHA remanescente foi medido pelo ensaio RhLDHA-F887 qPCR. Curvas IC50 de RhHMGB1, normalizadas para tratamento simulado, são mostradas.

[0212] Quatro oligonucleotídeos de HMGB1 conjugados a GalNAc exemplares (S27-AS14-M2, S33-AS20-M2, S35-AS22-M2, e S37-AS24-M2) foram ainda testados in vivo em primatas não humanos (macacos) para sua atividade no knockdown de HMGB1. PBS foi usado como controle negativo, e o composto de ferramenta S36-AS23-M2 foi usado como controle positivo neste experimento. As estruturas de S27-AS14-M2, S33-AS20-M2, S35-AS22-M2 e S36-AS23-M2 estão representadas na FIGURA 7.

[0213] Os oligonucleotídeos foram administrados por via

subcutânea a primatas não humanos a 4 mg/kg, uma dose única, ou 2 mg/kg, 4 doses repetidas. Biópsias de fígado de macaco foram feitas em cada momento após a administração. Amostras de fígado foram obtidas e o RNA foi extraído para avaliar os níveis de mRNA de HMGB1 por qPCR. As percentagens de mRNA de HMGB1 remanescente no fígado de macaco 7, 14, 25, 54, 81 e 112 dias após a administração, normalizado para o tratamento de controle de PBS, são mostradas (Figuras 9A-9B). Os resultados mostram que todos os oligonucleotídeos testados reduziram significativamente o nível de mRNA de HMGB1 do fígado 25 dias após a administração. Com 4 doses repetidas de 2 mg/kg, o efeito knockdown de HMGB1 durou 112 dias (FIGURA 9B).

Exemplo 4: Comparação de oligonucleotídeos de HMGB1 de RNAi em hepatócitos primários de macaco/humanos

[0214] A atividade de cinco oligonucleotídeos de RNAi de filamento duplo HMGB1 (S866-AS887, S869-AS878, S116-AS490, S117-AS491, S871-AS880 e S872-AS881 na Tabela 4) foram comparadas em camundongos, macacos e humanos linhas de celular. PBS foi usado como controle negativo, e o composto de ferramenta S36-AS23-M2 foi usado como controle positivo neste experimento. Neste ensaio, células de camundongo (células Hepa1-6, Figuras 10A e 10B), células de macaco (células LLC-MK2, Figuras 10C e 10D) e células humanas (Huh-7, Figuras 10E e 10F) foram transfectadas com os oligonucleotídeos indicados, respectivamente. As células foram mantidas por 24 horas após a transfecção, os RNAs foram isolados usando o tampão de preparação de amostra iScript RT-qPCR. O mRNA de HMGB1 foi interrogado usando ensaios de qPCR baseados em TAQMAN®. Dois ensaios de qPCR, um ensaio 5' (Figuras 10A, 10C e 10E) e um ensaio 3' FIG (Figuras 10B, 10D e 10F), foram usados para determinar os níveis de mRNA medidos por HEX (gene de manutenção - HPRT- F576) e sondas FAM, respectivamente. Os oligonucleotídeos

210, 840, 852, 853 mostram mais de 80 % de knockdown em concentrações de 0,1 nM e 1 nM em ambos os ensaios na linha de células de camundongo (Figuras 10A e 10B). Todos os oligonucleotídeos de RNAi exibem mais de 80 % KD em concentrações de 0,1 nM e 1 nM (Figuras 10C e 10D). Os oligonucleotídeos 210, 840, 852, 853, 932 mostram melhor potência com mais de ~ 90 % KD em concentrações de 0,1 nM e 1 nM na linha de células humanas (Figuras 10E e 10F).

Exemplo 5: Teste de GalXC-HMGB1 para seletividade de HMGB1

[0215] A seletividade dos oligonucleotídeos de HMGB1 conjugados a GalNAc S27-AS14-M2, S33-AS20-M2, S35-AS22-M2 e S36-AS23-M2 contra HMGB1, HMGB2 e HMGB3 foram testados em hepatócitos humanos. As estruturas de S27-AS14-M2, S33-AS20-M2, S35-AS22-M2 e S36-AS23-M2 são representadas na FIGURA 7. Um oligonucleotídeo LDHA conjugado a GalNAc para uso como controle positivo. As células Huh-7 foram transfectadas com os oligonucleotídeos indicados com 8 concentrações diferentes (diluição de 4 vezes com 8 pontos, a concentração mais elevada é 1 nM). As células foram mantidas por 24 horas após a transfecção, os RNAs foram isolados usando o tampão de preparação de amostra iScript RT-qPCR. O mRNA de HMGB1 foi interrogado usando ensaios de qPCR baseados em TAQMAN®. Ensaio de 5' qPCR usado para determinar os níveis de mRNA medidos por HEX (gene de manutenção - SFRS9) e sondas FAM, respectivamente. Curvas IC50 de HMGB1 (FIGURA 11A), HMGB2 (FIGURA 11B) e HMGB3 (FIGURA 11C), normalizado para tratamento simulado, são mostradas. Todos os quatro conjugados testados tinham valores de IC50 semelhantes para HMGB1 (FIGURA 11A). Nenhum dos conjugados (incluindo o oligonucleotídeo de controle LDHA) teve qualquer efeito do nível de mRNA de HMGB2 (FIGURA 11B) ou nível de mRNA de HMGB3 (FIGURA 11C).

## Exemplo 6: Materiais e Métodos

### Transfecção

[0216] Para a primeira triagem, Lipofectamine RNAiMAX™ foi usado para complexar os oligonucleotídeos para transfecção eficiente. Os oligonucleotídeos, RNAiMAX e Opti-MEM foram adicionados a uma placa e incubados à temperatura ambiente por 20 minutos antes da transfecção. O meio foi aspirado de um frasco de células de passagem ativa e as células foram incubadas a 37 °C na presença de tripsina por 3-5 minutos. Depois que as células não aderiram mais ao frasco, o meio de crescimento celular (sem penicilina e estreptomicina) foi adicionado para neutralizar a tripsina e suspender as células. Uma alíquota de 10 µL foi removida e contada com um hemocítmetro para quantificar as células por milímetro. Para células HeLa, 20.000 células foram semeadas por poço em 100 µL de meio. A suspensão foi diluída com a concentração de células conhecida para obter o volume total necessário para o número de células a serem transfectadas. A suspensão de células diluída foi adicionada às placas de transfecção de 96 poços, que já continham os oligonucleotídeos em Opti-MEM. As placas de transfecção foram então incubadas durante 24 horas a 37 °C. Após 24 horas de incubação, o meio foi aspirado de cada poço. As células foram lisadas usando o tampão de lise do kit Promega RNA Isolation. O tampão de lise foi adicionado a cada poço. As células lisadas foram então transferidas para o Corbett XtractorGENE (QIAxtractor) para isolamento de RNA ou armazenadas a -80 °C.

[0217] Para triagens e experiências subsequentes, por exemplo, o triagem secundário, Lipofectamine RNAiMAX foi utilizado para complexar os oligonucleotídeos para transfecção reversa. Os complexos foram feitos pela mistura de RNAiMAX e siRNAs em meio OptiMEM por 15 minutos. A mistura de transfecção foi transferida para placas de múltiplos poços e suspensão de células foi adicionada aos

poços. Após 24 horas de incubação, as células foram lavadas uma vez com PBS e depois lisadas usando tampão de lise do kit Promega SV96. O RNA foi purificado usando as placas SV96 em um coletor de vácuo. Quatro microlitros do ARN purificado foram então aquecidos a 65 °C durante 5 minutos e arrefecidos a 4 °C. O RNA foi então usado para a transcrição reversa usando o kit High Capacity Reverse Transcription (Life Technologies) em uma reação de 10 microlitros. O cDNA foi então diluído para 50 µL com água livre de nuclease e usado para PCR quantitativo com ensaios de endonuclease 5' multiplexados e SSoFast qPCR mastermix (Bio-Rad laboratories).

#### Síntese de cDNA

[0218] O RNA foi isolado de células de mamíferos em cultura de tecidos usando o Corbett X-tractor Gene™ (QIAextractor). Um protocolo SuperScript II modificado foi usado para sintetizar cDNA a partir do RNA isolado. O RNA isolado (aproximadamente 5 ng/µL) foi aquecido a 65 °C por cinco minutos e incubado com dNPs, hexâmeros aleatórios, oligo dTs e água. A mistura foi arrefecida durante 15 segundos. Uma “mistura de enzimas”, consistindo em água, tampão de primeiro filamento 5X, DTT, SUPERase•In™ (um inibidor de RNA) e SuperScript II RTase foi adicionada à mistura. O conteúdo foi aquecido a 42 °C durante uma hora, depois a 70 °C durante 15 minutos e depois arrefecido a 4 °C utilizando um termociclador. O cDNA resultante foi então submetido a qPCR baseado em SYBR®. As reações de qPCR foram multiplexadas, contendo dois ensaios de endonuclease 5' por reação..

#### Ensaio de qPCR

[0219] Os conjuntos de iniciador foram inicialmente selecionados usando qPCR baseado em SYBR®. A especificidade do ensaio foi verificada avaliando as curvas de fusão, bem como os controles “menos RT”. Diluições de molde de cDNA (diluições em série de 10 vezes de 20 ng e 0,02 ng por reação) de células HeLa e Hepa1-6 são usadas para testar

ensaios humanos (Hs) e de camundongo (Mm), respectivamente. Os ensaios de qPCR foram configurados em placas de 384 poços, cobertos com filme MicroAmp e executados no 7900HT da Applied Biosystems. As concentrações de reagentes e as condições de ciclo incluíram o seguinte: mistura SYBR 2x, iniciador direto 10 µM, iniciador reverso 10 µM, DD H<sub>2</sub>O e modelo de cDNA até um volume total de 10 µL.

[0220] Em alguns casos, conforme observado, qPCR foi realizada usando ensaios de qPCR baseados em TAQMAN®. As sondas TAQMAN® têm como alvo duas posições diferentes (5' e 3' uma para a outra) dentro da região de codificação do mRNA alvo (por exemplo, HMGB1) foram geralmente usadas para fornecer confirmação adicional dos níveis de mRNA na análise.

#### Clonagem

[0221] Os amplicons de PCR que exibiram uma única curva de fusão foram ligados ao kit de vetor pGEM®-T Easy da Promega de acordo com as instruções do fabricante. Seguindo o protocolo do fabricante, as células JM109 de alta eficiência foram transformadas com os vetores recém-ligados. As células foram então semeadas em placas LB contendo ampicilina e incubadas a 37 °C durante a noite para o crescimento da colônia.

#### Triagem de PCR e Mini-Prep de Plasmídeo

[0222] A PCR foi usada para identificar colônias de E. coli que foram transformadas com um vetor contendo o amplicon ligado de interesse. Iniciadores específicos de vetor que flanqueiam a inserção foram usados na reação de PCR. Todos os produtos de PCR foram então executados em um gel de agarose a 1 % e fotografados por um transiluminador após a coloração. Os géis foram avaliados qualitativamente para determinar quais plasmídeos pareciam conter um amplicon ligado do tamanho esperado (aproximadamente 300 pb, incluindo o amplicon e as sequências de vetor de flanqueamento

específicas para os iniciadores usados).

[0223] As colônias que foram confirmadas como transformantes por triagem de PCR foram então incubadas durante a noite em culturas consistindo em 2 mL de caldo LB com ampicilina a 37 °C com agitação. As células de *E. coli* foram então lisadas e os plasmídeos de interesse foram isolados usando o kit Mini-Prep da Promega. A concentração de plasmídeo foi determinada pela absorbância de UV a 260 nm.

#### Sequenciamento e Quantificação de Plasmídeo

[0224] Os plasmídeos purificados foram sequenciados usando o kit de sequenciação BigDye® Terminator. O iniciador específico do vetor, T7, foi usado para fornecer comprimentos de leitura que abrangem a inserção. Os seguintes reagentes foram usados nas reações de sequenciação: água, tampão de sequenciação 5X, mistura de terminador BigDye, iniciador T7 e plasmídeo (100 ng/μL) até um volume de 10 μL. A mistura foi mantida a 96 °C durante um minuto, depois submetida a 15 ciclos de 96 °C durante 10 segundos, 50 °C durante 5 segundos, 60 °C durante 1 minuto, 15 segundos; 5 ciclos de 96 °C por 10 segundos, 50 °C por 5 segundos, 60 °C por 1 minuto, 30 segundos; e 5 ciclos de 96 °C por 10 segundos, 50 °C por 5 segundos e 60 °C por 2 minutos. As reações de terminação de corante foram então sequenciadas usando sequenciadores de eletroforese capilar da Applied Biosystems.

[0225] Os plasmídeos verificado por sequência foram então quantificados. Eles foram linearizados usando uma única endonuclease de restrição de corte. A linearidade foi confirmada por eletroforese em gel de agarose. Todas as diluições de plasmídeo foram feitas em tampão TE (pH 7,5) com 100 μg de tRNA por mL de tampão para reduzir a ligação não específica do plasmídeo aos frascos de polipropileno.

[0226] Os plasmídeos linearizados foram então diluídos em série de 1.000.000 a 01 cópias por μL e submetidos a qPCR. A eficiência do

ensaio foi calculada e os ensaios foram considerados aceitáveis se a eficiência estivesse na faixa de 90 a 110 %.

#### Ensaio de Multiplexação

[0227] Para cada alvo, os níveis de mRNA foram quantificados por dois ensaios de nuclease 5'. Em geral, vários ensaios são selecionados para cada alvo. Os dois ensaios selecionados exibiram uma combinação de boa eficiência, baixo limite de detecção e ampla cobertura 5' a 3' do gene de interesse (GOI). Ambos os ensaios contra um GOI puderam ser combinados em uma reação quando diferentes fluoróforos foram usados nas respectivas sondas. Assim, a etapa final na validação do ensaio foi determinar a eficiência dos ensaios selecionados quando eles foram combinados no mesmo qPCR ou "multi-plexado".

[0228] Plasmídeos linearizados para ambos os ensaios em diluições de 10 vezes foram combinados e qPCR foi realizada. A eficiência de cada ensaio foi determinada como descrito acima. A taxa de eficiência aceita foi de 90 a 110 %.

[0229] Enquanto validando as reações multi-plexadas usando padrões de plasmídeo linearizado, valores de Cq para o alvo de interesse também foram avaliados usando cDNA como o padrão. Para alvos humanos ou de camundongo, cDNA de HeLa e Hepa1-6 foram usados, respectivamente. O cDNA, neste caso, foi derivado do RNA isolado no Corbett (~5 ng/μL em água) de células não transfectadas. Deste modo, os valores de Cq observados a partir deste cDNA de amostra foram representativos dos valores de Cq esperados de uma transfecção em placa de 96 poços. Em casos onde valores de Cq foram maiores do que 30, outras linhagens celulares foram buscadas que exibem níveis de expressão mais altos do gene de interesse. Uma biblioteca de RNA total isolado por intermédio de métodos de alto rendimento no Corbett de cada linhagem humana e de camundongo foi

gerada e usada para triar quanto a níveis aceitáveis de expressão alvo.

Descrição da nomenclatura de oligonucleotídeo

[0230] Todos os oligonucleotídeos aqui descritos são designados como SN1-ASN2-MN3. As designações seguintes se aplicam:

[0231] N1: número de identificador de sequência da sequência de filamento de sentido

[0232] N2: número de identificador de sequência da sequência de filamento anti-sentido

[0233] N3: número de referência de padrão de modificação, em que cada número representa um padrão de nucleotídeos modificados no oligonucleotídeo.

[0234] Por exemplo, S1-AS14-M1 representa um oligonucleotídeo com uma sequência de sentido que é apresentada pela SEQ ID NO: 1, uma sequência anti-sentido que é apresentada pela SEQ ID NO: 14, e que é adaptada ao padrão de modificação número 1.

Tabela 1: Principais Sequências de Oligonucleotídeo de RNAi de HMGB1

Designação para Sentido (S) - Anti-sentido (A)	Sequência de Sentido/Sequência de mRNA	CONFORME A SEQ ID NO:	Sequência Anti-sentido	CONFORME A SEQ ID NO:
S1-AS14	UGGGCAAAGGAGAUC CUAAA	1	UUUAGGAUCUCC UUUGCCCAGG	14
S2-AS15	AAAGAGAAAUGAAAAC CUAA	2	UUAGGUUUUCAU UUCUCUUUGG	15
S3-AS16	AAGAAGAUGAUGAUG AUGAA	3	UUCAUCAUCAUCA UCUUCUUGG	16
S4-AS17	AUGAUGAUGAUGAAU AAGUA	4	UACUUUUUCAUCA UCAUCAUGG	17
S5-AS18	GAUGAUGAAUAAGUU GGUUC	5	GAACCAACUUAAU CAUCAUCGG	18
S6-AS19	UGAAUAAGUUGGUUC UAGCA	6	UGCUGAACC CUUAUUCAGG	19
S7-AS20	AAUAAGUUGGUUCUA GCGCA	7	UGCUGAACC AACUUUUGG	20

Designação para Sentido (S) - Anti-sentido (A)	Sequência de Sentido/Sequência de mRNA	CONFORME A SEQ ID NO:	Sequência Anti-sentido	CONFORME A SEQ ID NO:
S8-AS21	AUAAGUUGGUUCUAG CGCAA	8	UUGCGCUAGAAC CAACUUAUGG	21
S9-AS22	AGAAAAAAAAUUGAAU GUAA	9	UUACAUUUCAAUU UUUUUCUGG	22
S10-AS23	UUGUUGUUCUGUUA CUGAA	10	UUCAGUUAACAG AACACAAGG	23
S11-AS24	UUCUGAAUGCUUCUA AGUAA	11	UUACUUGAAGC AUUCAGAAGG	24
S12-AS25	CUGAAUGCUUCUAG UAAAA	12	UUUUACUUGAA GCAUUCAGGG	25
S13-AS26	GAAUGCUUCUAAGUA AAUAA	13	UUUUUACUUG AAGCAUUCGG	26

Tabela 2: Principais sequências de oligonucleotídeo de HMGB1 conjugado a GalNAc com modificações

Oligonucleotídeos conjugados a GalNAc	Sequência de sentido (não modificada)	Sequência de sentido (modificada)	Sequência anti-sentido (não modificada)	Sequência anti-sentido (modificada)
S27-AS14-M2	UGGGCAAAGGAG AUCCUAAAGCAGC CGAAAGGCUGC (SEQ ID NO: 27)	[mUs][mG][mG][mG] [mC][mA][mA][fA][fG] ][fG][fA][mG][mA][m U][mC][mC][mU][mA ][mA][mA][mG][mC][ mA][mG][mC][mC][m G][adema- GalNAc][adema- GalNAc][adema- GalNAc][mG][mG][m C][mU][mG][mC] (SEQ ID NO: 788)	UUUAGGAUCUCC UUUGCCCAGG (SEQ ID NO: 14)	[MeFosfonato-4O- mUs][fUs][fU][mA][f G][mG][fA][mU][mC][ fU][mC][mC][mU][fU] [mU][mG][mC][mC][ mC][mAs][mGs][mG] (SEQ ID NO: 814)
S27-AS14-M3	UGGGCAAAGGAG AUCCUAAAGCAGC CGAAAGGCUGC (SEQ ID NO: 27)	[mUs][mG][fG][mG][ mC][mA][mA][fA][m G][fG][mA][fG][fA][m U][mC][mC][fU][mA][ mA][mA][mG][mC][m	UUUAGGAUCUCC UUUGCCCAGG (SEQ ID NO: 14)	[MeFosfonato-4O- mUs][fUs][fU][fA][fG] [mG][fA][mU][mC][fU] ][mC][fC][mU][fU][m U][fG][fC][mC][fC][m

Oligonucleotídeos conjugados a GalNAc	Sequência de sentido (não modificada)	Sequência de sentido (modificada)	Sequência anti-sentido (não modificada)	Sequência anti-sentido (modificada)
		A][mG][mC][mC][mG][ademA-GalNAc][ademA-GalNAc][ademA-GalNAc][mG][mG][mC][mU][mG][mC] (SEQ ID NO: 789)		As][mGs][mG] (SEQ ID NO: 815)
S28-AS15-M2	AAAGAGAAAUGAA AACCUAAGCAGCC GAAAGGCUGC (SEQ ID NO: 28)	[mAs][mA][mA][mG][mA][mG][mA][fA][fA][fU][fG][mA][mA][mA][mA][mC][mC][mU][mA][mA][mG][mC][mA][mG][mC][mC][mG][ademA-GalNAc][ademA-GalNAc][ademA-GalNAc][mG][mG][mC][mU][mG][mC] (SEQ ID NO: 790)	UUAGGUUUUCAU UUCUCUUUGG (SEQ ID NO: 15)	[MeFosfonato-4O-mUs][fUs][fA][mG][fG][mU][fU][mU][mU][fC][mA][mU][mU][fU][mC][mU][mC][mU][mU][mUs][mGs][mG] (SEQ ID NO: 816)
S28-AS15-M3	AAAGAGAAAUGAA AACCUAAGCAGCC GAAAGGCUGC (SEQ ID NO: 28)	[mAs][mA][fA][mG][mA][mG][mA][fA][mA][fU][mG][fA][fA][mA][mA][mC][fC][mU][mA][mA][mG][mC][mA][mG][mC][mC][mG][ademA-GalNAc][ademA-GalNAc][ademA-GalNAc][mG][mG][mC][mU][mG][mC] (SEQ ID NO: 791)	UUAGGUUUUCAU UUCUCUUUGG (SEQ ID NO: 15)	[MeFosfonato-4O-mUs][fUs][fA][fG][fG][mU][fU][mU][mU][fC][mA][fU][mU][fU][mC][fU][fC][mU][fU][mUs][mGs][mG] (SEQ ID NO: 817)
S29-AS16-M2	AAGAAGAUGAUGA UGAUGAAGCAGC CGAAAGGCUGC (SEQ ID NO: 29)	[mAs][mA][mG][mA][mA][mG][mA][fU][fG][fA][fU][mG][mA][mU][mG][mA][mU][mG][mA][mA][mG][mC][m	UUCAUCAUCAUCA UCUUCUUGG (SEQ ID NO: 16)	[MeFosfonato-4O-mUs][fUs][fC][mA][fU][mC][fA][mU][mC][fA][mU][mC][mA][fU][mC][mU][mU][mC][m

Oligonucleotídeos conjugados a GalNAc	Sequência de sentido (não modificada)	Sequência de sentido (modificada)	Sequência anti-sentido (não modificada)	Sequência anti-sentido (modificada)
		A][mG][mC][mC][mG][ademA-GalNAc][ademA-GalNAc][ademA-GalNAc][mG][mG][mC][mU][mG][mC] (SEQ ID NO: 792)		U][mUs][mGs][mG] (SEQ ID NO: 818)
S29-AS16-M3	AAGAAGAUGAUGAUGAUGAAGCAGCGAAAGGCUGC (SEQ ID NO: 29)	[mAs][mA][fG][mA][mA][mG][mA][fU][mG][fA][mU][fG][fA][mU][mG][mA][fU][mG][mA][mA][mG][mC][mA][mG][mC][mG][ademA-GalNAc][ademA-GalNAc][ademA-GalNAc][mG][mG][mC][mU][mG][mC] (SEQ ID NO: 793)	UUCAUCAUCAUCAUCUUCUUGG (SEQ ID NO: 16)	[MeFosfonato-4O-mUs][fUs][fC][fA][fU][mC][fA][mU][mC][fA][mU][fC][mA][fU][mC][fU][fU][mC][fU][mUs][mGs][mG] (SEQ ID NO: 819)
S30-AS17-M2	AUGAUGAUGAUGAAUAAGUAGCAGCGAAAGGCUGC (SEQ ID NO: 30)	[mAs][mU][mG][mA][mU][mG][mA][fU][fG][fA][fU][mG][mA][mA][mU][mA][mA][mG][mU][mA][mG][mC][mA][mG][mC][mG][ademA-GalNAc][ademA-GalNAc][ademA-GalNAc][mG][mG][mC][mU][mG][mC] (SEQ ID NO: 794)	UACUUAUCAUCAUCAUCAUGG (SEQ ID NO: 17)	[MeFosfonato-4O-mUs][fAs][fC][mU][fU][mA][fU][mU][mC][fA][mU][mC][mA][fU][mC][mA][mU][mC][mA][mUs][mGs][mG] (SEQ ID NO: 820)
S30-AS17-M3	AUGAUGAUGAUGAAUAAGUAGCAGCGAAAGGCUGC (SEQ ID NO: 30)	[mAs][mU][fG][mA][mU][mG][mA][fU][mG][fA][mU][fG][fA][mA][mU][mA][fA][mG][mU][mA][mG][mC][m	UACUUAUCAUCAUCAUCAUGG (SEQ ID NO: 17)	[MeFosfonato-4O-mUs][fAs][fC][fU][fU][mA][fU][mU][mC][fA][mU][fC][mA][fU][mC][fA][fU][mC][fA][mUs

Oligonucleotídeos conjugados a GalNAc	Sequência de sentido (não modificada)	Sequência de sentido (modificada)	Sequência anti-sentido (não modificada)	Sequência anti-sentido (modificada)
		A][mG][mC][mC][mG][ademA-GalNAc][ademA-GalNAc][ademA-GalNAc][mG][mG][mC][mU][mG][mC] (SEQ ID NO: 795)		][mGs][mG] (SEQ ID NO: 821)
S31-AS18-M1	GAUGAUGAAUAAG UUGGUUAGCAGC CGAAAGGCUGC (SEQ ID NO: 31)	[mGs][mA][fU][mG][fA][mU][mG][fA][fA][fU][fA][mA][fG][mU][fU][mG][fG][mU][mU][mA][mG][mC][mA][mG][mC][mC][mG][ademA-GalNAc][ademA-GalNAc][ademA-GalNAc][mG][mG][mC][mU][mG][mC] (SEQ ID NO: 796)	GAACCAACUUAUU CAUCAUCGG (SEQ ID NO: 18)	[MeFosfonato-40-mUs][fAs][fA][mC][fC][mA][fA][mC][mU][fU][mA][fU][mU][fC][mA][fU][fC][mA][fU][mCs][mGs][mG] (SEQ ID NO: 822)
S31-AS18-M2	GAUGAUGAAUAAG UUGGUUAGCAGC CGAAAGGCUGC (SEQ ID NO: 31)	[mGs][mA][mU][mG][mA][mU][mG][fA][fA][fU][fA][mA][mG][mU][mU][mG][mG][mU][mU][mA][mG][mC][mA][mG][mC][mC][mG][ademA-GalNAc][ademA-GalNAc][ademA-GalNAc][mG][mG][mC][mU][mG][mC] (SEQ ID NO: 797)	GAACCAACUUAUU CAUCAUCGG (SEQ ID NO: 18)	[MeFosfonato-40-mUs][fAs][fA][mC][fC][mA][fA][mC][mU][fU][mA][mU][mU][fC][mA][mU][mC][mA][mU][mCs][mGs][mG] (SEQ ID NO: 823)
S31-AS18-M3	GAUGAUGAAUAAG UUGGUUAGCAGC CGAAAGGCUGC (SEQ ID NO: 31)	[mGs][mA][fU][mG][mA][mU][mG][fA][mA][fU][mA][fA][fG][mU][mU][mG][fG][mU][mU][mA][mG][mC][m	GAACCAACUUAUU CAUCAUCGG (SEQ ID NO: 18)	[MeFosfonato-40-mUs][fAs][fA][fC][fC][mA][fA][mC][mU][fU][mA][fU][mU][fC][mA][fU][fC][mA][fU][mC



Oligonucleotídeos conjugados a GalNAc	Sequência de sentido (não modificada)	Sequência de sentido (modificada)	Sequência anti-sentido (não modificada)	Sequência anti-sentido (modificada)
		A][mG][mC][mC][mG][ademA-GalNAc][ademA-GalNAc][ademA-GalNAc][mG][mG][mC][mU][mG][mC] (SEQ ID NO: 801)		U][mUs][mGs][mG] (SEQ ID NO: 827)
S33-AS20-M3	AAUAAGUUGGUU CUAGCGCAGCAG CCGAAAGGCUGC (SEQ ID NO: 33)	[mAs][mA][fU][mA][mA][mG][mU][fU][mG][fG][mU][fU][fC][mU][mA][mG][fC][mG][mC][mA][mG][mC][mA][mG][mC][mG][ademA-GalNAc][ademA-GalNAc][ademA-GalNAc][mG][mG][mC][mU][mG][mC] (SEQ ID NO: 802)	UGCGCUAGAACC AACUUAUUGG (SEQ ID NO: 20)	[MeFosfonato-4O-mUs][fGs][fC][fG][fC][mU][fA][mG][mA][fA][mC][fC][mA][fA][mC][fU][fU][mA][fU][mUs][mGs][mG] (SEQ ID NO: 828)
S34-AS21-M2	AUAAGUUGGUUC UAGCGCAAGCAG CCGAAAGGCUGC (SEQ ID NO: 34)	[mAs][mU][mA][mA][mG][mU][mU][fG][fG][fU][fU][mC][mU][mA][mG][mC][mG][mC][mA][mA][mG][mC][mA][mG][mC][mC][mG][ademA-GalNAc][ademA-GalNAc][ademA-GalNAc][mG][mG][mC][mU][mG][mC] (SEQ ID NO: 803)	UUGCGCUAGAAC CAACUUAUGG (SEQ ID NO: 21)	[MeFosfonato-4O-mUs][fUs][fG][mC][fG][mC][fU][mA][mG][fA][mA][mC][mC][fA][mA][mC][mU][mU][mA][mUs][mGs][mG] (SEQ ID NO: 829)
S34-AS21-M3	AUAAGUUGGUUC UAGCGCAAGCAG CCGAAAGGCUGC (SEQ ID NO: 34)	[mAs][mU][fA][mA][mG][mU][mU][fG][mG][fU][mU][fC][fU][mA][mG][mC][fG][mC][mA][mA][mG][mC][m] (SEQ ID NO: 803)	UUGCGCUAGAAC CAACUUAUGG (SEQ ID NO: 21)	[MeFosfonato-4O-mUs][fUs][fG][fC][fG][mC][fU][mA][mG][fA][mA][fC][mC][fA][mA][fC][fU][mU][fA][mU] (SEQ ID NO: 829)

Oligonucleotídeos conjugados a GalNAc	Sequência de sentido (não modificada)	Sequência de sentido (modificada)	Sequência anti-sentido (não modificada)	Sequência anti-sentido (modificada)
		A][mG][mC][mC][mG][ademA-GalNAc][ademA-GalNAc][ademA-GalNAc][mG][mG][mC][mU][mG][mC] (SEQ ID NO: 804)		s][mGs][mG] (SEQ ID NO: 830)
S35-AS22-M1	AGAAAAAAAAUUGA AAUGUAAGCAGCC GAAAGGCUGC (SEQ ID NO: 35)	[mAs][mG][fA][mA][fA][mA][mA][fA][fA][fU][fU][mG][fA][mA][fA][mU][fG][mU][mA][mA][mG][mC][mA][mG][mC][mC][mG][ademA-GalNAc][ademA-GalNAc][ademA-GalNAc][mG][mG][mC][mU][mG][mC] (SEQ ID NO: 805)	UUACAUUUCAAUU UUUUUCUGG (SEQ ID NO: 22)	[MeFosfonato-4O-mUs][fUs][fA][mC][fA][mU][fU][mU][mC][fA][mA][fU][mU][fU][mU][fU][fU][mU][fU][fC][mUs][mGs][mG] (SEQ ID NO: 831)
S35-AS22-M2	AGAAAAAAAAUUGA AAUGUAAGCAGCC GAAAGGCUGC (SEQ ID NO: 35)	[mAs][mG][mA][mA][mA][mA][mA][fA][fA][fU][fU][mG][mA][mA][mA][mU][mG][mU][mA][mA][mG][mC][mA][mG][mC][mC][mG][ademA-GalNAc][ademA-GalNAc][ademA-GalNAc][mG][mG][mC][mU][mG][mC] (SEQ ID NO: 806)	UUACAUUUCAAUU UUUUUCUGG (SEQ ID NO: 22)	[MeFosfonato-4O-mUs][fUs][fA][mC][fA][mU][fU][mU][mC][fA][mA][mU][mU][fU][mU][mU][mU][mC][mUs][mGs][mG] (SEQ ID NO: 832)
S35-AS22-M3	AGAAAAAAAAUUGA AAUGUAAGCAGCC GAAAGGCUGC (SEQ ID NO: 35)	[mAs][mG][fA][mA][mA][mA][mA][fA][mA][fU][fU][mU][fG][fA][mA][mA][mU][fG][mU][mA][mA][mG][mC][mA]	UUACAUUUCAAUU UUUUUCUGG (SEQ ID NO: 22)	[MeFosfonato-4O-mUs][fUs][fA][fC][fA][mU][fU][mU][mC][fA][mA][fU][mU][fU][mU][fU][fU][mU][fU][fC][mU]

Oligonucleotídeos conjugados a GalNAc	Sequência de sentido (não modificada)	Sequência de sentido (modificada)	Sequência anti-sentido (não modificada)	Sequência anti-sentido (modificada)
		][mG][mC][mC][mG][ ademA- GalNAc][ademA- GalNAc][ademA- GalNAc][mG][mG][m C][mU][mG][mC] (SEQ ID NO: 807)		s][mGs][mG] (SEQ ID NO: 833)
S36-AS23-M1	UUGUUGUUCUGU UAACUGAAGCAGC CGAAAGGCUGC (SEQ ID NO: 36)	[mUs][mU][fG][mU][f U][mG][mU][fU][fC][f U][fG][mU][fU][mA][f A][mC][fU][mG][mA][ mA][mG][mC][mA][m G][mC][mC][mG][ad emA- GalNAc][ademA- GalNAc][ademA- GalNAc][mG][mG][m C][mU][mG][mC] (SEQ ID NO: 808)	UUCAGUUAACAGA ACAACAAGG (SEQ ID NO: 23)	[MeFosfonato-4O- mUs][fUs][fC][mA][f G][mU][fU][mA][mA][ fC][mA][fG][mA][fA][ mC][fA][fA][mC][fA][ mAs][mGs][mG] (SEQ ID NO: 834)
S36-AS23-M2	UUGUUGUUCUGU UAACUGAAGCAGC CGAAAGGCUGC (SEQ ID NO: 36)	[mUs][mU][mG][mU][ mU][mG][mU][fU][fC] [fU][fG][mU][mU][mA ][mA][mC][mU][mG][ mA][mA][mG][mC][m A][mG][mC][mC][mG ][ademA- GalNAc][ademA- GalNAc][ademA- GalNAc][mG][mG][m C][mU][mG][mC] (SEQ ID NO: 809)	UUCAGUUAACAGA ACAACAAGG (SEQ ID NO: 23)	[MeFosfonato-4O- mUs][fUs][fC][mA][f G][mU][fU][mA][mA][ fC][mA][mG][mA][fA] [mC][mA][mA][mC][ mA][mAs][mGs][mG] (SEQ ID NO: 835)
S36-AS23-M3	UUGUUGUUCUGU UAACUGAAGCAGC CGAAAGGCUGC (SEQ ID NO: 36)	[mUs][mU][fG][mU][ mU][mG][mU][fU][m C][fU][mG][fU][fU][m A][mA][mC][fU][mG][ mA][mA][mG][mC][m	UUCAGUUAACAGA ACAACAAGG (SEQ ID NO: 23)	[MeFosfonato-4O- mUs][fUs][fC][fA][fG] [mU][fU][mA][mA][fC ][mA][fG][mA][fA][m C][fA][fA][mC][fA][m

Oligonucleotídeos conjugados a GalNAc	Sequência de sentido (não modificada)	Sequência de sentido (modificada)	Sequência anti-sentido (não modificada)	Sequência anti-sentido (modificada)
		A][mG][mC][mC][mG][ademA-GalNAc][ademA-GalNAc][ademA-GalNAc][mG][mG][mC][mU][mG][mC] (SEQ ID NO: 810)		As][mGs][mG] (SEQ ID NO: 836)
S37-AS24-M2	UUCUGAAUGCUU CUAAGUAAGCAGC CGAAAGGCUGC (SEQ ID NO: 37)	[mUs][mU][mC][mU][mG][mA][mA][fU][fG][fC][fU][mU][mC][mU][mA][mA][mG][mU][mA][mA][mG][mC][mA][mG][mC][mC][mG][ademA-GalNAc][ademA-GalNAc][ademA-GalNAc][mG][mG][mC][mU][mG][mC] (SEQ ID NO: 811)	UUACUUAGAAGCA UUCAGAAGG (SEQ ID NO: 24)	[MeFosfonato-4O-mUs][fUs][fA][mC][fU][mU][fA][mG][mA][fA][mG][mC][mA][fU][mU][mC][mA][mG][mA][mAs][mGs][mG] (SEQ ID NO: 837)
S38-AS25-M2	CUGAAUGCUUCU AAGUAAAAGCAGC CGAAAGGCUGC (SEQ ID NO: 38)	[mCs][mU][mG][mA][mA][mU][mG][fC][fU][fU][fC][mU][mA][mA][mG][mU][mA][mA][mA][mA][mG][mC][mA][mA][mG][mC][mG][ademA-GalNAc][ademA-GalNAc][ademA-GalNAc][mG][mG][mC][mU][mG][mC] (SEQ ID NO: 812)	UUUUACUUAGAAG CAUUCAGGG (SEQ ID NO: 25)	[MeFosfonato-4O-mUs][fUs][fU][mU][fA][mC][fU][mU][mA][fG][mA][mA][mG][fC][mA][mU][mU][mC][mA][mGs][mGs][mG] (SEQ ID NO: 838)
S39-AS26-M2	GAAUGCUUCUAA GUAAUAAGCAGC CGAAAGGCUGC (SEQ ID NO: 39)	[mGs][mA][mA][mU][mG][mC][mU][fU][fC][fU][fA][mA][mG][mU][mA][mA][mA][mU][mA][mA][mG][mC][m	UUUUUUACUUAGA AGCAUUCGG (SEQ ID NO: 26)	[MeFosfonato-4O-mUs][fUs][fA][mU][fU][mU][fA][mC][mU][fU][mA][mG][mA][fA][mG][mC][mA][mU][m

Oligonucleotídeos conjugados a GalNAc	Sequência de sentido (não modificada)	Sequência de sentido (modificada)	Sequência anti-sentido (não modificada)	Sequência anti-sentido (modificada)
		A][mG][mC][mC][mG][ademA-GalNAc][ademA-GalNAc][ademA-GalNAc][mG][mG][mC][mU][mG][mC] (SEQ ID NO: 813)		U][mCs][mGs][mG] (SEQ ID NO: 839)

Tabela 3: Modificação Chave para Oligonucleotídeos de RNAi

Símbolo	Descrição da Modificação
ademA-GalNAc	2'-aminodietoximetanol-GalNAc adenosina
fA	2'-fluoro-desoxiadenosina
fAs	2'-fluoro-desoxiadenosina seguido por uma ligação fosforotioato
fC	2'-fluoro-desoxicitosina
fG	2'-fluoro-desoxiguanosina
fGs	2'-fluoro-desoxiguanosina seguido por uma ligação fosforotioato
fU	2'-fluoro-uridina
fUs	2'-fluoro-uridina seguido por uma ligação fosforotioato
mA	2'-O-metil adenosina
mAs	2'-O-metil adenosina seguido por uma ligação fosforotioato
mC	2'-O-metil citosina
mCs	2'-O-metil citosina seguido por uma ligação fosforotioato
MeFosfonato-4O-mU	Metil-4'-O-metilfosfonato-2'-O-metil uridina
MeFosfonato-4O-mUs	Metil-4'-O-metilfosfonato-2'-O-metil uridina seguido por uma ligação fosforotioato
mG	2'-O-metil guanosina
mGs	2'-O-metil guanosina seguido por uma ligação fosforotioato
mU	2'-O-metil uridina
mUs	2'-O-metil uridina seguido por uma ligação fosforotioato
s	Ligação fosforotioato

Tabela 4: Sequências de Oligonucleotídeo de RNAi de HMGB1 Incluídas na Triagem

oligonucleotídeos de RNAi	Sequência de Sentido/mRNA seq	CONFORME A SEQ ID NO	Sequência Anti-sentido	CONFORME A SEQ ID NO
S40-AS414	AACUAAACAUGGGC AAAGGAGAUCC	40	GGAUCUCCUUUGCCCA UGUUUAGUUU	414
S41-AS415	ACUAAACAUGGGCA AAGGAAUCCT	41	AGGAUUUCCUUUGCCC AUGUUUAGUUA	415
S42-AS416	CUAAACAUGGGCAA AGGAGAUCCCTA	42	UAGGAUCUCCUUUGCC CAUGUUUAGUU	416
S43-AS417	UAAACAUGGGCAA GGAGAACCUIA	43	UUAGGUUCUCCUUUGC CCAUGUUUAGU	417
S44-AS418	AAACAUGGGCAAAG GAGAUACUAAG	44	CUUAGUAUCUCCUUUG CCCAUGUUUAG	418
S45-AS419	AACAUGGGCAAAGG AGAUCUAAGA	45	UCUUUAUGAUCUCCUUU GCCCAUGUUUA	419
S46-AS420	ACAUGGGCAAAGGA GAUCCAAAGAA	46	UUCUUUGGAUCUCCUU UGCCCAUGUUU	420
S47-AS421	CAUGGGCAAAGGA GAUCCUAAGAAG	47	CUUCUUAGGAUCUCCU UUGCCCAUGUU	421
S48-AS422	AUGGGCAAAGGAG AUCCUAAGAAGC	48	GCUUCUUAGGAUCUCC UUUGCCCAUGU	422
S49-AS423	AAGCCGAGAGGCAA AAUGUAAUCAT	49	AUGAUUACAUUUUGCCU CUCGGCUUCU	423
S50-AS424	AGCCGAGAGGCAA AUGUCAUCATA	50	UAUGAUGACAUUUUGC CUCUCGGCUUC	424
S51-AS425	AAAUGUCAUCAU GCAUUAUUUGT	51	ACAAAUAUGCAUAUGA UGACAUUUUG	425
S52-AS426	CAUCAUAUGCAUUU UUUGUACAAAC	52	GUUUGUACAAAAAUGC AUAUGAUGAC	426
S53-AS427	AUCAUAUGCAUUU UUGUGAAACT	53	AGUUUUCACAAAAAUG CAUAUGAUGA	427
S54-AS428	AUAUGCAUUUUUUG UGCAAACUUGT	54	ACAAGUUUGCACAAAA AUGCAUAUGA	428
S55-AS429	GUCAACUUCUCAGA GUUUUAUAAGA	55	UCUUUAAAACUCUGAG AAGUUGACUG	429
S56-AS430	AAGAAGUGCUCAGA	56	UCUUCUACCUCUCUGA	430

oligonucleotídeos de RNAi	Sequência de Sentido/mRNA seq	CONFORME A SEQ ID NO	Sequência Anti-sentido	CONFORME A SEQ ID NO
	GAGGUAGAAGA		GCACUUCUAG	
S57-AS431	AGAAGUGCUCAGA GAGGUGAAAGAC	57	GUCUUUACCUCUCUG AGCACUUCUUA	431
S58-AS432	GAAGUGCUCAGAG AGGUGGAAGACC	58	GGUCUUCACCUCUCU GAGCACUUCUU	432
S59-AS433	AAGUGCUCAGAGA GGUGGAAGACCA	59	UGGUCUUCACCUCUC UGAGCACUUCU	433
S60-AS434	AGUGCUCAGAGAG GUGGAAAACCAT	60	AUGGUUUUACCACCUCU CUGAGCACUUC	434
S61-AS435	GUGCUCAGAGAGG UGGAAGACCATG	61	CAUGGUCUUCACCUC UCUGAGCACUU	435
S62-AS436	UGCUCAGAGAGGU GGAAGAACAUGT	62	ACAUGUUCUUCACCUC UCUGAGCACU	436
S63-AS437	GCUCAGAGAGGUG GAAGACAAUGTC	63	GACAUUGUCUUCACC UCUCUGAGCAC	437
S64-AS438	CUCAGAGAGGUGG AAGACCAUGUCT	64	AGACAUGGUCUUCACC CUCUCUGAGCA	438
S65-AS439	UCAGAGAGGUGGA AGACCAAGUCTG	65	CAGACUUGGUCUCCA CCUCUCUGAGC	439
S66-AS440	CAGAGAGGUGGAA GACCAUAUCUGC	66	GCAGAUUAGGUCUUC ACCUCUCUGAG	440
S67-AS441	AGAGAGGUGGAAG ACCAUGACUGCT	67	AGCAGUCAUGGUCUUC CACCUCUCUGA	441
S68-AS442	GAGAGGUGGAAGA CCAUGUAUGCTA	68	UAGCAUACAUGGUCUU CCACCUCUCUG	442
S69-AS443	AGAGGUGGAAGAC CAUGUCAGCUAA	69	UUAGCUGACAUGGUCU UCCACCUCUCU	443
S70-AS444	GAGGUGGAAGACC AUGUCUACUAAA	70	UUUAGUAGACAUGGUC UUCACCUCUC	444
S71-AS445	AGGUGGAAGACCA UGUCUGAUAAAG	71	CUUUAUCAGACAUGGU CUUCCACCUCU	445
S72-AS446	GGUGGAAGACCAU GUCUGCAAAAAGA	72	UCUUUUGCAGACAUGG UCUUCACCUC	446
S73-AS447	GUGGAAGACCAUG UCUGCUAAAGAG	73	CUCUUUAGCAGACAUG GUCUUCACCUCU	447
S74-AS448	UGGAAGACCAUGU	74	UCUCUUUAGCAGACAU	448

oligonucleotídeos de RNAi	Sequência de Sentido/mRNA seq	CONFORME A SEQ ID NO	Sequência Anti-sentido	CONFORME A SEQ ID NO
	CUGC UAAAGAGA		GGUCU UCCACC	
S75-AS449	GGAAGACCAUGUC UGC UAAAGAGAA	75	UUCUCUUUAGCAGACAU GGUCU UCCAC	449
S76-AS450	GAAGACCAUGUCU GCUAAAAAGAAA	76	UUUCUUUUUAGCAGACA UGGUCU UCCA	450
S77-AS451	AAGACCAUGUCUGC UAAAGAGAAAG	77	CUUUCUCUUUAGCAGA CAUGGUCU UCC	451
S78-AS452	AGACCAUGUCUGC UAAAGAAAAAGG	78	CCUUUUUCUUUAGCAG ACAUGGUCU UC	452
S79-AS453	AAUUUGAAGAUAU GGCAAAGCGG	79	CCGCUUUUGCCAUAU UUCAAAAUUUC	453
S80-AS454	AAUUUGAAGAUUG GCAAAGCGGA	80	UCCGCUUUUGCCAUAU CUUCAAAUUUU	454
S81-AS455	GAAAGAGAAAUGAA AACCUAUAUCC	81	GGAUUAGGUUUUCAU UUCUCUUUCAU	455
S82-AS456	AAAAAGAAGUUCA AGGAUACCAAT	82	AUUGGUAUCCUUGAAC UUCUUUUUUUGU	456
S83-AS457	CCCAAUGCACCCAA GAGGCAUCCTT	83	AAGGAUGCCUCUUGGG UGCAUUGGGAU	457
S84-AS458	CCAAUGCACCCAAG AGGCCACCUTC	84	GAAGGUGGCCUCUUGG GUGCAUUGGGA	458
S85-AS459	CAAUGCACCCAAGA GGCCUACUUCG	85	CGAAGUAGGCCUCUUG GGUGCAUUGGG	459
S86-AS460	AAUGCACCCAAGAG GCCUCAUUCGG	86	CCGAAUGAGGCCUCUU GGGUGCAUUGG	460
S87-AS461	AUGCACCCAAGAGG CCUCCAUCGGC	87	GCCGAUGGAGGCCUCU UGGGUGCAUUG	461
S88-AS462	UGCACCCAAGAGG CCUCCUACGGCC	88	GGCCGUAGGAGGCCUC UUGGGUGCAUU	462
S89-AS463	GCACCCAAGAGGC CUCCUAGGCCT	89	AGGCCUAAGGAGGCCU CUUGGGUGCAU	463
S90-AS464	CACCCAAGAGGCCU CCUUCAGCCTT	90	AAGGCUGAAGGAGGCC UCUUGGGUGCA	464
S91-AS465	ACCCAAGAGGCCUC CUUCGACCUTC	91	GAAGGUCGAAGGAGGC CUCUUGGGUGC	465
S92-AS466	CCCAAGAGGCCUC	92	AGAAGUCCGAAGGAGG	466

oligonucleotídeos de RNAi	Sequência de Sentido/mRNA seq	CONFORME A SEQ ID NO	Sequência Anti-sentido	CONFORME A SEQ ID NO
	CUUCGGACUUCT		CCUCUUGGGUG	
S93-AS467	CCAAGAGGCCUCC UUCGGCAUUCTT	93	AAGAAUGCCGAAGGAG GCCUCUUGGGU	467
S94-AS468	CAAGAGGCCUCCU UCGGCCAUCUTC	94	GAAGAUGGCCGAAGGA GGCCUCUUGGG	468
S95-AS469	AAGAGGCCUCCUU CGGCCUACUCC	95	GGAAGUAGGCCGAAGG AGGCCUCUUGG	469
S96-AS470	AGAGGCCUCCUUC GGCCUUAUUCCT	96	AGGAAUAAGGCCGAAG GAGGCCUCUUG	470
S97-AS471	GAGGCCUCCUUCG GCCUUAUCCTC	97	GAGGAUGAAGGCCGAA GGAGGCCUCUU	471
S98-AS472	AGGCCUCCUUCGG CCUUCUACCUCT	98	AGAGGUAGAAGGCCGA AGGAGGCCUCU	472
S99-AS473	GGCCUCCUUCGGC CUUCUACUCTT	99	AAGAGUAAGAAGGCCGA AGGAGGCCUC	473
S100-AS474	GCCUCCUUCGGCC UUCUUAUCUTC	100	GAAGAUGAAGAAGGCC GAAGGAGGCCU	474
S101-AS475	GGAAUACACUGCU GCAGAAGACAA	101	UUGUCUUCUGCAGCAG UGUUAUCCAC	475
S102-AS476	GAUGACAAGCAGCC UUAUGAAAAGA	102	UCUUUUAUAAGGCUG CUUGUCAUCUG	476
S103-AS477	GGAUUUGCUGCA UAUCGAACUAAA	103	UUUAGUUCGAUAUGCA GCAAUAUCCUU	477
S104-AS478	AGCAAGAAAAGAA GGAAGAGGAGG	104	CCUCCUCUCCUUCUU UUUCUUGCUUU	478
S105-AS479	GCAAGAAAAGAAG GAAGAAGAGGA	105	UCCUCUUCUCCUUCU UUUCUUGCUU	479
S106-AS480	CAAGAAAAGAAGG AAGAGAAGGAA	106	UCCUUCUCUCCUUC UUUUUCUUGCU	480
S107-AS481	AAGAAAAGAAGGA AGAGGAGGAAG	107	CUUCCUCCUCUCCUU CUUUUUCUUGC	481
S108-AS482	AGAAAAGAAGGAA GAGGAAGAAGA	108	UCUUCUCCUCUCCU UCUUUUUCUUG	482
S109-AS483	GAAGAUGAUGAUGA UGAUGAAUAAG	109	CUUAUUCAUCAUCA UCUUCUUCUU	483
S110-AS484	GAUGAUGAUGAUG	110	AACCAUCUUAUUCAUCA	484

oligonucleotídeos de RNAi	Sequência de Sentido/mRNA seq	CONFORME A SEQ ID NO	Sequência Anti-sentido	CONFORME A SEQ ID NO
	AAUAAGAUGGTT		UCAUCAUCUU	
S111-AS485	GAUGAUGAUGAAUA AGUUGAUUCTA	111	UAGAAUCAACUUUUUCA UCAUCAUCAU	485
S112-AS486	AUGAUGAUGAAUAA GUUGGAUCUAG	112	CUAGAUGCAACUUUUUC AUCAUCAUCA	486
S113-AS487	GAUGAAUAAGUUG GUUCUAACGCAG	113	CUGCGUUAGAACCAACU UAUUCAUCAU	487
S114-AS488	UGAAUAAGUUGGU UCUAGCACAGTT	114	AACUGUGCUAGAACCAA CUUAUUCAUC	488
S115-AS489	GAAUAAGUUGGUU CUAGCGAAGUTT	115	AAACUUCGCUAGAACCA ACUUUUAUCAU	489
S116-AS490	AAUAAGUUGGUUCU AGCGCAGUUTT	116	AAAACUGCGCUAGAACC AACUUUUAUCA	490
S117-AS491	AUAAGUUGGUUCUA GCGCAAUUUTT	117	AAAAAUUGCGCUAGAAC CAACUUUUAUC	491
S118-AS492	UAAGUUGGUUCUA GCGCAGAUUUTT	118	AAAAAUCUGCGCUAGAA CCAACUUUAUU	492
S119-AS493	AAGUUGGUUCUAG CGCAGUAUUUTT	119	AAAAAUACUGCGCUAGA ACCAACUUUAU	493
S120-AS494	UUUUUCUUGUCUA UAAAGCAUUUAA	120	UUAAAUGCUUUUAUAGAC AAGAAAAAAA	494
S121-AS495	UUUUCUUGUCUAUA AAGCAAUUUAAAC	121	GUUAAUUGCUUUUAUAGA CAAGAAAAAAA	495
S122-AS496	UUUCUUGUCUAUAA AGCAUAUAACC	122	GGUUUAUUGCUUUUAUA GACAAGAAAAA	496
S123-AS497	UUCUUGUCUAUAAA GCAUUAAACCC	123	GGGUUUAAUGCUUUUAU AGACAAGAAAA	497
S124-AS498	UCUUGUCUAUAAAG CAUUUAACCCC	124	GGGGUUAAAUGCUUUUA UAGACAAGAAA	498
S125-AS499	CAACUCACUCCUUU UAAAGAAAAAAA	125	UUUUUUCUUUAAAAGGA GUGAGUUGUG	499
S126-AS500	AACUCACUCCUUUU AAAGAAAAAAA	126	UUUUUUUCUUUAAAAGG AGUGAGUUGU	500
S127-AS501	ACUCACUCCUUUUA AAGAAAAAAT	127	AUUUUUUUCUUUAAAAG GAGUGAGUUG	501
S128-AS502	CUCACUCCUUUUA	128	AAUUUUUUUCUUUAAAA	502

oligonucleotídeos de RNAi	Sequência de Sentido/mRNA seq	CONFORME A SEQ ID NO	Sequência Anti-sentido	CONFORME A SEQ ID NO
	AGAAAAAATT		GGAGUGAGUU	
S129-AS503	UCACUCCUUUUAAA GAAAAAAUTG	129	CAUUUUUUUCUUUAAA AGGAGUGAGU	503
S130-AS504	CACUCCUUUUAAAG AAAAAAUUGA	130	UCAUUUUUUUCUUUAA AAGGAGUGAG	504
S131-AS505	ACUCCUUUUAAAGA AAAAAUUGAA	131	UUCAUUUUUUUCUUUA AAAGGAGUGA	505
S132-AS506	CUCCUUUUAAAGAA AAAAAUGAAA	132	UUUCAUUUUUUUCUU UAAAAGGAGUG	506
S133-AS507	UCCUUUUAAAGAAA AAAAUAGAAAT	133	AUUUCUAUUUUUUUCUU UAAAAGGAGU	507
S134-AS508	CCUUUUAAAGAAAA AAAUUAAAATG	134	CAUUUUAAUUUUUUUCU UUAAAAGGAG	508
S135-AS509	CUUUUAAAGAAAA AAUUGAAAUGT	135	ACAUUUCAUUUUUUUUC UUUAAAAGGA	509
S136-AS510	UUUUAAAGAAAAAA AUUGAAAUGTA	136	UACAUUUCAUUUUUUU CUUUAAAAGG	510
S137-AS511	UUUAAAGAAAAAAA UUGAAAUGUAA	137	UUACAUUUCAUUUUUUU UCUUUAAAAG	511
S138-AS512	UUAAAGAAAAAAAU UGAAAAGUAAG	138	CUUACUUUUCAUUUUUU UUCUUUAAAA	512
S139-AS513	UAAAGAAAAAAAUU GAAAUUAAGG	139	CCUUAUUAUUUCAUUUUU UUUCUUUAAA	513
S140-AS514	AAAGAAAAAAAUUG AAAUGAAAGGC	140	GCCUUUCAUUUCAUUUU UUUUCUUUAA	514
S141-AS515	GAAAAAAAUUGAAA UGUAAAGCUGT	141	ACAGCUUUUCAUUUCA UUUUUUUCUU	515
S142-AS516	AAAAAAAUUGAAAU GUAAGACUGTG	142	CACAGUCUUUCAUUUCA AUUUUUUUCU	516
S143-AS517	GUAAGAUUUGUUU UUAAACAGUACA	143	UGUACUGUUUAAAAACA AAUCUUACAC	517
S144-AS518	UAAGAUUUGUUUUU AAACUAUACAG	144	CUGUAUAGUUUAAAAAC AAAUCUUACA	518
S145-AS519	AAGAUUUGUUUUUA AACUGAACAGT	145	ACUGUUCAGUUUAAAAA CAAUCUUAC	519
S146-AS520	AUUUGUUUUUAAAC	146	GACACUGUACAGUUUAA	520

oligonucleotídeos de RNAi	Sequência de Sentido/mRNA seq	CONFORME A SEQ ID NO	Sequência Anti-sentido	CONFORME A SEQ ID NO
	UGUACAGUGTC		AAACAAAUCU	
S147-AS521	UUGUUUUUAAACUG UACAGAGUCTT	147	AAGACUCUGUACAGUUU AAAAACAAU	521
S148-AS522	UGUUUUUAAACUGU ACAGUAUCUTT	148	AAAGAUACUGUACAGUU UAAAAACAAA	522
S149-AS523	GUUUUUUAAACUGUA CAGUGACUUTT	149	AAAAGUCACUGUACAGU UUAAAAACAA	523
S150-AS524	UUUUUAAACUGUAC AGUGUAUUUTT	150	AAAAAUACACUGUACAG UUUAAAAACA	524
S151-AS525	UUUUAAACUGUACA GUGUCAUUUTT	151	AAAAUAGACACUGUACA GUUUAAAAAC	525
S152-AS526	UUUAAACUGUACAG UGUCUAUUUTT	152	AAAAUAGACACUGUAC AGUUUAAAAA	526
S153-AS527	UUAAACUGUACAGU GUCUUUUUUTG	153	CAAAUUAAGACACUGUA CAGUUUAAAA	527
S154-AS528	UAAACUGUACAGUG UCUUUUUUUGT	154	ACAAUUAAGACACUGU ACAGUUUAAA	528
S155-AS529	AAACUGUACAGUGU CUUUUAUUGTA	155	UACAAUUAAGACACUG UACAGUUUAA	529
S156-AS530	AACUGUACAGUGUC UUUUUAUGUAT	156	AUACAUAAAAAGACACU GUACAGUUUA	530
S157-AS531	ACUGUACAGUGUC UUUUUUAGUATA	157	UAUACUAAAAAAGACAC UGUACAGUUU	531
S158-AS532	CUGUACAGUGUCU UUUUUUUAUAG	158	CUAUUAAAAAAAAGACA CUGUACAGUU	532
S159-AS533	UGUACAGUGUCUU UUUUUGAAUAGT	159	ACUAUUCAAAAAAGAC ACUGUACAGU	533
S160-AS534	UACAGUGUCUUUU UUUGUAAAGUTA	160	UAACUUUACAAAAAAG ACACUGUACA	534
S161-AS535	CAGUGUCUUUUUU UGUAUAAUUAAC	161	GUUAAUUAUACAAAAA AGACACUGUA	535
S162-AS536	GUGGUUUUUCAA UAGCCAAUACC	162	GGUUUUUGGCUAUUGA AAAUACCACCA	536
S163-AS537	UGGUUUUUCAAUA GCCACAAACCT	163	AGGUUUUGGCUAUUG AAAAUACCACC	537
S164-AS538	GGUAUUUUCAAUAG	164	AAGGUUAGUGGCUAUU	538

oligonucleotídeos de RNAi	Sequência de Sentido/mRNA seq	CONFORME A SEQ ID NO	Sequência Anti-sentido	CONFORME A SEQ ID NO
	CCACU AACCTT		GAAAAUACCAC	
S165-AS539	UAUUUCAAUAGCC ACUAAACUUGC	165	GCAAGUUUAGUGGCUA UUGAAAAUACC	539
S166-AS540	AUUUCAAUAGCCA CUAACAUUGC	166	GGCAAUGUUAGUGGCU AUUGAAAAUAC	540
S167-AS541	UUUCAAUAGCCAC UAACCAUGCCT	167	AGGCAUGGUUAGUGGC UAUUGAAAAUA	541
S168-AS542	UUUCAAUAGCCACU AACCUAGCCTG	168	CAGGCUAGGUUAGUGG CUAUUGAAAAU	542
S169-AS543	UUCAAUAGCCACUA ACCUUACCGG	169	CCAGGUAAGGUUAGUG GCUAUUGAAAA	543
S170-AS544	UCAAUAGCCACUAA CCUUGACUGGT	170	ACCAGUCAAGGUUAGU GGCUAUUGAAA	544
S171-AS545	CAAUAGCCACUAAC CUUGCAUGGTA	171	UACCAUGCAAGGUUAG UGGCUAUUGAA	545
S172-AS546	AAUAGCCACUAACC UUGCCAGGUAC	172	GUACCUAGGCAAGGUUA GUGGCUAUUGA	546
S173-AS547	AUAGCCACUAACCU UGCCUAGUACA	173	UGUACUAGGCAAGGUU AGUGGCUAUUG	547
S174-AS548	UAGCCACUAACCUU GCCUGAUACAG	174	CUGUAUCAGGCAAGGU UAGUGGCUAUU	548
S175-AS549	AGCCACUAACCUUG CCUGGAACAGT	175	ACUGUUCAGGCAAGG UUAGUGGCUAU	549
S176-AS550	GCCACUAACCUUGC CUGGUACAGTA	176	UACUGUACCAGGCAAG GUUAGUGGCUA	550
S177-AS551	CCACUAACCUUGCC UGGUAAAGUAT	177	AUACUUUACCAGGCAAG GUUAGUGGCU	551
S178-AS552	CACUAACCUUGCCU GGUACAGUATG	178	CAUACUGUACCAGGCAA GGUUAGUGGC	552
S179-AS553	ACUAACCUUGCCUG GUACAAUUGG	179	CCAUAUUGUACCAGGCA AGGUUAGUGG	553
S180-AS554	GGGUUGUAAAUUG GCAUGGAAUUTT	180	AAAUUCCAUGCCAAUU UACAACCCCC	554
S181-AS555	GGUUGUAAAUUGG CAUGGAAUUTA	181	UAAAUUCCAUGCCAAU UUACAACCCCC	555
S182-AS556	GUUGUAAAUUGGC	182	UUAAAUUCCAUGCCAA	556

oligonucleotídeos de RNAi	Sequência de Sentido/mRNA seq	CONFORME A SEQ ID NO	Sequência Anti-sentido	CONFORME A SEQ ID NO
	AUGGAAUUUUA		UUUACAACCC	
S183-AS557	UUGUAAAUUGGCAU GGAAAUUAAA	183	UUUAAUUUCCAUGCCA AUUUACAACC	557
S184-AS558	UGUAAAUUGGCAU GGAAAUUAAAAG	184	CUUUUAUUUCCAUGCC AAUUACAAC	558
S185-AS559	GUAAAUUGGCAUG GAAAUUAAAAGC	185	GCUUUUAAUUCCAUG CCAAUUUACAA	559
S186-AS560	UAAAUUGGCAUGGA AAUUUAAAGCA	186	UGCUUUAAUUCCAUG CCAAUUUACA	560
S187-AS561	AAAUUGGCAUGGAA AUUUAAAGCAG	187	CUGCUUUAAUUCCA GCCAAUUUAC	561
S188-AS562	AAUUGGCAUGGAAA UUUAAAGCAGG	188	CCUGCUUUAAUUCCA UGCCAAUUUA	562
S189-AS563	AUUGGCAUGGAAAU UUAAAACAGGT	189	ACCUGUUUAAUUUCC AUGCCAAUUU	563
S190-AS564	UUGGCAUGGAAAU UUAAAGAAGGTT	190	AACCUUCUUUAAUUUC CAUGCCAAUU	564
S191-AS565	UGGCAUGGAAAUU UAAAGCAGGUTC	191	GAACCUGCUUUAAUUU CCAUGCCAAU	565
S192-AS566	GGCAUGGAAAUUUA AAGCAAGUUCT	192	AGAACUUGCUUUAAUU UCCAUGCCAA	566
S193-AS567	GCAUGGAAAUUUA AGCAGAUUCTT	193	AAGAAUCUGCUUUAAU UCCAUGCCA	567
S194-AS568	CAUGGAAAUUUA GCAGGAUCUTG	194	CAAGAUCCUGCUUUAA UUCCAUGCC	568
S195-AS569	AUGGAAAUUUAAG CAGGUACUUGT	195	ACAAGUACCUGCUUUA AUUCCAUGC	569
S196-AS570	UGGAAAUUUAAGC AGGUUAUUGTT	196	AACAUAACCUGCUUUA AAUUCCAUG	570
S197-AS571	GGAAAUUUAAGCA GGUUCAUGUTG	197	CAACAUGAACCUGCUU AAUUCCAUG	571
S198-AS572	GAAAUUUAAGCAG GUUCUAGUUGG	198	CCAACUAGAACCUGCU UAAUUCCA	572
S199-AS573	AAAUUUAAGCAGG UUCUUAUUGGT	199	ACCAUAAGAACCUGCU UUAAUUUCC	573
S200-AS574	AAUUUAAGCAGGU	200	CACCAUCAAGAACCUGC	574

oligonucleotídeos de RNAi	Sequência de Sentido/mRNA seq	CONFORME A SEQ ID NO	Sequência Anti-sentido	CONFORME A SEQ ID NO
	UCUUGAUGGTG		UUUAAAUUUC	
S201-AS575	AUUUAAAGCAGGUU CUUGUAGGUGC	201	GCACCUACAAGAACCUG CUUUAAAUUU	575
S202-AS576	UUUAAAGCAGGUUC UUGUUAGUGCA	202	UGCACUAACAAGAACCU GCUUUAAAUU	576
S203-AS577	UUAAAGCAGGUUCU UGUUGAUGCAC	203	GUGCAUCAACAAGAACC UGC UU AAAU	577
S204-AS578	UAAAGCAGGUUCUU GUUGGAGCACA	204	UGUGCUCCAACAAGAAC CUGCUUUAAA	578
S205-AS579	AAAGCAGGUUCUU GUUGGUACACAG	205	CUGUGUACCAACAAGAA CCUGCUUUAA	579
S206-AS580	AAGCAGGUUCUUG UUGGUGAACAGC	206	GCUGUUCACCAACAAGA ACCUGCUUUA	580
S207-AS581	AGCAGGUUCUUGU UGGUGCACAGCA	207	UGCUGUGCACCAACAA GAACCGCUUU	581
S208-AS582	GCAGGUUCUUGUU GGUGCAAAGCAC	208	GUGCUUUGCACCAACAA GAACCGCUU	582
S209-AS583	CAGGUUCUUGUUG GUGCACAGCACA	209	UGUGCUGUGCACCAAC AAGAACCUGCU	583
S210-AS584	AGGUUCUUGUUGG UGCACAACACAA	210	UUGUGUUGUGCACCAA CAAGAACCUGC	584
S211-AS585	GGUUCUUGUUGGU GCACAGAACAAA	211	UUUGUUCUGUGCACCA ACAAGAACCUG	585
S212-AS586	GUUCUUGUUGGUG CACAGCACAAAT	212	AUUUGUGCUGUGCACC ACAAGAACCU	586
S213-AS587	UUCUUGUUGGUGC ACAGCAAAAATT	213	AAUUUUUGCUGUGCAC CAACAAGAACC	587
S214-AS588	UCUUGUUGGUGCA CAGCACAAAUTA	214	UAAUUUGUGCUGUGCA CCAACAAGAAC	588
S215-AS589	CUUGUUGGUGCAC AGCACAAAUUAG	215	CUAAUUUGUGCUGUGC ACCAACAAGAA	589
S216-AS590	UUGUUGGUGCACA GCACAAAUUAGT	216	ACUAAUUUGUGCUGUG CACCAACAAGA	590
S217-AS591	UGUUGGUGCACAG CACAAAUUAGTT	217	AACUAAUUUGUGCUGU GCACCAACAAG	591
S218-AS592	GUUGGUGCACAGC	218	UAACUUUUUGUGCUG	592

oligonucleotídeos de RNAi	Sequência de Sentido/mRNA seq	CONFORME A SEQ ID NO	Sequência Anti-sentido	CONFORME A SEQ ID NO
	ACAAUAAGUTA		UGCACCAACAA	
S219-AS593	UUGGUGCACAGCA CAAUUAGUUAT	219	AUAACUAAUUUGUGCUG UGCACCAACA	593
S220-AS594	UGGUGCACAGCAC AAAUAAUUATA	220	UAUAAUUAAUUUGUGCU GUGCACCAAC	594
S221-AS595	GGUGCACAGCACAA AUUAGAUUAT	221	AUAUAUCUAAUUUGUGC UGUGCACCAA	595
S222-AS596	UUUUUCAUCUUCA GUUGUAUCUGA	222	UCAGAUACAACUGAAGA UGAAAAACU	596
S223-AS597	UUUUUCAUCUUCAG UUGUCACUGAT	223	AUCAGUGACAACUGAAG AUGAAAAAC	597
S224-AS598	UUUCAUCUUCAGU UGUCUAUGATG	224	CAUCAUAGACAACUGAA GAUGAAAAA	598
S225-AS599	UUUCAUCUUCAGUU GUCUCAGAUGC	225	GCAUCUGAGACAACUGA AGAUGAAAAA	599
S226-AS600	UUCAUCUUCAGUU GUCUCUAAUGCA	226	UGCAUUAGAGACAACUG AAGAUGAAAA	600
S227-AS601	UCAUCUUCAGUUG UCUCUGAUGCAG	227	CUGCAUCAGAGACAACU GAAGAUGAAA	601
S228-AS602	CAUCUUCAGUUGU CUCUGAAGCAGC	228	GCUGCUUCAGAGACAA CUGAAGAUGAA	602
S229-AS603	AUCUUCAGUUGUC UCUGAUACAGCT	229	AGCUGUAUCAGAGACAA CUGAAGAUGA	603
S230-AS604	UCUGAUGCAGCUU AUACGAAUAAT	230	AUUUUUUCGUUAAGCU GCAUCAGAGA	604
S231-AS605	CUGAUGCAGCUUA UACGAAUAATT	231	AAUUUUUCGUUAAGC UGCAUCAGAG	605
S232-AS606	CAGCUUAUACGAAA UAAUUUUUGTT	232	AACAAUAAUUUUUCGU AUAAGCUGCA	606
S233-AS607	AGCUUAUACGAAAU AAUUGAUGUTC	233	GAACAUCAAUUUUUCG UAUAAGCUGC	607
S234-AS608	GCUUAUACGAAUA AUUGUAGUUCT	234	AGAACUACAAUUUUUC GUUAAGCUG	608
S235-AS609	CUUAUACGAAUAA UUGUUUUUCTG	235	CAGAAUACAAUUUUU CGUAUAAGCU	609
S236-AS610	UAUACGAAUAAUU	236	AACAGUACAACAAUUAU	610

oligonucleotídeos de RNAi	Sequência de Sentido/mRNA seq	CONFORME A SEQ ID NO	Sequência Anti-sentido	CONFORME A SEQ ID NO
	GUUGUACUGTT		UUCGUUAAG	
S237-AS611	AUACGAAUAAUUG UUGUUAUGUTA	237	UAACAUACAACAAUUA UUUCGUUAA	611
S238-AS612	UACGAAUAAUUGU UGUUCAGUUA	238	UUAACUGAACAACAAU AUUUCGUUA	612
S239-AS613	ACGAAUAAUUGUU GUUCUUAUAC	239	GUUAAUAGAACAACAAU UAUUUCGUUA	613
S240-AS614	CGAAUAAUUGUUG UUCUGUAUACT	240	AGUUAUCAGAACAACAA UUAUUUCGUA	614
S241-AS615	GAAUAAUUGUUGU UCUGUAACTG	241	CAGUUACAGAACAACA AUUAAUUUCGU	615
S242-AS616	AAUAAUUGUUGUU CUGUUAACUGA	242	UCAGUUAACAGAACAAC AAUAAUUUCG	616
S243-AS617	AAUAAUUGUUGUUC UGUUAACUGAA	243	UUCAGUUAACAGAACAA CAAUAAUUUC	617
S244-AS618	AAUUGUUGUUCUG UUAACUAAUAC	244	GUUUUAGUUAACAGAA CAACAUAUUA	618
S245-AS619	AUUGUUGUUCUGU UAAACUGAAUACC	245	GGUUAUCAGUUAACAGA ACAACAUAUA	619
S246-AS620	UGUUGUUCUGUUA ACUGAAAACCAC	246	GUGGUUUUCAGUUAAC AGAACAACAAU	620
S247-AS621	GUUGUUCUGUUA CUGAAUACCACT	247	AGUGGUUAUUCAGUUA CAGAACAACAA	621
S248-AS622	UGUUCUGUUAACU GAUACAACUCT	248	AGAGUUGUUAUUCAGUU AACAGAACAAC	622
S249-AS623	UCUGUUAACUGAAU ACCACACUGTA	249	UACAGUGUGGUUAUUA GUUAACAGAAC	623
S250-AS624	CUGUUAACUGAAUA CCACUAUGUUA	250	UUACAUAGUGGUUAUUA GUUAACAGAA	624
S251-AS625	GUUAACUGAAUACC ACUCUAUAATT	251	AAUUAUAGAGUGGUUAU CAGUUAACAG	625
S252-AS626	AACUGAAUACCACU CUGUAAUUGCA	252	UGCAAUUACAGAGUGG UAUUCAGUUA	626
S253-AS627	ACUGAAUACCACUC UGUAAAUGCAA	253	UUGCAUUUACAGAGUG GUUUUCAGUUA	627
S254-AS628	CUGAAUACCACUCU	254	UUUGCUAAUACAGAGU	628

oligonucleotídeos de RNAi	Sequência de Sentido/mRNA seq	CONFORME A SEQ ID NO	Sequência Anti-sentido	CONFORME A SEQ ID NO
	GUAUUAGCAAA		GGUAUUUCAGUU	
S255-AS629	UGAAUACCACUCUG UAAUUACAAAA	255	UUUUGUAAUUACAGAGU GGUAUUUCAGU	629
S256-AS630	GAAUACCACUCUGU AAUUGAAAAAA	256	UUUUUUCAAUUACAGAG UGGUUUUCAG	630
S257-AS631	AAUACCACUCUGUA AUUGCAAAAAA	257	UUUUUUGCAAUUACAGA GUGGUUUUCA	631
S258-AS632	AAAAAGUUGCAGCU GUUUUAUUGAC	258	GUCAAUAAAACAGCUGC AACUUUUUUU	632
S259-AS633	AAAGUUGCAGCUG UUUUGUAGACAT	259	AUGUCUACAAAACAGCU GCAACUUUUU	633
S260-AS634	AAGUUGCAGCUGU UUUGUUAACATT	260	AAUGUUAACAAAACAGC UGCAACUUUU	634
S261-AS635	AGUUGCAGCUGUU UUGUUGACAUTC	261	GAAUGUCAACAAAACAG CUGCAACUUU	635
S262-AS636	GUUGCAGCUGUUU UGUUGAAAUCT	262	AGAAUUUCAACAAAACA GCUGCAACUU	636
S263-AS637	UGCAGCUGUUUUG UUGACAAUCUGA	263	UCAGAUUGUCAACAAAA CAGCUGCAAC	637
S264-AS638	GCAGCUGUUUUGU UGACAUACUGAA	264	UUCAGUAUGUCAACAAA ACAGCUGCAA	638
S265-AS639	CAGCUGUUUUGUU GACAUUAUGAAT	265	AUUCAUAAUGUCAACAA AACAGCUGCA	639
S266-AS640	AGCUGUUUUGUUG ACAUUCAGAATG	266	CAUUCUGAAUGUCAACA AACAGCUGC	640
S267-AS641	GCUGUUUUGUUGA CAUUCUAAAUGC	267	GCAUUUAGAAUGUCAAC AAAACAGCUG	641
S268-AS642	UGUUUUGUUGACA UUCUGAAUGCTT	268	AAGCAUUCAGAAUGUCA ACAAAACAGC	642
S269-AS643	UUUGUUGACAUUC UGAAUGAUUCTA	269	UAGAAUCAUUCAGAAUG UCAACAAAAC	643
S270-AS644	UUGUUGACAUUCU GAAUGCAUCUAA	270	UUAGAUGCAUUCAGAAU GUCAACAAAA	644
S271-AS645	UGUUGACAUUCUG AAUGCUACUAAG	271	CUUAGUAGCAUUCAGAA UGUCAACAAA	645
S272-AS646	GUUGACAUUCUGAA	272	ACUUUAAGCAUUCAGA	646

oligonucleotídeos de RNAi	Sequência de Sentido/mRNA seq	CONFORME A SEQ ID NO	Sequência Anti-sentido	CONFORME A SEQ ID NO
	UGCUUAUAAGT		AUGUCAACAA	
S273-AS647	UUGACAUUCUGAAU GCUUCAAGTA	273	UACUUUGAAGCAUUCAG AAUGUCAACA	647
S274-AS648	UGACAUUCUGAAUG CUUCUAAGUAA	274	UUACUUAGAAGCAUUCA GAAUGUCAAC	648
S275-AS649	GACAUUCUGAAUGC UUCUAAGUAAA	275	UUUACUUAGAAGCAUUC AGAAUGUCAAA	649
S276-AS650	CAUUCUGAAUGCUU CUAAGAAAATA	276	UAUUUUCUJAGAAGCAU UCAGAAUGUC	650
S277-AS651	AUUCUGAAUGCUUC UAAGUAAAUAC	277	GUAUUUACUJAGAAGCA UUCAGAAUGU	651
S278-AS652	UCUGAAUGCUUCUA AGUAAAUACAA	278	UUGUAUUUACUJAGAAG CAUUCAGAAU	652
S279-AS653	UGAAUGCUUCUAAG UAAAUAACAATT	279	AAUUGUAUUUACUJAGA AGCAUUCAGA	653
S280-AS654	AAUGCUUCUAAGUA AAUACA AUUTT	280	AAAAUUGUAUUUACUUA GAAGCAUUCA	654
S281-AS655	AUGCUUCUAAGUAA AUACA AUUTT	281	AAAAAUUGUAUUUACUJ AGAAGCAUUC	655
S282-AS656	GCUUCUAAGUAAAU ACAAU AUUTT	282	AAAAAUUUGUAUUUAC UUAGAAGCAU	656
S283-AS657	UUUUUAUUAGUAUU GUUGUACUUTT	283	AAAAGUACAACA AUACU AAUAAAAAAA	657
S284-AS658	UUUUUAUUAGUAUUG UUGUCAU UUTC	284	GAAAAUGACAACA AUAC UAAUAAAAAAA	658
S285-AS659	UUUAUUAGUAUUGU UGUCCA UUCA	285	UGAAAUGGACAACA AU CUAAUAAAAA	659
S286-AS660	UUAUUAGUAUUGUU GUCCUAUUCAT	286	AUGAAUAGGACAACA AU ACUAAUAAAA	660
S287-AS661	UAUUAGUAUUGUU GUCCUAUCATA	287	UAUGAUAGGACAACA UACUAAUAAA	661
S288-AS662	AUUAGUAUUGUUG UCCUUUACAUAG	288	CUAUGUAAAAGGACAACA AUACUAAUAA	662
S289-AS663	UUAGUAUUGUUGU CCUUUUAAUAGG	289	CCUAUUAAAAGGACAAC AAUACUAAUA	663
S290-AS664	UAGUAUUGUUGUC	290	ACCUAUGAAAAGGACAA	664

oligonucleotídeos de RNAi	Sequência de Sentido/mRNA seq	CONFORME A SEQ ID NO	Sequência Anti-sentido	CONFORME A SEQ ID NO
	CUUUUCAUAGGT		CAAUACUAAU	
S291-AS665	GUAUUGUUGUCCU UUUCAUAGGUCT	291	AGACCUAUGAAAAGGAC AACAAUACUA	665
S292-AS666	UUGUUGUCCUUUU CAUAGGACUGAA	292	UUCAGUCCUAUGAAAAG GACAACAAUA	666
S293-AS667	UGUUGUCCUUUUC AUAGGUAUGAAA	293	UUUCAUACCUAUGAAAA GGACAACAAU	667
S294-AS668	UUGUCCUUUUCUAU GGUCUAAAATT	294	AAUUUAGACCUAUGAA AAGGACAACA	668
S295-AS669	UGUCCUUUUCUAU GGUCUGAAUUTT	295	AAUUUCAGACCUAUGA AAAGGACAAC	669
S296-AS670	GUCCUUUUCAUAG GUCUGAAAUUTT	296	AAAAUUUCAGACCUAUG AAAAGGACAA	670
S297-AS671	UCCUUUUCAUAGG UCUGAAAUUUTT	297	AAAAUUUCAGACCUAU GAAAAGGACA	671
S298-AS672	CCUUUUCAUAGGU CUGAAAAUUUTC	298	GAAAAUUUCAGACCUA UGAAAAGGAC	672
S299-AS673	AUAGGUCUGAAAUU UUUCUACUUGA	299	UCAAGUAGAAAAUUUC AGACCUAUGA	673
S300-AS674	AGGGGAAGCUAGU CUUUUGAUUUTG	300	CAAAAUCAAAAGACUAG CUUCCCCUCA	674
S301-AS675	GGGGAAGCUAGUC UUUUGCAUUUGC	301	GCAAUAGCAAAGACUA GCUUCCCCUC	675
S302-AS676	GGGAAGCUAGUCU UUUGCUAUUGCC	302	GGCAAUAGCAAAGACU AGCUUCCCCU	676
S303-AS677	GGAAGCUAGUCUU UUGCUUAUGCCC	303	GGCAUAAGCAAAGAC UAGCUUCCCC	677
S304-AS678	GAAGCUAGUCUUU UGCUUUAGCCCA	304	UGGCUAAAGCAAAGA CUAGCUUCCC	678
S305-AS679	CAGUGUUUAUCCU UUCAUAAAGUTA	305	UAACUUUAUGAAAGAU AAACACUGUA	679
S306-AS680	GUGUUUAUCCUUU CAUAUAAUAGC	306	GCUAAUUUAUGAAAGG AUAAACACUG	680
S307-AS681	UUAUCCUUUCAU AGUUAACUAAT	307	AUUAGUUAACUAUUGA AAGGAUAAAC	681
S308-AS682	GCUAAUAAAAGCU	308	GUGUAUACAAAAGCUUU	682

oligonucleotídeos de RNAi	Sequência de Sentido/mRNA seq	CONFORME A SEQ ID NO	Sequência Anti-sentido	CONFORME A SEQ ID NO
	UUUGUAUACAC		UUAUUAGCUA	
S309-AS683	GUAAGUUAAGUUG AGAUAAUUUTC	309	GAAAAUUAUCUCAACUU AACUUUACCC	683
S310-AS684	AAAGUUAAGUUGAG AUAGUAUUCAT	310	AUGAAUACUAUCUCAAC UUAACUUUAC	684
S311-AS685	GUUAAGUUGAGUA GUUUUAAUCCA	311	UGGAUUAACUAUCUC AACUUAACUU	685
S312-AS686	UAAGUUGAGAUAGU UUUCAACCATA	312	UAUGGUUGAAAACUAUC UCAACUUAAC	686
S313-AS687	AAGUUGAGAUAGUU UUCAUACAUA	313	UUAUGUAUGAAAACUAU CUCAACUUA	687
S314-AS688	AGUUGAGAUAGUU UUCAUCAUAAC	314	GUUAUUGAUGAAAACUA UCUCAACUUA	688
S315-AS689	GUUGAGAUAGUUU UCAUCCAUAAC	315	AGUUAUGGAUGAAAACU AUCUCAACUU	689
S316-AS690	UGAGAUAGUUUCA UCCAUAACUGA	316	UCAGUUAUGGAUGAAAA CUAUCUCAAC	690
S317-AS691	GAGAUAGUUUCAU CCAUAACUGAA	317	UUCAGUUAUGGAUGAAA ACUAUCUCA	691
S318-AS692	AGAUAGUUUCAUC CAUAAAUGAAC	318	GUUCAUUUAUGGAUGA AAACUAUCUCA	692
S319-AS693	GUUUUCAUCCAUA CUGAAAUCUA	319	UGGAUUUUCAGUUAUG GAUGAAAACUA	693
S320-AS694	UUCAUCCAUAACUG AACAUACAAAA	320	UUUUGUAUGUUCAGUU AUGGAUGAAAA	694
S321-AS695	UUGAUCAGUUAAGA AAUUUAACATA	321	UAUGUUAAAUUUCUUA CUGAUCAGA	695
S322-AS696	GAUCAGUUAAGAAA UUUCAAAUAGC	322	GCUAUUUGAAAUUUCUU AACUGAUCAA	696
S323-AS697	CAUUUACAAACUGA AGAGUAAUCA	323	UUGAUUACUCUUCAGU UUGUAAAUGUA	697
S324-AS698	AUUUACAAACUGAA GAGUAAUCAAT	324	AUUGAUUACUCUUCAGU UUGUAAAUGU	698
S325-AS699	ACAAACUGAAGAGU AAUCAAUUCAC	325	GUAGAUUGAUUACUCU UCAGUUUGUAA	699
S326-AS700	AAACAUUUUGAAAG	326	UCAAGUACAGACUUUCA	700

oligonucleotídeos de RNAi	Sequência de Sentido/mRNA seq	CONFORME A SEQ ID NO	Sequência Anti-sentido	CONFORME A SEQ ID NO
	UCUGUACUUGA		AAAUGUUUGA	
S327-AS701	AAGGACUAAUAGAA AAGUAAGUUCT	327	AGAACUUACUUUUCUAU UAGUCCUUCA	701
S328-AS702	ACUAAUAGAAAAGU AUGUUUAUACC	328	GGUUUAACAUACUUUU CUAUUAGUCC	702
S329-AS703	AGAAAAGUAUGUUC UAACCAUUACA	329	UGUAAUGGUUAGAACA ACUUUUCUAU	703
S330-AS704	GAAAAGUAUGUUCU AACCUAUACAT	330	AUGUAUAGGUUAGAACA UACUUUUCUA	704
S331-AS705	AAGUAUGUUCUAAC CUUUAAAUGAG	331	CUCAUUAAAAGGUUAGA ACAUACUUUU	705
S332-AS706	GUAAUGGCAGUUA UAUUUUACAGTT	332	AACUGUAAAAUUAACU GCCAUUACAU	706
S333-AS707	UAAUGGCAGUUUA UUUUGAAGUTC	333	GAACUUCAAAAUUAAC UGCCAUUACA	707
S334-AS708	UAAAGAAGACCUGA GAAUGAAUCCC	334	GGGAUUCAUUCUCAGG UCUUCUUUAAU	708
S335-AS709	AAAGAAGACCUGAG AAUGUAUCCCC	335	GGGAUACAUUCUCAG GUCUUCUUUAA	709
S336-AS710	GAAGACCUGAGAAU GUUACACAAA	336	UUUGGUGAUACAUUCU CAGGUCUUCU	710
S337-AS711	AAGACCUGAGAAUG UAUCCACAAA	337	UUUUGUGGAUACAUUC UCAGGUCUUCU	711
S338-AS712	AGACCUGAGAAUGU AUCCCAAAAAG	338	CUUUUUGGGAUACAUU CUCAGGUCUUC	712
S339-AS713	GACCUGAGAAUGUA UCCCCAAAAGC	339	GCUUUUGGGGAUACAU UCUCAGGUCU	713
S340-AS714	ACCUGAGAAUGUAU CCCCAAAAGCG	340	CGCUUUUGGGGAUACA UUCUCAGGUCU	714
S341-AS715	CCUGAGAAUGUAUC CCCAAAAGCGT	341	ACGCUUUUGGGGAUAC AUUCUCAGGUC	715
S342-AS716	CUGAGAAUGUAUCC CCAAAAGCGTG	342	CACGCUUUUGGGGAUA CAUUCUCAGGU	716
S343-AS717	UGAGAAUGUAUCCC CAAAAACGUGA	343	UCACGUUUUUGGGGAU ACAUUCUCAGG	717
S344-AS718	GAGAAUGUAUCCCC	344	CUCACUCUUUUGGGGA	718

oligonucleotídeos de RNAi	Sequência de Sentido/mRNA seq	CONFORME A SEQ ID NO	Sequência Anti-sentido	CONFORME A SEQ ID NO
	AAAAGAGUGAG		UACAUUCUCAG	
S345-AS719	GCCAUUUUUUUUUUU UUUGUAGACAT	345	AUGUCUACAAAAUUUU AAUAUGGCAG	719
S346-AS720	CCAUUUUUUUUUUU UUGUUAACATT	346	AAUGUUACAAAAUUU UAAUAUGGCA	720
S347-AS721	CAUUUUUUUUUUU UGUUGACAUTA	347	UAAUGUCAACAAAAU UUAAUAUGGC	721
S348-AS722	AUAUUUUUUUUUU GUUGAAUUAG	348	CUAAUUUCAACAAAA UUUAAUAUGG	722
S349-AS723	AUUUUUUUUUUUGU UGACAAUAGTC	349	GACUAUUGUCAACAAA AAUUUAAUUAU	723
S350-AS724	AAAAUUUUUUGUUGA CAUUAAUCUCA	350	UGAGAUUAAUGUCAAC AAAAUUUUA	724
S351-AS725	AAUUUUUUUGUUGAC AUUAGACUCAG	351	CUGAGUCUAAUGUCAAC AAAAUUUUA	725
S352-AS726	AUUUUUUUGUUGACA UUAGUAUCAGT	352	ACUGAUACUAAUGUCA CAAAAAUUU	726
S353-AS727	GAAGACUAUGAAAA UGCUGACUATA	353	UAUAGUCAGCAUUUUA UAGUCUUCAC	727
S354-AS728	AGACUUCCAUUAC AAGUAAUUUTA	354	UAAAAUACUUGUAAUG GAAAGUCUCG	728
S355-AS729	ACUUUGCAUCUCAG UAUGAAUUATT	355	AAUAAUUCUACUGAGA UGCAAAGUUU	729
S356-AS730	CUUUGCAUCUCAG UAUGAAUAUTC	356	GAAUAAUUCUACUGAG AUGCAAAGUU	730
S357-AS731	UUGCAUCUCAGUAU GAAUUAUCAA	357	UUGAAUAAUUCUACUG AGAUGCAAAG	731
S358-AS732	GCAUCUCAGUAUGA AUUAUACAATT	358	AAUUGUAUAAUUCUAC UGAGAUGCAA	732
S359-AS733	CAUCUCAGUAUGAA UUUUUUAAUUTT	359	AAUUUUAAUUAUUA CUGAGAUGCA	733
S360-AS734	GAAUGAUUUUUUCU UACAAAACAAA	360	UUUGUUUUGUAAAGAAA AAUCAUCAA	734
S361-AS735	AGUUUAGGGAACAA UUUGGAAUUTT	361	AAUUUCCAAUUGUUC CCUAAACUCC	735
S362-AS736	GUUUAGGGAACAAU	362	AAAAUUGCCAAUUGUU	736

oligonucleotídeos de RNAi	Sequência de Sentido/mRNA seq	CONFORME A SEQ ID NO	Sequência Anti-sentido	CONFORME A SEQ ID NO
	UUGGCAAUUTT		CCCUAAACUC	
S363-AS737	UUUAGGGAACAAUU UGGCAAUUUTG	363	CAAAAUUGCCAAAUUGU UCCCUAAACU	737
S364-AS738	UUAGGGAACAAUUU GGCAAUUUGT	364	ACAAAUUUGCCAAAUUG UUCCCUAAAC	738
S365-AS739	UAGGGAACAAUUUG GCAAUUUGTG	365	CACAAUUUGCCAAAUU GUUCCCUAAA	739
S366-AS740	AGGGAACAAUUUG GCAAUUUGUGG	366	CCACAAUUUGCCAAAU UGUCCCUAA	740
S367-AS741	GGGAACAAUUUGG CAAUUUGUGGT	367	ACCACUAAAUUGCCAAA UUGUCCCUA	741
S368-AS742	GGAACAAUUUGGCA AUUUUUGGTT	368	AACCAUAAAAUUGCCAA AUUGUCCCU	742
S369-AS743	GAACAAUUUGGCAA UUUUGAGGUTT	369	AAACCUCAAAAUUGCCA AAUUGUCCCU	743
S370-AS744	AACAAUUUGGCAAU UUUGUAGUUTT	370	AAAACUACAAAAUUGCC AAAUUGUCC	744
S371-AS745	ACAAUUUGGCAUUU UUGUGAUUUTC	371	GAAAAUCACAAAAUUGC CAAAUUGUUC	745
S372-AS746	CAAUUUGGCAUUUU UGUGGAUUUCG	372	CGAAAUCCACAAAAUUG CCAAAUUGUU	746
S373-AS747	AAAUAGCGUUCUUG UAAUUUACAC	373	GUGUAUAAUUACAAGAA CGCUAUUUUA	747
S374-AS748	AAUAGCGUUCUUG UAAUUUACACG	374	CGUGUAAAAUUACAAGA ACGCUAUUUU	748
S375-AS749	GCGUUCUUGUAAU UUUACAAGCUTT	375	AAAGCUUGUAAAAUAC AAGAACGCUA	749
S376-AS750	UAAUUUUACACGCU UUUGUAAUGGA	376	UCCAUUACAAAAGCGUG UAAAAUACA	750
S377-AS751	CGCUUUUGUGAUG GAGUGCAGUUTT	377	AAAACUGCACUCCAUCA CAAAAGCGUG	751
S378-AS752	GCUUUUGUGAUGG AGUGC AUUUTG	378	CAAAUAGCACUCCAUC ACAAAAGCGU	752
S379-AS753	CUUUUGUGAUGGA GUGCUGAUUUGT	379	ACAAUCAGCACUCCA CACAAAAGCG	753
S380-AS754	UUUUGUGAUGGAG	380	AACAAUCAGCACUCCA	754

oligonucleotídeos de RNAi	Sequência de Sentido/mRNA seq	CONFORME A SEQ ID NO	Sequência Anti-sentido	CONFORME A SEQ ID NO
	UGCUGUAUUGTT		UCACAAAAGC	
S381-AS755	UUUGUGAUGGAGU GCUGUUAUGUTA	381	UAACAUAACAGCACUCC AUCACAAAAG	755
S382-AS756	UGUGAUGGAGUGC UGUUUUUUATA	382	UAUAAUAAAACAGCACU CCAUCACAAA	756
S383-AS757	UGAUGGAGUGCUG UUUUGUAAUATA	383	UAUAAUACAAAACAGCA CUCCAUCACA	757
S384-AS758	GAUGGAGUGCUGU UUUGUUAUUA	384	UUUAUAACAAAACAGC ACUCCAUCAC	758
S385-AS759	AUGGAGUGCUGUU UUGUUAAAUAAT	385	AUUUUUAACAAAACAG CACUCCAUC	759
S386-AS760	UGGAGUGCUGUUU UGUUUAUAUATT	386	AAUUUAUAACAAAACA GCACUCCAUC	760
S387-AS761	GGAGUGCUGUUUU GUUAUAAAUTT	387	AAUUUUUAACAAAAC AGCACUCCAUC	761
S388-AS762	GAGUGCUGUUUUG UUAUAUAAUUTA	388	UAAUUUAUAACAAAA CAGCACUCCA	762
S389-AS763	AGUGCUGUUUUGU UAUAUAUUUAG	389	CUAAUUUAUAACAAA ACAGCACUCC	763
S390-AS764	GUGCUGUUUUGUU AUAAAUAUAGA	390	UCUAAUUUAUAACAA AACAGCACUC	764
S391-AS765	UGCUGUUUUGUUA UAUAUAUAGAC	391	GUCUAUAUAUAUAACA AACAGCACUC	765
S392-AS766	GCUGUUUUGUUAU AUAAUUAGACT	392	AGUCUUAUUUAUAAC AAAACAGCAC	766
S393-AS767	CUGUUUUGUUAUA UAAUUUAGACTT	393	AAGUCUAAUUUAUAUA CAAACAGCA	767
S394-AS768	AUUUGCAUUUGUU UAUGUAAUUUCA	394	UGAAUUUACAUAAACAA AUGCAAUUGG	768
S395-AS769	GUUUAUGUAAUUUC AGGAGAAUAC	395	GUUUUUCUCCUGAAUU ACAUAAACAA	769
S396-AS770	AUGUAAUUUCAGGA GGAAUACUGAA	396	UUCAGUAUCCUCCUG AAUUUACAUAA	770
S397-AS771	GAAUACUGAACAUC UGAGUACUGGA	397	UCCAGUACUCAGAUGU UCAGUAUCCU	771
S398-AS772	CAUCUGAGUCCUG	398	AUUAGUAUCAUCCAGGA	772

oligonucleotídeos de RNAi	Sequência de Sentido/mRNA seq	CONFORME A SEQ ID NO	Sequência Anti-sentido	CONFORME A SEQ ID NO
	GAUGAUACUAAT		CUCAGAUGUU	
S399-AS773	AUCUGAGUCCUGG AUGAUAAUAATA	399	UAUUUUUAUCAUCCAGG ACUCAGAUGU	773
S400-AS774	UGAGUCCUGGAUG AUACUAAUAAAC	400	GUUUUUUAGUAUCAUCC AGGACUCAGA	774
S401-AS775	AGUCCUGGAUGAU ACUAAUAACTA	401	UAGUUUUUAGUAUCAU CCAGGACUCA	775
S402-AS776	GUCCUGGAUGAU CUAAUAAACUAA	402	UUAGUUUUUAGUAUCA UCCAGGACUC	776
S403-AS777	UCCUGGAUGAUAC UAAUAAACUAAT	403	AUUAGUUUUUAGUAUC AUCCAGGACU	777
S404-AS778	CCUGGAUGAUACUA AUAAAAUAATA	404	UAUUUUUUUAGUAU CAUCCAGGAC	778
S405-AS779	CUGGAUGAUACUAA UAAACAAUAA	405	UUUUUUUUUAGUA UCAUCCAGGA	779
S406-AS780	UGGAUGAUACUAAU AAACUAAUAAT	406	AUUUUUAGUUUUUAGU AUCUCCAGG	780
S407-AS781	GGAUGAUACUAAUA AACUAAUAATT	407	AAUUUUUAGUUUUUAG UAUCAUCCAG	781
S408-AS782	GAUGAUACUAAUAA ACUAAAAUTG	408	CAUUUUUUUAGUUUUUA GUAUCAUCCA	782
S409-AS783	AUGAUACUAAUAAA CUAAUAAUUGC	409	GCAAUUUUUAGUUUUUU AGUAUCAUCC	783
S410-AS784	UGAUACUAAUAAAC UAAUAAUUGC	410	UGCAAUUUUUAGUUUUU UAGUAUCAUC	784
S411-AS785	GAUACUAAUAAACU AAUAAUUGCAG	411	CUGCAUUUUUAGUUUU UUAGUAUCAU	785
S412-AS786	AUACUAAUAAACUA AUAAUAGCAGA	412	UCUGCUAAUUUAGUU UAUUAGUAUCA	786
S413-AS787	UACUAAUAAACUAA UAAUUACAGAG	413	CUCUGUAAUUUAGUU UAUUAGUAUC	787
S866-AS887	UGGGCAAAGGAGA UCCUAAAAAGCC	866	GGCUUUUUAGGAUCUC CUUUGCCCAUG	887
S867-AS876	AAAGAGAAAUGAAA ACCUAAAUCCC	867	GGGAUUUAGGUUUUCA UUUCUCUUUCA	876
S868-AS877	AAGAAGAUGAUGAU	868	ACUUUUUCAUCAUCAUC	877

oligonucleotídeos de RNAi	Sequência de Sentido/mRNA seq	CONFORME A SEQ ID NO	Sequência Anti-sentido	CONFORME A SEQ ID NO
	GAUGAAUAAGT		AUCUUCUUCU	
S869-AS878	AUGAUGAUGAUGAA UAAGUAGGUTC	869	GAACCUACUUAUUAUC AUCAUCAUCU	878
S870-AS879	GAUGAUGAAUAAGU UGGUUAUAGCG	870	CGCUAUAACCAACUUU UCAUCAUCAU	879
S871-AS880	AGAAAAAAUUGAA AUGUAAGGCTG	871	CAGCCUUACAUUUCAAU UUUUUCUUU	880
S872-AS881	UUGUUGUUCUGUU AACUGAAUACCA	872	UGGUUUCAGUUAACA GAACAACAAUU	881
S873-AS882	UUCUGAAUGCUUC UAAGUAAAUACA	873	UGUAUUUACUUAGAAGC AUUCAGAAUG	882
S874-AS883	CUGAAUGCUUCUAA GUAAAAACAAT	874	AUUGUUUUUACUUAGAA GCAUUCAGAA	883
S875-AS884	GAAUGCUUCUAAGU AAAUAAAUTT	875	AAAUUUUUUUACUUAG AAGCAUUCAG	884

Tabela 5: Sequências adicionais de oligonucleotídeo de HMGB1 conjugado a GalNAc com modificações (testadas na FIGURA 5).

oligonucleotídeos conjugados a GalNAc	Sequência de sentido (não modificada)	Sequência de sentido (modificada)	SEQ ID NO	Sequência anti-sentido (não modificada)	Sequência anti-sentido (não modificada)	SEQ ID NO
S840-AS853-M2	CUAAACAUG GGCAAAGGA GAGCAGCCG AAAGGCUGC	[mCs][mU][mA][ mA][mA][mC][m A][fU][fG][fG][fG ][mC][mA][mA][ mA][mG][mG][ mA][mG][mA][ mG][mC][mA][ mG][mC][mC][ mG][ademA- GalNAc][adem A- GalNAc][adem A-	840	UCUCCUUUG CCCAUGUUU AGGG	[MeFosfonato- 40- mUs][fCs][fU][mC ][fC][mU][fU][mU][ mG][fC][mC][mC][ mA][fU][mG][mU][ mU][mU][mA][mG s][mGs][mG]	853

oligonucleotídeos conjugados a GalNAc	Sequência de sentido (não modificada)	Sequência de sentido (modificada)	SEQ ID NO	Sequência anti-sentido (não modificada)	Sequência anti-sentido (não modificada)	SEQ ID NO
		GalNAc][mG][mG][mC][mU][mG][mC]				
S840-AS853-M3	CUAAACAUG GGCAAAGGA GAGCAGCCG AAAGGCUGC	[mCs][mU][fA][mA][mA][mC][mA][fU][mG][fG][mG][fC][fA][mA][mA][mG][fG][mA][mG][mA][mG][mC][mA][mG][mC][mC][mG][ademA-A-GalNAc][ademA-A-GalNAc][ademA-A-GalNAc][mG][mG][mC][mU][mG][mC]	840	UCUCCUUUG CCCAUGUUU AGGG	[MeFosfonato-4O-mUs][fCs][fU][fC][fC][mU][fU][mU][mG][fC][mC][fC][mA][fU][mG][fU][fU][mU][fA][mGs][mGs][mG]	853
S841-AS854-M2	UAAACAUGG GCAAAGGAG AAGCAGCCG AAAGGCUGC	[mUs][mA][mA][mA][mC][mA][mU][fG][fG][fG][fC][mA][mA][mA][mG][mG][mA][mG][mA][mA][mG][mC][mA][mG][mC][mC][mG][ademA-A-GalNAc][ademA-A-GalNAc][ademA-A-GalNAc][mG][m	841	UUCUCCUUU GCCCAUGUU UAGG	[MeFosfonato-4O-mUs][fUs][fC][mU][fC][mC][fU][mU][mU][fG][mC][mC][mC][fA][mU][mG][mU][mU][mU][mAs][mGs][mG]	854

oligonucleotídeos conjugados a GalNAc	Sequência de sentido (não modificada)	Sequência de sentido (modificada)	SEQ ID NO	Sequência anti-sentido (não modificada)	Sequência anti-sentido (não modificada)	SEQ ID NO
		G][mC][mU][mG][mC]				
S841-AS854-M3	UAAACAUGG GCAAAGGAG AAGCAGCCG AAAGGCUGC	[mUs][mA][fA][mA][mC][mA][mU][fG][mG][fG][mC][fA][fA][mA][mG][mG][fA][mG][mA][mA][mG][mC][mA][mG][mC][mC][mG][ademA-GalNAc][ademA-GalNAc][ademA-GalNAc][mG][mG][mC][mU][mG][mC]	841	UUCUCCUUU GCCCAUGUU UAGG (SEQ ID NO: 854)	[MeFosfonato-4O-mUs][fUs][fC][fU][fC][mC][fU][mU][mU][fG][mC][fC][mC][fA][mU][fG][fU][mU][fU][mAs][mGs][mG]	854
S842-AS855-M2	AGCCGAGAG GCAAAAUGU CAGCAGCCG AAAGGCUGC	[mAs][mG][mC][mC][mG][mA][mG][fA][fG][fG][fC][mA][mA][mA][mA][mU][mG][mU][mC][mA][mG][mC][mA][mG][mC][mC][mG][ademA-GalNAc][ademA-GalNAc][ademA-GalNAc][mG][mG][mC][mU][m	842	UGACAUUUU GCCUCUCG GCUGG	[MeFosfonato-4O-mUs][fGs][fA][mC][fA][mU][fU][mU][mU][fG][mC][mC][mU][fC][mU][mC][mG][mG][mC][mUs][mGs][mG]	855

oligonucleotídeos conjugados a GalNAc	Sequência de sentido (não modificada)	Sequência de sentido (modificada)	SEQ ID NO	Sequência anti-sentido (não modificada)	Sequência anti-sentido (não modificada)	SEQ ID NO
		G][mC]				
S842-AS855-M3	AGCCGAGAG GCAAAAUGU CAGCAGCCG AAAGGCUGC	[mAs][mG][fC][ mC][mG][mA][ mG][fA][mG][fG ][mC][fA][fA][m A][mA][mU][fG][ mU][mC][mA][ mG][mC][mA][ mG][mC][mC][ mG][ademA- GalNAc][adem A- GalNAc][adem A- GalNAc][mG][m G][mC][mU][m G][mC]	842	UGACAUUUU GCCUCUCG GCUGG	[MeFosfonato- 4O- mUs][fGs][fA][fC][ fA][mU][fU][mU][ mU][fG][mC][fC][ mU][fC][mU][fC][f G][mG][fC][mUs][ mGs][mG]	855
S843-AS856-M2	AAGAAGUGC UCAGAGAGG UAGCAGCCG AAAGGCUGC	[mAs][mA][mG][ mA][mA][mG][ mU][fG][fC][fU][ fC][mA][mG][m A][mG][mA][mG ][mG][mU][mA][ mG][mC][mA][ mG][mC][mC][ mG][ademA- GalNAc][adem A- GalNAc][adem A- GalNAc][mG][m G][mC][mU][m G][mC]	843	UACCUCUCU GAGCACUUC UUGG	[MeFosfonato- 4O- mUs][fAs][fC][mC ][fU][mC][fU][mC][ mU][fG][mA][mG][ mC][fA][mC][mU][ mU][mC][mU][mU s][mGs][mG]	856

oligonucleotídeos conjugados a GalNAc	Sequência de sentido (não modificada)	Sequência de sentido (modificada)	SEQ ID NO	Sequência anti-sentido (não modificada)	Sequência anti-sentido (não modificada)	SEQ ID NO
S843-AS856-M3	AAGAAGUGC UCAGAGAGG UAGCAGCCG AAAGGCUGC	[mAs][mA][fG][mA][mA][mG][mU][fG][mC][fU][mC][fA][fG][mA][mG][mA][fG][mG][mU][mA][mG][mC][mA][mG][mC][mC][mG][ademA-GalNAc][ademA-GalNAc][ademA-GalNAc][mG][mG][mC][mU][mG][mC]	843	UACCUCUCU GAGCACUUC UUGG	[MeFosfonato-4O-mUs][fAs][fC][fC][fU][mC][fU][mC][mU][fG][mA][fG][mC][fA][mC][fU][fU][mC][fU][mUs][mGs][mG]	856
S844-AS857-M2	CUCAGAGAG GUGGAAGAC CAGCAGCCG AAAGGCUGC	[mCs][mU][mC][mA][mG][mA][mG][fA][fG][fG][fU][mG][mG][mA][mA][mG][mA][mC][mC][mA][mG][mC][mA][mG][mC][mC][mG][ademA-GalNAc][ademA-GalNAc][ademA-GalNAc][mG][mG][mC][mU][mG][mC]	844	UGGUCUUC CACCUCUCU GAGGG	[MeFosfonato-4O-mUs][fGs][fG][mU][fC][mU][fU][mC][mC][fA][mC][mC][mU][fC][mU][mC][mU][mG][mA][mGs][mGs][mG]	857
S844-AS857-M3	CUCAGAGAG	[mCs][mU][fC][	844	UGGUCUUC	[MeFosfonato-	857

oligonucleotídeos conjugados a GalNAc	Sequência de sentido (não modificada)	Sequência de sentido (modificada)	SEQ ID NO	Sequência anti-sentido (não modificada)	Sequência anti-sentido (não modificada)	SEQ ID NO
	GUGGAAGAC CAGCAGCCG AAAGGCUGC	mA][mG][mA][ mG][fA][mG][fG ][mU][fG][fG][m A][mA][mG][fA][ mC][mC][mA][ mG][mC][mA][ mG][mC][mC][ mG][ademA- GalNAc][adem A- GalNAc][adem A- GalNAc][mG][m G][mC][mU][m G][mC]		CACCUCUCU GAGGG	4O- mUs][fGs][fG][fU][ fC][mU][fU][mC][ mC][fA][mC][fC][ mU][fC][mU][fC][f U][mG][fA][mGs][ mGs][mG]	
S845-AS858-M2	AGGUGGAAG ACCAUGUCU GAGCAGCCG AAAGGCUGC	[mAs][mG][mG] [mU][mG][mG][ mA][fA][fG][fA][f C][mC][mA][mU ][mG][mU][mC][ mU][mG][mA][ mG][mC][mA][ mG][mC][mC][ mG][ademA- GalNAc][adem A- GalNAc][adem A- GalNAc][mG][m G][mC][mU][m G][mC]	845	UCAGACAUG GUCUCCAC CUGG	[MeFosfonato- 4O- mUs][fCs][fA][mG ][fA][mC][fA][mU][ mG][fG][mU][mC][ [mU][fU][mC][mC] [mA][mC][mC][m Us][mGs][mG]	858
S845-AS858-M3	AGGUGGAAG ACCAUGUCU	[mAs][mG][fG][ mU][mG][mG][	845	UCAGACAUG GUCUCCAC	[MeFosfonato- 4O-	858

oligonucleotídeos conjugados a GalNAc	Sequência de sentido (não modificada)	Sequência de sentido (modificada)	SEQ ID NO	Sequência anti-sentido (não modificada)	Sequência anti-sentido (não modificada)	SEQ ID NO
	GAGCAGCCG AAAGGCUGC	mA][fA][mG][fA][mC][fC][fA][mU][mG][mU][fC][mU][mG][mA][mG][mC][mA][mG][mC][mC][mG][ademA-GalNAc][ademA-GalNAc][ademA-GalNAc][mG][mG][mC][mU][mG][mC]		CUGG	mUs][fCs][fA][fG][fA][mC][fA][mU][mG][fG][mU][fC][mU][fU][mC][fC][fA][mC][fC][mUs][mGs][mG]	
S885-AS886-M2	AAGACCAUG UCUGC AAA GAGCAGCCG AAAGGCUGC	[mAs][mA][mG][mA][mC][mC][mA][fU][fG][fU][fC][mU][mG][mC][mU][mA][mA][mA][mG][mA][mG][mC][mA][mG][mC][mC][mG][ademA-GalNAc][ademA-GalNAc][ademA-GalNAc][mG][mG][mC][mU][mG][mC]	885	UCUUUAGCA GACAUGGUC UUGG	[MeFosfonato-40-mUs][fCs][fU][mU][fU][mA][fG][mC][mA][fG][mA][mC][mA][fU][mG][mG][mU][mC][mU][mUs][mGs][mG]	886
S885-AS886-M3	AAGACCAUG UCUGC AAA GAGCAGCCG	[mAs][mA][fG][mA][mC][mC][mA][fU][mG][fU]	885	UCUUUAGCA GACAUGGUC UUGG	[MeFosfonato-40-mUs][fCs][fU][fU][	886

oligonucleotídeos conjugados a GalNAc	Sequência de sentido (não modificada)	Sequência de sentido (modificada)	SEQ ID NO	Sequência anti-sentido (não modificada)	Sequência anti-sentido (não modificada)	SEQ ID NO
	AAAGGCUGC	[mC][fU][fG][mC][mU][mA][fA][mA][mG][mA][mG][mC][mA][mG][mC][mC][mG][ademA-GalNAc][ademA-GalNAc][ademA-GalNAc][mG][mG][mC][mU][mG][mC]			fU][mA][fG][mC][mA][fG][mA][fC][mA][fU][mG][fG][fU][mC][fU][mUs][mGs][mG]	
S846-AS859-M2	AAAUUGAAG AUAUGGCAA GCAGCCGAA AGGCUGC	[mAs][mA][mA][mU][mU][mU][mG][fA][fA][fG][fA][mU][mA][mU][mG][mG][mC][mA][mA][mA][mG][mC][mA][mG][mC][mC][mG][ademA-GalNAc][ademA-GalNAc][ademA-GalNAc][mG][mG][mC][mU][mG][mC]	846	UUUGCCAUA UCUUCAAA UUGG	[MeFosfonato-40-mUs][fUs][fU][mG][fC][mC][fA][mU][mA][fU][mC][mU][mU][fC][mA][mA][mA][mU][mU][mUs][mGs][mG]	859
S846-AS859-M3	AAAUUGAAG AUAUGGCAA GCAGCCGAA AGGCUGC	[mAs][mA][fA][mU][mU][mU][mG][fA][mA][fG][mA][fU][fA][mU]	846	UUUGCCAUA UCUUCAAA UUGG	[MeFosfonato-40-mUs][fUs][fU][fG][fC][mC][fA][mU][	859

oligonucleotídeos conjugados a GalNAc	Sequência de sentido (não modificada)	Sequência de sentido (modificada)	SEQ ID NO	Sequência anti-sentido (não modificada)	Sequência anti-sentido (não modificada)	SEQ ID NO
		[mG][mG][fC][mA][mA][mA][mG][mC][mA][mG][mC][mC][mG][ademA-GalNAc][ademA-GalNAc][ademA-GalNAc][mG][mG][mC][mU][mG][mC]			mA][fU][mC][fU][mU][fC][mA][fA][fA][mU][fU][mUs][mGs][mG]	
S847-AS860-M2	AGCAAGAAAA AGAAGGAAG AGCAGCCGA AAGGCUGC	[mAs][mG][mC][mA][mA][mG][mA][fA][fA][fA][fA][mG][mA][mA][mG][mA][mG][mC][mA][mG][mC][mC][mG][ademA-GalNAc][ademA-GalNAc][ademA-GalNAc][mG][mG][mC][mU][mG][mC]	847	UCUCCUUC UUUUUCUUG CUGG	[MeFosfonato-4O-mUs][fCs][fU][mU][fC][mC][fU][mU][mC][fU][mU][mU][mU][fU][mC][mU][mU][mG][mC][mUs][mGs][mG]	860
S847-AS860-M3	AGCAAGAAAA AGAAGGAAG AGCAGCCGA AAGGCUGC	[mAs][mG][fC][mA][mA][mG][mA][fA][mA][fA][mA][fG][fA][mA][mG][mG][fA][	847	UCUCCUUC UUUUUCUUG CUGG	[MeFosfonato-4O-mUs][fCs][fU][fU][fC][mC][fU][mU][mC][fU][mU][fU][	860

oligonucleotídeos conjugados a GalNAc	Sequência de sentido (não modificada)	Sequência de sentido (modificada)	SEQ ID NO	Sequência anti-sentido (não modificada)	Sequência anti-sentido (não modificada)	SEQ ID NO
		mA][mG][mA][mG][mC][mA][mG][mC][mC][mG][ademA-GalNAc][ademA-GalNAc][ademA-GalNAc][mG][mG][mC][mU][mG][mC]			mU][fU][mC][fU][fU][mG][fC][mUs][mGs][mG]	
S848-AS861-M2	CAAGAAAAG AAGGAAGAG AGCAGCCGA AAGGCUGC	[mCs][mA][mA][mG][mA][mA][mA][fA][fA][fG][fA][mA][mG][mG][mA][mA][mG][mA][mG][mA][mG][mC][mA][mG][mC][mC][mG][ademA-GalNAc][ademA-GalNAc][ademA-GalNAc][mG][mG][mC][mU][mG][mC]	848	UCUCUCCU UCUUUUUCU UGGG	[MeFosfonato-40-mUs][fCs][fU][mC][fU][mU][fC][mC][mU][fU][mC][mU][mU][fU][mU][mU][mC][mU][mU][mGs][mGs][mG]	861
S848-AS861-M3	CAAGAAAAG AAGGAAGAG AGCAGCCGA AAGGCUGC	[mCs][mA][fA][mG][mA][mA][mA][fA][mA][fG][mA][fA][fG][mG][mA][mA][fG][mA][mG][mA][mA]	848	UCUCUCCU UCUUUUUCU UGGG	[MeFosfonato-40-mUs][fCs][fU][fC][fU][mU][fC][mC][mU][fU][mC][fU][mU][fU][fU][fU]	861



oligonucleotídeos conjugados a GalNAc	Sequência de sentido (não modificada)	Sequência de sentido (modificada)	SEQ ID NO	Sequência anti-sentido (não modificada)	Sequência anti-sentido (não modificada)	SEQ ID NO
		mG][mC][mC][mG][ademA-GalNAc][ademA-GalNAc][ademA-GalNAc][mG][mG][mC][mU][mG][mC]			Gs][mG]	
S850-AS863-M2	AUGAUGAUG AAUAAGUUG GAGCAGCCG AAAGGCUGC	[mAs][mU][mG][mA][mU][mG][mA][fU][fG][fA][fA][mU][mA][mA][mG][mU][mU][mG][mG][mA][mG][mC][mA][mG][mC][mC][mG][ademA-GalNAc][ademA-GalNAc][ademA-GalNAc][mG][mG][mC][mU][mG][mC]	850	UCCAACUUA UUCAUCAUC AUGG	[MeFosfonato-4O-mUs][fCs][fC][mA][fA][mC][fU][mU][mA][fU][mU][mC][mA][fU][mC][mA][mU][mC][mA][mUs][mGs][mG]	863
S850-AS863-M3	AUGAUGAUG AAUAAGUUG GAGCAGCCG AAAGGCUGC (SEQ ID NO: 850)	[mAs][mU][fG][mA][mU][mG][mA][fU][mG][fA][mA][fU][fA][mA][mG][mU][fU][mG][mG][mA][mG][mC][mA][mG][mC][mC][mG][ademA-GalNAc][ademA-GalNAc][ademA-GalNAc][mG][mG][mC][mU][mG][mC]	850	UCCAACUUA UUCAUCAUC AUGG	[MeFosfonato-4O-mUs][fCs][fC][fA][fA][mC][fU][mU][mA][fU][mU][fC][mA][fU][mC][fA][fU][mC][fA][mUs][mGs][mG]	863

oligonucleotídeos conjugados a GalNAc	Sequência de sentido (não modificada)	Sequência de sentido (modificada)	SEQ ID NO	Sequência anti-sentido (não modificada)	Sequência anti-sentido (não modificada)	SEQ ID NO
		mG][ademA-GalNAc][ademA-GalNAc][ademA-GalNAc][mG][mG][mC][mU][mG][mC]				
S851-AS864-M2	AAGUUGGUU CUAGCGCAG UAGCAGCCG AAAGGCUGC	[mAs][mA][mG][mU][mU][mG][mG][fU][fU][fC][fU][mA][mG][mC][mG][mC][mA][mG][mU][mA][mG][mC][mA][mG][mC][mC][mG][ademA-GalNAc][ademA-GalNAc][ademA-GalNAc][mG][mG][mC][mU][mG][mC]	851	UACUGCGCU AGAACCAAC UUGG	[MeFosfonato-4O-mUs][fAs][fC][mU][fG][mC][fG][mC][mU][fA][mG][mA][mA][fC][mC][mA][mA][mC][mU][mUs][mGs][mG]	864
S851-AS864-M3	AAGUUGGUU CUAGCGCAG UAGCAGCCG AAAGGCUGC	[mAs][mA][fG][mU][mU][mG][mG][fU][mU][fC][mU][fA][fG][mC][mG][mC][fA][mG][mU][mA][mG][mC][mA][mG][mC][mC][mG][ademA-	851	UACUGCGCU AGAACCAAC UUGG	[MeFosfonato-4O-mUs][fAs][fC][fU][fG][mC][fG][mC][mU][fA][mG][fA][mA][fC][mC][fA][fA][mC][fU][mUs][mGs][mG]	864

oligonucleotídeos conjugados a GalNAc	Sequência de sentido (não modificada)	Sequência de sentido (modificada)	SEQ ID NO	Sequência anti-sentido (não modificada)	Sequência anti-sentido (não modificada)	SEQ ID NO
		GalNAc][adem A- GalNAc][adem A- GalNAc][mG][mG][mC][mU][mG][mC]				
S852-AS865-M2	UUAUUAGUA UUGUUGUCC UAGCAGCCG AAAGGCUGC	[mUs][mU][mA][mU][mU][mA][mG][fU][fA][fU][fU][mG][mU][mU][mG][mU][mC][mC][mU][mA][mG][mC][mA][mG][mC][mC][mG][ademA- GalNAc][adem A- GalNAc][adem A- GalNAc][mG][mG][mC][mU][mG][mC]	852	UAGGACAAC AAUACUAAU AAGG	[MeFosfonato-40- mUs][fAs][fG][mG][fA][mC][fA][mA][mC][fA][mA][mU][mA][fC][mU][mA][mA][mU][mA][mAs][mGs][mG]	865
S852-AS865-M3	UUAUUAGUA UUGUUGUCC UAGCAGCCG AAAGGCUGC	[mUs][mU][fA][mU][mU][mA][mG][fU][mA][fU][mU][fG][fU][mU][mG][mU][fC][mC][mU][mA][mG][mC][mA][mG][mC][mC][mG][ademA- GalNAc][adem	852	UAGGACAAC AAUACUAAU AAGG	[MeFosfonato-40- mUs][fAs][fG][fG][fA][mC][fA][mA][mC][fA][mA][fU][mA][fC][mU][fA][fA][mU][fA][mAs][mGs][mG]	865

oligonucleotídeos conjugados a GalNAc	Sequência de sentido (não modificada)	Sequência de sentido (modificada)	SEQ ID NO	Sequência anti-sentido (não modificada)	Sequência anti-sentido (não modificada)	SEQ ID NO
		A-GalNAc][adem A-GalNAc][mG][mG][mC][mU][mG][mC]				

[0235] A revelação ilustrativamente aqui descrita adequadamente pode ser praticada na ausência de qualquer elemento ou elementos, limitação ou limitações que não são especificamente aqui reveladas. Assim, por exemplo, em cada exemplo nesta invenção qualquer um dos termos “compreendendo”, “consistindo essencialmente em”, e “consistindo em” podem ser substituídos com qualquer um dos outros dois termos. Os termos e expressões que foram utilizados são usados como termos de descrição e não de limitação, e não existe nenhuma intenção de que no uso de tais termos e expressões de excluir quaisquer equivalentes das características mostradas e descritas ou porções das mesmas, mas é reconhecido que várias modificações são possíveis dentro do escopo da invenção reivindicada. Assim, deve ser entendido que embora a presente invenção tenha sido especificamente revelada por modalidades preferidas, as características opcionais, modificação e variação dos conceitos revelados nesta invenção podem ser utilizadas pelos técnicos no assunto, e que tais modificações e variações são consideradas como estando dentro do escopo desta invenção como definido pela descrição e pelas reivindicações anexas.

[0236] Além disso, onde características ou aspectos da invenção são descritos em termos de grupos Markush ou outro agrupamento de alternativas, os técnicos no assunto reconhecerão que a invenção

também é deste modo descrita em termos de qualquer membro individual ou subgrupo de membros do grupo Markush ou outro grupo.

[0237] O uso dos termos “um” e “uma” e “o”, “a” e referentes similares no contexto de descrever a invenção (especialmente no contexto das reivindicações seguintes) deve ser interpretado como abrangendo tanto o singular quanto o plural, a menos que de outro modo indicado aqui ou claramente contradito pelo contexto. Os termos “compreendendo,” “tendo,” “incluindo,” e “contendo” devem ser interpretados como termos ilimitados (isto é, significando “incluindo, mas não limitado a,”) a menos que de outro modo observado. A recitação de faixas de valores nesta invenção é meramente intencionada a servir como um método abreviado de se referir individualmente a cada valor separado que cai dentro da faixa, a menos que de outro modo indicado aqui, e cada valor separado é incorporado no relatório descritivo como se ele fosse individualmente recitado nesta invenção. Todos os métodos aqui descritos podem ser realizados em qualquer ordem adequada a menos que de outro modo indicado aqui ou de outro modo claramente contradito pelo contexto. O uso de quaisquer e todos os exemplos, ou linguagem exemplar (por exemplo, “tal como”) fornecidos nesta invenção, é intencionado meramente a melhor esclarecer a invenção e não apresenta uma limitação no escopo da invenção a menos que de outro modo reivindicado. Nenhuma linguagem no relatório descritivo deve ser interpretada como indicando qualquer elemento não reivindicado como essencial para a prática da invenção.

[0238] As modalidades desta invenção são aqui descritas, incluindo o melhor modo conhecido aos inventores para realizar a invenção. Variações destas modalidades podem se tornar evidentes aos técnicos no assunto após a leitura da descrição precedente.

[0239] Os inventores esperam que os técnicos utilizem tais variações conforme apropriado, e os inventores pretendem que a

invenção seja praticada de outro modo do que como especificamente aqui descrito. Consequentemente, esta invenção inclui todas as modificações e equivalentes do assunto recitado nas reivindicações anexas conforme permitido pela lei aplicável. Além disso, qualquer combinação dos elementos descritos acima em todas as possíveis variações dos mesmos é abrangida pela invenção a menos que de outro modo indicado aqui ou de outro modo claramente contradito pelo contexto. Os técnicos no assunto reconhecerão ou serão capazes de avaliar usando não mais do que experimentação de rotina, muitos equivalentes às modalidades específicas da invenção aqui descrita. Tais equivalentes são intencionados a serem abrangidos pelas reivindicações seguintes.

## REIVINDICAÇÕES

1. Oligonucleotídeo para reduzir a expressão de HMGB1, caracterizado pelo fato de que compreende um filamento de sentido de 15 a 50 nucleotídeos em comprimento e um filamento anti-sentido de 15 a 30 nucleotídeos em comprimento, em que o filamento de sentido forma uma região duplex com o filamento anti-sentido, em que o filamento de sentido compreende uma sequência como apresentado em qualquer uma das SEQ ID NOs.: 1 a 13 e em que o filamento anti-sentido compreende uma sequência complementar selecionada a partir das SEQ ID NOs: 14 a 26.

2. Oligonucleotídeo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a sequência de filamento de sentido compreende ou consiste em uma sequência como apresentado em qualquer uma das SEQ ID NOs: 27 a 39.

3. Oligonucleotídeo, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que a sequência de filamento anti-sentido consiste em uma sequência como apresentado em qualquer uma das SEQ ID NOs: 14 a 26.

4. Oligonucleotídeo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a sequência de filamento de sentido compreende uma sequência como apresentado na SEQ ID NO: 27 e a sequência de filamento anti-sentido compreende uma sequência como apresentado na SEQ ID NO: 14.

5. Oligonucleotídeo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a sequência de filamento de sentido compreende uma sequência como apresentado na SEQ ID NO: 28 e a sequência de filamento anti-sentido compreende uma sequência como apresentado na SEQ ID NO: 15.

6. Oligonucleotídeo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a sequência de filamento de sentido

compreende uma sequência como apresentado na SEQ ID NO: 29 e a sequência de filamento anti-sentido compreende uma sequência como apresentado na SEQ ID NO: 16.

7. Oligonucleotídeo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a sequência de filamento de sentido compreende uma sequência como apresentado na SEQ ID NO: 30 e a sequência de filamento anti-sentido compreende uma sequência como apresentado na SEQ ID NO: 17.

8. Oligonucleotídeo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a sequência de filamento de sentido compreende uma sequência como apresentado na SEQ ID NO: 31 e a sequência de filamento anti-sentido compreende uma sequência como apresentado na SEQ ID NO: 18.

9. Oligonucleotídeo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a sequência de filamento de sentido compreende uma sequência como apresentado na SEQ ID NO: 32 e a sequência de filamento anti-sentido compreende uma sequência como apresentado na SEQ ID NO: 19.

10. Oligonucleotídeo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a sequência de filamento de sentido compreende uma sequência como apresentado na SEQ ID NO: 33 e a sequência de filamento anti-sentido compreende uma sequência como apresentado na SEQ ID NO: 20.

11. Oligonucleotídeo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a sequência de filamento de sentido compreende uma sequência como apresentado na SEQ ID NO: 34 e a sequência de filamento anti-sentido compreende uma sequência como apresentado na SEQ ID NO: 21.

12. Oligonucleotídeo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a sequência de filamento de sentido

compreende uma sequência como apresentado na SEQ ID NO: 35 e a sequência de filamento anti-sentido compreende uma sequência como apresentado na SEQ ID NO: 22.

13. Oligonucleotídeo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a sequência de filamento de sentido compreende uma sequência como apresentado na SEQ ID NO: 36 e a sequência de filamento anti-sentido compreende uma sequência como apresentado na SEQ ID NO: 23.

14. Oligonucleotídeo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a sequência de filamento de sentido compreende uma sequência como apresentado na SEQ ID NO: 37 e a sequência de filamento anti-sentido compreende uma sequência como apresentado na SEQ ID NO: 24.

15. Oligonucleotídeo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a sequência de filamento de sentido compreende uma sequência como apresentado na SEQ ID NO: 38 e a sequência de filamento anti-sentido compreende uma sequência como apresentado na SEQ ID NO: 25.

16. Oligonucleotídeo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a sequência de filamento de sentido compreende uma sequência como apresentado na SEQ ID NO: 39 e a sequência de filamento anti-sentido compreende uma sequência como apresentado na SEQ ID NO: 26.

17. Oligonucleotídeo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 16, caracterizado pelo fato de que o oligonucleotídeo compreende pelo menos um nucleotídeo modificado.

18. Oligonucleotídeo, de acordo com a reivindicação 17, caracterizado pelo fato de que todos os nucleotídeos do oligonucleotídeo são modificados.

19. Oligonucleotídeo, de acordo com a reivindicação 17 ou

18, caracterizado pelo fato de que o nucleotídeo modificado compreende uma 2'-modificação.

20. Oligonucleotídeo, de acordo com a reivindicação 19, caracterizado pelo fato de que a 2'-modificação é um 2'-fluoro ou 2'-O-metila.

21. Oligonucleotídeo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 17 a 20, caracterizado pelo fato de que uma ou mais das posições 1, 2, 4, 6, 7, 12, 14, 16, 18 a 27, e 31 a 36 do filamento de sentido, e/ou uma ou mais das posições 1, 4, 6, 8, 9, 11, 13, 15, 18, e 20 a 22 do filamento anti-sentido são modificadas com uma 2'-O-metila.

22. Oligonucleotídeo, de acordo com a reivindicação 21, caracterizado pelo fato de que todas as posições 1, 2, 4, 6, 7, 12, 14, 16, 18 a 27, e 31 a 36 do filamento de sentido, e todas as posições 1, 4, 6, 8, 9, 11, 13, 15, 18, e 20 a 22 do filamento anti-sentido são modificadas com uma 2'-O-metila.

23. Oligonucleotídeo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 17 a 22, caracterizado pelo fato de que uma ou mais das posições 3, 5, 8 a 11, 13, 15, e 17 do filamento de sentido, e/ou uma ou mais das posições 2, 3, 5, 7, 10, 12, 14, 16, 17, e 19 do filamento anti-sentido são modificadas com um 2'-fluoro.

24. Oligonucleotídeo, de acordo com a reivindicação 23, caracterizado pelo fato de que todas as posições 3, 5, 8 a 11, 13, 15, e 17 do filamento de sentido, e todas as posições 2, 3, 5, 7, 10, 12, 14, 16, 17, e 19 do filamento anti-sentido são modificadas com um 2'-fluoro.

25. Oligonucleotídeo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 17 a 20, caracterizado pelo fato de que uma ou mais das posições 1 a 7, 12 a 27, e 31 a 36 do filamento de sentido, e/ou uma ou mais das posições 1, 4, 6, 8, 9, 11 a 13, e 15 a 22 do filamento anti-sentido são modificadas com uma 2'-O-metila.

26. Oligonucleotídeo, de acordo com a reivindicação 25,

caracterizado pelo fato de que todas as posições 1 a 7, 12 a 27, e 31 a 36 do filamento de sentido, e todas as posições 1, 4, 6, 8, 9, 11 a 13, e 15 a 22 do filamento anti-sentido são modificadas com uma 2'-O-metila.

27. Oligonucleotídeo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 17 a 20, 25 e 26, caracterizado pelo fato de que uma ou mais das posições 8 a 11 do filamento de sentido, e/ou uma ou mais das posições 2, 3, 5, 7, 10, e 14 do filamento anti-sentido são modificadas com um 2'-fluoro.

28. Oligonucleotídeo, de acordo com a reivindicação 27, caracterizado pelo fato de que todas as posições 8 a 11 do filamento de sentido, e todas as posições 2, 3, 5, 7, 10, e 14 do filamento anti-sentido são modificadas com um 2'-fluoro.

29. Oligonucleotídeo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 17 a 20, caracterizado pelo fato de que uma ou mais das posições 1, 2, 4 a 7, 9, 11, 14 a 16, 18 a 27, e 31 a 36 do filamento de sentido, e/ou uma ou mais das posições 1, 6, 8, 9, 11, 13, 15, 18, e 20 a 22 do filamento anti-sentido são modificadas com uma 2'-O-metila.

30. Oligonucleotídeo, de acordo com a reivindicação 29, caracterizado pelo fato de que todas as posições 1, 2, 4 a 7, 9, 11, 14 a 16, 18 a 27, e 31 a 36 do filamento de sentido, e todas as posições 1, 6, 8, 9, 11, 13, 15, 18, e 20 a 22 do filamento anti-sentido são modificadas com uma 2'-O-metila.

31. Oligonucleotídeo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 17 a 20, 29, e 30, caracterizado pelo fato de que uma ou mais das posições 3, 8, 10, 12, 13, e 17 do filamento de sentido, e/ou uma ou mais das posições 2 a 5, 7, 10, 12, 14, 16, 17, e 19 do filamento anti-sentido são modificadas com um 2'-fluoro.

32. Oligonucleotídeo, de acordo com a reivindicação 31, caracterizado pelo fato de que todas as posições 3, 8, 10, 12, 13, e 17 do filamento de sentido, e todas as posições 2 a 5, 7, 10, 12, 14, 16, 17,

e 19 do filamento anti-sentido são modificadas com um 2'-fluoro.

33. Oligonucleotídeo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 32, caracterizado pelo fato de que o oligonucleotídeo compreende pelo menos uma ligação internucleotídica modificada.

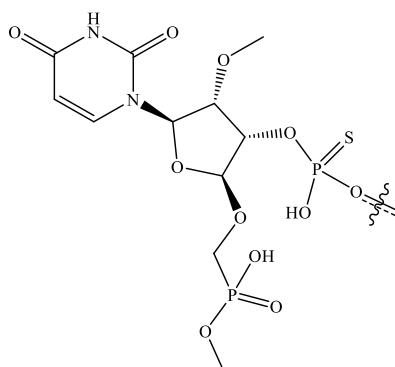
34. Oligonucleotídeo, de acordo com a reivindicação 33, caracterizado pelo fato de que a pelo menos uma ligação internucleotídica modificada é uma ligação fosforotioato.

35. Oligonucleotídeo, de acordo com a reivindicação 33 ou 34, caracterizado pelo fato de que o oligonucleotídeo tem uma ligação fosforotioato entre uma ou mais das: posições 1 e 2 do filamento de sentido, posições 1 e 2 do filamento anti-sentido, posições 2 e 3 do filamento anti-sentido, posições 3 e 4 do filamento anti-sentido, posições 20 e 21 do filamento anti-sentido, e posições 21 e 22 do filamento anti-sentido.

36. Oligonucleotídeo, de acordo com a reivindicação 35, caracterizado pelo fato de que o oligonucleotídeo tem uma ligação fosforotioato entre cada uma das: posições 1 e 2 do filamento de sentido, posições 1 e 2 do filamento anti-sentido, posições 2 e 3 do filamento anti-sentido, posições 20 e 21 do filamento anti-sentido, e posições 21 e 22 do filamento anti-sentido.

37. Oligonucleotídeo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 36, caracterizado pelo fato de que a uridina na primeira posição do filamento anti-sentido compreende um análogo de fosfato.

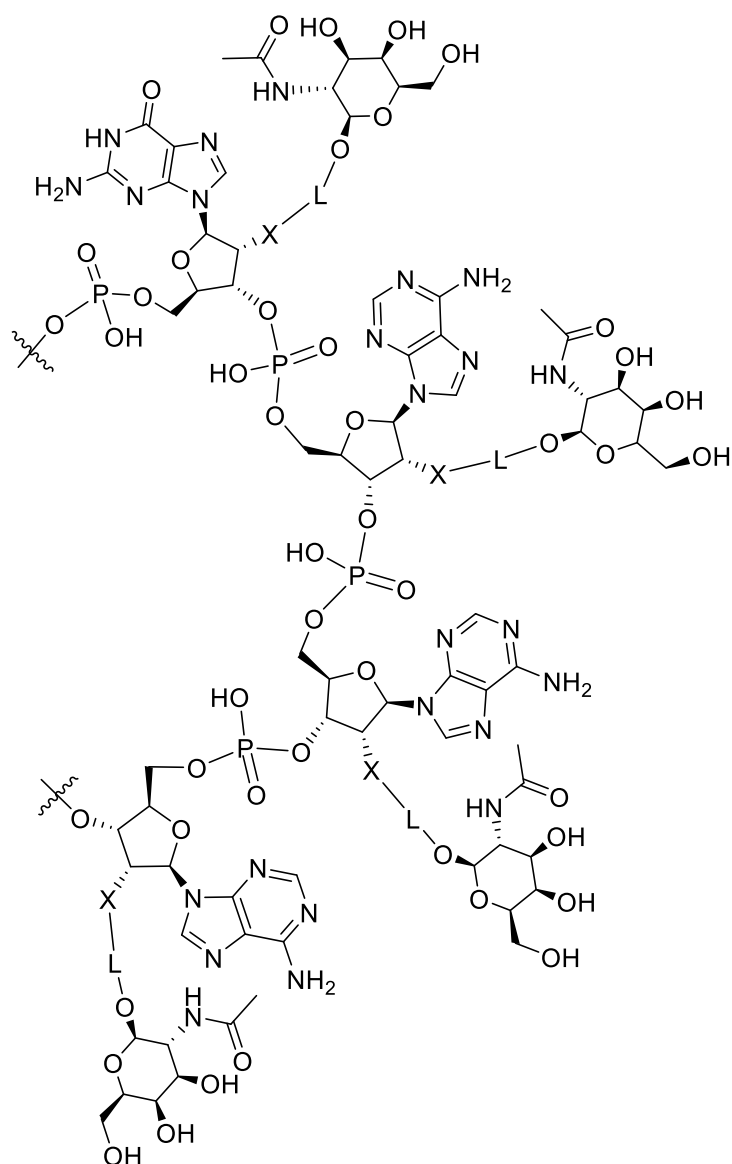
38. Oligonucleotídeo, de acordo com a reivindicação 37, caracterizado pelo fato de que compreende a estrutura seguinte na posição 1 do filamento anti-sentido:



39. Oligonucleotídeo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 38, caracterizado pelo fato de que um ou mais dos nucleotídeos da sequência -AAA- nas posições 28 a 30 no filamento de sentido é conjugado a uma porção GalNAc monovalente.

40. Oligonucleotídeo, de acordo com a reivindicação 39, caracterizado pelo fato de que cada um dos nucleotídeos da sequência -AAA- nas posições 28 a 30 no filamento de sentido é conjugado a uma porção GalNAc monovalente.

41. Oligonucleotídeo, de acordo com a reivindicação 40, caracterizado pelo fato de que o motivo -AAA- nas posições 28 a 30 no filamento de sentido compreende a estrutura:



em que:

L representa uma ligação, identificador de química de clique, ou um ligante de 1 a 20, átomos inclusivos, consecutivos, covalentemente ligados em comprimento, selecionados a partir do grupo consistindo em alqueno substituído e não substituído, alquenileno substituído e não substituído, alquinileno substituído e não substituído, heteroalqueno substituído e não substituído, heteroalquenileno substituído e não substituído, heteroalquinileno substituído e não substituído, e combinações dos mesmos; e

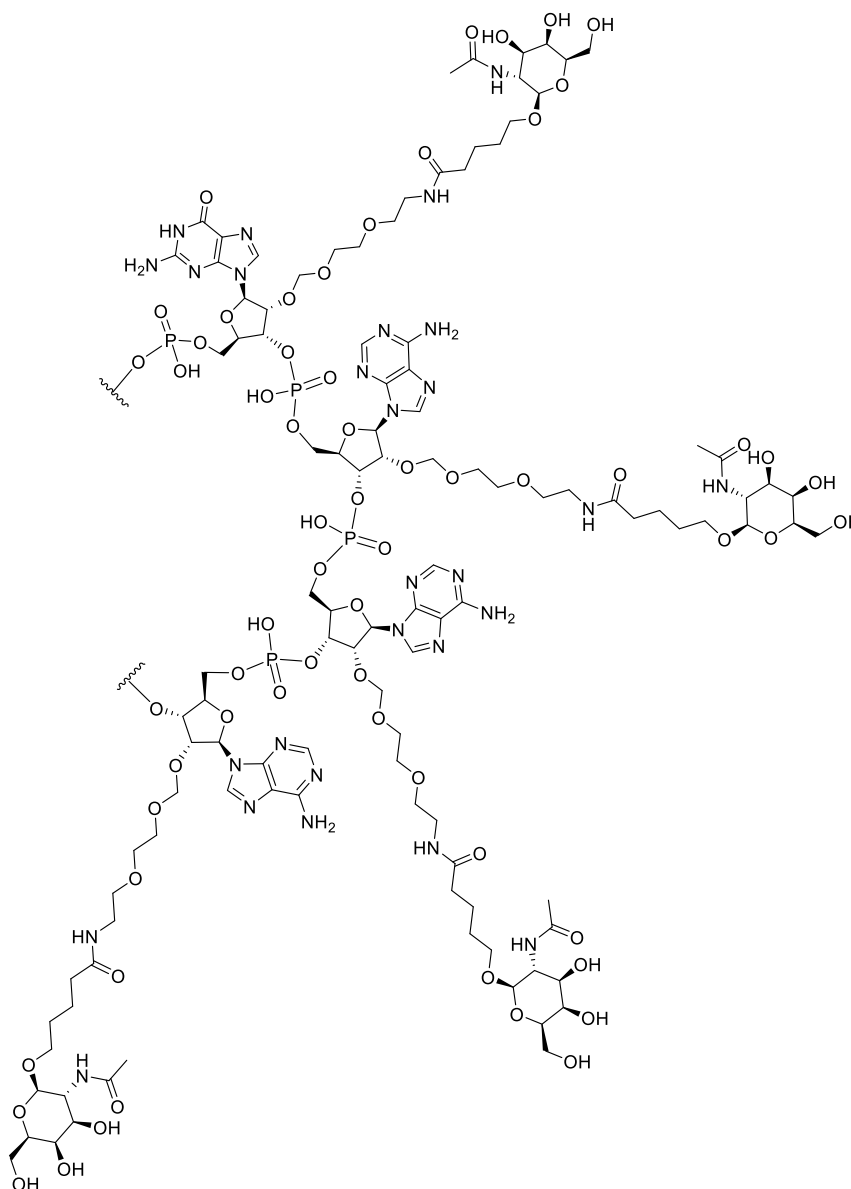
X é O, S, ou N.

42. Oligonucleotídeo, de acordo com a reivindicação 41,

caracterizado pelo fato de que L é um ligante de acetal.

43. Oligonucleotídeo, de acordo com a reivindicação 41 ou 42, caracterizado pelo fato de que X é O.

44. Oligonucleotídeo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 41 a 43, caracterizado pelo fato de que a sequência -AAA- nas posições 28 a 30 no filamento de sentido compreende a estrutura:



45. Oligonucleotídeo para reduzir a expressão de HMGB1, caracterizado pelo fato de que compreende um filamento anti-sentido de 15 a 30 nucleotídeos em comprimento, em que o filamento anti-sentido

tem uma região de complementaridade à HMGB1 que é complementar a pelo menos 15 nucleotídeos contíguos de uma sequência como apresentado em qualquer uma das SEQ ID NOs: 1 a 13.

46. Oligonucleotídeo, de acordo com a reivindicação 45, caracterizado pelo fato de que o filamento anti-sentido é 19 a 27 nucleotídeos em comprimento.

47. Oligonucleotídeo, de acordo com a reivindicação 45, caracterizado pelo fato de que o filamento anti-sentido é de 22 nucleotídeos em comprimento.

48. Oligonucleotídeo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 45 a 47, caracterizado pelo fato de que compreende ainda um filamento de sentido de 15 a 50 nucleotídeos em comprimento, em que o filamento de sentido forma uma região duplex com o filamento anti-sentido.

49. Oligonucleotídeo, de acordo com a reivindicação 48, caracterizado pelo fato de que o filamento de sentido é de 19 a 50 nucleotídeos em comprimento.

50. Oligonucleotídeo, de acordo com a reivindicação 48 ou 49, caracterizado pelo fato de que a região duplex é de 20 nucleotídeos em comprimento.

51. Oligonucleotídeo para reduzir a expressão de HMGB1 compreendendo um filamento de sentido e um filamento anti-sentido, caracterizado pelo fato de que:

(a) o filamento de sentido compreende uma sequência como apresentado na SEQ ID NO: 788 e o filamento anti-sentido compreende uma sequência como apresentado na SEQ ID NO: 814;

(b) o filamento de sentido compreende uma sequência como apresentado na SEQ ID NO: 789 e o filamento anti-sentido compreende uma sequência como apresentado na SEQ ID NO: 815;

(c) o filamento de sentido compreende uma sequência como

apresentado na SEQ ID NO: 790 e o filamento anti-sentido compreende uma sequência como apresentado na SEQ ID NO: 816;

(d) o filamento de sentido compreende uma sequência como apresentado na SEQ ID NO: 791 e o filamento anti-sentido compreende uma sequência como apresentado na SEQ ID NO: 817;

(e) o filamento de sentido compreende uma sequência como apresentado na SEQ ID NO: 792 e o filamento anti-sentido compreende uma sequência como apresentado na SEQ ID NO: 818;

(f) o filamento de sentido compreende uma sequência como apresentado na SEQ ID NO: 793 e o filamento anti-sentido compreende uma sequência como apresentado na SEQ ID NO: 819;

(g) o filamento de sentido compreende uma sequência como apresentado na SEQ ID NO: 794 e o filamento anti-sentido compreende uma sequência como apresentado na SEQ ID NO: 820;

(h) o filamento de sentido compreende uma sequência como apresentado na SEQ ID NO: 795 e o filamento anti-sentido compreende uma sequência como apresentado na SEQ ID NO: 821;

(i) o filamento de sentido compreende uma sequência como apresentado na SEQ ID NO: 796 e o filamento anti-sentido compreende uma sequência como apresentado na SEQ ID NO: 822;

(j) o filamento de sentido compreende uma sequência como apresentado na SEQ ID NO: 797 e o filamento anti-sentido compreende uma sequência como apresentado na SEQ ID NO: 823;

(k) o filamento de sentido compreende uma sequência como apresentado na SEQ ID NO: 798 e o filamento anti-sentido compreende uma sequência como apresentado na SEQ ID NO: 824;

(l) o filamento de sentido compreende uma sequência como apresentado na SEQ ID NO: 799 e o filamento anti-sentido compreende uma sequência como apresentado na SEQ ID NO: 825;

(m) o filamento de sentido compreende uma sequência como

apresentado na SEQ ID NO: 800 e o filamento anti-sentido compreende uma sequência como apresentado na SEQ ID NO: 826;

(n) o filamento de sentido compreende uma sequência como apresentado na SEQ ID NO: 801 e o filamento anti-sentido compreende uma sequência como apresentado na SEQ ID NO: 827;

(o) o filamento de sentido compreende uma sequência como apresentado na SEQ ID NO: 802 e o filamento anti-sentido compreende uma sequência como apresentado na SEQ ID NO: 828;

(p) o filamento de sentido compreende uma sequência como apresentado na SEQ ID NO: 803 e o filamento anti-sentido compreende uma sequência como apresentado na SEQ ID NO: 829;

(q) o filamento de sentido compreende uma sequência como apresentado na SEQ ID NO: 804 e o filamento anti-sentido compreende uma sequência como apresentado na SEQ ID NO: 830;

(r) o filamento de sentido compreende uma sequência como apresentado na SEQ ID NO: 805 e o filamento anti-sentido compreende uma sequência como apresentado na SEQ ID NO: 831;

(s) o filamento de sentido compreende uma sequência como apresentado na SEQ ID NO: 806 e o filamento anti-sentido compreende uma sequência como apresentado na SEQ ID NO: 832;

(t) o filamento de sentido compreende uma sequência como apresentado na SEQ ID NO: 807 e o filamento anti-sentido compreende uma sequência como apresentado na SEQ ID NO: 833;

(u) o filamento de sentido compreende uma sequência como apresentado na SEQ ID NO: 808 e o filamento anti-sentido compreende uma sequência como apresentado na SEQ ID NO: 834;

(v) o filamento de sentido compreende uma sequência como apresentado na SEQ ID NO: 809 e o filamento anti-sentido compreende uma sequência como apresentado na SEQ ID NO: 835;

(w) o filamento de sentido compreende uma sequência como

apresentado na SEQ ID NO: 810 e o filamento anti-sentido compreende uma sequência como apresentado na SEQ ID NO: 836;

(x) o filamento de sentido compreende uma sequência como apresentado na SEQ ID NO: 811 e o filamento anti-sentido compreende uma sequência como apresentado na SEQ ID NO: 837;

(y) o filamento de sentido compreende uma sequência como apresentado na SEQ ID NO:812 e o filamento anti-sentido compreende uma sequência como apresentado na SEQ ID NO: 838; ou

(z) o filamento de sentido compreende uma sequência como apresentado na SEQ ID NO: 813 e o filamento anti-sentido compreende uma sequência como apresentado na SEQ ID NO: 839.

52. Composição, caracterizada pelo fato de que compreende o oligonucleotídeo, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 51, e um excipiente.

53. Método de liberar um oligonucleotídeo a um indivíduo, o método caracterizado pelo fato de que compreende administrar a composição, como definido na reivindicação 52, ao indivíduo.

54. Método, de acordo com a reivindicação 53, caracterizado pelo fato de que o indivíduo tem ou está em risco de ter fibrose hepática.

55. Método, de acordo com a reivindicação 54, caracterizado pelo fato de que o indivíduo tem doença hepática colestática ou autoimune.

56. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 53 a 55, caracterizado pelo fato de que a expressão da proteína HMGB1 é reduzida administrando-se ao indivíduo o oligonucleotídeo.

57. Método para tratar um indivíduo tendo ou em risco de ter fibrose hepática, caracterizado pelo fato de que compreende administrar ao indivíduo um oligonucleotídeo, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 51.

58. Método, de acordo com a reivindicação 57, caracterizado

pelo fato de que o indivíduo tem doença hepática colestática ou autoimune.

59. Método, de acordo com a reivindicação 58, caracterizado pelo fato de que o indivíduo tem esteato-hepatite não alcoólica (NASH).

60. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 57 a 59, caracterizado pelo fato de que o oligonucleotídeo é administrado antes da exposição do indivíduo a um agente hepatotóxico.

61. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 57 a 59, caracterizado pelo fato de que o oligonucleotídeo é administrado subsequente à exposição do indivíduo a um agente hepatotóxico.

62. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 57 a 59, caracterizado pelo fato de que o oligonucleotídeo é administrado simultaneamente com a exposição do indivíduo a um agente hepatotóxico.

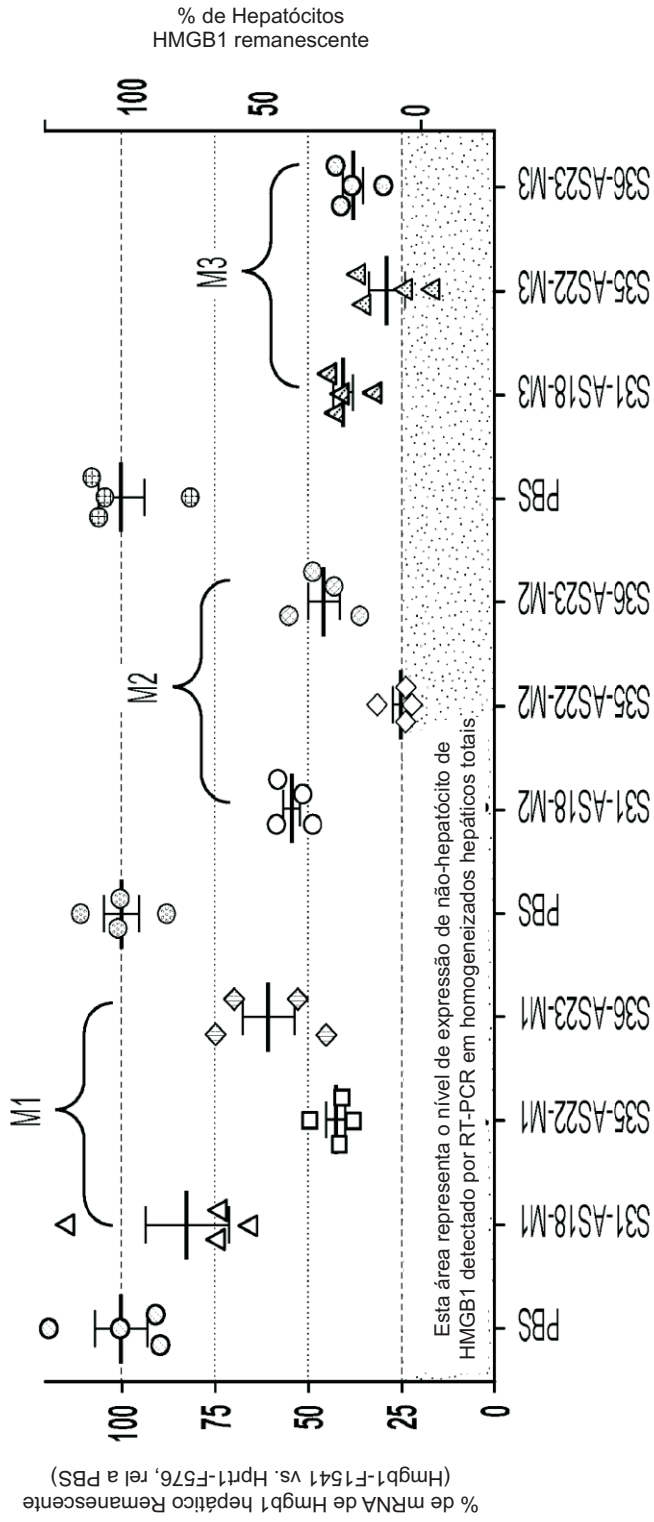
63. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 57 a 62, caracterizado pelo fato de que a administração resulta em uma redução nos níveis hepáticos de HMGB1.

64. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 57 a 63, caracterizado pelo fato de que a administração resulta em uma redução nos níveis séricos de HMGB1.

65. Uso de um oligonucleotídeo, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 51, caracterizado pelo fato de ser para tratar um indivíduo tendo ou em risco de ter fibrose hepática.

66. Uso, de acordo com a reivindicação 65, caracterizado pelo fato de que o indivíduo tem doença hepática colestática ou autoimune.

67. Uso, de acordo com a reivindicação 65, caracterizado pelo fato de que o indivíduo tem esteato-hepatite não alcoólica (NASH).



Oligonucleotídeos de HMGB1 conjugados a GalNAc

FIG. 1A



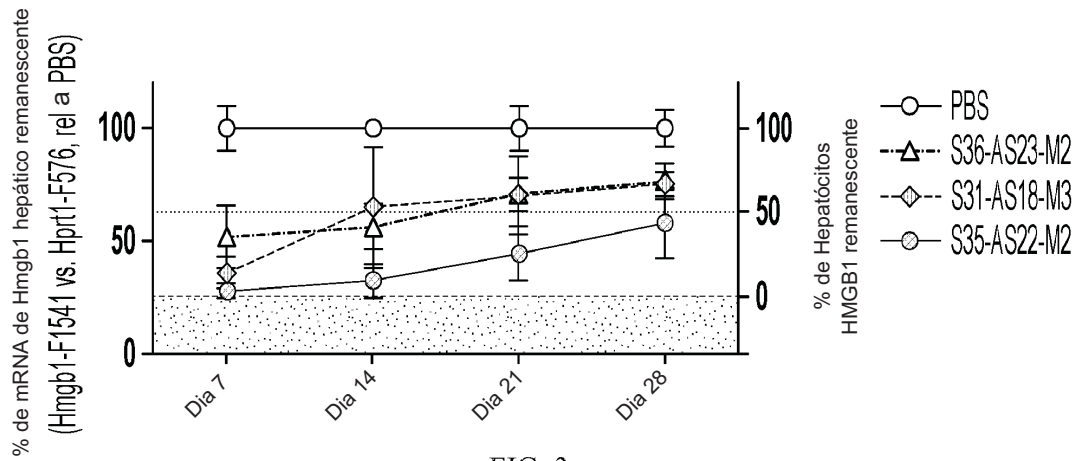
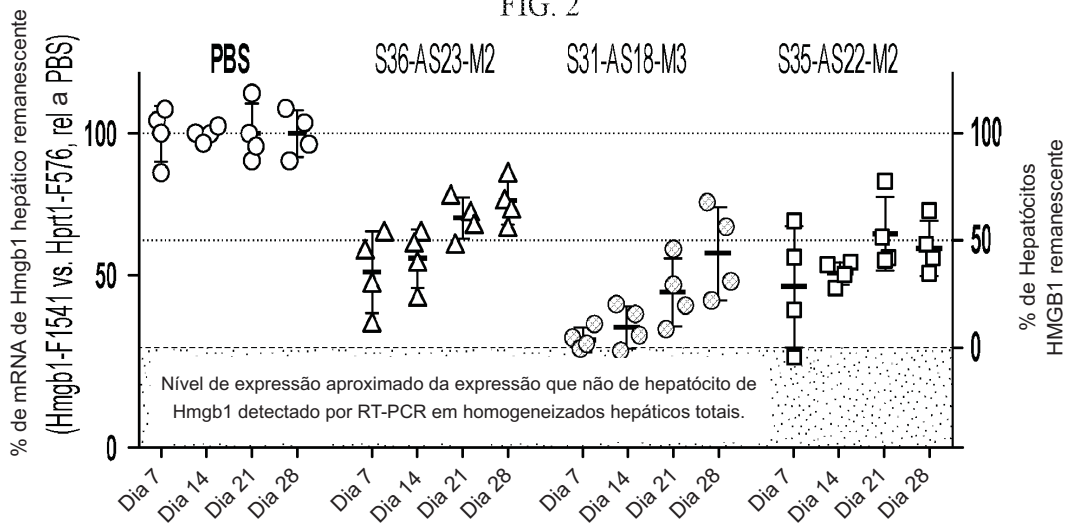
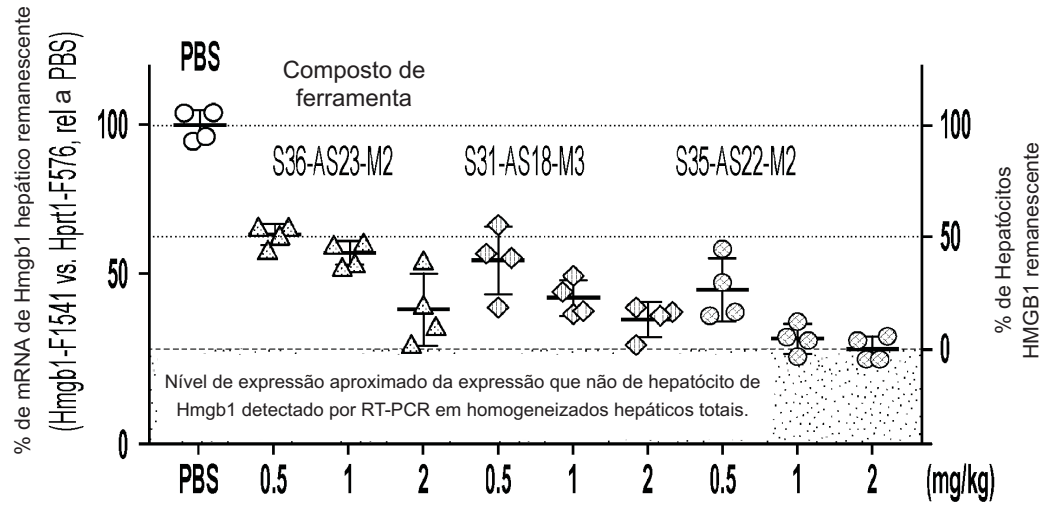


FIG. 3

Knockdown de HMGB1 comuns triplos em células HuH-7, 1 mM, 24 h  
 Normalizado para Hs HPRT-517-591(Hex) e Hs SFRS9 594-690(Hex) vs controle simulado

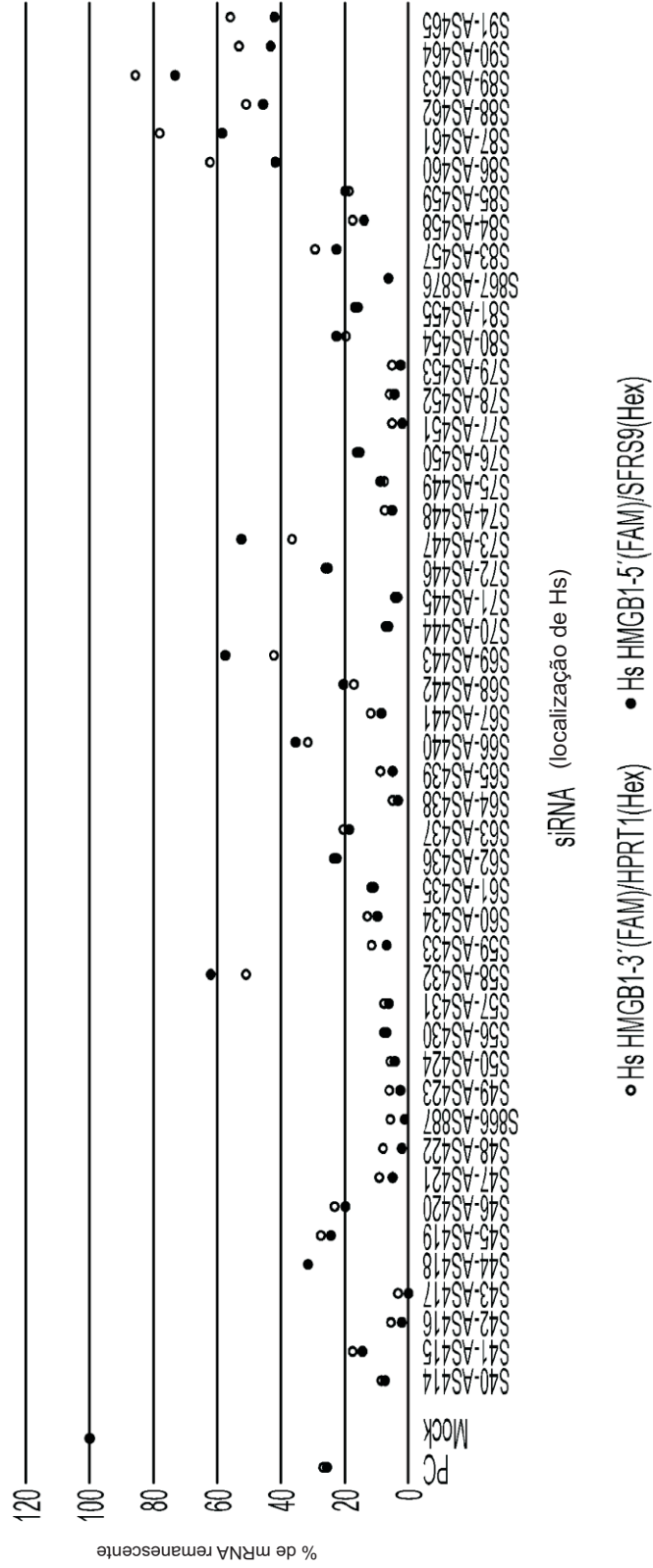


FIG. 4A

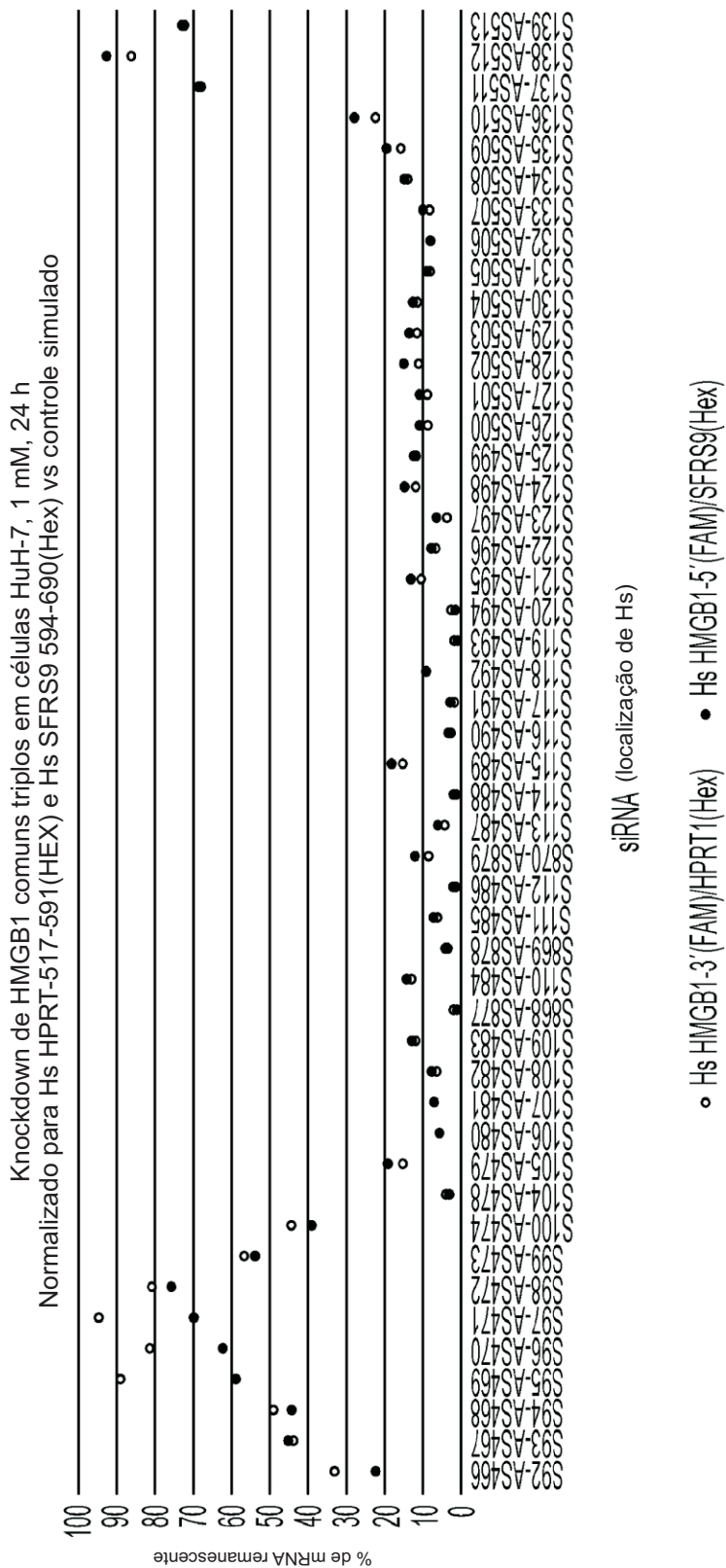


FIG. 4B

Knockdown de HMGB1 comuns triplos em células HuH-7, 1 mM, 24 h  
 Normalizado para Hs HPRT1-517-591(HEX) e Hs SFRS9 594-690(Hex) vs controle simulado

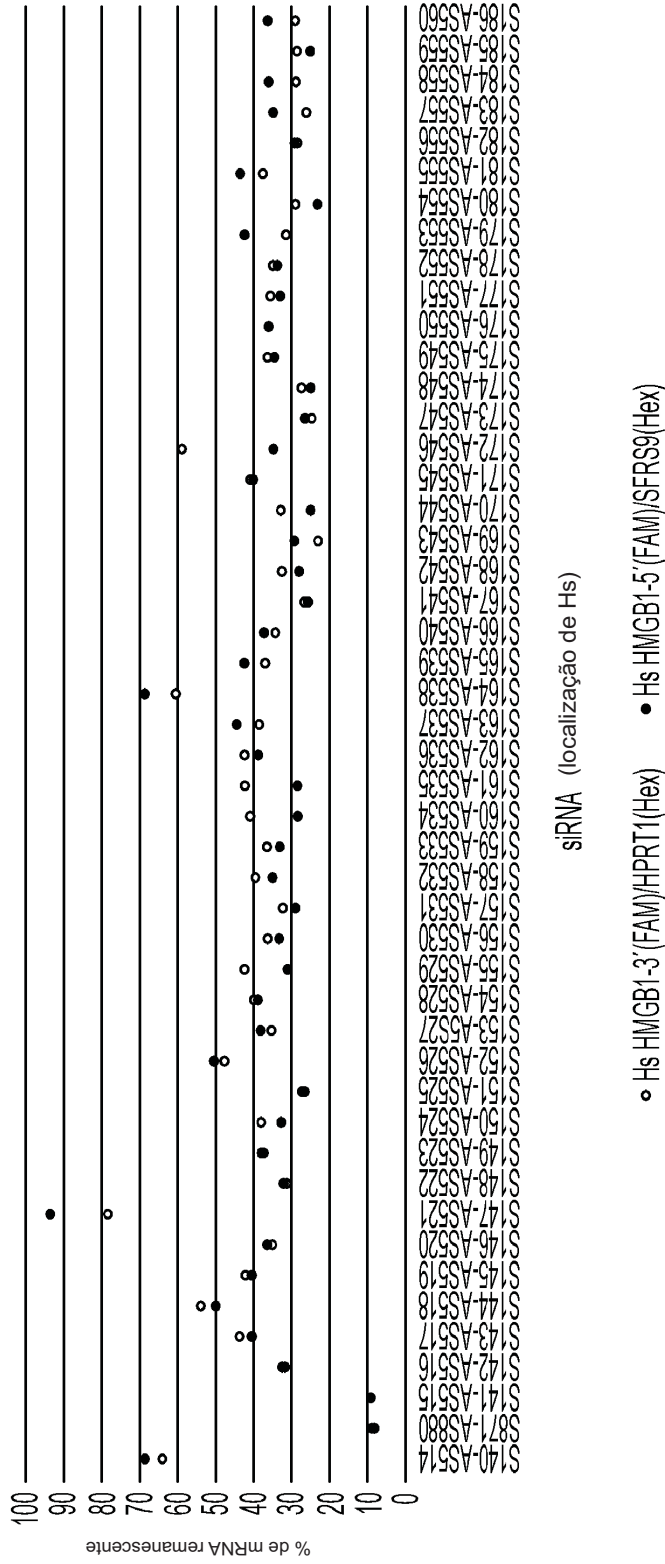


FIG. 4C

Knockdown de HMGB1 comuns triplos em células HuH-7, 1 mM, 24 h  
 Normalizado para Hs HPRT-517-591(HEX) e Hs SFRS9 594-690(Hex) vs controle simulado

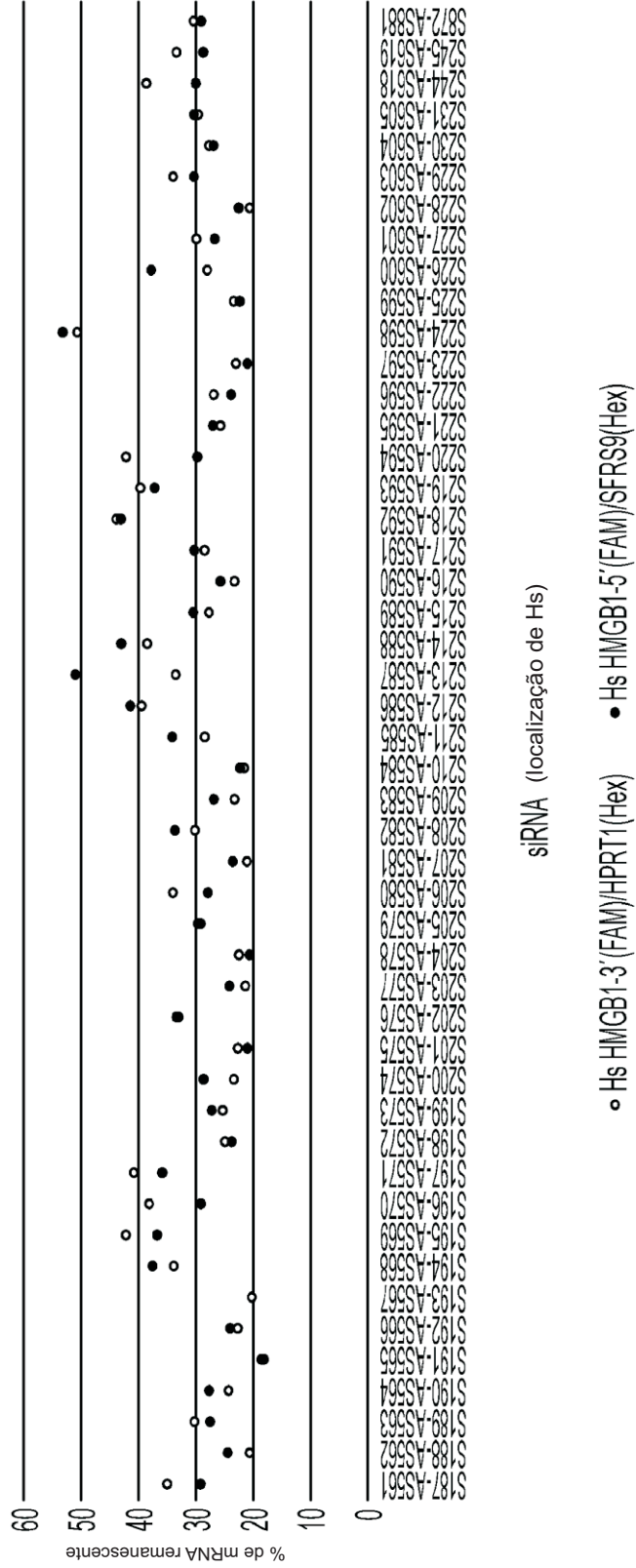


FIG. 4D

Knockdown de HMGB1 comuns triplos em células HuH-7, 1 mM, 24 h  
 Normalizado para Hs HPRT-517-591(Hex) e Hs SFRS9 594-690(Hex) vs controle simulado

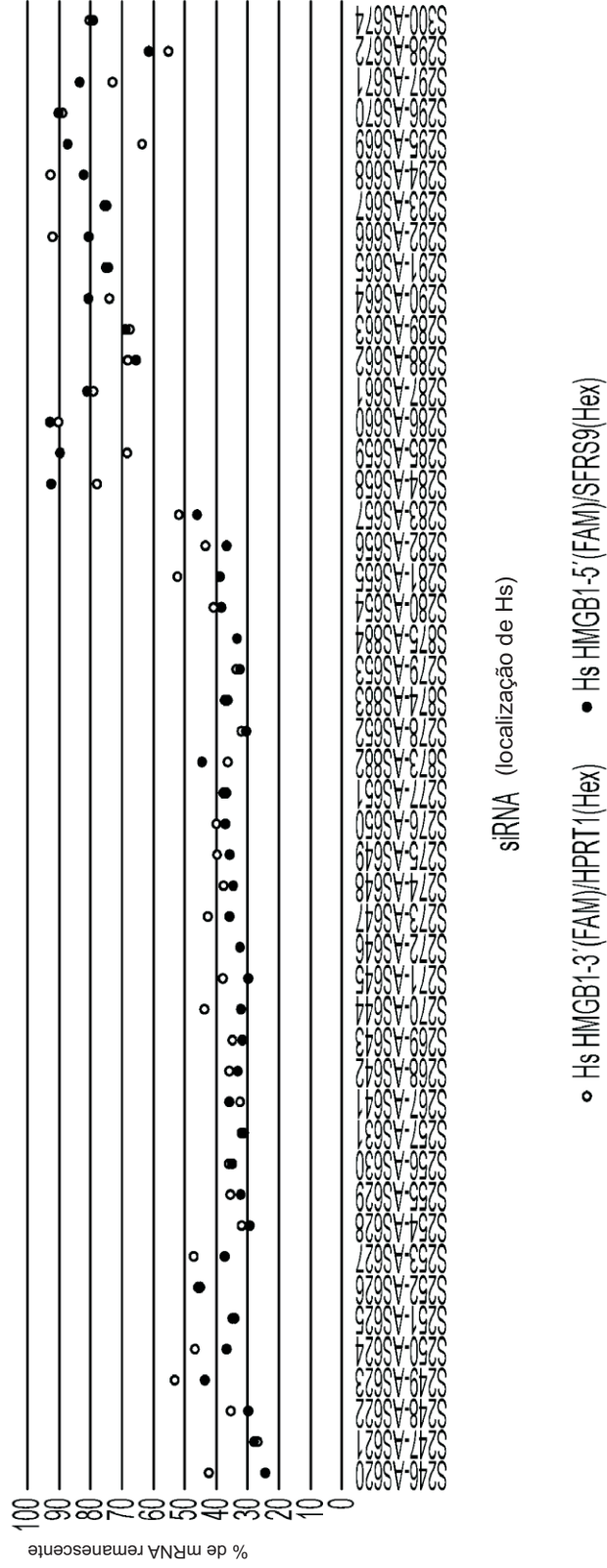


FIG. 4E

Knockdown de HMGB1 comuns triplos em células HuH-7, 1 mM, 24 h  
 Normalizado para Hs HPRT-517-591(HEX) e Hs SFRS9 594-690(Hex) vs controle simulado

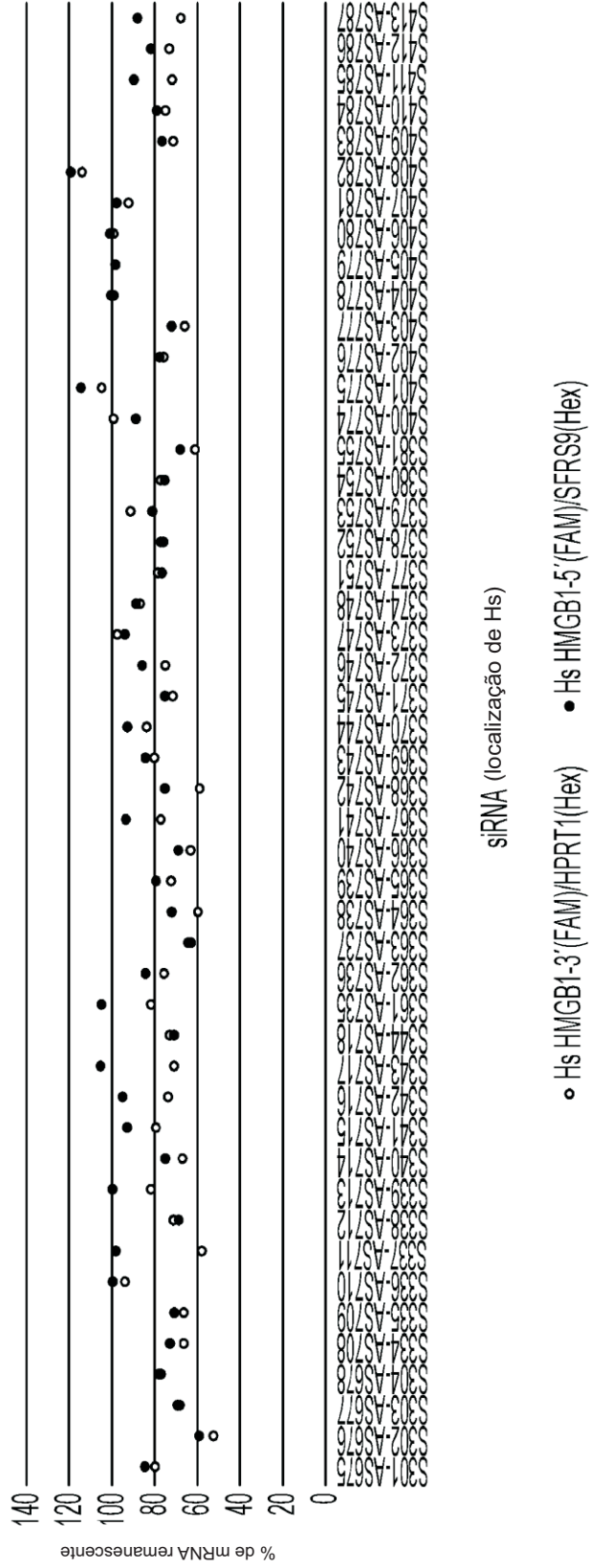
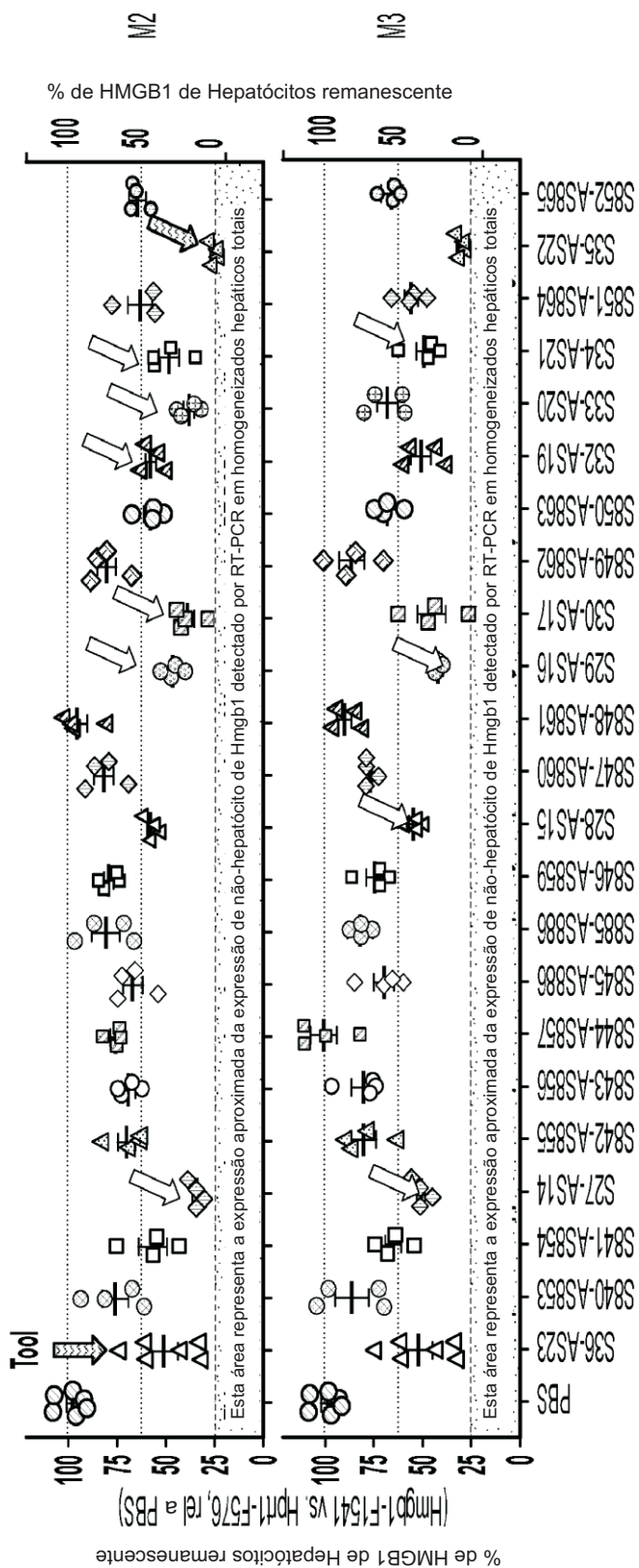


FIG. 4F



Oligonucleotídeos de HMGB1 conjugados a GalNAc

FIG. 5

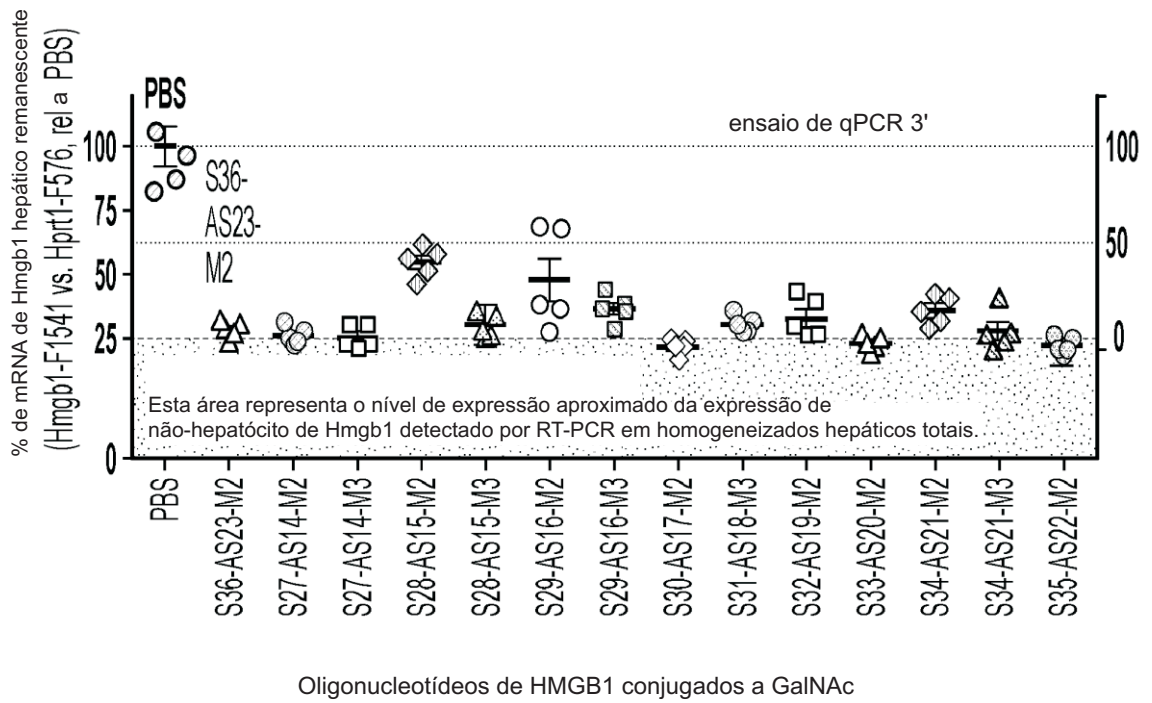


FIG. 6



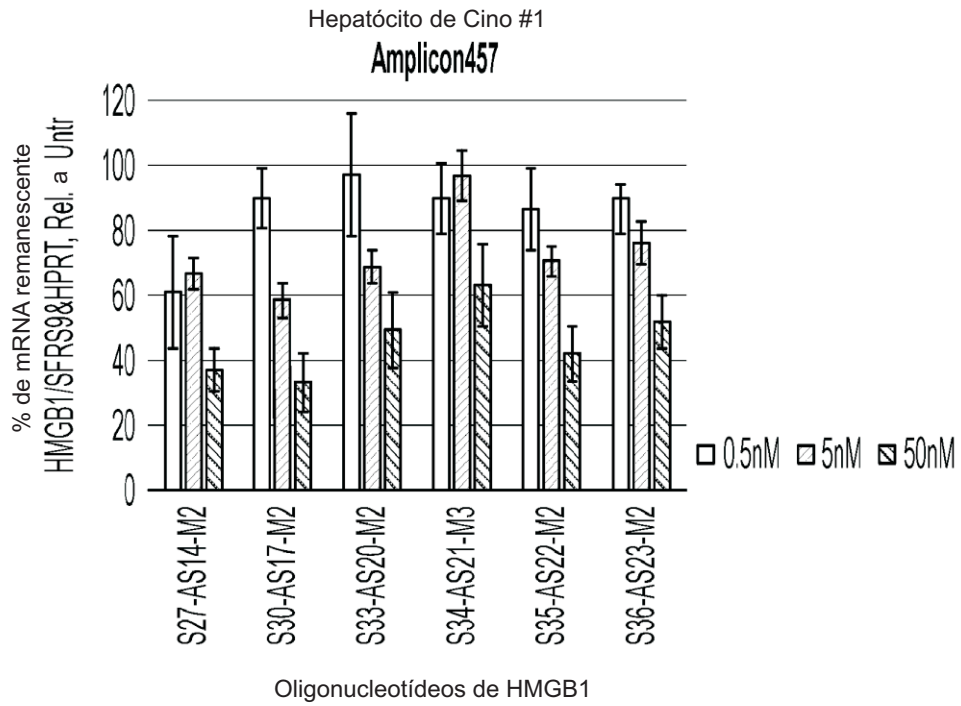


FIG. 8A

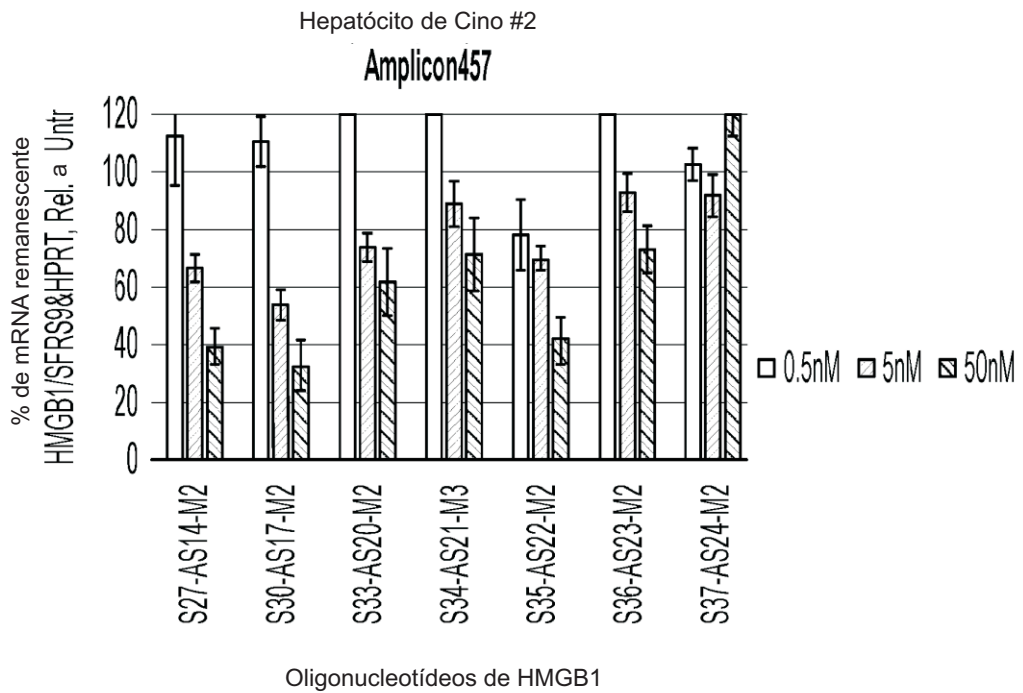


FIG. 8B

14/21

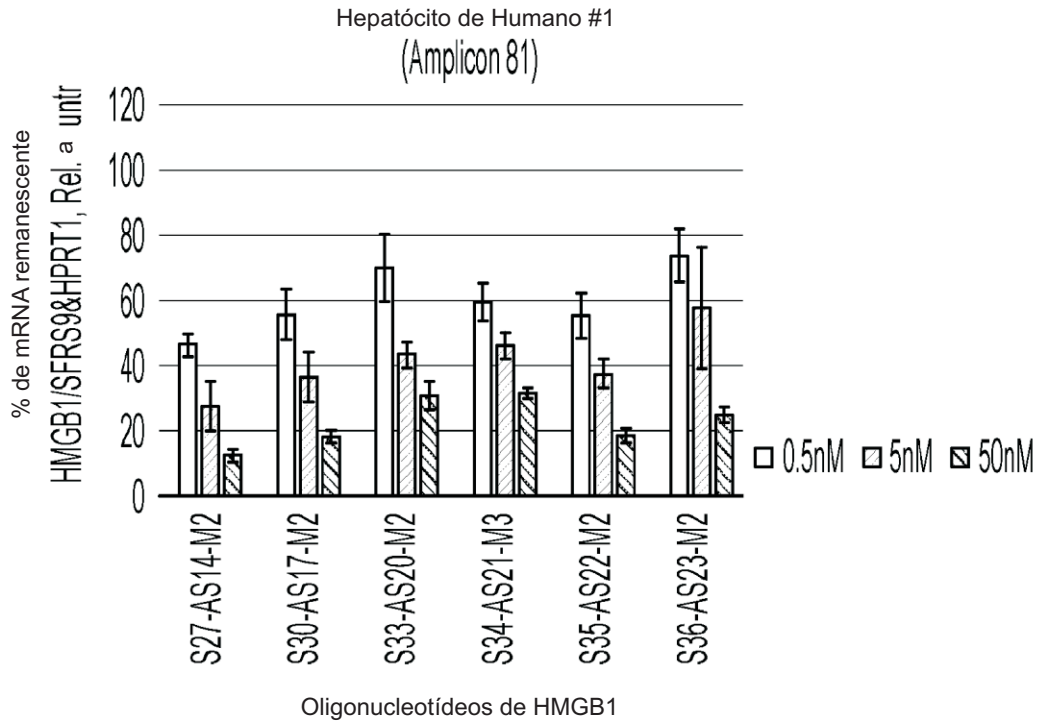


FIG. 8C

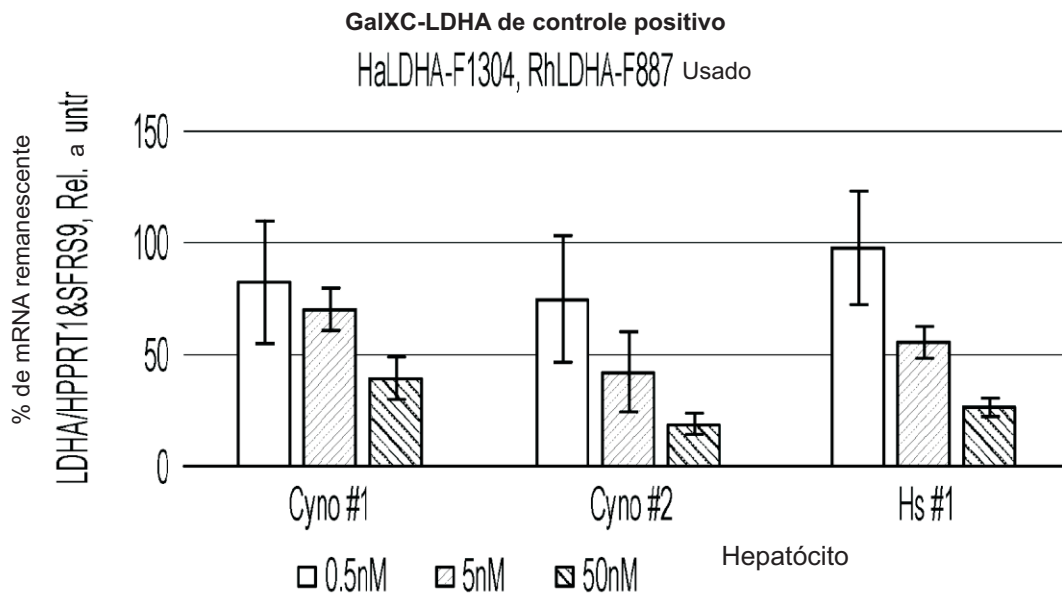


FIG. 8D

MRNA de HMGB1 hepático em macacos, 4 mg/kg, uma dose, GalXC-

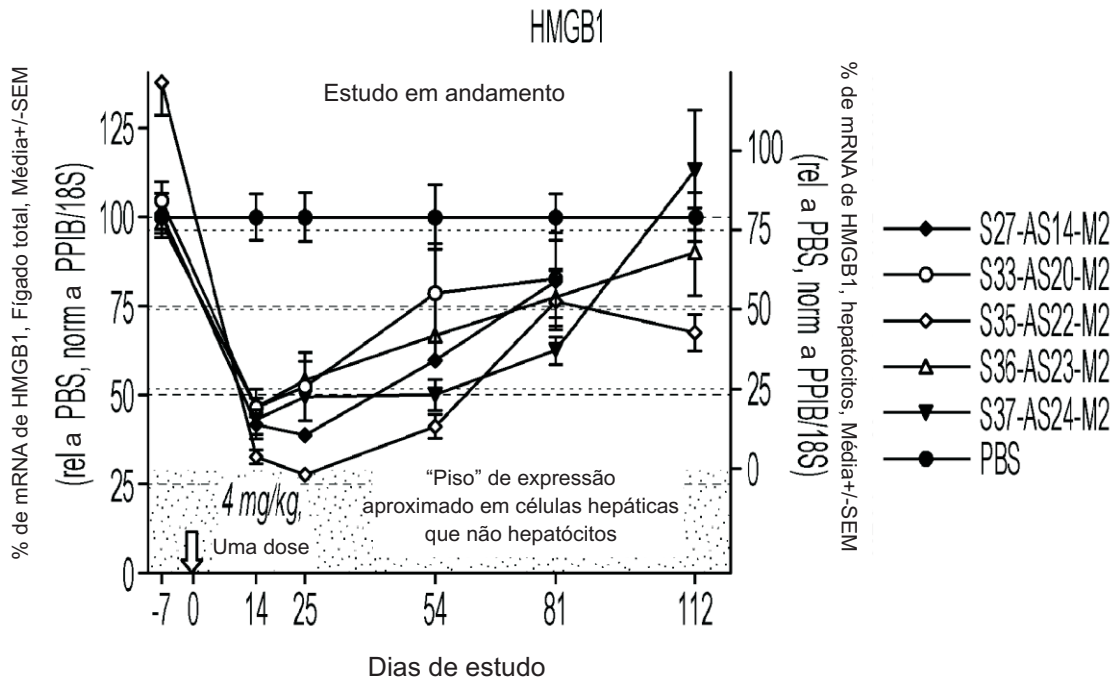


FIG. 9A

MRNA de HMGB1 hepático em macacos, 4 mg/kg, uma dose, GalXC-  
Liver HMGB1 mRNA in monkeys, 2 mg/kg, q4wx4, GalXC-HMGB1

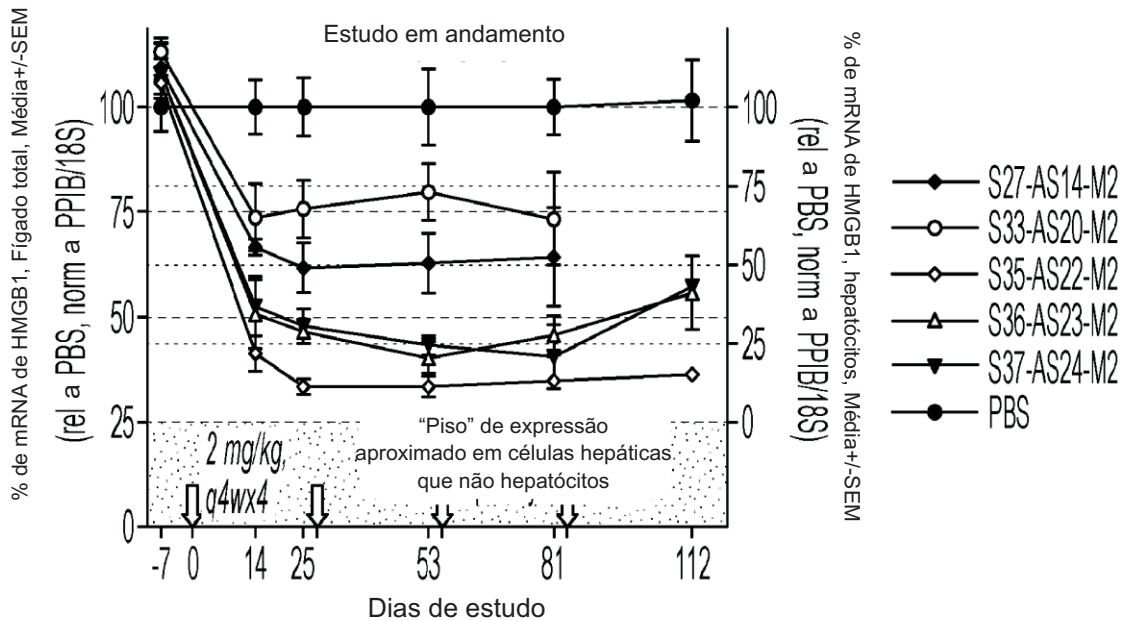


FIG. 9B

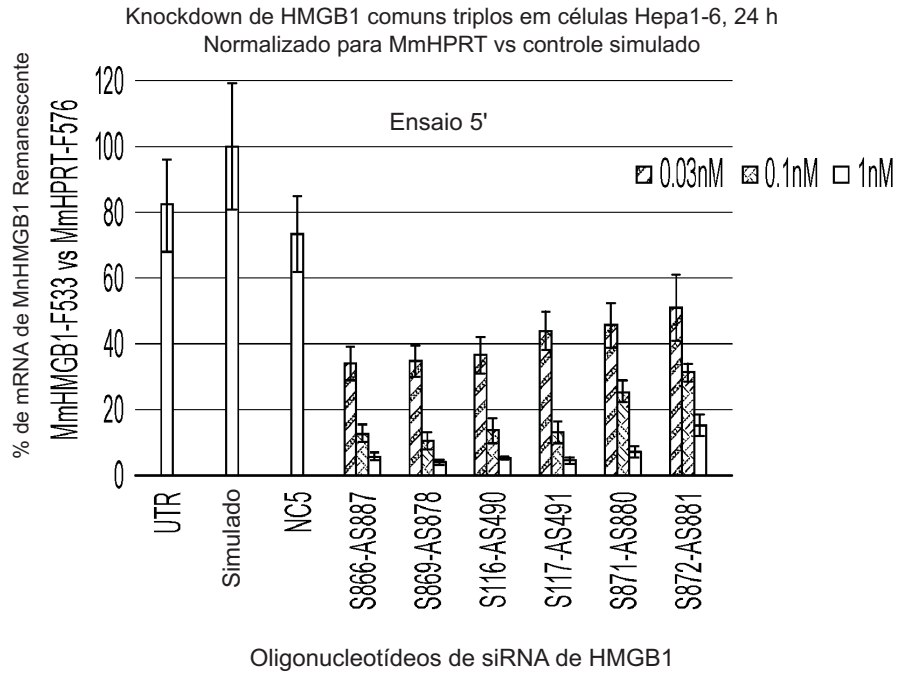


FIG. 10A

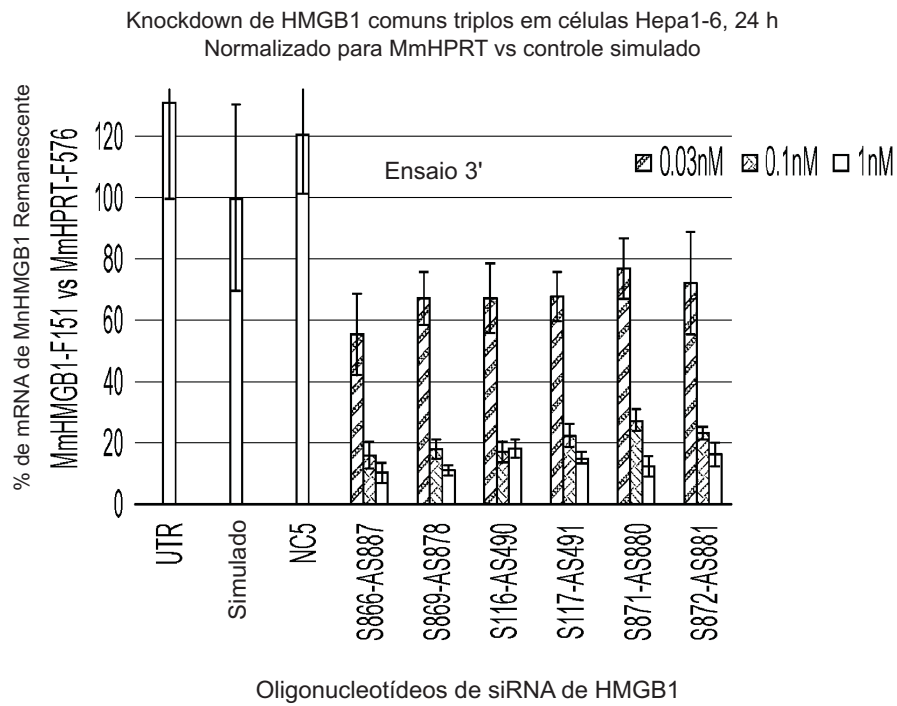


FIG. 10B

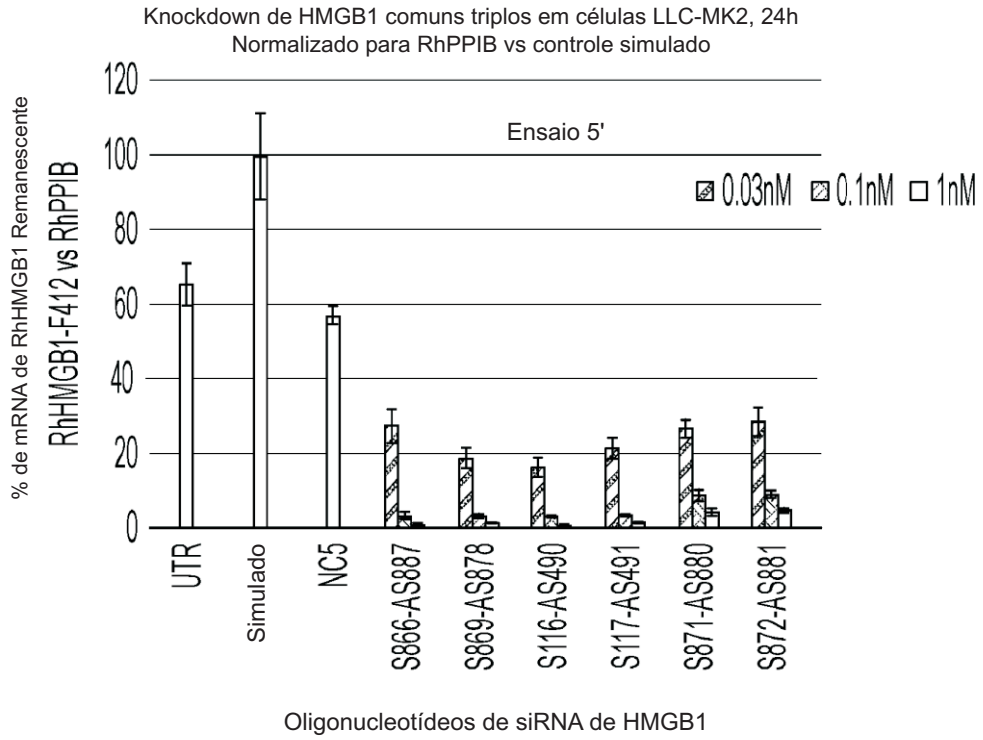


FIG. 10C

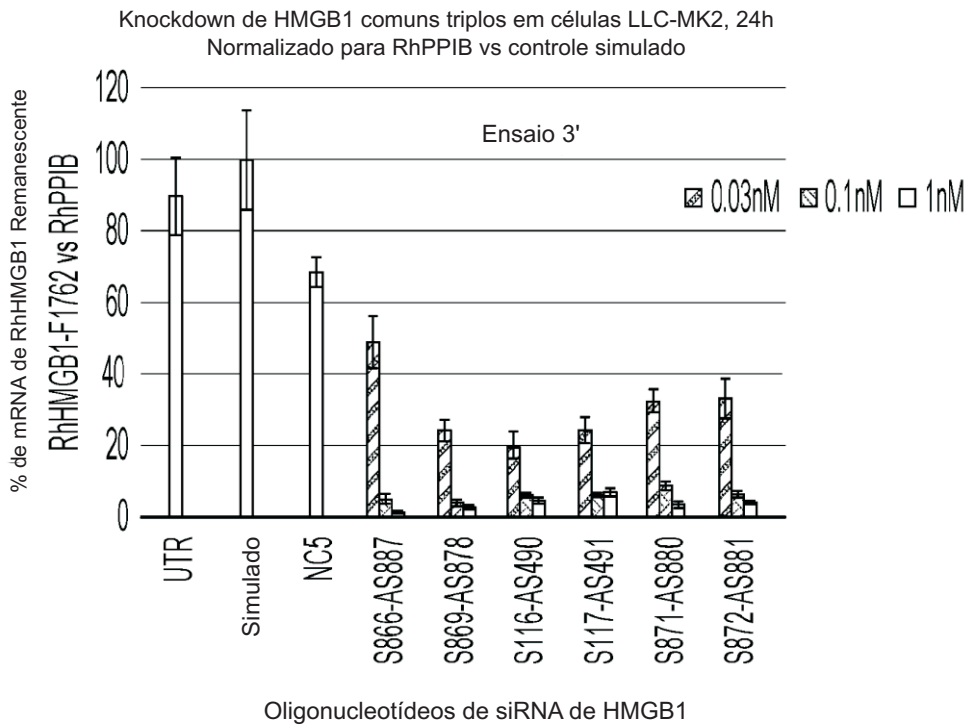


FIG. 10D

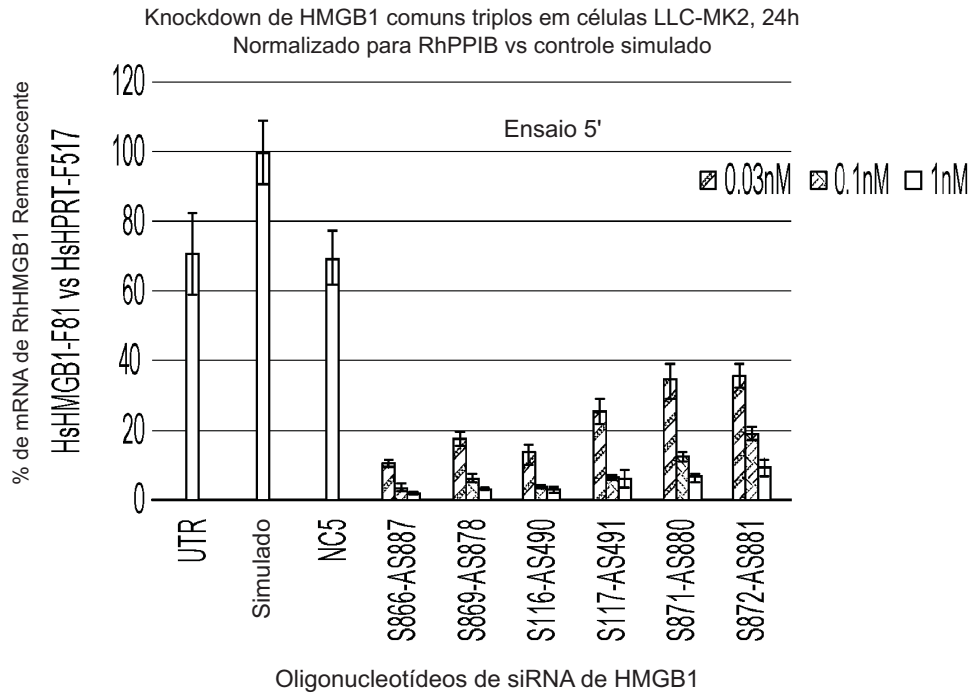


FIG. 10E

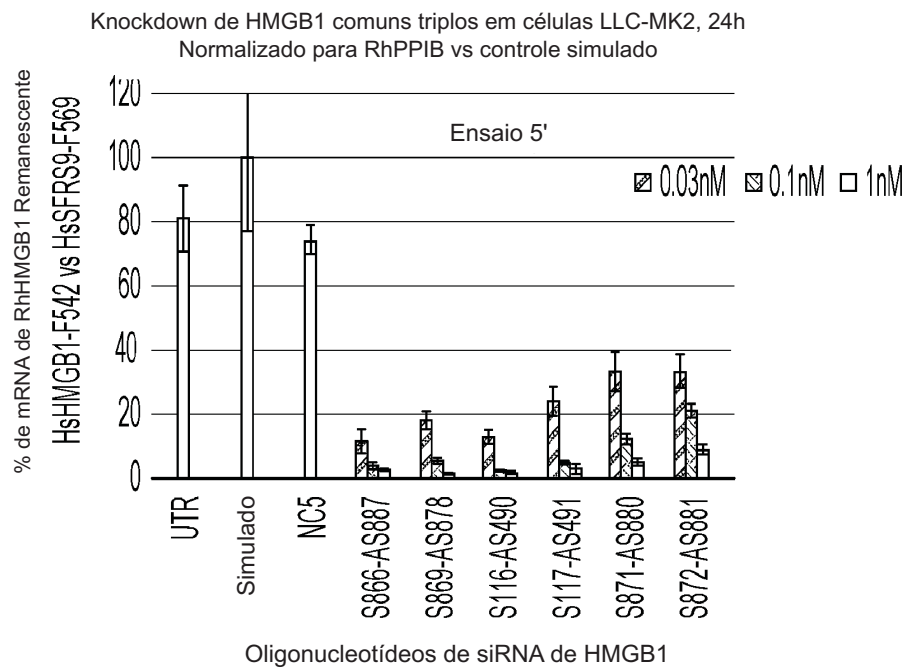


FIG. 10F

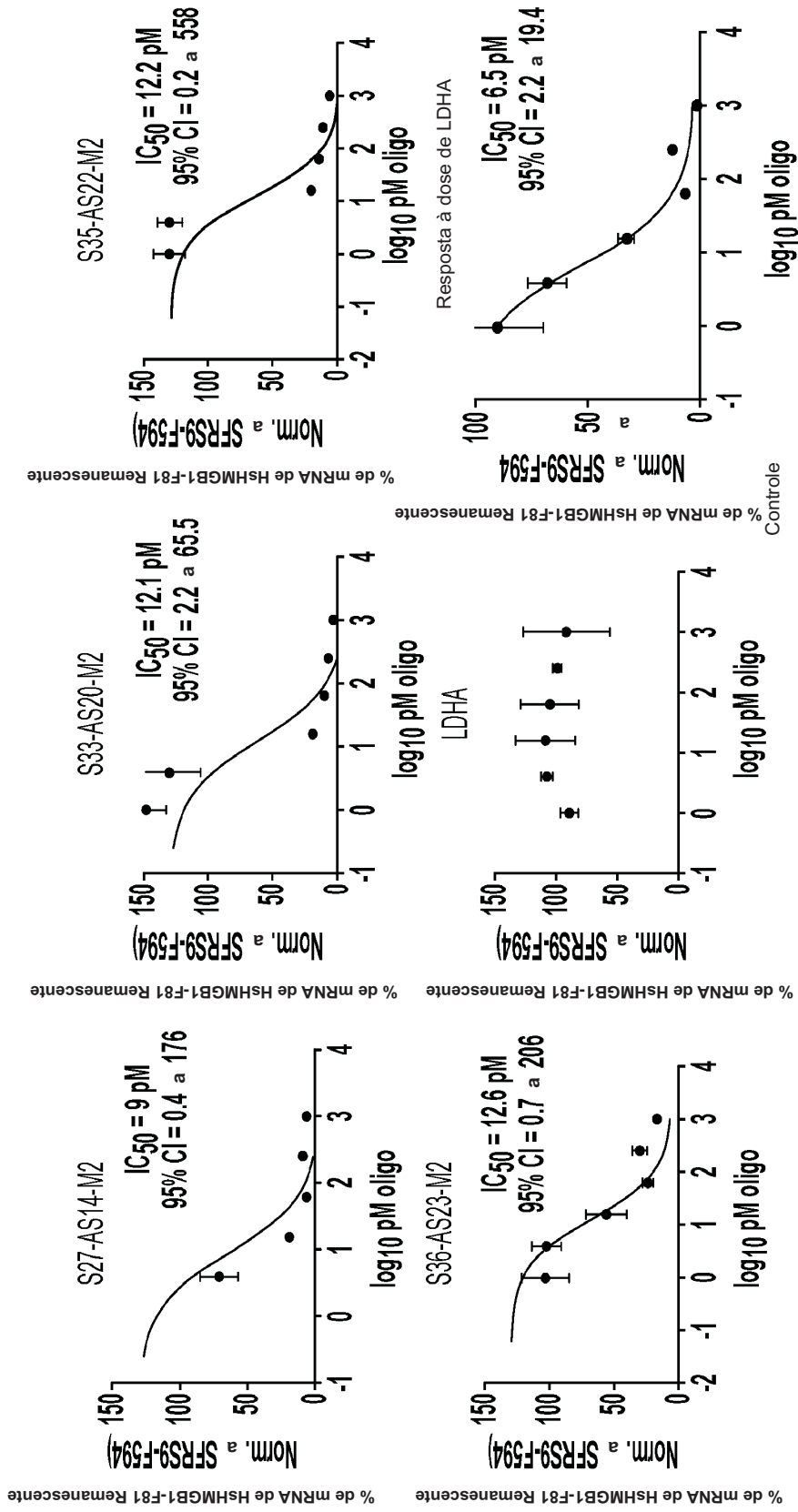


FIG. 11A

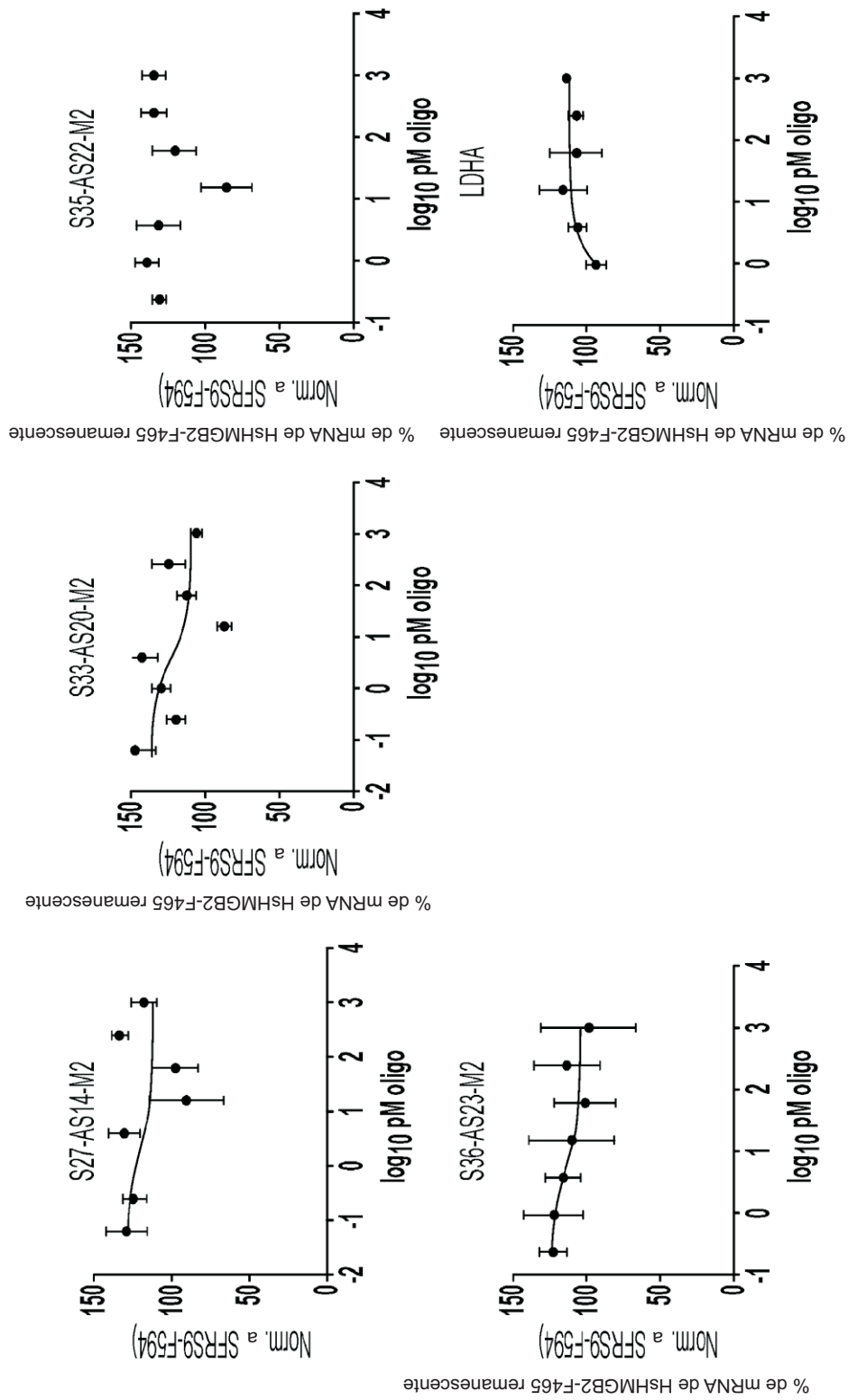


FIG. 11B

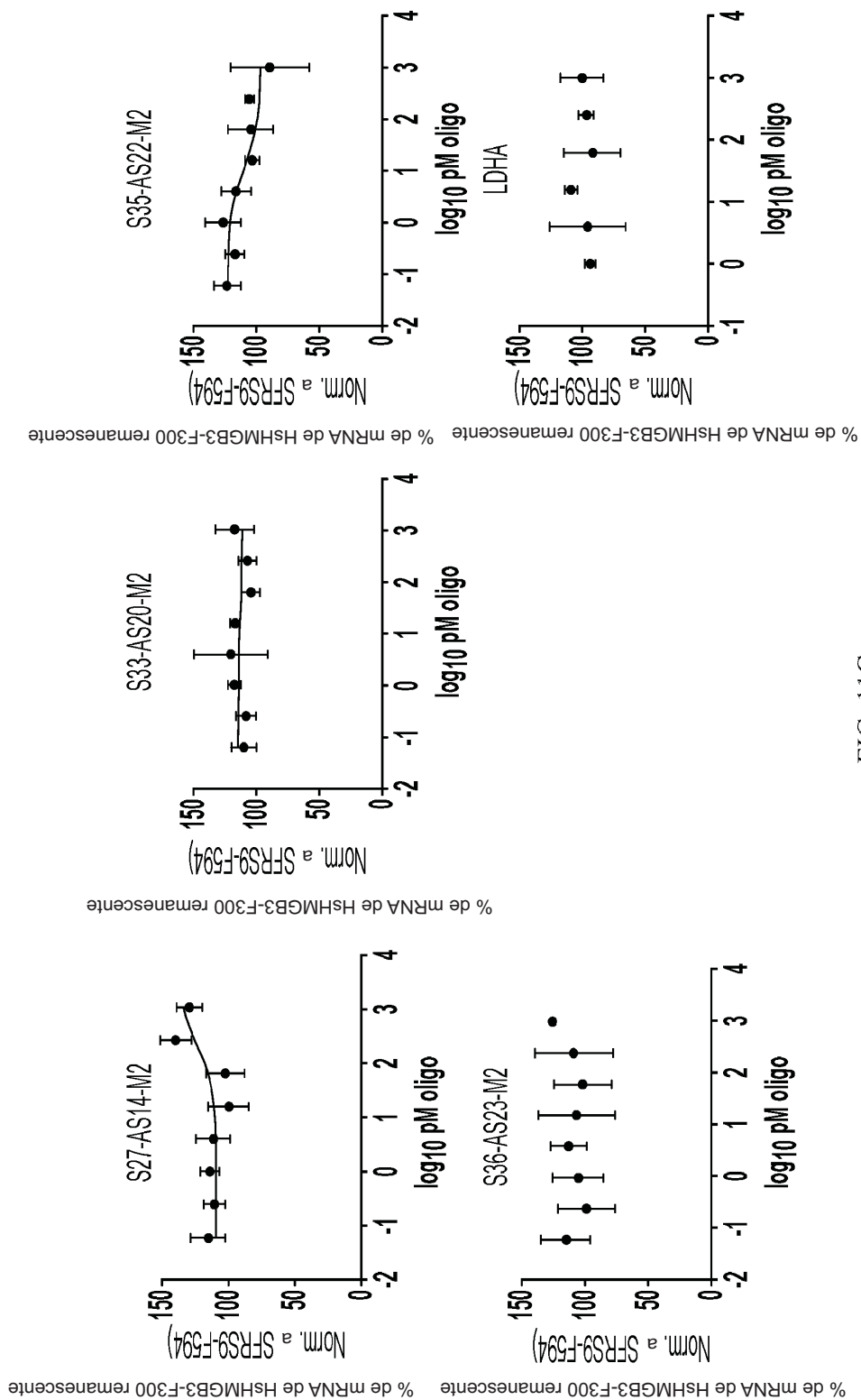


FIG. 11C

## RESUMO

Patente de Invenção: **“COMPOSIÇÕES E MÉTODOS PARA INIBIR A EXPRESSÃO DE HMGB1”**.

A presente invenção refere-se a oligonucleotídeos, composições e métodos úteis para reduzir a expressão de HMGB1, particularmente em hepatócitos. Os oligonucleotídeos revelados para a redução da expressão de HMGB1 podem ser de filamento duplo ou de filamento único e podem ser modificados para características melhoradas tais como resistência mais forte a nucleases e imunogenicidade mais baixa. Os oligonucleotídeos revelados para a redução da expressão de HMGB1 também podem ser designados como incluindo ligantes de alvejamento para alvejar uma célula ou órgão particulares, tais como os hepatócitos do fígado, e podem ser usados para tratar fibrose hepática e condições relacionadas.

Este anexo apresenta o código de controle da listagem de sequências biológicas.

### Código de Controle

Campo 1



Campo 2



### Outras Informações:

- Nome do Arquivo: LISTAGEM DE SEQUENCIA P254324.TXT
- Data de Geração do Código: 24/06/2021
- Hora de Geração do Código: 14:41:39
- Código de Controle:
  - Campo 1: FFAB1C1CC463A6E3
  - Campo 2: 117255FE6F9732C0