



República Federativa do Brasil

Ministério do Desenvolvimento, Indústria,
Comércio e Serviços

Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 0919732-0 B1

(22) Data do Depósito: 20/10/2009

(45) Data de Concessão: 22/08/2023

(54) Título: ÁCIDOS RIBONUCLEICOS DE FITA DUPLA (DSRNA), COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA E USO DOS MESMOS

(51) Int.Cl.: C12N 15/113; A61K 31/713; C12N 15/11; C07H 21/02.

(30) Prioridade Unionista: 02/03/2009 US 61/156,670; 09/06/2009 US 61/185,545; 15/09/2009 US 61/242,783; 18/11/2008 US 61/115,738; 20/10/2008 US 61/106,956; (...).

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

(72) Inventor(es): DINAH WEN-YEE SAH; GREGORY HINKLE; RENE ALVAREZ; QINGMIN CHEN; STUART MILSTEIN.

(86) Pedido PCT: PCT US2009061381 de 20/10/2009

(87) Publicação PCT: WO 2010/048228 de 29/04/2010

(85) Data do Início da Fase Nacional: 20/04/2011

(57) Resumo: ÁCIDOS RIBONUCLEICOS DE FITA DUPLA (dsR-NA) E MÉTODOS PARA INIBIÇÃO DA EXPRESSÃO DE TRANSTIRRETINA, VETORES, CÉLULAS, COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS, BEM COMO USO DOS REFERIDOS ÁCIDOS RIBONUCLEICOS DE FITA DUPLA. A presente invenção refere-se a um ácido ribonucleico de fita dupla (dsRNA) se direcionando a um gene da transtirretina (TTR) e métodos de uso do dsRNA para inibir expressão de TTR.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**ÁCIDOS RIBONUCLEICOS DE FITA DUPLA (dsRNA), COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA E USO DOS MESMOS**".

Campo da Invenção

[001] A presente invenção refere-se a um ácido ribonucleico de fita dupla (dsRNA) se direcionando a um gene da transtirretina (TTR) e métodos de uso do dsRNA para inibir expressão de TTR.

Referência Cruzada a Pedidos Relacionados

[002] O presente pedido reivindica o benefício do Pedido de Patente Provisório U.S. Nº de Série 61/106.956 depositado em 20 de outubro de 2008; do Pedido de Patente Provisório U.S. Nº de Série 61/115.738 depositado em 18 de novembro de 2008; do Pedido de Patente Provisório U.S. Nº de Série 61/156.670 depositado em 2 de março de 2009; Pedido de Patente Provisório U.S. Nº de Série 61/185.545 depositado em 9 de junho de 2009; Pedido de Patente Provisório U.S. Nº de Série 61/242.783 depositado em 15 de setembro de 2009; e Pedido de Patente Provisório U.S. Nº de Série 61/244.794 depositado em 22 de setembro de 2009, todos aqui incorporados a título de referência, em sua totalidade, para todos os propósitos.

Referência à Listagem de Sequência

[003] O presente pedido inclui uma Listagem de Sequência eletronicamente submetida como um arquivo de texto nomeado _____ .txt, criado em _____, 2009, com um tamanho de _____ bytes. A listagem de sequência é incorporada aqui a título de referência.

Antecedentes da Invenção

[004] A transtirretina (TTR) é uma proteína de ligação ao hormônio da tireoide secretado. A TTR liga e transporta proteína de ligação retinol (RBP)/ Vitamina A e tiroxina do soro (T4) em plasma e fluido cerebrospinal.

[005] Ambas a TTR de sequência normal e TTR de sequência variante causam amiloidose. TTR de sequência normal causa amiloidose cardíaca em pessoas que já são idosas e é chamada amiloidose sistêmica senil (SSA) (também chamada amiloidose cardíaca senil (SCA)). SSA é frequentemente acompanhada por depósitos microscópicos em muitos outros órgãos. Mutações em TTR aceleram o processo de formação de amiloide de TTR e são o fator de risco mais importante para o desenvolvimento de amiloidose de TTR clinicamente significativa (também chamada ATTR (amiloidose tipo transtirretina). Mais de 85 variantes de TTR amiloidogênicas são conhecidas causar amiloidose familiar sistêmica. O fígado é o principal local de expressão de TTR. Outros sítios significativos de expressão incluem o plexo coroide, retina e pâncreas.

[006] Amiloidose de TTR se manifesta em várias formas. Quando o sistema nervoso periférico é afetado de maneira mais destacada, a doença é chamada polineuropatia amiloidótica familiar (FAP). Quando o coração é principalmente envolvido, mas não o sistema nervoso, a doença é chamada cardiomiopatia amiloidótica familiar (FAC). Um terceiro tipo principal de amiloidose de TTR é chamado amiloidose leptomeningeal/SNC (Sistema Nervoso Central).

[007] Moléculas de RNA de fita dupla (dsRNA) mostraram bloquear a expressão de gene em um mecanismo regulador altamente conservado conhecido como interferência de RNA (RNAi). O WO 99/32619 (Fire e outros) descreveu o uso de um dsRNA de pelo menos 25 nucleotídeos de comprimento inibir a expressão de genes em *C. elegans*. dsRNA foi também mostrado degradar RNA-alvo em outros organismos incluindo plantas (vide, por exemplo, WO 99/53050, Waterhouse e outros; e WO 99/61631, Heifetz e outros), *Drosophila* (vide, por exemplo, Yang, D. e outros, *Curr. Biol.* (2000) 10:1191-1200) e mamíferos (vide WO 00/44895, Limmer; e DE 101 00 586.5, Kreutzer

e outros).

[008] A U.S. 20070207974 descreve siRNAs funcionais e hiperfuncionais. A U.S. 20090082300 descreve moléculas antissenso direcionadas contra TTR. A Patente U.S. Nº 7.250.496 descreve micro-RNAs direcionados contra TTR.

Sumário da Invenção

[009] Em uma modalidade, a invenção provê um ácido ribonucleico de fita dupla (dsRNA) para inibição da expressão de transtirretina (TTR), onde o dito dsRNA compreende uma fita de senso e uma fita antissenso, a fita de senso compreendendo uma região complementar a uma parte de um mRNA codificando transtirretina (TTR), onde a dita região de complementaridade é de menos do que 30 nucleotídeos de comprimento e a fita antissenso compreende 15 ou mais nucleotídeos contíguos de SEQ ID NO:170, SEQ ID NO:450, SEQ ID N:730 ou SEQ ID NO:1010. Em uma modalidade relacionada, a fita de senso compreende 15 ou mais nucleotídeos contíguos de SEQ ID NO: 169, SEQ ID NO: 449, SEQ ID NO:729 ou SEQID NO:1009. Em ainda outra modalidade relacionada, a fita de senso consiste na SEQ ID NO:449 e a fita de senso consiste na SEQ ID NO:450. Em ainda outra modalidade relacionada, a fita de senso consiste na SEQ ID NO:729 e a fita antissenso consiste na SEQ ID NO:730. Em ainda outra modalidades relacionada, a fita de senso consiste na SEQ ID NO:1009 e a fita antissenso consiste na SEQ ID NO:1010. Em ainda outra modalidade relacionada, o dsRNA compreende uma fita de senso selecionada das tabelas 3A, 3B, 4, 6A, 6B, 7 e 16 e uma fita antissenso selecionada das tabelas 3A, 3B, 4, 6A, 6B, 7 e 16.

[0010] Em certas modalidades, a região de complementaridade entre a fita antissenso do dsRNA e do mRNA codificando transtirretina é de 19 nucleotídeos de comprimento. Em outra modalidade, a região de complementaridade consiste na SEQ ID NO:169. Em outras

modalidades, cada fita do dsRNA é de 19, 20, 21, 22, 24 ou 24 nucleotídeos de comprimento. Em ainda outra modalidade, cada fita é de 21 nucleotídeos de comprimento.

[0011] Em certas modalidades, o dsRNA para inibição da expressão de transtirretina não cliva um mRNA de TTR entre o nucleotídeo da adenina na posição 637 da SEQ ID NO:1331 e o nucleotídeo de guanina na posição 638 da SEQ ID NO:1331. Em outras modalidades, o dsRNA cliva um mRNA de TTR entre o nucleotídeo da guanina na posição 636 de SEQ ID NO:1331 e o nucleotídeo de adenina na posição 637 de SEQ ID NO:1331. Em certas modalidades, o dsRNA anela para um mRNA de TTR entre o nucleotídeo de guanina na posição 628 de SEQ ID NO:1331 e o nucleotídeo de uracila na posição 646 de SEQ ID NO:1331.

[0012] Em ainda outras modalidades relacionadas, a invenção provê dsRNA conforme acima descrito para inibição da expressão de transtirretina onde o dsRNA compreende um ou mais nucleotídeos modificados. Em modalidades relacionadas, pelo menos um nucleotídeo (ou nucleotídeos) modificado é escolhido do grupo consistindo em: um nucleotídeo modificado com 2'-O-metila, um nucleotídeo compreendendo um grupo 5'-fosforotioato e um nucleotídeo terminal ligado a um derivado de cloesterila ou grupo bisdecilamida do ácido dodecanoico. Em outra modalidade relacionada, o nucleotídeo modificado é escolhido do grupo de: um nucleotídeo modificado com 2'-desóxi-2'-fluor, um nucleotídeo modificado com 2'-desóxi, um nucleotídeo bloqueado, um nucleotídeo abásico, nucleotídeo modificado com 2'-amino, nucleotídeo modificado com 2'-alquila, nucleotídeo de morfolino, um fosforoamidato e um nucleotídeo compreendendo uma base não natural. Em certas modalidades, o dsRNA compreende pelo menos um nucleotídeo modificado com 2'-O-metila.

[0013] Em outras modalidades, um dsRNA conforme acima descrito para inibição da expressão de transtirretina é conjugado a um ligante ou

formulado em uma formulação de lipídeo. Em certas modalidades, uma formulação de lipídeo pode ser uma formulação LNP, uma formulação LNP01, uma formulação XTC-SNALP ou uma formulação SNALP. Em modalidades relacionadas, a formulação XTC-SNALP é como segue: usando 2,2-Dilinoil-4-dimetilaminoetil-[1,3]-dioxolano (XTC) com XTC/DPPC/Colesterol/PEG-cDMA em uma razão de 57,1/7,1/34,3/1,4 e uma razão de lipídeo:siRNA de cerca de 7. Em ainda outras modalidades relacionadas, a fita de senso do dsRNA consiste na SEQ ID NO:1009 e a fita antissenso consiste na SEQ ID NO:1010 e o dsRNA é formulado em uma formulação XTC-SNALP como segue: usando 2,2-Dilinoil-4-dimetilaminoetil-[1,3]-dioxolano (XTC) com um XTC/DPPC/Colesterol/PEG-cDMA em uma razão de 57,1/7,1/34,3/1,4 e uma razão de lipídeo:siRNA de cerca de 7. Alternativamente, um dsRNA tais como aqueles descritos acima pode ser formulado em uma formulação LNP09 como segue: usando XTC/DSPC/Col/PEG2000-C14 em uma razão de 50/10/38,5/1,5% em mol e uma razão de lipídeo/siRNA de cerca de 11:1. Em outra variação, o dsRNA é formulado em uma formulação LNP11 como segue: usando MC3/DSPC/Col/PEG200-C14 em uma razão de 50/10/38,5/1,5% em mol e uma razão de lipídeo:siRNA de cerca de 11:1. Em ainda outra modalidade, o dsRNA é formulado em uma formulação LNPP09 ou uma formulação LNP11 e reduz os níveis de mRNA de TTR em cerca de 85 a 90% em uma dose de 0,3 mg/kg, com relação a um grupo controle de PBS. Em ainda outra modalidade, o dsRNA é formulado em uma formulação LNP09 ou uma formulação LNP11 e reduz os níveis de mRNA de TTR em cerca de 50% em uma dose de 0,1 mg/kg, com relação a um grupo controle de PBS. Em ainda outra modalidade, o dsRNA é formulado em uma formulação LNP09 ou uma formulação LNP11 e reduz os níveis de proteína TTR de uma maneira dependente da dose com relação a um grupo controle de PBS conforme medido

através de western blot. Em ainda outra modalidade, o dsRNA é formulado em uma formulação SNALP como segue: usando DlinDMA com um DlinDMA/DPPC/Colesterol/PEG2000-cDMA em uma razão de 57,1/7,1/34,3/1,4 e uma razão de lipídeo:siRNA de cerca de 7.

[0014] Em certas modalidades, a invenção provê um dsRNA tal como aqueles descritos acima para inibição da expressão de transtirretina, onde a administração do dsRNA a uma célula resulta em cerca de 95% de inibição de expressão de mRNA de TTR conforme medido através de um ensaio de PCR de tempo real, onde a célula é uma célula HepG2 ou uma célula Hep3B, e onde a concentração de dsRNA é 10 nM. Em modalidades relacionadas, a administração do dsRNA a uma célula resulta em cerca de 74% de inibição de expressão de mRNA de TTR conforme medido através de um ensaio de DNA ramificado, onde a célula é uma célula HepG2 ou uma célula Hep3B, e onde a concentração do dsRNA é 10 nM. Em outras modalidades relacionadas, o dsRNA tem uma IC50 de menos do que 10 pM em uma célula HepG2, onde a concentração do dsRNA é 10 nM. Em ainda outras modalidades relacionadas, o dsRNA tem uma ED50 de cerca de 1 mg/kg. Em ainda outras modalidades relacionadas, a administração do dsRNA reduz o mRNA de TTR em cerca de 80% em fígado de macaco cinomólogo, onde a concentração do dsRNA é 3 mg/kg. Em ainda outras modalidades relacionadas, administração do dsRNA não resulta na atividade imunoestimuladora em células mononucleares de sangue periférico humano (PBMCs) conforme medido através de ensaios ELISA IFN-alfa e TNF-alfa. Em ainda outras modalidades relacionadas, a administração do dsRNA reduz os níveis de mRNA de TTR no fígado em cerca de 97% ou níveis de proteína TTR no soro em cerca de 90%, onde a concentração do dsRNA é 6 mg/kg. Em ainda outras modalidades relacionadas, administração do dsRNA reduz os níveis de mRNA de TTR e/ou níveis de proteína TTR no soro até 22

dias, onde a concentração do dsRNA é 6 mg/kg ou 3 mg/kg. Em ainda outras modalidades relacionadas, o dsRNA suprime os níveis de proteína TTR no soro até o dia 14 pós-tratamento quando administrado a um indivíduo com necessidade do mesmo a 1 mg/kg ou 3 mg/kg. Em ainda outras modalidades relacionadas, o dsRNA reduz a expressão de TTR em 98,9% em uma célula Hep3B em uma concentração de 0, 1 nM conforme medido através de PCR de tempo real. Em ainda outras modalidades relacionadas, o dsRNA reduz a expressão de TTR em 99,4% em uma célula Hep3H em uma concentração de 10 mM conforme medido através de PCR de tempo real.

[0015] Em outras modalidades, a invenção provê um ácido ribonucleico de fita dupla (dsRNA) para inibição da expressão de transtirretina (TTR), onde o dito dsRNA compreende uma fita de senso e uma fita antissenso, a fita de senso compreendendo uma região complementar a uma parte de um mRNA codificando transtirretina (TTR), onde a dita região de complementaridade é de menos do que 30 nucleotídeos de comprimento e onde o dsRNA compreende uma fita de senso selecionada das tabelas 3A, 3B, 4, 6A, 6B, 7 e 16 e uma fita antissenso selecionada das tabelas 3A, 3B, 4, 6A, 6B, 7 e 16.

[0016] Em outra modalidade, a invenção provê um ácido ribonucleico de fita dupla (dsRNA) para inibição da expressão de transtirretina (TTR), onde o dito dsRNA compreende uma fita antissenso compreendendo uma região complementar para 15-30 nucleotídeos dos nucleotídeos 618-648 da SEQ ID NO:1331 e onde a dita fita antissenso forma par de base com a guanina na posição 628 de SEQ ID NO:1331.

[0017] Em certas modalidades, a invenção provê uma célula contendo qualquer um dos dsRNAs descritos no sumário, acima. Em certas outras modalidades, a invenção provê um vetor compreendendo uma sequência de nucleotídeo que codifica pelo menos uma fita de qualquer um dos dsRNAs descritos no sumário, acima. Em certas

modalidades, o vetor está em uma célula.

[0018] Em outras modalidades, a invenção provê uma composição farmacêutica para inibição da expressão de um gene de TTR compreendendo qualquer um dos dsRNAs descritos no sumário, acima, e um veículo farmacêuticamente aceitável. Em modalidades relacionadas, a invenção provê uma composição farmacêutica para inibição da expressão de um gene de TTR compreendendo um dsRNA e uma formulação de SNALP, onde o dsRNA compreende uma fita antissenso que é de menos do que 30 nucleotídeos de comprimento e compreende 15 ou mais nucleotídeos contíguos de SEQ ID NO:170, SEQ ID NO:450, SEQ ID NO:730 ou SEQ ID NO:1010, e onde a formulação SNALP compreende DlinDMA, DPPC, Colesterol e PEG2000-cDMA em uma razão de 57,1/7,1/34,4/1,4, respectivamente.

[0019] Em ainda outra modalidade, a invenção provê um método de inibição de expressão de TTR em uma célula, o método compreendendo: (a) contato da célula com qualquer um dos dsRNAs descritos no sumário, acima; e (b) manutenção da célula produzida na etapa (a) por um tempo suficiente para obter degradação do transcrito de mRNA de um gene de TTR, desta maneira inibindo a expressão do gene de TTR na célula.

[0020] Em ainda outra modalidade, a invenção provê um método de tratamento de um distúrbio mediado pela expressão de TTR compreendendo administrar a um ser humano com necessidade de tal tratamento uma quantidade terapeuticamente eficaz de qualquer um dos dsRNAs descritos no sumário, acima. Em modalidades relacionadas, o dsRNA é administrado ao ser humano em cerca de 0,01, 0,1, 0,5, 1,0, 2,5 ou 5,0 mg/kg. Em ainda outra modalidade relacionada, o dsRNA é administrado ao humano em cerca de 1,0 mg/kg. Em ainda outra modalidade relacionada, o ser humano sendo tratado tem amiloidose de transtirretina e/ou distúrbio do fígado. Em uma modalidade relacionada, o

ser humano é ainda provido com um transplante de fígado. Em ainda outra modalidade, a administração do dsRNA reduz mRNA de TTR em cerca de 80% em fígado humano, onde a concentração do dsRNA é 3 mg/kg. Em ainda outra modalidade relacionada, administração do dsRNA não resulta em atividade imunoestimuladora no humano conforme medido através de ensaios ELISA IFN-alfa e TNF-alfa. Em ainda outra modalidade relacionada, administração do dsRNA reduz os níveis de mRNA de TTR no fígado em cerca de 97% ou níveis de proteína TTR no soro em cerca de 90%, onde a concentração do dsRNA é 6 mg/kg. Em ainda outra modalidade relacionada, administração do dsRNA reduz os níveis de mRNA de TTR no fígado e/ou os níveis de proteína TTR no soro até 22 dias, onde a concentração do dsRNA é 6 mg/kg ou 3 mg/kg. Em ainda outra modalidade relacionada, o dsRNA é formulado em uma formulação LNP09 como segue: usando XTC/DSPC/Col/PEG2000-C14 em uma razão de 50/10/38,5/1,5% em mol e uma razão de lipídeo:siRNA de cerca de 11:1. Em ainda outra modalidade relacionada, o dsRNA é formulado em uma formulação LPN11 como segue: usando MC3/DSPC/Col/PEG2000-C14 em uma razão de 50/10/38,5/1,5% em mol e uma razão de lipídeo:dsRNA de cerca de 11:1. Em ainda outra modalidade relacionada, o dsRNA é formulado em uma formulação LNP09 ou uma formulação LNP11 e reduz os níveis de mRNA de TTR em cerca de 85 a 90% em uma dose de 0,3 mg/kg, com relação a um grupo controle de PBC. Em ainda outra modalidade relacionada, o dsRNA é formulado em uma formulação LNP09 ou uma formulação LNP11 e reduz os níveis de mRNA de TTR em cerca de 50% em uma dose de 0,1mg/kg, com relação a um grupo controle de PBC. Em ainda outra modalidade relacionada, o dsRNA é formulado em uma formulação LNP09 ou uma formulação LNP11 e reduz os níveis de proteína TTR de uma maneira dependente da dose com relação a um grupo controle de PBC conforme medido através de western blot. Em ainda outra modalidade relacionada,

administração do dsRNA suprime os níveis de proteína TTR no soro até o dia 14 pós-tratamento quando administrado a humano a 1 mg/kg ou 3 mg/kg. Em ainda outra modalidade relacionada, o dsRNA é formulado em uma formulação SNALP como segue: usando DlinDMA com um DlinDMA/DPPC/Colesterol/PEG2000-cDMA em uma razão de 57,1/7,1/34,4/1,4 e uma razão de lipídeo:siRNA de cerca de 7.

[0021] Em outra modalidade, a invenção provê o uso de um dsRNA para tratamento de um distúrbio mediado pela expressão de TTR compreendendo administrar a um humano com necessidade de tal tratamento uma quantidade terapeuticamente eficaz de qualquer um dos dsRNAs descritos no sumário, acima. Em modalidades relacionadas, o dsRNA é administrado a um humano em cerca de 0,01, 0,1, 0,5, 1,0, 2,5 ou 5,0 mg/kg. Em uma modalidade relacionada particular, o dsRNA é administrado ao humano em cerca de 1,0 mg/kg. Em outra modalidade relacionada, o humano tem amiloidose de transtirretina e/ou distúrbio do fígado. Em ainda outra modalidade do uso provido pela invenção, o ser humano tratado é provido ainda com um transplante de fígado.

[0022] Em ainda outra modalidade, a invenção provê o uso de um dsRNA em um método para inibição da expressão de TTR em uma célula, onde o método compreende (a) contato da célula com um dsRNA descrito no Sumário, acima; e (b) manutenção da célula produzida na etapa (a) por um tempo suficiente para obter degradação do transcrito de mRNA de um gene de TTR, desta maneira inibindo a expressão do gene de TTR na célula.

[0023] Os detalhes de uma ou mais modalidades da invenção são mostrados no relatório abaixo. Outras características, objetos e vantagens da invenção serão aparentes a partir do relatório e dos desenhos e a partir das reivindicações.

Descrição dos Desenhos

[0024] A figura 1 é um gráfico de níveis de TNF-alfa e IFN-alfa em PBMCs humanas cultivadas seguindo transfecção com siRNAs de TTR.

[0025] As figuras 2A e 2B são curvas de dose resposta para AD-18324 e AD-18328, respectivamente, em células HepG2.

[0026] A figura 3 é uma curva de dose resposta para AD-18246 em células HepG2.

[0027] As figuras 4A e 4B mostram inibição de níveis de mRNA de fígado e proteína no plasma, respectivamente, em camundongos H129-mTTR-KO/iNOS-KO/hTTR transgênicos através de administração de bolo intravenosa de TTR-dsRNA (AD-18324 e AD-18246) formulada em LNP01.

[0028] A figura 5 é um gráfico resumindo as medições de níveis de mRNA de TTR em fígados de primatas não humanos seguindo infusão intravenosa de 15 minutos de TTR-dsRNA (AD-18324 e AD-18328) formulada em SNALP.

[0029] As figuras 6A e 6B mostram inibição de níveis de mRNA humano no fígado de TTR V30M e proteína no soro, respectivamente, em camundongos transgênicos através de uma administração de bolo intravenosa de SNALP-18328. Médias de grupo foram determinadas, normalizadas para o grupo controle de PBS e então postas em gráfico. Barras de erro representam desvios-padrão. A redução percentual da média de grupo, com relação a PBS, é indicada para os grupos SNALP-1955 e SNALP-18328. (***) $p < 0,001$, ANOVA One-way, com teste post-hoc de Dunn).

[0030] As figuras 7A e 7B mostram a durabilidade de redução de níveis de mRNA no fígado de TTR V30M humano e de proteína no soro, respectivamente, em camundongos transgênicos durante 22 dias seguindo uma administração de bolo intravenosa única de SNALP-18328. Médias de grupo foram determinadas. Níveis de mRNA de TTR/GAPDH foram normalizados para os níveis do dia 0 e postos em

gráfico. A redução percentual de níveis de mRNA de TTR normalizados com relação a SNALP-1955 para cada ponto de tempo foi calculada e é indicada para os grupos SNALP-18328. *** $p < 0,001$, ANOVA One-way, com teste post-hoc de Dunn).

[0031] A figura 8 mostra o curso de tempo de níveis de proteína no soro TTR em primatas não humanos durante 14 dias seguindo uma infusão intravenosa de 15 minutos de SNALP-18328.

[0032] A figura 9 mostra a redução da imunorreatividade de TTR em vários tecidos de camundongos inativados em TTR V30M /HSF-1 seguindo administração de bolo intravenosa de SNALP-18328. E, esôfago, S, estômago; I1, intestino/duodeno; I4, intestino/colo; N, nervo; D, gânglios da raiz dorsal.

[0033] A figura 10 mostra a medição dos níveis de mRNA de TTR em fígados de primatas não humanos seguindo infusão intravenosa de 15 minutos de XTC-SNALP-18328.

[0034] As figuras 11A e 11B mostram as medições dos níveis de mRNA de TTR e proteína no soro, respectivamente, em fígados de primatas não humanos seguindo infusão intravenosa de 15 minutos de LNP09-18328 ou LNP11-18328. A figura 11C mostra o curso de tempo de níveis de proteína no soro TTR durante 28 dias seguindo uma infusão intravenosa de 15 minutos de 0,3 mg/kg de LNP09-18328, conforme comparado com o grupo controle de PBS.

[0035] A figura 12 mostra a sequência de mRNA de TTR (Seq. Ref. NM_000371.3, SEQ ID NO:1331).

[0036] As figuras 13A e 13B são as sequências de mRNA de TTR humano e de rato, respectivamente. A figura 13A é a sequência do mRNA de TTR humano (Seq. Ref. NM_000371.2, SEQ ID NO:1329). A figura 13B é a sequência de mRNA de TTR de rato (Seq. Ref. NM_012681.1, SEQ ID NO:1330).

[0037] A figura 14 mostra o alinhamento de nucleotídeo de

NM_000371.3, NM_000371.2 e AD-18328.

[0038] A figura 15 ilustra sintomas e mutações em TTR associado com neuropatia amiloidótica familiar, cardiomiopatia amiloidótica familiar e amiloidose.

[0039] A figura 16 mostra redução dos níveis de mRNA de TTR em fígado com SNALP-18534 com durações de infusão diferentes. Grupos de animais (n=4/grupo) foram administrados com 1 mg/kg de SNALP-18534 através de uma infusão de 15 minutos ou 1, 2 ou 3 horas. Quarenta e oito horas depois, os ratos foram eutanasiados e os fígados coletados. Níveis de mRNA de TTR e GAPDH foram medidos de lisados de fígado usando o ensaio de bDNA Quantigen. A razão de níveis de mRNA de TTR de GAPDH foi calculada para cada animal. Médias de grupo foram determinadas e normalizadas para um grupo controle de PBS e então postas em gráfico. Barras de erro representam desvios-padrão (**p<0,001, ANOVA One-way com teste post-hoc de Bonferroni, com relação a PBS).

[0040] A figura 17 mostra as medições de níveis de mRNA de TTR em fígados de ratos seguindo infusão intravenosa por 15 minutos de LNP07-18534 ou LNP08-18534.

[0041] A figura 18 mostra inibição in vivo de níveis de mRNA de TTR endógenos em fígados de Ratos Sprague-Dawley seguindo infusão IV de 15 minutos de LNP09-18534 ou LNP11-18534. Grupos de animais (n=4/grupo) foram intravenosamente administrados 0,01, 0,03, 0,1 ou 0,3 mg/kg de LNP09-18534, LNP-11-18534; ou PBS através de uma infusão de 15 minutos. Quarenta e oito horas depois, os animais foram eutanasiados e os fígados coletados. Níveis de mRNA de TTR e GAPDH foram medidos de lisados de biópsia de fígado usando o ensaio de bDNA Quantigene. A razão de níveis de mRNA de TTR para GAPDH foi calculada para cada animal. Médias de grupo foram determinadas, normalizadas para grupo controle de PBS e então postas em gráfico.

Barras de erro representam desvios-padrão.

Descrição Detalhada da Invenção

[0042] A invenção provê dsRNAs e métodos de uso dos dsRNAs para inibição da expressão de um gene de TTR em uma célula ou um mamífero onde o dsRNA se direciona a um gene da TTR. A invenção também provê composições e métodos para tratamento de condições e doenças patológicas, tal como amiloidose de TTR, em um mamífero causadas pela expressão de um gene de TTR. dsRNA direciona a degradação específica de sequência de mRNA através de um processo conhecido como interferência de RNA (RNAi).

[0043] Os dsRNAs das composições apresentadas aqui incluem uma fita de RNA (a fita antissenso) tendo uma região que é de pelo menos 30 nucleotídeos de comprimento, geralmente 19-24 nucleotídeos de comprimento e é substancialmente complementar a pelo menos parte de um transcrito de mRNA de um gene de TTR. O uso desses dsRNAs permite a degradação direcionada de mRNAs de genes que estão implicados em patologias associadas com expressão de TTR em mamíferos. Dosagens muito baixas de dsRNAs de TTR em particular podem especificamente e eficientemente mediar RNAi, resultando em inibição significativa de expressão de um gene de TTR. Usando ensaios baseados em célula, os presentes inventores demonstram que dsRNAs se direcionando a TTR podem especificamente e eficientemente mediar RNAi, resultando em inibição significativa de expressão de um gene de TTR. Desta maneira, métodos e composições incluindo esses dsRNAs são úteis para tratamento de processos patológicos que podem ser mediados por sub-regulagem de TTR, tal como no tratamento de um distúrbio do fígado ou uma amiloidose de TTR, por exemplo, FAP.

[0044] Os métodos e composições contendo um dsRNA de TTR são úteis para tratamento de processo patológicos mediados por

expressão de TTR, tal como amiloidose de TTR. Em uma modalidade, um método de tratamento de um distúrbio mediado pela expressão de TTR inclui administração a um humano com necessidade de tal tratamento de uma quantidade terapeuticamente eficaz de um dsRNA direcionado a TTR. Em uma modalidade, o dsRNA é administrado ao ser humano em cerca de 0,01, 0,1, 0,5, 1,0, 2, 2,5, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 ou 25 mg

[0045] A descrição detalhada que segue descreve como fazer e usar composições contendo dsRNAs para inibir a expressão de um gene de TTR, bem como composições e métodos para tratamento de doenças e distúrbios causados pela expressão deste gene. As composições farmacêuticas apresentadas na presente invenção incluem um dsRNA tendo uma fita antissenso compreendendo uma região de complementaridade que é de menos do que 30 nucleotídeos de comprimento, geralmente 19-24 nucleotídeos de comprimento, e é substancialmente complementar a pelo menos parte de um transcrito de RNA de um gene de TTR, junto com um veículo farmacêuticamente aceitável. As composições mostradas na presente invenção também incluem um dsRNA tendo uma fita antissenso tendo uma região de complementaridade que é de menos do que 30 nucleotídeos de comprimento, geralmente 19-24 nucleotídeos de comprimento e é substancialmente complementar a pelo menos parte de um transcrito de RNA de um gene de TTR.

[0046] A fita de senso de um dsRNA pode incluir 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 ou mais nucleotídeos contíguos de SEQ ID NO:169, SEQ ID NO:449, SEQ ID NO:729 ou SEQ ID NO:1009. A fita antissenso de um dsRNA pode incluir 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 ou mais nucleotídeos contíguos de SEQ ID NO:170, SEQ ID NO:450, SEQ ID NO:730 ou SEQ ID NO:1010. Em uma modalidade, a fita de senso de um dsRNA pode consistir em SEQ ID NO:449 ou um fragmento da mesma e a fita

antissenso pode consistir em SEQ ID NO:450 ou fragmento da mesma. Em uma modalidade, a fita de senso de um dsRNA pode consistir em SEQ ID NO:729 ou fragmentos da mesma e a fita antissenso pode consistir em SEQ ID N:730 ou fragmentos da mesma. Em uma modalidade, a fita de senso de um dsRNA pode consistir em SEQ ID NO:1009 ou fragmentos da mesma e a fita antissenso pode consistir em SEQ ID NO:1010 ou fragmentos da mesma.

[0047] Em uma modalidade, um dsRNA pode incluir pelo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ou mais nucleotídeos modificados. Em uma modalidade, um nucleotídeo modificado pode incluir um nucleotídeo modificado com 2'-O-metila, um nucleotídeo compreendendo um grupo 5'-fosforotioato e/ou um nucleotídeo terminal ligado a um derivado de colesterila ou grupo bisdecilamida do ácido dodecanoico. Em uma modalidade, um nucleotídeo modificado pode incluir um nucleotídeo modificado com 2'-desóxi-2'-fluor, um nucleotídeo modificado com 2'-deso-óxi, um nucleotídeo bloqueado, um nucleotídeo abásico, um nucleotídeo modificado com 2'-amino, um nucleotídeo modificado com 2'-alquila, nucleotídeo de morfolino, um fosforoamidato e/ou uma base não natural compreendendo nucleotídeo.

[0048] Em uma modalidade, a região de complementaridade de um dsRNA é de pelo menos 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 ou mais nucleotídeos de comprimento. Em uma modalidade, a região de complementaridade inclui 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 ou mais nucleotídeos contíguos de SEQ ID NO:169.

[0049] Em uma modalidade, cada fita de dsRNA é de 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 ou mais nucleotídeos de comprimento. Em uma modalidade, o dsRNA inclui uma fita de senso ou fragmento de 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 ou 21 nucleotídeos do mesmo, selecionados das tabelas 3A, 3B, 4, 6A, 6B, 7 16, e uma fita antissenso ou de fragmento 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17,

18, 19, 20 ou 21 nucleotídeos do mesmo, selecionados das tabelas 3A, 3B, 4, 6A, 6B, 7 e 16.

[0050] Em uma modalidade, administração de um dsRNA a uma célula resulta em cerca de 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 90%, 95% ou mais inibição de expressão de mRNA de TTR conforme medido através de ensaio de PCR de tempo real. Em uma modalidade, administração de um dsRNA a uma célula resulta em cerca de 40% a 45%, 45% a 50%, 50% a 55%, 55% a 60%, 60% a 65%, 65% a 70%, 70% a 75%, 75% a 80%, 80% a 85%, 85% a 90%, 90% a 95% ou mais inibição de expressão de mRNA de TTR conforme medido através de ensaio de PCR de tempo real. Em uma modalidade, administração de um dsRNA a uma célula resulta em cerca de 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 90%, 95% ou mais inibição de expressão de mRNA de TTR conforme medido através de um ensaio de DNA ramificado. Em uma modalidade, administração de um dsRNA a uma célula resulta em cerca de 40% a 45%, 45% a 50%, 50% a 55%, 55% a 60%, 60% a 65%, 65% a 70%, 70% a 75%, 75% a 80%, 80% a 85%, 85% a 90%, 90% a 95% ou mais inibição de expressão de mRNA de TTR conforme medido através de um ensaio de DNA ramificado.

[0051] Em uma modalidade, um dsRNA tem uma IC₅₀ de menos do que 0,01pM, 0,1oM, 1pM, 5pM, 10pM, 100pM ou 1000pM. Em uma modalidade, um dsRNA tem uma ED₅₀ de cerca de 0,01, 0,1, 1, 5 ou 10 mg/kg.

[0052] Em uma modalidade, administração de um dsRNA pode reduzir o mRNA de TTR em cerca de 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 90%, 95% ou mais em macacos cinomólogos. Em uma modalidade, administração de um dsRNA reduz os níveis de mRNA de TTR no fígado em cerca de 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 90%, 95% ou mais ou níveis de proteína TTR no soro em

cerca de 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 90%, 95% ou mais. Em uma modalidade, administração de um dsRNA reduz os níveis de mRNA de TTR no fígado e/ou níveis de proteína TTR no soro até 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 ou mais dias.

[0053] Em uma modalidade, um dsRNA é formulado em uma formulação LNP e reduz os níveis de mRNA de TTR em cerca de 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 90%, 95% ou mais em uma dose de 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 ou 1 mg/kg, com relação a um grupo controle de PBC. Em uma modalidade, um dsRNA é formulado em uma formulação LNP e reduz os níveis de proteína TTR em cerca de 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 90%, 95% ou mais com relação a um grupo controle de PBC conforme medido através de um western blot. Em uma modalidade, um dsRNA suprime níveis de proteína TTR no soro até 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 ou 25 dias pós-tratamento quando administrado a um indivíduo com necessidade do mesmo em 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 ou 25 mg/kg.

[0054] Desta maneira, em alguns aspectos, composições farmacêuticas contendo um dsRNA de TTR e um veículo farmaceuticamente aceitável, métodos de uso das composições para inibir expressão de um gene de TTR e métodos de uso das composições farmacêuticas para tratar doenças causadas por expressão de um gene de TTR são descritos na invenção.

I. Definição

[0055] Por questão de conveniência, o significado de certos termos e frases usados no relatório, exemplos e reivindicações apenas é dado abaixo. Se houver uma discrepância aparente entre o uso de um termo em outras partes deste relatório e sua definição provida nesta seção, a

definição nesta seção deve prevalecer.

[0056] "G", "C", "A" e "U" cada um geralmente significa um nucleotídeo que contém guanina, citosina, adenina e uracila como uma base, respectivamente. "T" e "dT" são usados intercomutavelmente aqui e referem-se a um desoxirribonucleotídeo onde a nucleobase é timina, por exemplo, desoxirribotimina. No entanto, será compreendido que o termo "ribonucleotídeo" ou "nucleotídeo" ou "desoxirribonucleotídeo" pode também se referir a um nucleotídeo modificado, como detalhado mais abaixo, ou uma porção de substituição substituta. O versado na técnica tem ciência que guanina, citosina, adenina e uracila podem ser substituídas por outras porções sem alterar substancialmente as propriedades de emparelhamento de base de um oligonucleotídeo compreendendo um nucleotídeo carregando tal porção de substituição. Por exemplo, sem limitação, um nucleotídeo compreendendo inosina como sua base pode emparelhar em par de base com nucleotídeos contendo adenina, citosina ou uracila. Aqui, nucleotídeos contendo uracila, guanina ou adenina podem ser substituídos nas sequências de nucleotídeo da invenção por um nucleotídeo contendo, por exemplo, inosina. Sequências compreendendo tais porções de substituição são modalidades da invenção.

[0057] Conforme aqui usado, "transtirretina" ("TTR") refere-se a um gene em uma célula. TTR é também conhecida como ATTR, HsT2651, PALB, pré-albumina, TBPA e transtirretina (prealbumina, amiloidose tipo I). A sequência de um transcrito de mRNA de TTR humano pode ser encontrada em NM_000371. A sequência de mRNA de TTR de camundongo pode ser encontrada em NM_013697.2 e a sequência de mRNA de TTR de rato pode ser encontrada na NM_012681.1.

[0058] Conforme aqui usado, "sequência-alvo" refere-se a uma porção contígua da sequência de nucleotídeo de uma molécula de mRNA formada durante a transcrição de um gene de TTR, incluindo

mRNA que é um produto de processamento de um produto de transcrição primário.

[0059] Conforme aqui usado, o termo "fita compreendendo uma sequência" refere-se a um oligonucleotídeo compreendendo uma cadeia de nucleotídeos que é descrita pela sequência referida usando a nomenclatura de nucleotídeo padrão.

[0060] Conforme aqui usado, e a menos que de outro modo indicado, o termo "complementar", quando usado para descrever uma primeira sequência de nucleotídeo em relação a uma segunda sequência de nucleotídeo, refere-se à habilidade de um oligonucleotídeo ou polinucleotídeo compreendendo a primeira sequência de nucleotídeo em hibridizar e formar uma estrutura dúplex sob certas condições com um oligonucleotídeo ou polinucleotídeo compreendendo a segunda sequência de nucleotídeo, como será compreendido pelo versado na técnica. Tais condições podem, por exemplo, ser condições adstringentes, onde condições adstringentes podem incluir: NaCl 400 mM, PIPES 40 mM pH 6,4, EDTA 1 mM, 50°C ou 70°C por 12-16 horas seguido por lavagem. Outras condições, tais como condições fisiologicamente relevantes como pode ser encontrado dentro de um organismo, podem encontrar aplicação. O versado na técnica será capaz de determinar o conjunto de condições mais apropriado para um teste de complementaridade de duas sequências de acordo com a aplicação final dos nucleotídeos hibridizados.

[0061] Isto inclui emparelhamento de base do oligonucleotídeo ou polinucleotídeo compreendendo a primeira sequência de nucleotídeo com o oligonucleotídeo ou polinucleotídeo compreendendo a segunda sequência de nucleotídeo em todo o comprimento das primeira e segunda sequências de nucleotídeo. Tais sequências podem ser referidas como "integralmente complementares" uma com relação à outra. No entanto, onde uma primeira sequência for referida como

"substancialmente complementar" com relação a uma segunda sequência aqui, as duas sequências podem ser integralmente complementares, ou elas podem formar um ou mais, mas geralmente não mais do que 4, 3 ou 2, pares de base sem combinação quando da hibridização, enquanto retendo a habilidade em hibridizar sob as condições mais relevantes para sua aplicação final. No entanto, onde dois oligonucleotídeos forem projetados para formar, quando da hibridização, uma ou mais sobreposições de fita simples, tais sobreposições não devem ser consideradas sem combinação com relação à determinação de complementaridade. Por exemplo, um dsRNA compreendendo um oligonucleotídeo de 21 nucleotídeos de comprimento e outro oligonucleotídeo de 23 nucleotídeos de comprimento, onde o oligonucleotídeo mais longo compreende uma sequência de 21 nucleotídeos que é integralmente complementar ao oligonucleotídeo mais curto, pode ser ainda referido como "integralmente complementar" para os propósitos descritos aqui.

[0062] Sequências "complementares" conforme aqui usado podem também incluir, ou serem formadas totalmente de pares de base não Watson-Crick e/ou pares de base formados de nucleotídeos não naturais e modificados, contanto que as necessidades acima com relação à sua habilidade em hibridizar sejam satisfeitas. Tais pares de base não Watson-Crick incluem, mas não estão limitados a, emparelhamento de base G:U ou Hoogstein.

[0063] Os termos "complementar", "integralmente complementar" e "substancialmente complementar" podem ser usados com relação à combinação de base entre a fita de senso e a fita antissenso de um dsRNA ou entre a fita antissenso de um dsRNA e uma sequência-alvo, como será compreendido a partir do contexto de seu uso.

[0064] Conforme aqui usado, um polinucleotídeo que é "substancialmente complementar a pelo menos parte de" um RNA

mensageiro (mRNA) refere-se a um polinucleotídeo que é substancialmente complementar a uma porção contígua do mRNA de interesse (por exemplo, um mRNA codificando TTR) incluindo uma 5'UTR, uma estrutura de leitura aberta (ORF) ou uma 3'UTR. Por exemplo, um polinucleotídeo é complementar a pelo menos uma parte de um mRNA de TTR se a sequência for substancialmente complementar a uma porção não interrompida de um mRNA codificando TTR.

[0065] O termo "RNA de fita dupla" ou "dsRNA", conforme aqui usado, refere-se a um complexo de moléculas de ácido ribonucleico tendo uma estrutura de dúplex compreendendo duas fitas de ácido nucleico antiparalelas e substancialmente complementares, conforme acima definido. Em geral, a maioria dos nucleotídeos de cada fita são ribonucleotídeos, mas conforme descrito em detalhes aqui, cada uma ou ambas as fitas podem também incluir pelo menos um não ribonucleotídeo, por exemplo, um desoxirribonucleotídeo e/ou um nucleotídeo modificado. Ainda, conforme usado no presente relatório, "dsRNA" pode incluir modificações químicas para ribonucleotídeos, incluindo modificações substanciais em nucleotídeos múltiplos e incluindo todos os tipos de modificações revelados aqui ou conhecidos na técnica. Quaisquer tais modificações, conforme usado na molécula tipo siRNA, são compreendidas por "dsRNA" para os propósitos deste relatório e reivindicações.

[0066] As duas fitas formando a estrutura de dúplex podem ser porções diferentes de uma molécula de RNA maior ou eles podem ser moléculas de RNA separadas. Onde as duas fitas são parte de uma molécula maior, e então estão conectados por uma cadeia não interrompida de nucleotídeos entre a extremidade 3'de uma fita e a extremidade 5' da respectiva outra fita formando a estrutura de dúplex, a cadeia de RNA de conexão é referida como uma "alça grampo de cabelo". Onde as duas fitas são conectadas covalentemente por meio

de outra que não uma cadeia não interrompida de nucleotídeos entre a extremidade 3' de uma fita e a extremidade 5' da respectiva outra fita formando a estrutura de dúplex, a estrutura de conexão é referida como um "ligante". As fitas de RNA podem ter o mesmo número ou um número diferente de nucleotídeos. O número máximo de pares de base é o número de nucleotídeos na fita mais curta do dsRNA menos quaisquer sobreposições que estejam presentes no dúplex. Em adição à estrutura de dúplex, um dsRNA pode compreender uma ou mais sobreposições de nucleotídeo. O termo "siRNA" é também usado aqui para se referir a um dsRNA conforme acima descrito.

[0067] Conforme aqui usado, uma "sobreposição de nucleotídeo" refere-se a um nucleotídeo ou nucleotídeos que protrudem a partir da estrutura de dúplex de um dsRNA quando uma extremidade 3' de uma fita do dsRNA se estende além da extremidade 5' da outra fita ou vice-versa. "Cega" ou "extremidade cega" significa que não há quaisquer nucleotídeos não emparelhados na extremidade do dsRNA, isto é, nenhuma sobreposição de nucleotídeo. Um dsRNA de "extremidade cega" é um dsRNA que é de fita dupla em todo o seu comprimento, isto é, nenhuma sobreposição de nucleotídeo em nenhuma extremidade da molécula.

[0068] O termo "fita antissenso" refere-se à fita de um dsRNA que inclui uma região que é substancialmente complementar a uma sequência-alvo. Conforme aqui usado, o termo "região de complementaridade" refere-se à região da fita antissenso que é substancialmente complementar a uma sequência, por exemplo, uma sequência-alvo, conforme aqui definido. Onde a região de complementaridade não for totalmente complementar à sequência-alvo, as faltas de combinação são mais toleradas nas regiões terminais e, se presentes, estão geralmente em região ou regiões terminais, por exemplo, dentro de 6, 5, 4, 3 ou 2 nucleotídeos do terminal 5' e/ou 3'.

[0069] O termo "fita de senso", conforme aqui usado, refere-se à fita de um dsRNA que inclui uma região que é substancialmente complementar a uma região da fita antissenso.

[0070] Conforme aqui usado, o termo "SNALP" refere-se a uma partícula de ácido nucleico-lipídeo estável. Uma SNALP representa uma vesícula de lipídeos revestindo um interior aquoso reduzido compreendendo um ácido nucleico tal como um dsRNA ou um plasmídeo a partir do qual um dsRNA é transcrito. SNALP são descritos, por exemplo, nas Publicações de Pedido de Patente U.S. Nos 20060240093, 20070135372 e USSN 61/045.228 depositada em 15 de abril de 2008. Esses pedidos são aqui incorporados a título de referência.

[0071] "Introdução em uma célula", quando se referindo a um dsRNA, significa facilitação de percepção ou absorção na célula, como é compreendido por aqueles versados na técnica. Absorção ou percepção de dsRNA pode acontecer através de processos celulares difusivos ou ativos ou através de agentes ou dispositivos auxiliares. O significado deste termo não é limitado a células *in vitro*; um dsRNA pode ser também "introduzido em uma célula", onde a célula é parte de um organismo vivo. Em tal caso, introdução na célula vai incluir a administração no organismo. Por exemplo, para administração *in vivo*, dsRNA pode ser injetado em um sítio de tecido ou administrado sistemicamente. Introdução *in vitro* em uma célula inclui métodos conhecidos na técnica tais como eletroporação e lipofecção. Abordagens adicionais são descritas aqui ou conhecidas na técnica.

[0072] Os termos "silêncio", "inibir a expressão de", "sub-regular a expressão de", "suprimir a expressão de" e similares, contanto que eles façam referência a um gene de TTR, referem-se à supressão pelo menos parcial da expressão de um gene de TTR, conforme manifestado por uma redução da quantidade de mRNA que pode ser isolada de uma

primeira célula ou grupo de células onde um gene de TTR é transcrito e que foi ou foram tratados de maneira que a expressão de um gene de TTR é inibida comparado com uma segunda célula ou grupo de células substancialmente idênticas à primeira célula ou grupo de células mas que não foi ou foram tratados (células controle). O grau de inibição é geralmente expresso em termos de

$$\frac{(\text{mRNA in control cells}) - (\text{mRNA in treated cells})}{(\text{mRNA em células controle}) - (\text{mRNA em células tratadas})} \bullet 100 \%$$

[0073] Alternativamente, o grau de inibição pode ser dado em termos de uma redução de um parâmetro que é funcionalmente ligado à expressão do gene de TTR, por exemplo, a quantidade de proteína codificada por um gene de TTR que é secretada por uma célula, ou o número de células mostrando um certo fenótipo, por exemplo, apoptose. A princípio, silenciamento de gene de TTR pode ser determinado em qualquer célula expressando o alvo, ou constitutivamente ou através de engenharia genômica, e através de qualquer ensaio apropriado. No entanto, quando uma referência é necessária a fim de determinar se um dado dsRNA inibe a expressão de um gene de TTR a um certo grau e então é compreendido pela presente invenção, os ensaios providos nos exemplos abaixo devem servir como tal referência.

[0074] Por exemplo, em certos casos, expressão de um gene de TTR é suprimida em pelo menos 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45% ou 50% através da administração do oligonucleotídeo de fita dupla descrito na invenção. Em algumas modalidades, um gene de TTR é suprimido em pelo menos cerca de 60%, 70% ou 80% através da administração do oligonucleotídeo de fita dupla descrito na invenção. Em algumas modalidades, um gene de TTR é suprimido em pelo menos cerca de 85%, 90% ou 95% através da administração do oligonucleotídeo de fita dupla descrito na invenção.

[0075] Conforme aqui usado, no contexto de expressão de TTR, os

termos "tratar", "tratamento" e similar referem-se ao alívio de processos patológicos mediados pela expressão de TTR. No contexto da presente invenção, contanto que faça referência a qualquer uma das outras condições mencionadas abaixo (outros que não processos patológicos mediados pela expressão de TTR), os termos "tratar", "tratamento" e similares significam aliviar pelo menos um sintoma associado com tal condição, ou deixar mais lenta ou reverter a progressão de tal condição, tal como deixar mais lenta a progressão de uma amiloidose de TTR, tal como FAP. Sintomas de amiloidose de TTR incluem neuropatia sensorial (por exemplo, parestesia, hipestesia em membros distais), neuropatia autônoma (por exemplo, disfunção gastrointestinal, tal como úlcera gástrica ou hipotensão ortostática), neuropatia motora, ataques, demência, mielopatia, polineuropatia, síndrome do túnel carpal, insuficiência autônoma, cardiomiopatia, opacidades vítreas, insuficiência renal, nefropatia, mBMI (Índice de Massa Corporal modificado) substancialmente reduzido, disfunção do nervo craniano ou distrofia do látice da córnea.

[0076] Conforme aqui usado, as expressões "quantidade terapeuticamente eficaz" e "quantidade profilaticamente eficaz" referem-se a uma quantidade que provê um benefício terapêutico no tratamento, prevenção ou cuidado de processos patológicos mediados pela expressão de TTR ou um sintoma visível de processos patológicos mediados pela expressão de TTR. A quantidade típica que é terapeuticamente eficaz pode ser prontamente determinada por um praticamente médico comum e pode variar dependendo de fatores conhecidos na técnica tais como, por exemplo, o tipo de processos patológicos mediados por expressão de TTR, a história e a idade do paciente, o estágio dos processos patológicos mediados pela expressão de TTR e a administração de outros processos antipatológicos mediados por agentes de expressão de TTR.

[0077] Conforme aqui usado, uma "composição farmacêutica" compreende uma quantidade farmacologicamente eficaz de um dsRNA e um veículo farmaceuticamente aceitável. Conforme aqui usado, "quantidade farmacologicamente eficaz", "quantidade terapeuticamente eficaz" ou simplesmente "quantidade eficaz" refere-se àquela quantidade de um RNA eficaz para produzir o resultado farmacológico, terapêutico ou preventivo pretendido. Por exemplo, se um dado tratamento clínico for considerado eficaz quando há pelo menos 25% de redução em um parâmetro mensurável associado com uma doença ou distúrbio, uma quantidade terapeuticamente eficaz de um fármaco para o tratamento desta doença ou distúrbio é a quantidade necessária para realizar pelo menos 25% de redução neste parâmetro. Por exemplo, uma quantidade terapeuticamente eficaz de um dsRNA se direcionando a TTR pode reduzir os níveis de TTR no soro em pelo menos 25%. Em outro exemplo, uma quantidade terapeuticamente eficaz de um dsRNA se direcionando a TTR pode melhorar a função do fígado ou função renal em pelo menos 25%.

[0078] O termo "veículo farmaceuticamente aceitável" refere-se a um veículo para administração de um agente terapêutico. Tais veículos incluem, mas não estão limitados a solução salina, solução salina tamponada, dextrose, água, glicerol, etanol e combinações dos mesmos. O termo exclui especificamente meio de cultura celular. Para fármacos administrados oralmente, veículos farmaceuticamente aceitáveis incluem, mas não estão limitados a excipientes farmaceuticamente aceitáveis tais como diluentes inertes, agentes de desintegração, agentes de ligação, agentes lubrificantes, agentes adoçantes, agentes saborizantes, agentes de coloração e conservantes. Diluentes inertes adequados incluem carbonato de sódio e cálcio, fosfato de sódio e cálcio e lactose, enquanto amido de milho e ácido algínico são agentes de desintegração adequados. Agentes de

ligação podem incluir amido e gelatina, enquanto o agente de lubrificação, se presente, será geralmente estearato de magnésio, ácido esteárico ou talco. Se desejado, os comprimidos podem ser revestidos com um material tal como gliceril monoestearato ou gliceril diestearato, para retardar a absorção no trato gastrointestinal.

[0079] Conforme aqui usado, uma "célula transformada" é uma célula na qual um vetor foi introduzido a partir do qual uma molécula de dsRNA pode ser expressa.

II. Ácido ribonucleico de fita dupla (dsRNA)

[0080] Conforme descrito em mais detalhes aqui, a invenção provê moléculas de ácido ribonucleico de fita duplo (dsRNA) para inibição da expressão de um gene de TTR em uma célula ou mamífero, por exemplo, em um humano tendo uma amiloidose de TTR, onde o dsRNA inclui uma fita antissenso tendo uma região de complementaridade que é complementar a pelo menos uma parte de um mRNA formado na expressão de um gene de TTR, e onde a região de complementaridade é de menos do que 30 nucleotídeos de comprimento, geralmente 19-24 nucleotídeos de comprimento e onde o dito dsRNA, quando do contato com uma célula expressando o dito gene de TTR, inibe a expressão do dito gene de TTR em pelo menos 30% conforme ensaiado através de, por exemplo, um método baseado em PCR ou DNA ramificado (bDNA) ou através de um método baseado em proteína, tal como através de Western blot. Expressão de um gene de TTR pode ser reduzida em pelo menos 30% quando medido através de um ensaio conforme descrito nos exemplos abaixo. Por exemplo, expressão de um gene de TTR em cultura celular, tal como em células Hep3B, pode ser ensaiada através da medição dos níveis de mRNA de TTR, tal como através de ensaio de bDNA ou TaqMan, ou através da medição dos níveis de proteína, tal como através de ensaio ELISA. O dsRNA da invenção pode incluir ainda uma ou mais sobreposições de nucleotídeo de fita simples.

[0081] O dsRNA pode ser sintetizado através de métodos-padrão conhecidos na técnica conforme discutido adicionalmente abaixo, por exemplo, através do uso de um sintetizador de DNA automático, tais como comercialmente disponíveis da, por exemplo, Bioserch, Applied Biosystems, Inc. O dsRNA inclui duas fitas de RNA que são suficientemente complementares para hibridizar para formar uma estrutura de dúplex. Uma fita do dsRNA (a fita antissenso) inclui uma região de complementaridade que é substancialmente complementar, e geralmente totalmente complementar, a uma sequência-alvo, derivada da sequência de um mRNA formado durante a expressão de um gene de TTR, a outra fita (a fita de senso) inclui uma região que é complementar à fita antissenso, de maneira que as duas fitas hibridizam e formam uma estrutura de dúplex quando combinados sob condições adequadas. Em geral, a estrutura de dúplex está entre 15 e 30 ou entre 25 e 30 ou entre 18 e 25 ou entre 19 e 24 ou entre 19 e 21 ou 19, 20 ou 21 pares de base de comprimento. Em uma modalidade, o dúplex é de 19 pares de base de comprimento. Em outra modalidade, o dúplex é de 21 pares de base de comprimento. Quando dois siRNAs diferentes são usados em combinação, os comprimentos do dúplex podem ser idênticos ou podem diferir.

[0082] Cada fita do dsRNA da invenção é geralmente entre 15 e 30 ou entre 18 e 25 ou 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 ou 25 nucleotídeos de comprimento. Em outras modalidades, cada fita é de 25-30 nucleotídeos de comprimento. Cada fita do dúplex pode ser do mesmo comprimento ou de comprimentos diferentes. Quando dois siRNAs diferentes são usados em combinação, os comprimentos de cada fita de cada siRNA podem ser idênticos ou diferentes.

[0083] O dsRNA da invenção pode incluir uma ou mais sobreposições de fita simples de um ou mais nucleotídeos. Em uma modalidade, pelo menos uma extremidade do dsRNA tem uma

sobreposição de nucleotídeo de fita simples de 1 a 4, geralmente 1 ou 2 nucleotídeos. Em outra modalidade, a fita antissenso do dsRNA tem 1-10 sobreposições de nucleotídeo cada uma na extremidade 3' e na extremidade 5' na fita de senso. Em modalidades adicionais, a fita de senso do dsRNA tem sobreposições de 1-10 nucleotídeos na extremidade 3' e na extremidade 5' na fita antissenso.

[0084] Um dsRNA tendo pelo menos uma sobreposição de oligonucleotídeo pode ter propriedades inibidoras inesperadamente superiores a contraparte de extremidade cega. Em algumas modalidades, a presença de apenas uma sobreposição de nucleotídeo reforça a atividade de interferência do dsRNA, sem afetar sua estabilidade geral. Um dsRNA tendo apenas uma sobreposição provou ser particularmente estável e eficaz *in vivo*, bem como em uma variedade de células, meios de cultura, sangue e soro. Em geral, a sobreposição de fita simples está localizada na extremidade terminal 3' da fita antissenso ou, alternativamente, na extremidade terminal 3' da fita de senso. O dsRNA pode ter também uma extremidade cega, geralmente localizada na extremidade 5' da fita antissenso. Tais dsRNAs podem ter estabilidade e atividade inibidora aperfeiçoadas, desta maneira permitindo administração em doses baixas, isto é, menos do que 5 mg/g de peso do corpo do recipiente por dia. Em geral, a fita antissenso do dsRNA tem uma sobreposição de nucleotídeo na extremidade 3' e a extremidade 5' é cega. Em outra modalidade, um ou mais dos nucleotídeos na sobreposição são substituídos com um nucleosídeo tiofosfato.

[0085] Em uma modalidade, um gene de TTR é um gene de TTR humano. Em modalidades específicas, a fita de senso do dsRNA é uma das sequências de senso da tabela 3A, 3B, 4, 6A, 6B ou 7 e a fita antissenso é uma das sequências antissenso da tabela 3A, 3B, 4, 6A, 6B ou 7. Agentes antissenso alternativos que se direcionam a qualquer

local na sequência-alvo provida na tabela 3A, 3b, 4, 6A ou 7 podem ser prontamente determinados usando a sequência-alvo e a sequência de TTR de flanqueamento.

[0086] O versado na técnica sabe que os dsRNAs tendo uma estrutura de dúplex entre 20 e 23, mais especificamente 21, pares de base foram tidos como particularmente eficazes na indução de interferência de RNA (Elbashir e outros, *EMBO* 2001, 20:6877-6888). No entanto, outros constataram que dsRNAs mais curtos ou mais longos podem ser eficazes também. Nas modalidades descritas acima, em virtude da natureza das sequências de oligonucleotídeo providas nas tabelas 3A, 3B, 4, 6A, 6B e 7, os dsRNAs descritos na invenção podem incluir pelo menos uma fita de um comprimento descrito aqui. Pode ser razoavelmente esperado que dsRNAs mais curtos tendo uma das sequências da tabela 3A, 3B, 4, 6A, 6B ou 7 menos apenas alguns nucleotídeos em uma ou ambas as extremidades possam ser similarmente eficazes comparado com dsRNAs descritos acima. Desta maneira, dsRNAs tendo uma sequência parcial de pelo menos 15, 16, 17, 18, 19, 20 ou mais nucleotídeos contíguos de uma das sequências da tabela 3, 4, 6 ou 7, e diferindo em sua habilidade em inibir a expressão de um gene de TTR em um ensaio conforme descrito aqui abaixo em não mais do que 5, 10, 15, 20, 25 ou 30% de inibição de um dsRNA compreendendo a sequência inteira, são compreendidos pela invenção. dsRNAs adicionais que clivam dentro de uma sequência-alvo de TTR desejada podem ser prontamente feitos usando a sequência antissenso de TTR correspondente e uma sequência de senso complementar.

[0087] Ainda, os dsRNAs providos na tabela 3A, 3B, 4, 6A, 6B ou 7 identificam um sítio em uma TTR que é suscetível à clivagem baseada em RNAi. Desta maneira, a presente invenção descreve ainda dsRNAs que se direcionam dentro da sequência direcionada por um dos agentes

da presente invenção. Conforme aqui usado, um segundo dsRNA é dito se direcionar dentro da sequência de um primeiro dsRNA se o segundo dsRNA cliva a mensagem em qualquer lugar dentro do mRNA que é complementar à fita antissenso do primeiro dsRNA. Tal segundo dsRNA vai geralmente consistir em pelo menos 15 nucleotídeos contíguos de uma das sequências providas na tabela 3A, 3b, 4, 6A, 6B ou 7 acoplados a sequências de nucleotídeo adicionais obtidas da região contígua à sequência selecionada em um gene de TTR.

[0088] O dsRNA descrito na invenção pode conter uma ou mais faltas de combinação com a sequência-alvo. Em uma modalidade, o dsRNA descrito na invenção não contém mais do que 3 faltas de combinação. Se a fita antissenso do dsRNA contiver faltas de combinação com a sequência-alvo, é preferível que a área de falta de combinação não esteja localizada no centro da região de complementaridade. Se a fita antissenso do dsRNA contiver faltas de combinação com a sequência-alvo, é preferível que a falta de combinação seja restrita a 5 nucleotídeos de qualquer extremidade, por exemplo, 5, 4, 3, 2 ou 1 nucleotídeos da extremidade 5' ou 3' da região de complementaridade. Por exemplo, para uma fita de dsRNA de 23 nucleotídeos que é complementar a uma região de um gene de TTR, o dsRNA geralmente não contém qualquer falta de combinação dentro dos 13 nucleotídeos centrais. Os métodos descritos na invenção podem ser usados para determinar se um dsRNA contendo uma falta de combinação com uma sequência-alvo é eficaz na inibição da expressão de um gene de TTR. Consideração da eficácia de dsRNAs com faltas de combinação na inibição da expressão de um gene de TTR é importante, especialmente se a região particular de complementaridade com um gene de TTR for conhecida ter variação de sequência polimórfica dentro da população.

Modificações

[0089] Em ainda outra modalidade, o dsRNA é quimicamente modificado para aumentar a estabilidade. Os ácidos nucleicos descritos na invenção podem ser sintetizados e/ou modificados através de métodos bem estabelecidos na técnica, tais como aqueles descritos em "Current protocols in nucleic acid chemistry", Beaucage, S.L. e outros (Eds.), John Wiley & Sons, Inc., Nova York, NY, USA, que é aqui incorporado a título de referência. Exemplos específicos de compostos de dsRNA úteis na presente invenção incluem dsRNAs contendo estruturas principais modificadas ou ligações não nucleotídeo naturais. Conforme definido no presente pedido, dsRNA tendo estruturas principais modificadas incluem aqueles que retêm um átomo de fósforo na estrutura principal e aqueles que não têm um átomo de fósforo na estrutura principal. Para os propósitos do presente pedido, e como algumas vezes referido na técnica, dsRNAs modificados que não têm um átomo de fósforo em sua estrutura principal internucleosídeo podem também ser considerados ser oligonucleosídeos.

[0090] Estruturas principais de dsRNA modificadas incluem, por exemplo, fosforotioatos, fosforotioatos quirais, fosforoditioatos, fosforotriésteres, aminoalquilfosforotriésteres, metila e outros alquil fosforonatos incluindo 3'-alquilenos fosfonatos e fosfonatos quirais, fosfinatos, fosforamidatos incluindo 3'-amino fosforamidato e aminoalquilfosforamidatos, tionofosforamidatos, tionoalquilfosfonatos, tionoalquilfosforotriésteres e boranofosfatos tendo ligações 3'-5' normais, análogos ligados 2'-5' desses, e aqueles) tendo polaridade invertida onde os pares adjacentes de unidades nucleosídeo são ligados 3'-5' a 5'-3' ou 2'-5' a 5'-2'. Várias formas de sais, sais mistos e ácido livre são também incluídas.

[0091] Patentes U.S. representativas que ensinam a preparação das ligações contendo fósforo acima incluem, mas não estão limitadas a, Patentes U.S. N^{os} 3.687.808; 4.469.863; 4.476.301; 5.023.243;

5.177.195; 5.188.897; 5.264.423; 5.276.019; 5.278.302; 5.286.717; 5.321.131; 5.399.676; 5.405.939; 5.453.496; 5.455.233; 5.466.677; 5.476.925; 5.519.126; 5.536.821; 5.541.316; 5.550.111; 5.563.253; 5.571.799; 5.587.361; e 5.625.050, cada uma aqui incorporada a título de referência.

[0092] Estruturas principais de dsRNA modificadas que não incluem um átomo de fósforo nelas têm estruturas principais que são formadas por ligações internucleosídeo alquila ou cicloalquila de cadeia curta, heteroátomos mistos e ligações internucleosídeo alquila ou cicloalquila, ou uma ou mais ligações internucleosídeo heteroatômicas ou heterocíclicas de cadeia curta. Essas incluem aquelas tendo ligações morfolino (formadas em parte da porção açúcar de um nucleosídeo); estrutura principal de siloxana; estruturas principais de sulfeto, sulfóxido e sulfona; estruturas principais de formacetila e tioformacetila; estruturas principais de metileno formacetila e tioformacetila; estruturas principais contendo alceno; estruturas principais de sulfamato; estruturas principais de metilenoimino e metileno-hidrazino; estruturas principais de sulfonato e sulfonamida; estruturas principais de amida; e outras tendo partes componentes de N, O, S e CH₂ misturadas.

[0093] Patentes U.S. representativas que ensinam a preparação dos oligonucleosídeos acima incluem, mas não estão limitadas a Patentes U.S. N^{os} 5.034.506; 5.166.315; 5.185.444; 5.214.134; 5.216.141; 5.235.033; 5.64.562; 5.264.564; 5.405.938; 5.434.257; 5.466.677; 5.470.967; 5.489.677; 5.541.307; 5.561.225; 5.596.086; 5.602.240; 5.608.046; 5.610.289; 5.618.704; 5.623.070; 5.663.312; 5.633.360; 5.677.437; e 5.677.439, cada uma delas é aqui incorporada a título de referência.

[0094] Em outros miméticos de dsRNA adequados, ambas as ligações açúcar e internucleosídeo, isto é, a estrutura principal, das unidades nucleotídeo são substituídas com grupos novos. As unidades

de base são mantidas para hibridização com um composto-alvo de ácido nucleico apropriado. Tal composto oligomérico, um mimético de dsRNA que foi mostrado ter excelentes propriedades de hibridização, é referido como um ácido nucleico de peptídeo (PNA). Em compostos PNA, a estrutura principal de açúcar de um dsRNA é substituída com uma estrutura principal de amida, em particular uma estrutura principal de aminoetilglicina. As nucleobases são retidas e são ligadas diretamente ou indiretamente a átomos de aza nitrogênio da porção amida da estrutura principal. Patentes U.S. representativas que ensinam a preparação de compostos PNA incluem, mas não estão limitadas a Patentes U.S. N^{os} 5.539.082; 5.714.331; e 5.719.262, cada uma delas aqui incorporada a título de referência. Ensino adicional de compostos PNA podem ser encontrados em Nielsen e outros, *Science*, 1991, 254, 1497-1500.

[0095] Outras modalidades da invenção são dsRNAs com estruturas principais de fosforotioato e oligonucleosídeos com estruturas principais de heteroátomo, e em particular --CH₂--NH--CH₂--, --CH₂--N(CH₃)--O--CH₂--[conhecido como uma estrutura principal de metileno (metilimino) ou MMI], --CH₂--O--N(CH₃)--CH₂--, --CH₂--N(CH₃)--N(CH₃)--CH₂-- e --N(CH₃)--CH₂--CH₂--[onde a estrutura principal fosfodiéster nativa é representada como --O--P--O--CH₂--] da Patente U.S. N^o 5.489.677 acima referida e as estruturas principais de amida da Patente U.S. N^o 5.602.240 acima referida. Também são preferidos dsRNAs tendo estruturas principais de morfolino da patente U.S. N^o 5.034.506 acima mencionada.

[0096] dsRNAs modificados podem também conter uma ou mais porções de açúcar substituídas. dsRNAs preferidos compreendem um dos que seguem na posição 2': OH; F; O-; S- ou N-alquila; O-, S- ou N-alquenila; O-, S- ou N-alquinila; ou O-alquil-O-alquila, onde a alquila, alquenila e a alquinila podem ser C₁ a C₁₀ alquila ou C₂ a C₁₀ alquenila

e alquinila substituídas ou não substituídas. Particularmente preferidos são $O[(CH_2)_nO]_mCH_3$, $O(CH_2)_nOCH_3$, $O(CH_2)_nNH_2$, $O(CH_2)_nCH_3$, $O(CH_2)_nONH_2$ e $O(CH_2)_nON[(CH_2)_nCH_3]_2$, onde n e m são de 1 a cerca de 10. Outros dsRNAs preferidos compreendem um dos que seguem na posição 2': C_1 a C_{10} alquila inferior, alquila inferior substituída, alcarila, aralquila, O-alcarila ou O-aralquila, SH, SCH₃, OCN, Cl, Br, CN, CF₃, OCF₃, SOCH₃, SO₂CH₃, ONO₂, NO₂, N₃, NH₂, heterocicloalquila, heterocicloalcarila, aminoalquilamino, polialquilamino, silila substituída, um grupo de clivagem de RNA, um grupo repórter, um intercalador, um grupo para aperfeiçoamento das propriedades farmacocinéticas de um dsRNA ou um grupo para aperfeiçoamento das propriedades farmacodinâmicas de um dsRNA, e outros substituintes tendo propriedades similares. Uma modificação preferida inclui 2'-metoxietóxi (2'-O--CH₂CH₂OCH₃, também conhecido como 2'-O-(2-metoxietila) ou 2'-MOE (Martin e outros, *Helv. Chim. Acta*, 1995, 78, 486-504), isto é, um grupo alcóxi-alcóxi. Uma modificação preferida adicional inclui 2'-dimetilamino-oxietóxi, isto é, um grupo $O(CH_2)_2ON(CH_3)_2$, também conhecido como 2'-DMAOE, conforme descrito nos exemplos abaixo, e 2'-dimetilaminoetoxietóxi (também conhecido na técnica como 2'-O-dimetilaminoetoxietila ou 2'-DMAEOE), isto é 2'-O--CH₂--O-CH₂--N(CH₂)₂, também descrita nos exemplos abaixo.

[0097] Outras modificações preferidas incluem 2'-metóxi (2'-OCH₃), 2'-aminopropóxi (2'-OCH₂CH₂CH₂NH₂) e 2'-fluor (2'-F). Modificações similares podem ser também feitas em outras posições no dsRNA, particularmente na posição 3' do açúcar no nucleotídeo 3' terminal ou em dsRNAs ligados 2'-5' e na posição 5' do nucleotídeo 5' terminal. DsRNAs podem também ter miméticos de açúcar tais como porções ciclobutila no lugar de açúcar pentofuranosila. Patentes U.S. representativas que ensinam a preparação de tais estruturas de açúcar modificadas incluem, mas não estão limitadas a 4.981.957; 5.118.800;

5.319.080; 5.359.044; 5.393.878; 5.446.137; 5.466.786; 5.514.785; 5.519.134; 5.567.811; 5.576.427; 5.591.722; 5.597.909; 5.610.300; 5.627.053; 5.639.873; 5.646.265; 5.658.873; 5.670.633; e 5.700.920 certas dessas patentes são de propriedade comum com o presente pedido, e cada uma delas é aqui incorporada a título de referência em sua totalidade.

[0098] dsRNAs podem também incluir modificações ou substituições de nucleobase (frequentemente referida na técnica simplesmente como "base"). Conforme aqui usado, nucleobases "não modificadas" ou "naturais" incluem as bases purina adenina (A) e guanina (G) e as bases pirimidina timina (T), citosina (C) e uracila (U). Nucleobases modificadas incluem outras nucleobase sintéticas e naturais tais como 5-metilcitosina (5-me-C), 5-hidroximetil citosina, xantina, hipoxantina, 2-aminoadenina, 6-metila e outros derivados alquila de adenina e guanina, 2-propila e outros derivados alquila de adenina e guanina, 2-tiouracila, 2-tiotimina e 2-tiocitosina, 5-halouracila e citosina, 5-propinil uracila e citosina, 6-azo uracila, citosina e timina, 5-uracila (pseudouracila), 4-tiouracila, 8-halo, 8-amino, 8-tiol, 8-tioalquila, 8-hidroxila e outras adeninas e guaninas 8-substituídas e guaninas, 5-halo, particularmente 5-bromo- 5-triflurometila e outras uracilas e citosinas substituídas, 7-metilguanina e 7-metiladenina, 8-azáguanina e 8-azaadenina, 7-desazáguanina e 7-dasazadenina e 3-desazáguanina e 3-desazaadenina. Nucleobases incluem ainda aquelas descritas na Patente U.S Nº 3.687.808, aquelas descritas na *Concise Encyclopedia of Polymer Science and Engineering*, páginas 858-859, Kroschwitz, J.L., ed. John Wiley & Sons, 1990, aquelas descritas por Englisch e outros, *Angewandte Chemie*, International Edition, 1991, 20, 613 e aquelas descritas por Sanghvi, Y.S., capítulo 15, *dsRNA Research and Applications*, páginas 289-302, Crooke, S. T. e Lebleu, B., Ed., CRC Press, 1993. Certas dessas nucleobase são

particularmente úteis para aumento da afinidade de ligação dos compostos oligoméricos descritos na invenção. Essas incluem pirimidinas 5-substituídas, 6-azapirimidinas e N-2, N-6 e 0-6 purinas substituídas, incluindo 2-aminopropiladenina, 5-propiniluracila e 5-propinilcitosina. Substituições 5-metilcitosina foram mostradas aumentar a estabilidade do dúplex do ácido nucleico por volta de 0,6-1,2°C (Sanghvi, Y. S., Crooke, S. T. e Lebleu, B., eds., *DsRNA Research and Applications*, CRC Press, Boca Raton, 1993, pp. 276-278) e são substituições de base exemplares, ainda mais particularmente quando combinadas com modificações de açúcar 2'-O-metoxietila.

[0099] Patentes U.S. representativas que ensinam a preparação das nucleobases modificadas mencionadas acima bem como outras nucleobase modificadas incluem as, mas não estão limitadas às patentes mencionadas acima: Patente U.S. Nº 3.687.808, bem como Patentes U.S. Nºs 4.845.205; 5.130.30; 5.134.066; 5.175.273; 5.367.066; 5.432.272; 5.457.187; 5.459.255; 5.484.908; 5.502.177; 5.525.711; 5.552.540; 5.587.469; 5.594.121. 5.596.091; 5.614.617; e 5.681.941, cada uma delas é aqui incorporada a título de referência, e a Patente U.S. Nº 5.750.692, também aqui incorporada a título de referência.

Conjugados

[00100] Outra modificação dos dsRNAs da invenção envolve ligar quimicamente ao dsRNA uma ou mais porções ou conjugados que aumentam a atividade, distribuição celular ou absorção celular do dsRNA. Tais porções incluem, mas não estão limitadas a moléculas de lipídeo tal como uma porção de colesterol (Letsinger e outros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, 86: 6553-6556), ácido cólico (Manoharan e outros, *Biorg. Med. Chem. Let.*, 1994, 4:1053-1060), um tioéter, por exemplo, beril-S-tritiltiol (Manoharan e outros, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1992, 660:306-309; Manoharan e outros, *Biorg. Med. Chem. Let.*, 1993,

3:2765-2770), um tiocolesterol (Oberhauser e outros, *Nucl. Acids Res.*, 1992, 20:533-538), uma cadeia alifática, por exemplo, resíduos dodecanodiol ou undecila (Saison-Behmoaras e outros, *EMBO J*, 1991, 10:1111-1118; Kabanov e outros, *FEBS Lett.*, 1990, 259:327-330; Svinarchuk e outros, *Biochimie*, 1993, 75:49-54), um fosfolípídeo, por exemplo, di-hexadecil-rac-glicerol ou trietilamônio 1,2-di-O-hexadecil-rac-glicero-3-Hfosfonato (Manoharan e outros, *Tetrahedron Lett.*, 1995, 36:3651-3654; Shea e outros, *Nucl. Acids Res.*, 1990, 18:3777-3783), uma cadeia de poliamina ou um polietileno glicol (Manoharan e outros, *Nucleosides & Nucleotides*, 1995, 14:969-973), ou ácido adamantano acético (Manoharan e outros, *Tetrahedron Lett.*, 1995, 36:3651-3654), uma porção palmitila (Mishra e outros, *Biochim. Biophys. Acta*, 1995, 1264:229-237) ou uma porção octadecilamina ou hexilamino-carboniloxicolesterol (Crooke e outros, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1996, 277:923-937).

[00101] Patentes U.S. representativas que ensinam a preparação de tais conjugados de dsRNA incluem, mas não estão limitadas a Patentes U.S. N^{os} 4.828.979; 4.948.882; 5.218.105; 5.525.465; 5.541.313; 5.545.730; 5.552.538; 5.578.717. 5.580.731; 5.591.584; 5.109.124; 5.118.802; 5.138.045; 5.414.077; 5.486.603; 5.512.439; 5.578.718; 5.608.046; 4.587.044; 4.605.735; 4.667.025; 4.762.779; 4.789.737; 4.824.941; 4.835.263; 4.876.335; 4.904.582; 4.958.013; 5.082.830; 5.112.963; 5.214.136; 5.082.830; 5.112.963; 5.214.136; 5.245.022; 5.254.469; 5.258.506; 5.262.536; 5.272.250; 5.292.873; 5.317.098; 5.371.241. 5.391.723; 5.416.203. 5.451.463; 5.510.475; 5.512.667; 5.514.785; 5.565.552; 5.567.810; 5.574.142; 5.585.481; 5.587.371; 5.595.726; 5.597.696; 5.599.923; 5.599.928 e 5.688.941, cada uma das quais é aqui incorporada a título de referência.

[00102] Não é necessário que todas as posições em um dado composto sejam uniformemente modificadas, e na realidade mais de

uma das modificações acima mencionadas podem ser incorporadas em um único composto ou até mesmo em um único nucleosídeo dentro de um dsRNA. A presente invenção também inclui compostos de dsRNA que são compostos quiméricos. Compostos de dsRNA "quiméricos" ou "quimeras" no contexto desta presente invenção são compostos de dsRNA, particularmente dsRNAs, que contêm duas ou mais regiões quimicamente distintas, cada uma formada de pelo menos uma unidade de monômero, isto é, um nucleotídeo no caso de um composto de dsRNA. Os dsRNAs contêm tipicamente pelo menos uma região onde o dsRNA é modificado de maneira a conferir ao dsRNA resistência aumentada à degradação por nucleasse, absorção celular aumentada e/ou afinidade de ligação aumentada para o ácido nucleico alvo. Uma região adicional do dsRNA pode servir como um substrato para enzima capaz de clivar híbridos de RNA:DNA ou RNA:RNA. A título de exemplo, RNase H é uma endonuclease que cliva a fita de mRNA de um dúplex de RNA:DNA. Ativação de RNase H, desta maneira, resulta em clivagem do alvo de RNA, desta maneira aumentando muito a eficiência de inibição de dsRNA da expressão de gene. Consequentemente, resultados comparáveis podem ser frequentemente obtidos com dsRNAs mais curtos quando dsRNAs quiméricos são usados, comparado com desoxiRNAs fosforotioato hibridizando para a mesma região-alvo.

[00103] Clivagem do RNA-alvo pode ser rotineiramente detectada através de eletroforese em gel e, se necessário, técnicas de hibridização de ácido nucleico associadas conhecidas na técnica. O sítio de clivagem no mRNA-alvo de um dsRNA pode ser determinado usando métodos geralmente conhecidos de um versado comum na técnica, por exemplo, o método 5'-RACE descrito em Soutschek e outros, *Nature*, 2004, Vol. 432, pp. 173-178 (que é aqui incorporado a título de referência para todos os propósitos). Em uma modalidade, usando o método 5'-RACE

descrito por Soutschek e outros, ALN-18328 foi determinado clivar um mRNA de TTR entre o nucleotídeo guanina na posição 636 de SEQ ID NO:1331 (NM_000371.3) e o nucleotídeo adenina na posição 637 de SEQ ID NO:1331. Em uma modalidade, foi determinado que ALN-18328 não cliva um mRNA de TTR entre o nucleotídeo de adenina na posição 637 de SEQ ID NO:1331 e o nucleotídeo guanina na posição 638 de SEQ ID NO:1331.

[00104] Em certos casos, o dsRNA pode ser modificado por um grupo não ligante. Várias moléculas não ligantes foram conjugadas a dsRNAs a fim de aumentar a atividade, distribuição celular ou absorção celular do dsRNA, e procedimentos para realização de tais conjugações estão disponíveis na literatura científica. Tais porções não ligantes têm porções lipídeo incluídas, tal como colesterol (Letsinger e outros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, 86:6553), ácido cólico (Manoharan e outros, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1994, 4:1053), um tioéter, por exemplo, hexil-S-tritiltiol (Manoharan e outros, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1992, 660:306; Manoharan e outros, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1993, 3:2765), um tiocolesterol (Oberhauser e outros, *Nucl. Acids Res.*, 1992, 20:533), uma cadeia alifática, por exemplo, resíduos dodecanodiol ou undecila (Saison-Behmoaras e outros, *EMBO J.*, 1991, 10:111; Kabanov e outros, *FEBS Lett.*, 1990, 259:327; Svinarchuk e outros, *Biochimie*, 1993, 75:49), um fosfolipídeo, por exemplo, di-hexadecil-rac-glicerol ou trietilamônio 1,2-di-O-hexadecil-rac-glicero-3-H-fosfonato (Manoharan e outros, *Tetrahedron Lett.*, 1995, 36:3651; Shea e outros, *Nucl. Acids Res.*, 1990, 18:3777), uma cadeia de poliamina ou polietileno glicol (Manoharan e outros, *Nucleosides & Nucleotides*, 1995, 14:969) ou ácido adamantano acético (Manoharan e outros, *Tetrahedron Lett.*, 1995, 36:3651), uma porção palmitila (Mishra e outros, *Biochim. Biophys. Acta*, 1995, 1264:229) uma porção octadecilamina ou hexilamino-carbonil-oxicolesterol (Crooke e outros, *J. Pharmacol. Exp.*

Ther., 1996, 277:923). Patentes dos Estados Unidos representativas que ensinam a preparação de tais conjugados de dsRNA foram listadas acima. Protocolos de conjugação típicos envolvem a síntese de dsRNA carregando um aminoligante em uma ou mais posições da sequência. O grupo amino é então reagido com a molécula sendo conjugada usando reagentes de acoplamento ou ativação. A reação de conjugação pode ser realizada ou com o dsRNA ainda ligado ao apoio sólido ou seguindo clivagem do dsRNA em fase de solução. Purificação do conjugado de dsRNA através de HPLC tipicamente dá o conjugado puro.

dsRNAs codificados por Vetor

[00105] Em outro aspecto, as moléculas de dsRNA de TTR são expressas a partir de unidades de transcrição inseridas em vetores de DNA ou RNA (vide, por exemplo, Couture, A. e outros, *TIG.* (1996), 12:5-10; Skillern, A., e outros, Publicação PCT Internacional Nº WO 00/22113, Conrad, Publicação PCT Internacional No. WO 00/22114 e Conrad, Patente U.S. No. 6.054.299). Esses transgenes podem ser introduzidos como um construto linear, um plasmídeo circular ou um vetor viral, que pode ser incorporado e herdado como um transgene integrado no genoma hospedeiro. O transgene pode ser também construído para permitir que ele seja herdado como um plasmídeo extracromossomal (Gassmann, e outros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1995) **92**:1292).

[00106] As fitas individuais de um dsRNA podem ser transcritas por promotores em dois vetores de expressão separados e co-transfectados em uma célula-alvo. Alternativamente, cada fita individual do dsRNA pode ser transcrita por promotores que estão ambos localizados no mesmo plasmídeo de expressão. Em uma modalidade, um dsRNA é expresso como uma repetição invertida unida por uma sequência de polinucleotídeo ligante de maneira que o dsRNA tem uma estrutura de

tronco e alça.

[00107] Os vetores de expressão de dsRNA recombinantes são geralmente plasmídeos de DNA ou vetores virais. Vetores virais expressando dsRNA podem ser construídos baseados em, mas não limitado a vírus adenoassociado (para uma revisão vide Muzyczka e outros, *Curr. Topics Micro. Immunol.* (1992) 158:97-129)); adenovírus (vide, por exemplo, Berkner, e outros, *BioTechniques* (1998) 6:616), Rosenfeld e outros (1991, *Science* 252:431-434) e Rosenfeld e outros (1992), *Cell* 68:143-155)); ou alfavírus bem como outros conhecidos na técnica. Retrovírus foram usados para introduzir uma variedade de genes em muitos tipos de célula diferentes, incluindo células epiteliais, *in vitro* e/ou *in vivo* (vide, por exemplo, Eglitis, e outros, *Science* (1985) 230:1395-1398; Danos e Mulligan, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1998) 85:6460-6464; Wilson e outros, 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:3014-3018; Armentano e outros, 1990, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:61416145; Huber e outros, 1991, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:8039-8043; Ferry e outros, 1991, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:8377-8381; Chowdhury e outros, 1991, *Science* 254:1802-1805; van Beusechem. e outros, 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:7640-19 ; Kay e outros, 1992, *Human Gene Therapy* 3:641-647; Dai e outros, 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10892-10895; Hwu e outros, 1993, *J. Immunol.* 150:4104-4115; Patente U.S. Nº 4.868.116; Patente U.S. Nº 4,980,286; Pedido PCT WO 89/07136; Pedido PCT WO 89/02468; Pedido PCT WO 89/05345; e Pedido PCT WO 92/07573). Vetores retrovirais recombinantes capazes de transdução e expressão de genes inseridos no genoma de uma célula podem ser produzidos através de transfecção do genoma retroviral recombinante em linhagens de célula de empacotamento adequadas tais como PA317 e Psi-CRIP (Comette e outros, 1991, *Human Gene Therapy* 2:5-10; Cone e outros, 1984, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6349). Vetores adenovirais

recombinantes podem ser usados para infectar uma ampla variedade de células e tecidos em hospedeiros suscetíveis (por exemplo, rato, hamster, cachorro e chimpanzé) (Hsu e outros, 1992, *J. Infectious Disease*, 166:769) e também tem a vantagem de não requerer células mitoticamente ativas para infecção.

[00108] Qualquer vetor viral capaz de aceitar as sequências de codificação para a(s) molécula(s) de dsRNA a serem expressas pode ser usado, por exemplo, vetores derivados de adenovírus (AV); vírus adenoassociado (AAV); retrovírus (por exemplo, lentivírus (LV), Rabdovírus, vírus da leucemia de murino); vírus da herpes e similares. O tropismo de vetores virais pode ser modificado por pseudotipificação dos vetores com proteínas envelope e outros antígenos de superfície de outros vírus ou através da substituição de proteínas capsídeo virais diferentes, conforme apropriado.

[00109] Por exemplo, vetores lentivirais descritos na invenção podem ser pseudotipificados com proteínas de superfície do vírus da estomatite vesicular (VSV), raivas, Ebola, Mokola e similar. Vetores AAV descritos na invenção podem ser feitos para direcionar células diferentes através de engenharia dos vetores para expressar sorotipos de proteína capsídeo diferentes. Por exemplo, um vetor AAV expressando um capsídeo sorotipo 2 em um genoma de sorotipo 2 é chamado AAV 2/2. Este gene de capsídeo sorotipo 2 no vetor AAV 2/2 pode ser substituído por um gene de capsídeo sorotipo 5 para produzir um vetor AAV 2/5. Técnicas para construção de vetores AAV que expressam sorotipos de proteína capsídeo diferentes estão dentro da habilidade na técnica; vide, por exemplo, Rabinowitz, J. E. e outros (2002) *J. Virol.* 76:791-801, cujo conteúdo em sua totalidade é aqui incorporado a título de referência.

[00110] Seleção de vetores virais recombinantes adequados para uso na invenção, métodos para inserção de sequências de ácido

nucleico para expressão do dsRNA no vetor e métodos de administração do vetor viral a células de interesse estão dentro da habilidade na técnica. Vide, por exemplo, Dornburg, R. (1995), *Gene Therap.* 2: 301-310; Eglitis, M. A. (1988), *Biotechniques* 6: 608-614; Miller, A. D. (1990), *Hum. Gene. Therap.* 1: 5-14; Anderson, W. F. (1998), *Nature* 392: 25-30; e Robinson, D. A. e outros, *Nat. Genet.* 33: 401-406, cujos conteúdos em sua totalidade são aqui incorporados a título de referência.

[00111] Vetores virais podem ser derivados de AV e AAV. Em uma modalidade, o dsRNA descrito na invenção é expresso como duas moléculas de RNA de fita simples complementares, separadas, de um vetor AAV recombinante tendo, por exemplo, os promotores de RNA ou U6 ou H1 ou o promotor de citomegalovírus (CMV).

[00112] Um vetor AV adequado para expressão do dsRNA descrito na invenção, um método para construção do vetor AV recombinante e um método para administração do vetor a células-alvo são descritos em Xia, H. e outros (2002), *Nat. Biotech.* 20: 1006-1010.

[00113] Vetores AAV adequados para expressão do dsRNA descrito na invenção, métodos para construção de um vetor AV recombinante e métodos para administração dos vetores em células-alvo são descritos em Samulski R e outros (1987), *J. Virol.* 61: 3096-3101; Fisher, K. J. e outros (1996), *J. Virol.*, 70: 520-532; Samulski R. e outros (1989), *J. Virol.* 63: 3822-3826; Pat. U.S. Nº 5,252,479; Pat. U.S. Nº 5.139.941; Pedido de Patente Internacional Nº WO 94/13788; e Pedido de Patente Internacional Nº WO 93/24641, cujos conteúdos em sua totalidade são aqui incorporados a título de referência.

[00114] O promotor dirigindo a expressão de dsRNA em um vetor de plasmídeo ou viral de DNA descrito na invenção pode ser uma polimerase I de RNA eucariótica (por exemplo, promotor de RNA ribossomal), polimerase II de RNA (por exemplo, promotor precoce de

CMV ou promotor da actina ou promotor de snRNA U1) ou geralmente promotor de polimerase III de RNA (por exemplo, promotor de snRNA U6 ou RNA 7SK) ou um promotor procariótico, por exemplo, o promotor T7, contanto que o plasmídeo de expressão também codifique polimerase de RNA T7 requerida para transcrição a partir de um promotor T7. O promotor pode também direcionar expressão de transgene para o pâncreas (vide, por exemplo, a sequência reguladora de insulina para o pâncreas (Bucchini e outros, 1986, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:2511-2515)).

[00115] Ainda, expressão do transgene pode ser precisamente regulada, por exemplo, usando uma sequência reguladora induzível e sistemas de expressão tal como uma sequência reguladora que é sensível a certos reguladores fisiológicos, por exemplo, níveis de glicose em circulação, ou hormônios (Docherty e outros, 1994, FASEB J. 8:20-24). Tais sistemas de expressão induzíveis, adequados para o controle de expressão de transgene em células ou em mamíferos, incluem regulação por ecdisona, por estrogênio, progesterona, tetraciclina, indutores químicos de dimerização e isopropil-beta-D1-tiogalactopiranosídeo (EPTG). Um versado na técnica seria capaz de escolher a sequência reguladora/de promotor apropriada com base no uso pretendido do transgene de dsRNA.

[00116] Em geral, vetores recombinantes capazes de expressão de moléculas de dsRNA são administrados conforme descrito abaixo, e persistem em células-alvo. Alternativamente, vetores virais podem ser usados, os quais proveem expressão transiente de moléculas de dsRNA. Tais vetores podem ser repetidamente administrados conforme necessário. Uma vez expressos, os dsRNAs se ligam ao RNA-alvo e modulam sua função ou expressão. Administração de vetores expressando dsRNA pode ser sistêmica, tal como através de administração intravenosa ou intramuscular, através da administração a

células-alvo explantadas do paciente seguido por reintrodução no paciente ou através de qualquer outro meio que permita introdução em uma célula-alvo desejada.

[00117] Plasmídeos de DNA de expressão de dsRNA são tipicamente transfectados em células-alvo como um complexo com veículos de lipídeo catiônicos (por exemplo, Oligofectamina) ou veículos baseados em lipídeo não catiônico (por exemplo, Transit-TKO®). Transfecções de lipídeo múltiplas para inativações mediadas por dsRNA se direcionando a regiões diferentes de um gene de TTR único ou genes de TTR múltiplos durante um período de uma semana ou mais são também compreendidas pela invenção. Introdução bem-sucedida de vetores em células hospedeiro pode ser monitorada usando vários métodos conhecidos. Por exemplo, transfecção transiente pode ser sinalizada com um repórter, tal como um marcador fluorescente, tal como uma Proteína Fluorescente Verde (GFP). Transfecção estável de células *ex vivo* pode ser assegurada usando marcadores que proveem a célula transfectada com resistência a fatores ambientais específicos (por exemplo, antibióticos e fármacos), tal como resistência à higromicina B.

[00118] Moléculas de dsRNA específicas de TTR podem ser também inseridas em vetores e usadas como vetores de terapia de gene para pacientes humanos. Vetores de terapia de gene podem ser administrados a um indivíduo através de, por exemplo, injeção intravenosa, administração local (vide Patente U.S. 5.328.470) ou através de injeção estereotática (vide, por exemplo, Chen e outros (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:3054-3057). A preparação farmacêutica do vetor de terapia de gene pode incluir o vetor de terapia de gene em um diluente aceitável ou pode incluir uma matriz de liberação lenta onde o veículo de administração de gene é embebido. Alternativamente, onde o vetor de administração de gene completo

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

III. Composições farmacêuticas contendo dsRNA

[00119] Em uma modalidade, a invenção provê composições farmacêuticas contendo um dsRNA, conforme aqui descrito, e um veículo farmaceuticamente aceitável. A composição farmacêutica contendo o dsRNA é útil para tratamento de uma doença ou distúrbio associado com a expressão ou atividade de um gene de TTR, tais como processos patológicos mediados por expressão de TTR. Tais composições farmacêuticas são formuladas com base no modo de administração. Um exemplo são composições que são formuladas para administração sistêmica através de administração parenteral, por exemplo, através de administração intravenosa (IV). Outro exemplo são composições que são formuladas para administração direta no parênquima cerebral, por exemplo, através de infusão no cérebro, tal como através de infusão de bomba contínua.

[00120] As composições farmacêuticas descritas aqui são administradas em dosagens suficientes para inibir expressão de genes da TTR.

[00121] Em geral, uma dose de dsRNA adequada estará na faixa de 0,01 a 200,0 miligramas por quilograma de peso do corpo do recipiente por dia, em geral na faixa de 1 a 50 mg por quilograma de peso do corpo por dia. Por exemplo, o dsRNA pode ser administrado a 0,0059 mg/kg, 0,01 mg/kg, 0,0295 mg/kg, 0,05 mg/kg, 0,0590 mg/kg, 0,163 mg/kg, 0,2 mg/kg, 0,3 mg/kg, 0,4 mg/kg, 0,5 mg/kg, 0,543 mg/kg, 0,5900 mg/kg, 0,6 mg/kg, 0,7 mg/kg, 0,8 mg/kg, 0,9 mg/kg, 1 mg/kg, 1,1 mg/kg, 1,2 mg/kg, 1,3 mg/kg, 1,4 mg/kg, 1,5 mg/kg, 1,628 mg/kg, 2 mg/kg, 3 mg/kg, 5,0 mg/kg, 10 mg/kg, 20 mg/kg, 30 mg/kg, 40 mg/kg ou 50 mg/kg por dose

única.

[00122] Em uma modalidade, a dosagem está entre 0,01 e 0,2 mg/kg. Por exemplo, o dsRNA pode ser administrado em uma dose de 0,01 mg/kg, 0,02 mg/kg, 0,3 mg/kg, 0,04 mg/kg, 0,05 mg/kg, 0,06 mg/kg, 0,07 mg/kg, 0,08 mg/kg, 0,09 mg/kg, 0,10 mg/kg, 0,11 mg/kg, 0,12 mg/kg, 0,13 mg/kg, 0,14 mg/kg, 0,15 mg/kg, 0,16 mg/kg, 0,17 mg/kg, 0,18 mg/kg, 0,19 mg/kg ou 0,20 mg/kg.

[00123] Em uma modalidade, a dosagem está entre 0,005 mg/kg and 1,628 mg/kg. Por exemplo, o dsRNA pode ser administrado em uma dose de 0,0059 mg/kg, 0,0295 mg/kg, 0,0590 mg/kg, 0,163 mg/kg, 0,543 mg/kg, 0,5900 mg/kg ou 1,628 mg/kg.

[00124] Em uma modalidade, a dosagem está entre 0,2 mg/kg e 1,5 mg/kg. Por exemplo, o dsRNA pode ser administrado em uma dose de 0,2 mg/kg, 0,3 mg/kg, 0,4 mg/kg, 0,5 mg/kg, 0,6 mg/kg, 0,7 mg/kg, 0,8 mg/kg, 0,9 mg/kg, 1 mg/kg, 1,1 mg/kg, 1,2 mg/kg, 1,3 mg/kg, 1,4 mg/kg ou 1,5 mg/kg.

[00125] A composição farmacêutica pode ser administrada uma vez por dia ou o dsRNA pode ser administrado como duas, três ou mais subdoses em intervalos apropriados durante o dia ou até mesmo usando infusão contínua ou administração através de uma formulação de liberação controlada. Neste caso, o dsRNA contido em cada subdose deve ser correspondentemente menor a fim de atingir a dosagem diária total. A unidade de dosagem pode ser também composta para administração durante vários dias, por exemplo, usando uma formulação de liberação sustentada convencional que provê liberação sustentada do dsRNA durante um período de vários dias. Formulações de liberação sustentada são bem conhecidas na técnica e são particularmente úteis para administração de agentes em um sítio particular, de maneira que pudessem ser usadas com os agentes da presente invenção. Nesta modalidade, a unidade de dosagem contém

um múltiplo correspondente da dose diária.

[00126] O efeito de uma dose única sobre os níveis de TTR é de duração longa, de maneira que doses subsequentes são administradas em intervalos de não mais do que 3, 4 ou 5 dias, em intervalos de não mais do que 1, 2, 3 ou 4 semanas e em intervalos de não mais do que 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 semanas.

[00127] O versado na técnica vai compreender que certos fatores podem influenciar a dosagem e o momento requerido para tratar eficazmente um indivíduo, incluindo, mas não limitado a severidade da doença ou distúrbio, tratamentos anteriores, a saúde geral e/ou idade do indivíduo e outras doenças presentes. Além disso, tratamento de um indivíduo com uma quantidade terapeuticamente eficaz de uma composição pode incluir um tratamento único ou uma série de tratamentos. Estimativas de dosagens eficazes e meias-vidas in vivo para os dsRNAs individuais compreendidos pela invenção podem ser feitas usando metodologias convencionais ou com base em teste in vivo usando um modelo animal apropriado, conforme descrito em outro ponto aqui.

[00128] Avanços em genética de camundongo geraram vários modelos de camundongo para o estudo de várias doenças humanas, tais como processos patológicos mediados por expressão de TTR. Tais modelos são usados para teste in vivo de dsRNA, bem como para determinação de uma dose terapeuticamente eficaz. Um modelo de camundongo adequado é, por exemplo, um camundongo contendo um plasmídeo expressando TTR humana. Outro modelo de camundongo adequado é um camundongo transgênico carregando um transgene que expressa TTR humana.

[00129] Os dados obtidos de ensaios de cultura de célula e estudos animais podem ser usados na formulação de uma faixa de dosagem para uso em humanos. A dosagem de composições descritas na

invenção se encontra geralmente dentro de uma faixa de concentrações em circulação que incluem a ED₅₀ com pouca ou nenhuma toxidez. A dosagem pode variar dentro desta faixa dependendo da forma de dosagem empregada e da via de administração utilizada. Para qualquer composto usado nos métodos descritos na invenção, a dose terapeuticamente eficaz pode ser estimada inicialmente de ensaios de cultura celular. Uma dose pode ser formulada em modelos animais para atingir uma faixa de concentração no plasma de circulação do composto ou, quando apropriado, do produto de polipeptídeo de uma sequência-alvo (por exemplo, atingindo uma concentração menor do polipeptídeo) que inclui a IC₅₀ (isto é, a concentração do composto de teste que atinge uma inibição metade-máxima de sintomas) conforme determinado em cultura celular. Tal informação pode ser usada para determinar com mais precisão doses úteis em humanos. Níveis no plasma podem ser medidos, por exemplo, através de cromatografia líquida de alto desempenho.

[00130] Os dsRNAs descritos na invenção podem ser administrados em combinação com outros agentes conhecidos eficazes em tratamento de processos patológicos mediados por expressão de gene-alvo. Em qualquer caso, o médico que administra pode ajustar a quantidade e o momento de administração de dsRNA com base nos resultados observados usando medições padrão de eficácia conhecidas na técnica ou descritas aqui.

Administração

[00131] A presente invenção também inclui composições e formulações farmacêuticas que incluem os compostos de dsRNA descritos na invenção. As composições farmacêuticas da presente invenção podem ser administradas de várias maneiras dependendo de se tratamento local ou sistêmico é desejado e da área a ser tratada. Administração pode ser tópica, pulmonar, por exemplo, através de

inalação ou insuflação de pós ou aerossóis, incluindo através de nebulizador; intratraqueal, intranasal, epidérmica e transdérmica, oral ou parenteral. Administração parenteral inclui injeção ou infusão intravenosa, intra-arterial, subcutânea, intraperitoneal ou intramuscular; ou intracraniana, por exemplo, administração intraparenquimal, intratecal ou intraventricular.

[00132] O dsRNA pode ser administrado de uma maneira a se direcionar a um tecido particular, tal como o fígado (por exemplo, os hepatócitos do fígado).

[00133] A presente invenção inclui composições farmacêuticas que podem ser administradas através de injeção diretamente no cérebro. A injeção pode ser injeção esterotática em uma região particular do cérebro (por exemplo, a substantia nigra, córtex, hipocampo, estriato ou globus pallidus) ou o dsRNA pode ser administrado em regiões múltiplas do sistema nervoso central (por exemplo, em regiões múltiplas do cérebro e/ou no cordão espinhal). O dsRNA pode ser também administrado em regiões difusas do cérebro (por exemplo, administração difusa no córtex do cérebro).

[00134] Em uma modalidade, um dsRNA se direcionando a uma TTR pode ser administrado por meio de uma canula ou outro dispositivo de administração tendo uma extremidade implantada em um tecido, por exemplo, o cérebro, por exemplo, a substantia nigra, córtex, hipocampo, estriato, corpus callosum ou globus pallidus do cérebro. A cânula pode ser conectada a um reservatório da composição de dsRNA. O fluxo ou administração pode ser mediado por uma bomba, por exemplo, uma bomba ou minibomba osmótica, tal como uma bomba Alzet (Durect, Cupertino, CA). Em uma modalidade, uma bomba ou reservatório é implantado em uma área distante do tecido, por exemplo, no abdômen, e administração é realizada por um conduíte levando da bomba ou reservatório para o sítio de liberação. Infusão da composição de dsRNA

no cérebro pode ser durante várias horas ou por vários dias, por exemplo, por 1, 2, 3, 5 ou 7 dias ou mais. Dispositivos para administração ao cérebro são descritos, por exemplo, nas Patentes U.S. Nos 6.093.180 e 5.814.014.

[00135] Composições e formulações farmacêuticas para administração tópica podem incluir emplastos transdérmicos, unguentos, loções, cremes, géis, gotas, supositórios, sprays, líquidos e pós. Veículos farmacêuticos, bases aquosas, em pó ou oleosas espessantes e similar convencionais podem ser necessários ou desejáveis. Conservantes revestidos, luvas e similares podem ser também úteis. Formulações tópicas adequadas incluem aquelas onde o dsRNA descrito na invenção está em misturas com um agente de administração tópico tais como lipídeos, lipossomas, ácidos graxos, ésteres do ácido graxo, esteroides, agentes de quelação e tensoativos. Lipídeos e lipossomos adequados incluem etanolamina neutra (por exemplo, dioleoilfosfatidil DOPE etanolamina, dimiristoilfosfatidil colina DMPC, diestearoilfosfatidil colina), negativa (por exemplo, dimiristoilfosfatidil glicerol DMPG) e catiônica (por exemplo, dioleoiltetrametilaminopropil DOTAP e dioleoilfosfatidil etanolamina DOTMA). DsRNAs descritos na invenção podem ser encapsulados dentro de lipossomos ou podem formar complexos com eles, em particular para lipossomos catiônicos. Alternativamente, dsRNAs podem ser complexados com lipídeos, em particular a lipídeos catiônicos. Ácidos graxos adequados e ésteres incluem, mas não estão limitados a, ácido araquidônico, ácido oleico, ácido eicosanoico, ácido láurico, ácido caprílico, ácido cáprico, ácido mirístico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido linoleico, ácido linolênico, dicaprato, tricaprato, monooleína, dilaurina, glicerol 1-monocaprato, 1-dodecilazacicloheptan-2-ona, uma acilcarnitina, uma acilcolina ou um C₁-C₁₀ alquil éster (por exemplo, isopropilmiristato IPM), monoglicerídeo, diglicerídeo ou sal

farmaceuticamente aceitável do mesmo. Formulações tópicas são descritas em detalhes na Patente U.S. Nº 6.747.014, que é aqui incorporada a título de referência.

Formulações lipossomais

[00136] Há muitas estruturas de tensoativo organizadas além de microemulsões que foram estudadas e usadas para a formulação de fármacos. Essas incluem monocamadas, micelas, bicamadas e vesículas. Vesículas, tais como lipossomos, têm atraído grande interesse por causa de sua especificidade e da duração de ação que elas oferecem do ponto de vista de administração de fármaco. Conforme usado na presente invenção, o termo "lipossoma" significa uma vesícula composta de lipídeos anfifílicos dispostos em uma bicamada ou bicamadas esféricas.

[00137] Lipossomos são vesículas unilamelares ou multilamelares que têm uma membrana formada de um material lipofílico e um interior aquoso. A porção aquosa contém a composição a ser administrada. Lipossomos catiônicos possuem a vantagem de serem capazes de fundir à parede celular. Lipossomos não catiônicos, embora não capazes de fundir tão eficientemente com a parede celular, são absorvidos por macrófagos in vivo.

[00138] A fim de cruzar pele de mamífero intacta, vesículas de lipídeo devem passar por uma série de poros finos, cada um com um diâmetro de menos do que 50 nm, sob a influência de um gradiente transdérmica adequado. Desta maneira, é desejável usar um lipossoma que seja altamente deformável e capaz de passar por tais poros finos.

[00139] Vantagens adicionais de lipossomos incluem; lipossomos obtidos de fosfolipídeos naturais que são biocompatíveis e biodegradáveis; lipossomos que podem incorporar uma ampla variedade de fármacos solúveis em água e lipídeo; lipossomos que podem proteger fármacos encapsulados em seus compartimentos

internos de metabolismo e degradação (Rosoff, em *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger e Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 245). Considerações importantes na preparação de formulações de lipossoma são a carga de superfície do lipídeo, tamanho da vesícula e o volume aquoso dos lipossomos.

[00140] Lipossomos são úteis para a transferência e a administração de ingredientes ativos ao sítio de ação. Devido ao fato da membrana lipossomal ser estruturalmente similar a membranas biológicas, quando lipossomos são administrados a um tecido, os lipossomos começam a fundir com as membranas celulares e conforme a fusão do lipossoma e da célula progride, os teores lipossomais são esvaziados para a célula onde o agente ativo pode agir.

[00141] Formulações lipossomais têm sido o foco de investigação extensiva como o modo de administração para muitos fármacos. Há crescente evidência que para administração tópica, lipossomos apresentam várias vantagens com relação a outras formulações. Tais vantagens incluem efeitos colaterais reduzidos com relação à absorção sistêmica alta do fármaco administrado, acúmulo aumentado do fármaco administrado no alvo desejado e a habilidade em administrar uma ampla variedade de fármacos, ambos hidrofílicos e hidrofóbicos, na pele.

[00142] Vários trabalhos detalharam a habilidade de lipossomos em administrar agentes incluindo DNA de peso molecular alto na pele. Compostos incluindo analgésicos, anticorpos, hormônios e DNAs de peso molecular alto foram administrados à pele. A maioria das administrações resultou no direcionamento da epiderme superior.

[00143] Os lipossomos se encaixam em duas classes amplas. Lipossomos catiônicos são lipossomos positivamente carregados que interagem com as moléculas de DNA negativamente carregadas para

formar um complexo estável. O complexo DNA/lipossomo positivamente carregado se liga à superfície celular negativamente carregada e é internalizado em um endossoma. Devido ao pH ácido dentro do endossoma, os lipossomos são rompidos, liberando seus teores no citoplasma celular (Wang e outros, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1987, 147, 980-985).

[00144] Lipossomas que são sensíveis ao pH ou negativamente carregados aprisionam DNA em vez de complexar com ele. Uma vez que ambos o DNA e o lipídeo são similarmente carregados, repulsão em vez de formação de complexo acontece. Não obstante, um pouco de DNA é aprisionado no interior aquoso desses lipossomas. Lipossomas sensíveis ao pH têm sido usados para administrar DNA codificando o gene da timidina cinase a monocamadas celulares em cultura. Expressão do gene exógeno foi detectada nas células-alvo (Zhou e outros, *Journal of Controlled Release*, 1992, 19, 269-274).

[00145] Um tipo principal de composição lipossomal inclui fosfolipídeos outros que não fosfatidilcolina naturalmente derivada. Composições lipossomas neutras, por exemplo, podem ser formadas a partir de dimiristoil fosfatidilcolina (DMPC) ou dipalmitoil fosfatidilcolina (DPPC). Composições de lipossoma aniônicas geralmente são formadas de dimiristoil fosfatidilglicerol, enquanto lipossomas fusogênicos aniônicos são formados principalmente de dioleoil fosfatidiletanolamina (DOPE). Outro tipo de composição lipossomal é formado de fosfatidilcolina (PC) tal como, por exemplo, PC de soja e PC de ovo. Outro tipo é formado de misturas de fosfatidil e/ou fosfatidilcolina e/ou colesterol.

[00146] Vários estudos avaliaram a administração tópica de formulações de fármaco lipossomais à pele. Administração de lipossomos contendo interferon à pele de porquinho-da-índia resultou em uma redução de úlceras de herpes na pele enquanto administração

de interferon através de outros meios (por exemplo, como uma solução ou como uma emulsão) foi ineficaz (Weiner e outros, *Journal of Drug Targeting*, 1992, 2, 405-410). Ainda, um estudo adicional testou a eficácia de interferon administrado como parte de uma formulação lipossomal para a administração de interferon usando um sistema aquoso e concluiu que a formulação lipossomal era superior à administração aquosa (du Plessis e outros, *Antiviral Research*, 1992, 18, 259-265).

[00147] Sistemas lipossomais não iônicos foram também examinados para determinar sua utilidade na administração de fármacos à pele, em particular sistemas compreendendo tensoativo não iônico e colesterol. Formulações lipossomais não iônicas compreendendo Novasome® I (gliceril dilaurato/colesterol/polioxietileno-1-estearil éter) e Novasome® II (gliceril diestearato/colesterol/polioxietileno-1-estearil éter) foram usados para administrar ciclosporina-A na derme de pele de camundongo. Os resultados indicaram que tais sistemas lipossomais não iônicos foram eficazes na facilitação da deposição de ciclosporina-A em camadas diferentes da pele (Hu e outros, *S.T.P. Pharma. Sci.*, 1994, 4, 6, 466).

[00148] Lipossomas também incluem lipossomas "estericamente estabilizados", um termo que, conforme aqui usado, refere-se a lipossomas compreendendo um ou mais lipídeos especializados que, quando incorporados a lipossomas, resultam em tempos de vida de circulação aumentados com relação a lipossomas que não têm tais lipídeos especializados. Exemplos de lipossomas estericamente estabilizados são aqueles onde parte da porção de lipídeo de formação de vesícula do lipossoma (A) compreende um ou mais glicolipídeos, tal como monosialogangliosídeo GM1 ou (B) é derivatizada com um ou mais polímeros hidrofílicos, tal como uma porção de polietileno glicol (PEG). Embora não desejando ser limitado a nenhuma teoria particular, é pensado na técnica que, pelo menos para gangliosídeos contendo

lipossomas, esfingomielina ou lipídeos derivatizados de PEG estericamente estabilizados, a meia-vida de circulação aumentada desses lipossomos estericamente deriva de uma absorção reduzida em células do sistema reticuloendotelial (RES) (Allen e outros, FEBS Letters, 1987, 223, 42; Wu e outros, Cancer Research, 1993, 53, 3765).

[00149] Vários lipossomos compreendendo um ou mais glicolipídeos são conhecidos na técnica. Papahadjopoulos e outros (Ann. N.Y. Acad. Sci., 1987, 507, 64) relataram a habilidade de monosialogangliosídeo GM1, galactocerebrosídeo sulfato e fosfatidilinositol em melhorar as meias-vidas de lipossomas no sangue. Essas constatações foram expostas por Gabizon e outros (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1988, 85, 6949). A Patente U.S. Nº 4.837.028 e o WO 88/04924, ambos para Allen e outros, descrevem lipossomos compreendendo (1) esfingomielina e (2) o gangliosídeo GM1 ou um galactocerebrosídeo éster sulfato. A Patente U.S. Nº 5.543.152 (Webb e outros) descreve lipossomas compreendendo esfingomielina. Lipossomas compreendendo 1,2-sn-dimiristoilfosfatidilcolina são revelados no WO 97/13499 (Lim e outros).

[00150] Muitos lipossomos compreendendo lipídeos derivatizados com um ou mais polímeros hidrofílicos, e métodos de preparação dos mesmos, são conhecidos na técnica. Sunamoto e outros (Bull. Chem. Soc. Jpn., 1980, 53, 2778) descrevem lipossomos compreendendo um detergente não iônico, 2C1215G, que contém uma porção PEG. Illum e outros (FEBS Lett., 1984, 167, 79) notaram que revestimento hidrofílico de partículas de poliestireno com glicóis poliméricos resulta em meias-vidas sanguíneas significativamente maiores. Fosfolipídeos sintéticos modificados pela ligação de grupos carboxílicos de polialquileno glicóis (por exemplo, PEG) são descritos por Sears (Patentes U.S. Nos 4.426.330 e 4.534.899). Klibanov e outros, FEBS Lett., 1990, 268, 235) descreveram experimentos demonstrando que lipossomos compreendendo fosfatidiletanolamina (PE) derivados com PEG ou

estearato de PEG têm aumentos significantes em meias-vidas de circulação sanguínea. Blume e outros (Biochimica et Biophysica Acta, 1990, 1029, 91) estenderam tais observações para outros fosfolípidos derivatizados de PEG, por exemplo, DSPE-PEG, formados da combinação de diestearoilfosfatidiletanolamina (DSPE) e PEG. Lipossomos tendo porções de PEG covalentemente ligadas em sua superfície externa são descritos na Patente Europeia Nº EP 0 445 131 B1 e no WO 90/04384 de Fisher. Composições de lipossomo contendo 1-20 por cento moléculas de PE derivatizado com PEG, e métodos para uso das mesmas, são descritos por Woodle e outros (Patentes U.S. Nos 5.013.556 e 5.356.633) e Martin e outros (Patente U.S. Nº 5.213.804 e Patente Europeia Nº EP 0 496 813 B1). Lipossomos compreendendo vários outros conjugados de lipídeo-polímero são descritos no WO 91/05545 e na Patente U.S. Nº 5.225.212 (ambos de Martin e outros) e no WO 94/20073. Lipossomos compreendendo lipídeos de ceramidas modificados com PEG são descritos no WO 96/10391 (Choi e outros). A Patente U.S. Nº 5.540.935 (Miyazaki e outros) e a Patente U.S. 5.556.948 (Tagawa e outros) descrevem lipossomos contendo PEG que podem ser derivatizados mais com porções funcionais em suas superfícies.

[00151] Vários lipossomos compreendendo ácidos nucleicos são conhecidos na técnica. O WO 96/40062 para Thierry e outros descreve métodos para encapsulamento de ácidos nucleicos de peso molecular alto em lipossomas. A Patente U.S. Nº 5.264.221 para Tagawa e outros descreve lipossomos ligados à proteína e assegura que os conteúdos de tais lipossomos possam incluir um dsRNA. A Patente U.S. Nº 5.665.710 para Rahman e outros descreve certos métodos para encapsulamento de oligodesoxirribonucleotídeos em lipossomos. O WO 97/04787 para Love e outros revela lipossomos compreendendo dsRNAs direcionados ao gene raf.

[00152] Transfersomas são ainda outro tipo de lipossomas, e são agregados de lipídeo altamente transformáveis que são candidatos atraentes para veículos de administração de fármaco. Transfersomas podem ser descritos como gotículas de lipídeo que são altamente deformáveis de maneira que elas são facilmente capazes de penetrar através de poros que são menores do que a gotícula. Transfersomas são adaptáveis ao ambiente onde eles são usados, por exemplo, eles são de auto-otimização (adaptativos ao formato de poros na pele), autorreparação, frequentemente atingindo seus alvos sem fragmentação, e frequentemente autocarregamento. Para produzir transfersomas, é possível adicionar ativadores de borda de superfície, geralmente tensoativos, a uma composição lipossomal padrão. Transfersomas têm sido usados para administrar albumina de soro à pele. A administração mediada por transfersoma de albumina de soro foi mostrada ser tão eficaz quanto injeção subcutânea de uma solução contendo albumina de soro.

[00153] Tensoativos encontram aplicação ampla em formulações tais como emulsões (incluindo microemulsões) e lipossomas. A maneira mais comum de classificação das propriedades de muitos tipos diferentes de tensoativos, ambos naturais e sintéticos, é através do uso do equilíbrio hidrofílico/lipofílico (HLB). A natureza do grupo hidrofílico (também conhecido como "cabeça") provê o meio mais útil para categorização dos tensoativos diferentes usados em formulações (Rieger, em *Pharmaceutical Dosage Forms*, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 1988, p. 285).

[00154] Se a molécula de tensoativo não for ionizada, ela é classificada como um tensoativo não iônico. Tensoativos não iônicos encontram aplicação ampla em produtos farmacêuticos e cosméticos e são úteis em uma ampla faixa de valores de pH. Em geral, seus valores de HLB variam de a partir de 2 a cerca de 18 dependendo de sua

estrutura. Tensoativos não iônicos incluem ésteres não iônicos tais como etileno glicol ésteres, propileno glicol ésteres, gliceril ésteres, poligliceril ésteres, ésteres de sorbitano, ésteres de sacarose e ésteres etoxilados. Alcanolamidas e éteres não iônicos tais como etoxilatos de álcool graxo, álcoois propoxilados e polímeros em bloco etoxilados/propoxilados estão também incluídos nesta classe. Os tensoativos de polioxietileno são os membros mais populares da classe de tensoativo não iônico.

[00155] Se a molécula tensoativa carregar uma carga negativa quando ela é dissolvida ou dispersa em água, o tensoativo é classificado como aniônico, tensoativos aniônicos incluem carboxilatos tais como sabões, acil lactilatos, acil amidas de aminoácidos, ésteres de ácido sulfúrico tais como alquil sulfatos e alquil sulfatos etoxilados, sulfonatos tal como alquil benzeno sulfonatos, acil isetionatos, acil tauratos e sulfossuccinatos e fosfatos. Os membros mais importantes da classe de tensoativo aniônico são os alquil sulfatos e os sabões.

[00156] Se a molécula tensoativa carregar uma carga positiva quando ela é dissolvida ou dispersa em água, o tensoativo é classificado como catiônico. Tensoativos catiônicos incluem sais de amônio quaternário e aminas etoxiladas. Os sais de amônio quaternários são os membros mais usados desta classe.

[00157] Se a molécula tensoativa tiver a habilidade em carregar ou uma carga positiva ou negativa, o tensoativo é classificado como anfotérico. Tensoativos anfotéricos incluem derivados de ácido acrílico, alquilamidas substituídas, N-alquilbetaínas e fosfatídeos.

[00158] O uso de tensoativos em produtos de fármaco, formulações e em emulsões foi revisto (Rieger, *Pharmaceutical Dosage Forms*, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 1988, p. 285).

Partículas de lipídeo de ácido nucleico

[00159] Em uma modalidade, o dsRNA de TTR descrito na invenção

é integralmente encapsulado na formulação de lipídeo, por exemplo, para formar um SPLP, pSPLP, SNALP ou outra partícula de lipídeo de ácido nucleico. Conforme aqui usado, o termo "SNALP" refere-se a uma partícula de ácido nucleico-lipídeo estável, incluindo SPLP. Conforme aqui usado, o termo "SPLP" refere-se a uma partícula de ácido nucleico-lipídeo compreendendo DNA de plasmídeo encapsulado dentro de uma vesícula de lipídeo. SNALPs e SPLPs tipicamente contêm um lipídeo catiônico, um lipídeo não catiônico e um lipídeo que previne agregação da partícula (por exemplo, um conjugado de PEG-lipídeo). SNALPs e SPLPs são extremamente úteis para administrações sistêmicas, uma vez que eles exibem tempos de vida de circulação prolongados seguindo injeção intravenosa (i.v.) e acumulam em sítios distais (por exemplo, sítios tipicamente separados do sítio de administração). SPLPs incluem "pSPLP", que incluem um complexo de agente de condensação-ácido nucleico encapsulado conforme descrito na Publicação PCT N° WO 00/03683. As partículas da presente invenção tipicamente têm um diâmetro médio de cerca de 50 nm a cerca de 150 nm, mais tipicamente cerca de 60 nm a cerca de 130 nm, mais tipicamente cerca de 70 nm a cerca de 110 nm, mais tipicamente cerca de 70 nm a cerca de 90 nm e são substancialmente não tóxicas. Ainda os ácidos nucleicos quando presentes nas partículas de ácido nucleico-lipídeo da presente invenção são resistentes em solução aquosa para degradação com uma nuclease. Partículas de ácido nucleico-lipídeo e seu método para preparação são descritas nas, por exemplo, Patentes U.S. N°s 5.976.567; 5.981.501; 6.534.484; 6.586.410; 6.815.432; e Publicação PCT N° WO 96/40964.

[00160] Em uma modalidade, a razão de lipídeo para fármaco (razão massa/massa) (por exemplo, razão de lipídeo para dsRNA) estará na faixa de a partir de cerca de 1:1 a cerca de 50:1, de a partir de cerca de 1:1 a cerca de 25:1, de a partir de cerca de 3:1 a cerca de 15:1, de a

partir de cerca de 4:1 a cerca de 10:1, de a partir de cerca de 5:1 a cerca de 9:1 ou cerca de 6:1 a cerca de 9:1.

[00161] O lipídeo catiônico pode ser, por exemplo, cloreto de N,N-dioleil-N,N-dimetilamônio (DODAC), brometo de N,N-diestearil-N,N-dimetilamônio (DDAB), cloreto de N-(1-(2,3-dioleoilóxi)propil)-N,N,N-trimetilamônio (DOTAP), cloreto de N-(1-(2,3-dioleilóxi)propil)-N,N,N-trimetilamônio (DOTMA), N,N-dimetil-2,3-dioleilóxi)propilamina (DODMA), 1,2-DiLinoleilóxi-N,N-dimetilaminopropano (DLinDMA), 1,2-Dilinenilóxi-N,N-dimetilaminopropano (DLenDMA), 1,2-Dilinoilcarbamoilóxi-3-dimetilaminopropano (DLin-C-DAP), 1,2-Dilinoilóxi-3-(dimetilamino)acetoxipropano (DLin-DAC), 1,2-Dilinoilóxi-3-morfolinopropano (DLin-MA), 1,2-Dilinoil-3-dimetilaminopropano (DLinDAP), 1,2-Dilinoil-3-dimetilaminopropano (DLin-S-DMA), 1-Linoil-2-linoilóxi-3-dimetilaminopropano (DLin-2-DMA), sal de cloreto de 1,2-dilinoilóxi-3-trimetilaminopropano (DLin-TMA.Cl), sal de cloreto de 1,2-dilinoil-3-trimetilaminopropano (DLin-TAP.Cl), 1,2-Dilinoilóxi-3-(N-metilpiperazino)propano (DLin-MPZ) ou 3-(N,N-Dilinoilamino)-1,2-propanodiol (DLinAP), 3-(N,N-Dioleilamino)-1,2-propanodiol (DOAP), 1,2-Dilinoil-3-(2-N,N-dimetilamino)etoxipropano (DLin-EG-DMA), 1,2-Dilinenilóxi-N,N-dimetilaminopropano (DLinDMA), 2,2-Dilinoil-4-dimetilaminometil-[1,3]-dioxolano (DLin-K-DMA) ou análogos dos mesmos, (3aR,5s,6aS)-N,N-dimetil-2,2-di((9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienil)tetra-hidro-3aH-ciclopenta[d][1,3]dioxol-5-amina (ALN100), (6Z,9Z,28Z,31Z)-heptatriaconta-6,9,28,31-tetraen-19-il 4-(dimetilamino)butanoato (MC3), 1,1'-(2-(4-(2-((2-(bis(2-hidroxidodecil)amino)etil)(2-hidroxidodecil)amino)etil)piperazin-1-il)etilazanedil)didodecan-2-ol (Tech G1) ou uma mistura dos mesmos. O lipídeo catiônico pode compreender de a partir de cerca de 10% em mol a cerca de 50% em mol ou cerca de 40% em mol do lipídeo total presente na partícula.

[00162] Em outra modalidade, o composto 2,2-Dilinoil-4-dimetilaminoetil-[1,3]-dioxolano pode ser usado para preparar nanopartícula de lipídeo-siRNA. Síntese de 2,2-Dilinoil-4-dimetilaminoetil-[1,3]-dioxolano é descrita no Pedido de patente provisório dos Estados Unidos número 61/107.998 depositado em 23 de outubro de 2008, que é aqui incorporado a título de referência.

[00163] Em uma modalidade, a partícula de lipídeo-siRNA inclui 40% de 2, 2-Dilinoil-4-dimetilaminoetil-[1,3]-dioxolano: 10% de DSPC: 40% de Colesterol: 10% de PEG-C-DOMG (por cento em mol) com um tamanho de partícula de $63,0 \pm 20$ nm e uma razão de siRNA/Lipídeo de 0,027.

[00164] O lipídeo não catiônico pode ser um lipídeo aniônico ou um lipídeo neutro incluindo, mas não limitado a, diesteoilfosfatidilcolina (DSPC), dioleoilfosfatidilcolina (DOPC), dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), dioleoilfosfatidilglicerol (DOPG), dipalmitoilfosfatidilglicerol (DPPG), dioleoil-fosfatidiletanolamina (DOPE), palmitoiloleoilfosfatidilcolina (POPC), palmitoiloleoilfosfatidiletanolamina (POPE), dioleoil- fosfatidiletanolamina 4-(N-maleimidometil)-ciclohexano-1- carboxilato (DOPE-mal), dipalmitoil fosfatidil etanolamina (DPPE), dimiristoilfosfoetanolamina (DMPE), distearoil-fosfatidil-etanolamina (DSPE), 16-O-monometil PE, 16-O-dimetil PE, 18-1 -trans PE, 1 -stearoil-2-oleoil- fosfatidietanolamina (SOPE), colesterol ou uma mistura dos mesmos. O lipídeo não catiônico pode ser de a partir de cerca de 5% em mol a cerca de 90% em mol, cerca de 10% em mol ou cerca de 58% em mol, se colesterol for incluído, do lipídeo total presente na partícula.

[00165] O lipídeo conjugado que inibe agregação de partículas pode ser, por exemplo, um polietilenoglicol (PEG)-lipídeo incluindo, sem limitação, um PEG-diacilglicerol (DAG), uma PEG-dialquiloxipropila (DAA), um PEG-fosfolipídeo, uma PEG-ceramida (Cer) ou uma mistura

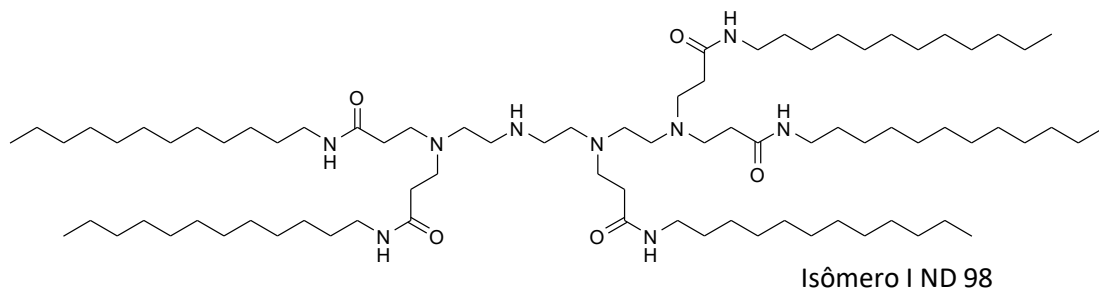
dos mesmos. O conjugado de PEG-DAA pode ser, por exemplo, uma PEG-dilauroiloxipropila (Ci2), uma PEG-dimiristiloxipropila (Ci4), uma PEG-dipalmitiloxipropila (Ci6) ou uma PEG-diesteariloxipropila (Ci8). O lipídeo conjugado que previne agregação de partículas pode ser de a partir de 0% em mol a cerca de 20% em mol ou cerca de 2% em mol do lipídeo total presente na partícula.

[00166] Em algumas modalidades, a partícula de ácido nucleico-lipídeo inclui ainda colesterol em, por exemplo, cerca de 10% em mol a cerca de 60% em mol ou cerca de 48% em mol do lipídeo total presente na partícula.

LNP01

[00167] Em uma modalidade, o lipidoide ND98.4HCl (Fórmula I), Colesterol (Sigma-Aldrich) e PEG-Ceramida C16 (Avanti Polar Lipids) podem ser usados para preparar nanopartícula de lipídeo-siRNA (isto é, partículas de LNP01). Soluções de estoque de cada um em etanol podem ser preparadas como segue: ND98, 133 mg/ml; Colesterol, 25 mg/ml, PEG-Ceramida C16, 100 mg/ml. A solução de ND98, Colesterol e PEG-Ceramida C16 pode então ser combinada em uma, por exemplo, razão molar de 42:48:10. A solução de lipídeo combinada pode ser misturada com siRNA aquoso (por exemplo, em acetato de sódio, pH 5) de maneira que a concentração de etanol final seja cerca de 35-45% e a concentração de acetato de sódio final seja cerca de 100-300 mM. Nanopartículas de lipídeo-siRNA tipicamente se formam espontaneamente quando da mistura. Dependendo da distribuição de tamanho de partícula desejada, a mistura de nanopartícula resultante pode ser extrudada através de uma membrana de polycarbonato (por exemplo, arrancado de 100 nm) usando, por exemplo, um extrusor termobarrel, tal como Lipex Extruder (Northern Lipids, Inc.). Em alguns casos, a etapa de extrusão pode ser omitida. Remoção de etanol e troca de tampão simultânea podem ser realizadas através de, por exemplo,

diálise ou filtragem de fluxo tangencial. Tampão pode ser trocado com, por exemplo, solução salina tamponada com fosfato (PBS) em cerca de pH 7, por exemplo, cerca de pH 6,9, cerca de pH 7,0, cerca de pH 7,1, cerca de pH 7,2, cerca de pH 7,3 ou cerca de pH 7,4.



Fórmula 1

[00168] Formulações LNP01 são descritas, por exemplo, na Publicação de Pedido Internacional N° WO 2008/042973, que é aqui incorporada a título de referência.

[00169] Formulações de lipídeo-siRNA exemplares adicionais são como segue:

	Lipídeo Catiônico	lipídeo catiônico/lipídeo não catiônico/colesterol/conjugado de PEG-lipídeo Razão de Lipídeo:siRNA	Processo
SNALP	1,2-Dilinoilóxi-N,N-dimetilaminopropano (DLinDMA)	DLinDMA/DPPC/Colesterol/PEG-cDMA (57,1/7,1/34,4/1,4) lipídeo:siRNA ~ 7:1	
SNALP-XTC	2,2-Dilinoil-4-dimetilaminoetil-[1,3]-dioxolano (XTC)	XTC/DPPC/Colesterol/PEG-cDMA 57,1/7,1/34,4/1,4 lipídeo:siRNA ~ 7:1	
LNP05	2,2-Dilinoil-4-dimetilaminoetil-[1,3]-dioxolano (XTC)	XTC/DSPC/Colesterol/PEG-DMG 57,5/7,5/31,5/3,5 lipídeo:siRNA ~ 6:1	Extrusão
LNP06	2,2-Dilinoil-4-dimetilaminoetil-[1,3]-dioxolano (XTC)	XTC/DSPC/Colesterol/PEG-DMG 57,5/7,5/31,5/3,5 lipídeo:siRNA ~ 11:1	Extrusão

LNP07	2,2-Dilinoleil-4-dimetilaminoetil-[1,3]-dioxolano (XTC)	XTC/DSPC/Colesterol/PEG-DMG 60/7,5/31/1,5, lipídeo:siRNA ~ 6:1	Mistura em linha
LNP08	2,2-Dilinoleil-4-dimetilaminoetil-[1,3]-dioxolano (XTC)	XTC/DSPC/Colesterol/PEG-DMG 60/7,5/31/1,5, lipídeo:siRNA ~ 11:1	Mistura em linha
LNP09	2,2-Dilinoleil-4-dimetilaminoetil-[1,3]-dioxolano (XTC)	XTC/DSPC/Colesterol/PEG-DMG 50/10/38,5/1,5 lipídeo:siRNA 10:1	Mistura em linha
LNP10	(3aR,5s,6aS)-N,N-dimetil-2,2-di((9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienil)tetra-hidro-3aH-ciclo-penta[d][1,3]dioxol-5-amina (ALN100)	ALN100/DSPC/Colesterol/PEG-DMG 50/10/38,5/1,5 lipídeo:siRNA 10:1	Mistura em linha
LNP11	(6Z,9Z,28Z,31Z)-heptatriaconta-6,9,28,31-tetraen-19-il 4-(dimetilamino)butanoato (MC3)	MC-3/DSPC/Colesterol/PEG-DMG 50/10/38,5/1,5 Lipídeo:siRNA 10:1	Mistura em linha
LNP12	1,1'-(2-(4-(2-((2-(bis(2-hidroxidodecil)amino)etil)(2-hidroxidodecil)amino)etil)piperazin-1-il)etilazanedil)didodecan-2-ol (Tech G1)	Tech G1/DSPC/Colesterol/PEG-DMG 50/10/38,5/1,5 Lipídeo:siRNA 10:1	Mistura em linha

[00170] Formulações LNP09 e formulações compreendendo XTC são descritas, por exemplo, no Pedido de Patente Provisório U.S. Nº de Série 61/239.686, depositado em 3 de setembro de 2009, que é aqui incorporado a título de referência. Formulações LNP11 e formulações compreendendo MC3 são descritas, por exemplo, no Pedido de Patente Provisório U.S. Nº de Série 61/244.834, depositado em 22 de setembro de 2009, que é aqui incorporado a título de referência.

[00171] Formulações preparadas ou através do método padrão ou livre de extrusão podem ser caracterizadas de maneiras similares. Por exemplo, formulações são tipicamente caracterizadas por inspeção visual. Elas devem ser soluções transluzentes esbranquiçadas livres de agregados ou sedimento. Tamanho de partícula e distribuição de tamanho de partícula de nanopartículas de lipídeo podem ser medidos através de difração de luz usando, por exemplo, um Malvern Zetasizer Nano ZS (Malvern, USA). As partículas devem ser de cerca de 20-300 nm, tal como 40-100 nm de tamanho. A distribuição de tamanho de partícula deve ser unimodal. A concentração de siRNA total na formulação, bem como na fração aprisionada, é estimada usando um ensaio de exclusão de corante. Uma amostra do siRNA formulado pode ser incubada com um corante de ligação de RNA, tal como Ribogreen (Molecular Probes) na presença ou na ausência de um tensoativo de rompimento de formulação, por exemplo, Triton-X100 0,5%. O siRNA total na formulação pode ser determinado através do sinal da amostra contendo o tensoativo, com relação a uma curva-padrão. A fração aprisionada é determinada subtraindo o teor de siRNA "livre" (conforme medido pelo sinal na ausência de tensoativo) do teor de siRNA total. A porcentagem aprisionada de siRNA é tipicamente >85%. Para formulação SNALP, o tamanho de partícula é pelo menos 30 nm, pelo menos 40 nm, pelo menos 50 nm, pelo menos 60 nm, pelo menos 70 nm, pelo menos 80 nm, pelo menos 90 nm, pelo menos 100 nm, pelo menos 110 nm, pelo menos 120 nm. A faixa adequada é tipicamente cerca de pelo menos 50 nm a cerca de pelo menos 110 nm, cerca de pelo menos 60 nm a cerca de pelo menos 100 nm ou cerca de pelo menos 80 nm a cerca de pelo menos 90 nm.

[00172] Composições e formulações para administração oral incluem pós ou grânulos, micropartículas, nanopartículas, suspensões ou soluções em água ou meio não aquoso, cápsulas de gel, sachês,

comprimidos ou minicomprimidos. Espessantes, agentes de aromatização, diluentes, emulsificantes, auxiliares de dispersão ou ligantes podem ser desejáveis. Em algumas modalidades, formulações orais são aquelas onde dsRNAs descritos na invenção são administrados em conjunto com um ou mais tensoativos aumentadores de penetração e quelantes. Tensoativos adequados incluem ácidos graxos e/ou ésteres ou sais dos mesmos, ácidos de bile e/ou sais dos mesmos. Ácidos/sais de bile adequados incluem ácido quenodesoxicólico (CDCA) e ácido ursodesoxicólico (UDCA), ácido cólico, ácido desidrocólico, ácido desoxicólico, ácido glucólico, ácido glicólico, ácido glicodesoxicólico, ácido taurocólico, ácido taurodesoxicólico, tauro-24,25-di-hifro-fusidato de sódio e glicodi-hifrofusidato de sódio. Ácidos graxos adequados incluem ácido araquidônico, ácido undecanoico, ácido oleico, ácido láurico, ácido caprílico, ácido cáprico, ácido mirístico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido linoleico, ácido linolênico, dicaprato, tricaprato, monooleína, dilaurina, gliceril 1-monocaprato, 1-dodecilazazacicloheptan-2-ona, uma acilcarnitina, uma acilcolina ou um monoglicerídeo, um diglicerídeo ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo (por exemplo, sódio). Em algumas modalidades, combinações de aumentadores de penetração são usadas, por exemplo, ácidos /sais graxos em combinação com ácidos/sais de bile. Uma combinação exemplar é o sal de sódio de ácido láurico, ácido cáprico e UDCA. Aumentadores de penetração adicionais incluem polioxietileno-9-lauril éter, polioxietileno-20-cetil éter. DsRNAs descritos na invenção podem ser administrados oralmente, em forma granular incluindo partículas secas por pulverização ou complexados para formar micro ou nanopartículas. Agentes de complexação de DsRNA incluem poli-amino ácidos; políminas; poliacrilatos; poliacrilacrilatos, polioxietanos, polialquilcianoacrilatos; gelatinas cationizadas, albuminas, amidos,

acrilato, polietilenoglicóis (PEG) e amidos; polialquilcianoacrilatos; políminas derivatizada de DEAE, pululanos, celulosas e amidos. Agentes de complexação adequados incluem quitosana, N-trimetilquitosana, poli-L-lisina, poli-histidina, poliornitina, poliesperminas, protamina, polivinilpirrolidona, politiodietilaminometileno P(TDAE), poliaminoestireno (por exemplo, p-amino), poli(metilcianoacrilato), poli(etilcianoacrilato), poli(butilcianoacrilato), poli(isobutilcianoacrilato), poli(iso-hexilcianoacrilato), DEAE-metacrilato, DEAE-hexilacrilato, DEAE-acrilamida, DEAE-albumina e DEAE-dextrano, polimetilacrilato, poliexilacrilato, ácido poli(D,L-láctico), ácido poli(DL-láctico-co-glicólico) (PLGA), alginato e polietilenoglicol (PEG). Formulações orais para dsRNA e sua preparação são descritas em detalhes nas Patente U.S. 6.887.906, Publicação U.S. Nº 20030027780 e Patente U.S. Nº 6.747.014, cada uma delas aqui incorporada a título de referência.

[00173] Composições e formulações para administração parenteral, intraparenquimal (no cérebro), intratecal, intraventricular ou intra-hepática podem incluir soluções aquosas estéreis que podem também conter tampões, diluentes e outros aditivos adequados tais como, mas não limitado a aumentadores de penetração, compostos veículos e outros veículos ou excipientes farmacologicamente aceitáveis.

[00174] Composições farmacêuticas da presente invenção incluem, mas não estão limitadas a, soluções, emulsões e formulações contendo lipossoma. Essas composições podem ser geradas a partir de uma variedade de componentes que incluem, mas não estão limitados a líquidos pré-formados, sólidos autoemulsificantes e semissólidos autoemulsificantes. Particularmente preferidas são formulações que se direcionam ao fígado quando tratando distúrbios hepáticos tal como carcinoma hepático.

[00175] As formulações farmacêuticas da presente invenção, que podem estar convenientemente presentes em forma de dosagem

unitária, podem ser preparadas de acordo com técnicas convencionais bem conhecidas na indústria farmacêutica. Tais técnicas incluem a etapa de trazer em associação os ingredientes ativos com o veículo(es) ou excipiente(s) farmacêutico(s). Em geral, as formulações são preparadas trazendo em associação uniformemente e intimamente os ingredientes ativos com veículos líquidos ou veículos sólidos finamente divididos ou ambos e, então, se necessário, moldagem do produto.

[00176] As composições da presente invenção podem ser formuladas em qualquer uma de muitas formas de dosagem possíveis tais como, mas não limitado a comprimidos, cápsulas, cápsulas de gel, xaropes líquidos, géis moles, supositórios e enemas. As composições da presente invenção podem ser também formuladas como suspensões em meios aquosos, não aquosos ou mistos. Suspensões aquosas podem conter ainda substâncias que aumentam a viscosidade da suspensão incluindo, por exemplo, carboximetilcelulose de sódio, sorbitol e/ou dextrano. A suspensão pode também conter estabilizadores.

Emulsões

[00177] As composições da presente invenção podem ser preparadas e formuladas como emulsões. Emulsões são tipicamente sistemas heterogêneos de um líquido disperso em outro na forma de gotículas geralmente excedendo 0,1 μm de diâmetro (Idson, em *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger e Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 199; Rosoff, in *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger e Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., Volume 1, p. 245; Block em *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger e Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 2, p. 335; Higuchi e outros, em *Remington's Pharmaceutical Sciences*, Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1985, p. 301). Emulsões são frequentemente sistemas

bifásicos compreendendo duas fases líquidas não miscíveis intimamente misturadas e dispersas uma com a outra. Em geral, emulsões podem ser da variedade água-em-óleo (a/o) ou óleo-em-água (o/a). Quando uma fase aquosa é finamente dividida em e dispersa como gotículas minúsculas em uma fase de óleo bruta, a composição resultante é chamada emulsão água-em-óleo (a/o). Alternativamente, quando é chamada uma emulsão óleo-em-água. Emulsões podem conter componentes adicionais em adição às fases dispersas, e o fármaco ativo que pode estar presente como uma solução ou na fase aquosa, ou fase oleosa ou em si mesma como uma fase separada. Excipientes farmacêuticos tais como emulsificantes, estabilizadores, corantes e antioxidantes podem também estar presentes em emulsões conforme necessário. Emulsões farmacêuticas podem ser também emulsões múltiplas que são compreendidas de mais de duas fases tais como, por exemplo, no caso de emulsões óleo-em-água-em-óleo (o/a/o) e água-em-óleo-em-água (a/o/a). Tais formulações complexas frequentemente proveem certas vantagens que emulsões binárias simples não. Emulsões múltiplas onde gotículas de óleo individuais de uma emulsão o/a encerram gotículas de água pequenas constituem uma emulsão a/o/a. Da mesma maneira, um sistema de gotículas de óleo encerradas em glóbulos de água estabilizados em uma fase contínua oleosa provê uma emulsão o/a/o.

[00178] Emulsões são caracterizadas por pouca ou nenhuma estabilidade termodinâmica. Frequentemente, a fase dispersa ou descontínua da emulsão é bem dispersa na fase externa ou contínua e mantida nesta forma por meio de emulsificantes ou da viscosidade da formulação. Qualquer uma das fases da emulsão pode ser um semissólido ou um sólido, como é o caso de bases de unguento tipo emulsão e cremes. Outros meios de estabilização de emulsões compreende o uso de emulsificantes que podem ser incorporados a

qualquer fase da emulsão. Emulsificantes podem ser amplamente classificados em quatro categorias: tensoativos sintéticos, emulsificantes de ocorrência natural, bases de absorção e sólidos finamente dispersos (Idson, *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger e Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 199).

[00179] Tensoativos sintéticos, também conhecidos como agentes tensoativos, encontraram uma ampla aplicabilidade na formulação de emulsões e foram revistos na literatura (Rieger, em *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 285; Idson, em *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger e Banker (Eds.), Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 1988, volume 1, p. 199). Tensoativos são tipicamente anfifílicos e compreendem uma porção hidrofílica e uma hidrofóbica. A razão da natureza hidrofílica para a natureza hidrofóbica do tensoativo foi chamada o equilíbrio hidrófilo/lipófilo (HLB) e é uma ferramenta valiosa na categorização e seleção de tensoativos na preparação de formulações. Tensoativos podem ser classificados em classes diferentes com base na natureza do grupo hidrofílico: não iônico, aniônico, catiônico e anfotérico (Rieger, em *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 285).

[00180] Emulsificantes de ocorrência natural usados nas formulações de emulsão incluem lanolina, cera de abelha, fosfatídeos, lectina e acácia. Bases de absorção possuem propriedades hidrofílicas de maneira que elas podem absorver água para formar emulsões a/o ainda retendo suas consistências semissólidas, tais como lanolina anidra e petrolato hidrofílico. Sólidos finamente divididos têm sido usados como bons emulsificantes, especialmente em combinação com tensoativos e em preparações viscosas. Esses incluem sólidos

inorgânicos polares, tais como hidróxidos de metal pesado, argilas que não incham tais como bentonita, atapulgita, hectorita, caulim, montmorilonita, silicato de alumínio coloidal e silicato de alumínio magnésio coloidal, pigmentos e sólidos não polares tal como triestearato de carbono ou glicerila.

[00181] Uma grande variedade de materiais não emulsificantes está também incluída em formulações de emulsão e contribui para as propriedades de emulsão. Esses incluem gorduras, óleos, ceras, ácidos graxos, álcoois graxos, ésteres graxos, umectantes, coloides hidrofílicos, conservantes e antioxidantes (Block, em *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger and Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 335; Idson, em *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger e Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 199).

[00182] Coloides hidrofílicos ou hidrocoloides incluem gomas de ocorrência natural e polímeros sintéticos tais como polissacarídeos (por exemplo, acácia, ágar, ácido algínico, carragenana, goma guar, goma karaya e tragacanto), derivados de celulose (por exemplo, carboximetilcelulose e carboxipropilcelulose) e polímeros sintéticos (por exemplo, carbômero, éteres de celulose e polímeros de carboxivinila). Esses dispersam ou incham em água para formar soluções coloidais que estabilizam emulsões através da formação de películas interfaciais fortes em torno das gotículas de fase dispersa e através do aumento da viscosidade da fase externa.

[00183] Uma vez que emulsões frequentemente contêm vários ingredientes tais como carboidratos, proteínas, esteróis e fosfatídeos que podem apoiar prontamente o crescimento de micróbios, essas formulações frequentemente incorporam conservantes. Conservantes geralmente usados incluídos em formulações de emulsão incluem metil parabeno, propil parabeno, sais de amônio quaternário, cloreto de

benzalcônio, ésteres do ácido p-hidroxibenzoico e ácido bórico. Antioxidantes são também geralmente adicionados a formulações de emulsão para prevenir deterioração da formulação. Antioxidantes usados podem ser sequestrantes de radical livre tais como tocoferóis, alquil galatos, hidroxianisol butilado, hidroxitolueno butilado ou agentes de redução tais como ácido ascórbico e metabissulfito de sódio e sinergistas de antioxidante tais como ácido cítrico, ácido tartárico e lecitina.

[00184] A administração de formulações de emulsão através de vias dermatológica, oral e parenteral e métodos para sua fabricação foram revistos na literatura (Idson, em *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger e Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 199). Formulações de emulsão para administração oral têm sido amplamente usadas por causa da facilidade de formulação, bem como eficácia de um ponto de vista de absorção e biodisponibilidade (Rosoff, em *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger e Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 245; Idson, em *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger e Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 199). Laxantes à base de óleo mineral, vitaminas solúveis em óleo e preparações nutritivas com alto teor de gordura estão dentre os materiais que têm sido geralmente administrados oralmente como emulsões o/a.

[00185] Em uma modalidade da presente invenção, as composições de dsRNAs e ácidos nucleicos são formuladas como microemulsões. Uma microemulsão pode ser definida como um sistema de água, óleo e anfífilo que é uma solução líquida opticamente isotrópica e termodinamicamente estável (Rosoff, em *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger e Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 245). Microemulsões típicas são sistemas

que são preparados primeiro dispersando um óleo em uma solução tensoativa aquosa e então adicionando uma quantidade suficiente de um quarto componente, geralmente um álcool de comprimento de cadeia intermediário para formar um sistema transparente. Desta maneira, microemulsões foram também descritas como dispersões isotropicamente claras, termodinamicamente estáveis, de dois líquidos não miscíveis que são estabilizados por películas interfaciais ou moléculas tensoativas (Leung e Shah, em: *Controlled Release of Drugs: Polymers and Aggregate Systems*, Rosoff, M., Ed., 1989, VCH Publishers, New York, páginas 185-215). Microemulsões são geralmente preparadas através de uma combinação de três a cinco componentes que incluem óleo, água, tensoativo, cotensoativo e eletrólito. Se a microemulsão é do tipo água-em-óleo (a/o) ou óleo-em-água (o/a) depende das propriedades do óleo e do tensoativo usados e da estrutura e do revestimento geométrico das cabeças polares e caudas de hidrocarbono das moléculas de tensoativo (Schott, em *Remington's Pharmaceutical Sciences*, Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1985, p. 271).

[00186] A abordagem fenomenológica utilizando diagramas de fase foi extensivamente estudada e resultou em um conhecimento compreensivo, a um versado na técnica, de como formular microemulsões (Rosoff, em *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger e Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 245; Block, em *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, Rieger e Banker (Eds.), 1988, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., volume 1, p. 335). Comparado com emulsões convencionais, microemulsões oferecem a vantagem de solubilização de fármacos insolúveis em água em uma formulação de gotículas termodinamicamente estáveis que são espontaneamente formadas.

[00187] Tensoativos usados na preparação de microemulsões

incluem, mas não estão limitados a, tensoativos iônicos, tensoativos não iônicos, Brij 96, polioxietileno oleil éteres, ésteres do ácido poliglicerol graxo, tetraglicerol monolaurato (ML310), tetraglicerol mono-oleato (MO310), hexaglicerol mono-oleato (PO310), hexaglicerol pentaoleato (PO500), decaglicerol monocaprato (MCA750), dicaglicerol mono-oleato (ML750), decaglicerol sequioleato (SO750), decaglicerol decaoleato (DAO750), sozinho ou em combinação com cotensoativos. O cotensoativo, geralmente um álcool de cadeia curta tal como etanol, 1-propanol e 1-butanol, serve para aumentar a fluidez interfacial através da penetração na película do tensoativo e conseqüentemente criação de uma película desordenada por causa do espaço de veio gerado entre as moléculas de tensoativo. Microemulsões podem, no entanto, ser preparadas sem o uso de cotensoativos e sistemas de microemulsão autoemulsificantes livres de álcool são conhecidos na técnica. A fase aquosa pode ser tipicamente, mas não é limitada a, água, uma solução aquosa do fármaco, glicerol, PEG300, PEG400, poligliceróis, propileno glicóis e derivados de etileno glicol. A fase de óleo pode incluir, mas não é limitada a materiais tais como Captex 300, Captex 355, Capmul MCM, ésteres de ácido graxo, mono-, di- e tri-glicerídeos de cadeia média (C₈-C₁₂), ésteres do ácido gliceril graxo polioxietilado, álcoois graxos, glicerídeos poliglicolizados, glicerídeos C₈-C₁₀ poliglicolizados saturados, óleos vegetais e óleo de silício.

[00188] Microemulsões são particularmente de interesse do ponto de vista de solubilização de fármaco e da absorção aumentada de fármacos. Microemulsões à base de lipídeo (ambas o/a e a/o) foram propostas para aumentar a biodisponibilidade oral de fármacos, incluindo peptídeos (Constantinides e outros, *Pharmaceutical Research*, 1994, 11, 1385-1390; Ritschel, *Meth. Find. Exp. Clin. Pharmacol.*, 1993, 13, 205). Microemulsões oferecem vantagens de solubilização de fármaco aperfeiçoada, proteção do fármaco de hidrólise enzimática,

possível aumento de absorção de fármaco devido a alterações induzidas por tensoativo em fluidez e permeabilidade da membrana, facilidade de preparação, facilidade de administração oral com relação a formas de dosagem sólidas, potência clínica aperfeiçoada e menor toxicidade (Constantinides e outros, *Pharmaceutical Research*, 1994, 11, 1385; Ho e outros, *J. Pharm. Sci.*, 1996, 85, 138-143). Frequentemente microemulsões podem se formar espontaneamente quando seus componentes são unidos em temperatura ambiente. Isto pode ser particularmente vantajoso quando formulando fármacos termolábeis, peptídeos ou dsRNAs. Microemulsões têm sido também eficazes na administração transdérmica de componentes ativos em ambas as aplicações cosméticas e farmacêuticas. É esperado que as composições e formulações de microemulsão da presente invenção facilitem a absorção sistêmica aumentada de dsRNAs e ácidos nucleicos a partir do trato gastrointestinal, também melhorem a absorção celular local de dsRNAs e ácidos nucleicos.

[00189] As microemulsões da presente invenção podem também conter componentes e aditivos adicionais tais como monoestearato sorbitano (Grill 3), Labrasol, e aumentadores de penetração para melhorar as propriedades da formulação e aumentar a absorção dos dsRNAs e ácidos nucleicos da presente invenção. Aumentadores de penetração usados nas microemulsões da presente invenção podem ser classificados como pertencentes a uma das cinco categorias amplas – tensoativos, ácidos graxos, sais de bile, agentes de quelação e não tensoativos de não quelação (Lee e outros, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, p. 92). Cada uma dessas classes foi discutida acima.

Aumentadores de penetração

[00190] Em uma modalidade, a presente invenção emprega vários aumentadores de penetração para realizar a administração eficiente de

ácidos nucleicos, particularmente dsRNAs, à pele de animais. A maioria dos fármacos está em solução em ambas as formas ionizada e não ionizada. No entanto, geralmente apenas fármacos solúveis em lipídeo ou lipofílicos cruzam prontamente as membranas celulares. Foi constatado que mesmo fármacos não lipofílicos podem cruzar membranas celulares se a membrana a ser cruzada for tratada com um aumentador de penetração. Em adição ao auxílio da difusão de fármacos não lipofílicos através das membranas celulares, aumentadores de penetração também aumentam a permeabilidade de fármacos lipofílicos. Aumentadores de penetração podem ser classificados como pertencentes a uma das cinco categorias amplas, isto é, tensoativos, ácidos graxos, sais de bile, agentes de quelação e não tensoativos de não quelação (Lee e outros, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, p.92). Cada uma das classes mencionadas acima de aumentadores de penetração é descrita abaixo em mais detalhes.

[00191] Tensoativos: de acordo com a presente invenção, tensoativos (ou "agentes tensoativos") são entidades químicas que, quando dissolvidas em uma solução aquosa, reduzem a tensão de superfície da solução ou a tensão interfacial entre a solução aquosa e outro líquido, com o resultado que absorção de dsRNA através da mucosa é aumentada. Em adição aos sais de bile e ácidos graxos, esses aumentadores de penetração incluem, por exemplo, lauril sulfato de sódio, polioxietileno-9-lauril éter e polioxietileno-20-cetil éter) (Lee e outros, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, p.92); e emulsões perfluorquímicas tal como FC-43. Takahashi e outros, *J. Pharm. Pharmacol.*, 1988, 40, 252).

[00192] Ácidos graxos: vários ácidos graxos e seus derivados que agem como aumentadores de penetração incluem, por exemplo, ácido oleico, ácido láurico, ácido cáprico (ácido n-decanoico), ácido mirístico,

ácido palmítico, ácido esteárico, ácido linoleico, ácido linolênico, dicaprato, mono-oleína (1-mono-oleoil-rac-glicerol), dilaurina, ácido caprílico, ácido araquidônico, glicerol 1-monocaprato, 1-dodecilazacicloheptan-2-ona, acilcarnitinas, acilcolinas, c. sub. 1-10 alquil ésteres dos mesmos (por exemplo, metila, isopropila e t-butila) e mono- e di-glicerídeos dos mesmos (isto é, oleato, laurato, caprato, miristato, palmitato, estearato, linoleato, etc) (Lee e outros, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, p.92; Muranishi, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1990, 7, 1-33; El Hariri e outros, *J. Pharm. Pharmacol.*, 1992, 44, 651-654).

[00193] Sais de bile: o papel fisiológico da bile inclui a facilitação de dispersão e absorção de lipídeos e vitaminas solúveis em gordura (Brunton, Capítulo 38 em: Goodman & Gilman's *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 9ª Ed., Hardman e outros Eds., McGraw-Hill, New York, 1996, pp. 934-935). Vários sais de bile naturais, e seus derivados sintéticos, agem como aumentadores de penetração. Desta maneira, o termo "sais de bile" inclui qualquer um dos componentes de ocorrência natural de bile bem como qualquer um de seus derivados sintéticos. Sais de bile adequados incluem, por exemplo, ácido cólico (ou seu sal de sódio farmacologicamente aceitável, colato de sódio), ácido desidrocólico (desidrocolato de sódio), ácido desoxicólico (desoxicolato de sódio), ácido glucólico (glucolato de sódio), ácido glicólico (glicocolato de sódio), ácido glicodesoxicólico (glicodesoxicolato de sódio), ácido taurocólico (taurocolato de sódio), ácido taurodesoxicólico (taurodesoxicolato de sódio), ácido quenodesoxicólico (quenodesoxicolato de sódio), ácido ursodesoxicólico (UDCA), tauro-24,25-di-hidro-fusidato (STDHF), glicodi-hidrofusidato de sódio e polioxietileno-9-lauril éter (POE) (Lee e outros, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, página 92; Swinyard, Capítulo 39 Em: *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18ª Ed., Gennaro, ed.,

Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1990, páginas 782-783; Muranishi, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1990, 7, 1-33; Yamamoto e outros, *J. Pharm. Exp. Ther.*, 1992, 263, 25; Yamashita e outros, *J. Pharm. Sci.*, 1990, 79, 579-583).

[00194] Agentes de quelação: agentes de quelação, conforme usado de acordo com a presente invenção, podem ser definidos como compostos que removem íons metálicos de solução através da formação de complexos com os mesmos, com o resultado que absorção de dsRNAs através da mucosa é aumentada. Com relação ao seu uso como aumentadores de penetração na presente invenção, agentes de quelação têm a vantagem agregada de também servirem como inibidores de DNase, uma vez que a maioria das nucleases de DNA caracterizadas requerem um íon de metal divalente para catálise e são então inibidas por agentes de quelação (Jarrett, *J. Chromatogr.*, 1993, 618, 315-339). Agentes de quelação adequados incluem, mas não estão limitados a, etilenodiaminotetra-acetato dissódico (EDTA), ácido cítrico, salicilatos (por exemplo, salicilato de sódio, 5-metoxissalicilato e homovanilato), derivados de N-acila de colágeno, lauret-9 e derivados de N-amino acila de beta-dicetonas (enaminas) (Lee e outros, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, page 92; Muranishi, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1990, 7, 1-33; Buur e outros, *J. Control Rel.*, 1990, 14, 43-51).

[00195] Não tensoativos de não quelação: conforme aqui usado, compostos de aumento de penetração não tensoativos de não quelação podem ser definidos como compostos que demonstram atividade insignificante como agentes de quelação ou como tensoativos, mas que, não obstante, aumentam absorção de dsRNAs através da mucosa alimentar (Muranishi, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1990, 7, 1-33). Esta classe de aumentadores de penetração inclui, por exemplo, ureias cíclicas não saturadas, derivados de 1-alquil- e

1-alquenilazacido-alcanona (Lee e outros, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1991, página 92); e agentes anti-inflamatórios não esteroidais tais como diclofenato sódico, indometacina e fenilbutazona (Yamashita e outros, *J. Pharm. Pharmacol.*, 1987, 39, 621-626).

Veículos

[00196] Certas composições da presente invenção também incorporam compostos veículos na formulação. Conforme aqui usado, "composto veículo" pode se referir a um ácido nucleico, ou análogo do mesmo, que é inerte (isto é, não possui atividade biológica *per se*), mas é reconhecido como ácido nucleico através de processos *in vivo* que reduzem a biodisponibilidade de um ácido nucleico tendo atividade biológica através de, por exemplo, degradação do ácido nucleico biologicamente ativo ou promoção de sua remoção da circulação. A coadministração de um ácido nucleico e um composto veículo, tipicamente com um excesso da última substância, pode resultar em uma redução substancial da quantidade de ácido nucleico recuperada no fígado, rim ou outros reservatórios extracirculatórios, presumivelmente devido à competição entre o composto veículo e o ácido nucleico para um receptor comum. Por exemplo, a recuperação de um dsRNA parcialmente fosforotioato em tecido hepático pode ser reduzida quando é coadministrado com ácido polinosínico, dextrano sulfato, ácido policitídico ou ácido 4-acetamido-4'-isotiociano-estilbeno-2,2'-dissulfônico (Miyao e outros, *DsRNA Res. Dev.*, 1995, 5, 115-121; Takakura e outros, *DsRNA & Nucl. Acid Drug Dev.*, 1996, 6, 177-183).

Excipientes

[00197] Em contraste com um composto veículo, um "veículo farmacêutico" ou "excipiente" é um solvente, agente de suspensão ou qualquer outro veículo farmacologicamente inerte farmacêuticamente aceitável para administração de um ou mais ácidos nucleicos a um animal. O excipiente pode ser líquido ou sólido e é selecionado, com a

maneira planejada de administração em mente, de maneira a prover a massa desejada, consistência, etc, quando combinado com um ácido nucleico e os outros componentes de uma dada composição farmacêutica. Veículos farmacêuticos típicos incluem, mas não estão limitados a, agentes de ligação (por exemplo, amido de milho pré-gelatinizado, polivinilpirrolidona ou hidroxipropilmetilcelulose, etc); cargas (por exemplo, lactose e outros açúcares, celulose microcristalina, pectina, gelatina, sulfato de cálcio, etil celulose, poliacrilato ou hidrogeno fosfato de cálcio, etc); lubrificantes (por exemplo, estearato de magnésio, talco, sílica, dióxido de silício coloidal, ácido esteárico, estearatos metálicos, óleos vegetais hidrogenados, amido de milho, polietileno glicóis, benzoato de sódio, acetato de sódio, etc); desintegrantes (por exemplo, amido, amido glicolato de sódio, etc); e agentes umectantes (por exemplo, lauril sulfato de sódio, etc).

[00198] Excipientes orgânicos ou inorgânicos farmacêuticamente aceitáveis adequados para administração não parenteral que não reagem prejudicialmente com ácidos nucleicos podem ser também usados para formular as composições da presente invenção. Veículos farmacêuticamente aceitáveis incluem, mas não estão limitados a água, soluções de sal, álcoois, polietileno glicóis, gelatina, lactose, amilose, estearato de magnésio, talco, ácido silícico, parafina viscosa, hidroximetilcelulose, polivinilpirrolidona e similares.

[00199] Formulações para administração tópica de ácidos nucleicos podem incluir soluções aquosas estéreis e não estéreis, soluções não aquosas em solventes comuns tais como álcoois ou soluções dos ácidos nucleicos em bases de óleo líquidas ou sólidas. As soluções podem também conter tampões, diluentes e outros aditivos adequados. Excipientes orgânicos ou inorgânicos farmacêuticamente aceitáveis adequados para administração não parenteral que não reagem prejudicialmente com ácidos nucleicos podem ser usados.

[00200] Excipientes farmacologicamente aceitáveis adequados incluem, mas não estão limitados a água, soluções de sal, álcool, polietileno glicólico, gelatina, lactose, amilose, estearato de magnésio, talco, ácido silícico, parafina viscosa, hidroximetilcelulose, polivinilpirrolidona e similares.

Outros Componentes

[00201] As composições da presente invenção podem conter ainda outros componentes adjuntos convencionalmente encontrados em composições farmacêuticas, em seus níveis de uso estabelecidos na técnica. Desta maneira, por exemplo, as composições podem conter materiais adicionais, compatíveis, farmacologicamente ativos tais como, por exemplo, antipruríticos, adstringentes, anestésicos locais ou agentes anti-inflamatórios ou podem conter materiais adicionais úteis em formular fisicamente várias formas de dosagem das composições da presente invenção tais como corantes, agentes aromatizantes, conservantes, antioxidantes, opacificantes, agentes de espessamento e estabilizadores. No entanto, tais materiais, quando adicionados, não devem interferir indevidamente com as atividades biológicas dos componentes das composições da presente invenção. As formulações podem ser esterilizadas e, se desejado, misturadas com agentes auxiliares, por exemplo, lubrificantes, conservantes, estabilizadores, agentes umectantes, emulsificantes, sais para influência da pressão osmótica, tampões, agentes de coloração, substâncias de saborização e/ou substâncias aromáticas e similares que não interagem prejudicialmente com o(s) ácido(s) nucleico(s) da formulação.

[00202] Suspensões aquosas podem conter substâncias que aumentam a viscosidade da suspensão incluindo, por exemplo, carboximetilcelulose de sódio, sorbitol e/ou dextrano. A suspensão pode também conter estabilizadores.

[00203] Em algumas modalidades, composições farmacêuticas

descritas na invenção incluem (a) um ou mais compostos dsRNA e (b) um ou mais agentes biológicos anticitocina que funcionam através de um mecanismo não RNAi. Exemplos de tais biológicos incluem biológicos que se direcionam a IL1 β (por exemplo, anakinra), IL6 (tocilizumabe) ou TNF (etanercepte, infliximabe, adlimumabe ou certolizumabe).

[00204] Toxicidade e eficácia terapêutica de tais compostos podem ser determinadas através de procedimentos farmacêuticos padrão em culturas celulares ou animais experimentais, por exemplo, para determinação da LD₅₀ (a dose letal de 50% da população) e a ED₅₀ (a dose terapeuticamente eficaz em 50% da população). A razão de dose entre efeitos tóxicos e terapêuticos é o índice terapêutico e pode ser expressa como a razão LD₅₀/ED₅₀. Os compostos que exibem índices terapêuticos altos são preferidos.

[00205] Os dados obtidos de ensaios de cultura celular e estudos animais podem ser usados em formulação de uma faixa de dosagem para uso em seres humanos. A dosagem de composições descritas na invenção se encontra geralmente dentro de uma faixa de concentrações de circulação que incluem a ED₅₀ com pouca ou nenhuma toxidez. A dosagem pode variar dentro desta faixa dependendo da forma de dosagem empregada e da via de administração utilizada. Para qualquer composto usado nos métodos descritos na invenção, a dose terapeuticamente eficaz pode ser estimada inicialmente a partir de ensaios de cultura celular. Uma dose pode ser formulada em modelos animais para atingir uma faixa de concentração de plasma de circulação do composto ou, quando apropriado, do produto de polipeptídeo de uma sequência-alvo (por exemplo, atingindo uma concentração menor do polipeptídeo) que inclui a IC₅₀ (isto é, a concentração do composto de teste que atinge uma inibição metade-máxima de sintomas) conforme determinado em cultura celular. Tal informação pode ser usada para determinar com mais precisão doses úteis em humanos. Níveis no

plasma podem ser medidos, por exemplo, através de cromatografia líquida de alto desempenho.

[00206] Em adição à sua administração, conforme acima discutido, os dsRNAs descritos na invenção podem ser administrados em combinação com outros agente conhecidos eficazes no tratamento de processos patológicos mediados por expressão de TTR. Em qualquer caso, o médico que está administrando pode ajustar a quantidade e o momento de administração de dsRNA com base nos resultados observados usando medições padrões de eficácia conhecidos na técnica ou descritos aqui.

Métodos para tratamento de doenças causadas pela expressão de um gene de TTR

[00207] A invenção refere-se em particular ao uso de um dsRNA se direcionando a TTR e composições contendo pelo menos um tal dsRNA para o tratamento de um distúrbio ou doença mediado por TTR. Por exemplo, um dsRNA se direcionando a um gene de TTR pode ser útil para o tratamento de uma amiloidose de TTR, tal como polineuropatia amiloidótica familiar (FAP), cardiomiopatia amiloidótica familiar (FAC), leptomeningeal/amiloidose do SNC, forma VII de amiloidose (também conhecida como amiloidose leptomeningeal ou meningocerebrovascular), hipertiroxinemia e amiloidose cardíaca (também chamada amiloidose sistêmica senil (SSA) e amiloidose cardíaca senil (SCA).

[00208] A figura 15 ilustra sintomas e mutações em TTR associados com neuropatia amiloidótica familiar, cardiomiopatia amiloidótica familiar e amiloidose do SNC. A invenção inclui composições e métodos para tratamento das doenças e sintomas e direcionadas a essas versões mutantes de TTR.

[00209] Um dsRNA se direcionando a um gene de TTR é também usado para tratamento de sintomas e distúrbios, tal como amiloidose de TTR. Sintomas associados com tal amiloidose incluem, por exemplo,

ataques, demência, mielopatia, polineuropatia, síndrome do túnel carpal, insuficiência autonômica, cardiomiopatia, disfunção gastrointestinal (por exemplo, úlceras gástricas, diarreia, constipação, má-absorção), perda de peso, hepatomegalia, linfadenopatia, goiter, opacidades vítreas, insuficiência renal (incluindo proteinúria e falência renal), nefropatia, disfunção do nervo craniano, distrofia do látice da córnea e falência cardíaca congestiva com fraqueza generalizada e dificuldades de respirar da retenção de fluido.

[00210] Devido aos efeitos inibidores sobre expressão de TTR, uma composição de acordo com a invenção ou uma composição farmacêutica preparada a partir da mesma pode aumentar a qualidade de vida.

[00211] A invenção refere-se ainda ao uso de um dsRNA ou uma composição farmacêutica da mesma, por exemplo, para tratamento de uma amiloidose de TTR, em combinação com outros métodos farmacêuticos e/ou outros terapêuticos, por exemplo, com agentes farmacêuticos conhecidos e/ou métodos terapêuticos conhecidos, tais como, por exemplo, aqueles que são atualmente empregados para tratamento desses distúrbios. Em um exemplo, um dsRNA se direcionando a TTR pode ser administrado em combinação com um transplante de fígado. Em outros exemplos, um dsRNA se direcionando a TTR pode ser administrado em combinação com um método farmacêutico ou terapêutico para tratamento de um sintoma de uma doença de TTR, tais como diuréticos, ACE (enzima de conversão de angiotensina), bloqueadores de receptor de angiotensina (ARBs) ou diálise, por exemplo, para tratamento de função renal.

[00212] O dsRNA e um agente terapêutico adicional podem ser administrados na mesma combinação, por exemplo, parenteralmente, ou o agente terapêutico adicional pode ser administrado como parte de uma composição separada ou através de outro método descrito aqui.

[00213] A invenção refere-se a um método de administração de um dsRNA se direcionando a TTR a um paciente tendo doença ou distúrbio mediado por expressão de TTR, tal como amiloidose de TTR, por exemplo, FAP. Administração do dsRNA pode estabilizar e melhorar a função neurológica periférica, por exemplo, em um paciente com FAP. Pacientes podem ser administrados com uma quantidade terapêutica de dsRNA tal como 0,1 mg/kg, 0,2 mg/kg, 0,5 mg/kg, 1,0 mg/kg, 1,5 mg/kg, 2,0 mg/kg ou 2,5 mg/kg de dsRNA. O dsRNA pode ser administrado através de infusão intravenosa durante um período de tempo tal como durante um período de 5 minutos, 10 minutos, 15 minutos, 20 minutos, 25 minutos, 60 minutos, 120 minutos ou 180 minutos. A administração é repetida, por exemplo, em uma base regular, tal como bissemanalmente (isto é, a cada duas semanas) por um mês, dois meses, três meses, quatro meses ou mais. Após um regime de tratamento inicial, os tratamentos podem ser administrados em uma base menos frequente. Por exemplo, após administração bissemanal por três meses, administração pode ser repetida uma vez por mês, por seis meses ou um ano ou mais. Administração do dsRNA pode reduzir os níveis de TTR no sangue ou na urina do paciente em pelo menos 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% ou 90% ou mais.

[00214] Antes da administração de uma dose integral do dsRNA, os pacientes podem ser administrados como uma dose menor, tal como uma dose que é 5% da dose integral, e monitorados quanto a efeitos adversos, tal como uma reação alérgica ou uma mudança em função do fígado. Por exemplo, em pacientes monitorados quanto a mudanças na função do fígado, uma baixa incidência de mudança de LFT (Teste de Função do Fígado (*Liver Function Test*)) (por exemplo, uma incidência de 10-20% de LFT) é aceitável (por exemplo, um aumento de 3 vezes, reversível, em níveis de ALT (alanina aminotransferase) e/ou AST (aspartato aminotransferase)).

[00215] Muitas doenças e distúrbios associados a TTR são hereditários. Desta maneira, um paciente com necessidade de dsRNA de TTR pode ser identificado pela história familiar. Um provedor de cuidado da saúde, tal como um médico, enfermeiro ou membro da família, pode considerar a história familiar antes de prescrever ou administrar um dsRNA de TTR. Um teste de DNA pode também ser realizado no paciente para identificar uma mutação no gene de TTR, antes de um dsRNA de TTR ser administrado ao paciente.

[00216] O paciente pode ter uma biópsia realizada antes de receber um dsRNA de TTR. Uma biópsia pode ser, por exemplo, em um tecido, tal como a mucosa gástrica, nervo periférico, pele, gordura abdominal, fígado ou rim, e a biópsia pode revelar placas de amiloide, que são indicativas de um distúrbio mediado por TTR. Quando da identificação de placas de amiloide, o paciente é administrado com um dsRNA de TTR.

Métodos para inibição de expressão de um gene de TTR

[00217] Em ainda outro aspecto, a invenção provê um método para inibição da expressão de um gene de TTR em um mamífero. O método inclui administração de uma composição descrita na invenção ao mamífero de maneira que expressão do gene de TTR-alvo seja silenciada.

[00218] Quando o organismo a ser tratado é um mamífero tal como um ser humano, a composição pode ser administrada através de qualquer meio conhecido na técnica incluindo, mas não limitado a vias orais ou parenterais, incluindo administrações intracraniana (por exemplo, intraventricular, intraparenquimal e intratecal), intravenosa, intramuscular, subcutânea, transdérmica, via aérea (aerossol), nasal, retal e tópica (incluindo bucal e sublingual). Em certas modalidades, as composições são administradas através de infusão ou injeção intravenosa.

[00219] A menos que de outro modo definido, todos os termos técnicos e científicos usados aqui têm o mesmo significado conforme

geralmente compreendido por um versado comum na técnica à qual a presente invenção pertence. Embora métodos e materiais similares ou equivalentes àqueles descritos aqui possam ser usados na prática ou teste dos dsRNAs e dos métodos descritos na invenção, métodos e materiais adequados são descritos abaixo. Todas as publicações, pedidos de patente, patentes e outras referências mencionadas aqui são incorporadas a título de referência em sua totalidade. Em caso de conflito, o presente pedido, incluindo definições, vai prevalecer. Ainda, os materiais, métodos e exemplos são ilustrativos apenas e não pretendem ser limitantes.

EXEMPLOS

Exemplo 1. Síntese de dsRNA

Fonte de reagentes

[00220] Onde a fonte de reagente não for especificamente dada aqui, tal reagente pode ser obtido de qualquer fornecedor de reagentes para biologia molecular em um padrão de qualidade/pureza para aplicação em biologia molecular.

Síntese de siRNA

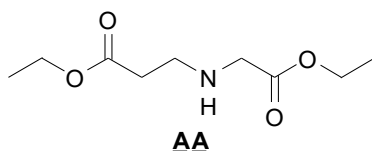
[00221] RNAs de fita simples foram produzidos através de síntese de fase sólida em uma escala de 1 μ mole usando um sintetizador Expedite 8909 (Applied Biosystems, Applied Biosystems GmbH, Darmstadt, Alemanha) e vidro de poro controlado (CPG, 500Å, Proligo Biochemie GmbH, Hamburg, Alemanha) como apoio sólido. RNA e RNA contendo 2'-O-metil nucleotídeos foram gerados através de síntese de fase sólida empregando as fosforamiditas correspondentes e 2'-O-metil fosforamiditas, respectivamente, (Proligo Biochemie GmbH, Hamburg, Alemanha). Esses formadores foram incorporados em sítios selecionados dentro da sequência da cadeia de oligorribonucleotídeo usando química de fosforamidita de nucleosídeo padrão tal como descrito em *Current protocols in nucleic acid chemistry*, Beaucage, S.L.

e outros (Edrs.), John Wiley & Sons, Inc., New York, NY, USA. Ligações fosforotioato foram introduzidas através da substituição da solução de oxidação de iodo com uma solução do reagente Beaucage (Chruachem Ltd., Glasgow, RU) em acetonitrila (1%). Reagentes aciliares adicionais foram obtidos de Mallinckrodt Baker (Griesheim, Alemanha).

[00222] Desproteção e purificação dos oligorribonucleotídeos brutos através de uma HPLC de troca de ânion foram realizadas de acordo com procedimentos estabelecidos. Rendimentos e concentrações foram determinados através de absorção por UV de uma solução do respectivo RNA em um comprimento de onda de 260 nm usando um fotômetro espectral (DU 640B, Beckman Coulter GmbH, Unterschleißheim, Alemanha). RNA de fita dupla foi gerado misturando uma solução equimolar de fitas complementares em tampão de anelamento (fosfato de sódio 20 mM, pH 6,8; cloreto de sódio 100 mM), aquecido em um banho de água a 85-90° C por 3 minutos em temperatura ambiente durante um período de 3-4 horas. A solução de RNA anelado foi armazenada a -20° C até uso.

[00223] Para a síntese de siRNAs conjugados a 3'-colesterol (aqui referidos como –Col-3'), um apoio sólido apropriadamente modificado foi usado para síntese de RNA. O apoio sólido modificado foi preparado como segue:

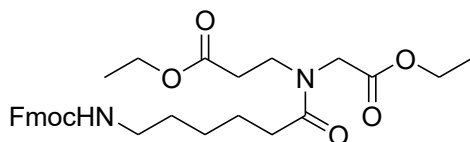
[00224] Dietil-2-azabutano-1,4-dicarboxilato **AA**



[00225] Uma solução aquosa 4,7M de hidróxido de sódio (50 mL) foi adicionada a uma solução gelada, agitada, de cloridrato de etil glicinato (32,19 g, 0,23 mol) em água (50 mL). Então, etil acrilato (23,1 g, 0,23 mol) foi adicionado e a mistura foi agitada em temperatura ambiente até o término da reação ser constatado através de TLC. Após 19 h a solução

foi dividida com diclorometano (3 x 100 mL). A camada orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro, filtrada e evaporada. O resíduo foi destilado para dar AA (28,8 g, 61%).

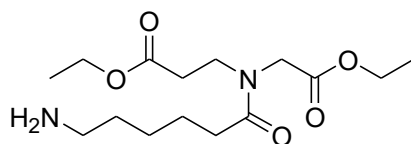
[00226] Etil éster do ácido 3-{etoxicarbonilmetil-[6-(9H-fluoren-9-ilmtoxycarbonil-amino)-hexanoil]-amino}-propiónico **AB**



AB

[00227] Ácido Fmoc-6-amino-hexanoico (9,12 g, 25,83 mmoles) foi dissolvido em diclorometano (50 mL) e esfriado com gelo. Diisopropilcarbodiimida (3,25 g, 3,99 mL, 25,83 mmoles) foi adicionada à solução a 0° C. Ela foi então seguida pela adição de Dietil-azabutano-1,4-dicarboxilato (5 g, 24,6 mmoles) e dimetilamino piridina (0,305 g, 2,5 mmoles). A solução foi trazida para temperatura ambiente e agitada por mais 6 h. O término da reação foi verificado através de TLC. A mistura de reação foi concentrada sob vácuo e acetato de etila foi adicionado para precipitar di-isopropila ureia. A suspensão foi filtrada. O filtrado foi lavado com ácido clorídrico aquoso 5%, bicarbonato de sódio 5% e água. A camada orgânica combinada foi seca em sulfato de sódio e concentrada para dar o produto bruto que foi purificado através de cromatografia de coluna (EtOAc 50%/Hexanos) para dar 11,87 g (88%) de AB.

[00228] Etil éster do ácido 3-[(6-amino-hexanoil)-ttoxycarbonilmetil-amino]-propiónico **AC**

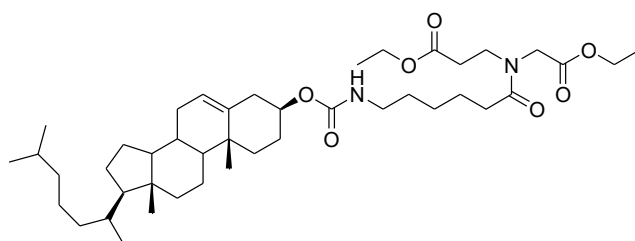


AC

[00229] Etil éster do ácido 3-{etoxicarbonilmetil-[6-(9H-fluoren-9-ilmtoxycarbonilamino)-hexanoil]-amino}-propiónico AB (11,5 g, 21,3 mmol) foi dissolvido em piperidina 20% em dimetiformamida a 0° C. A

solução foi continuada a agitar por 1 h. A mistura de reação foi concentrada sob vácuo, água foi adicionada ao resíduo e o produto foi extraído com acetato de etila. O produto bruto foi purificado através de conversão em seu sal de cloridrato.

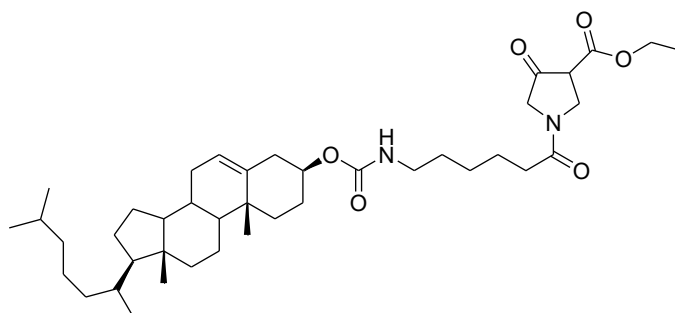
[00230] Etil éster do ácido 3-({6-[17-(1,5-dimetil-hexil)-10,13-dimetil-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecaidro-1H-ciclopenta[a]fenantren-3-iloxicarbonilamino]-hexanoil}Etoxicarbonilmetil-amino)-propiónico **AD**



AD

[00231] O sal de cloridrato de etil éster do ácido AC 3-[(6-amino-hexanoil)-etoxicarbonilmetil-amino]-propiónico (4,7 g, 14,8 mmoles) foi absorvido em diclorometano. A suspensão foi esfriada para 0° C em gelo. Di-isopropiletilamina (3,87 g, 5,2 mL, 30 mmoles) foi adicionada à solução. Colesteril cloroformato (6,675 g, 14,8 mmoles) foi adicionado à solução resultante. A mistura de reação foi agitada da noite para o dia. A mistura de reação foi diluída com diclorometano e foi lavada com ácido clorídrico 10%. O produto foi purificado através de cromatografia flash (10,3 g, 92%).

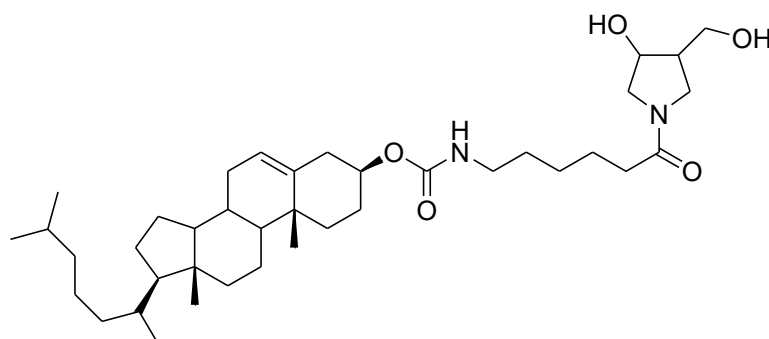
[00232] Etil éster do ácido 1-{6-[17-(1,5-dimetil-hexil)-10,13-dimetil-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecaidro-1H-ciclopenta[a]fenantren-3-iloxicarbonilamino]-hexanoil}-4-oxo-pirrolidino-3-carboxílico **AE**



AE

[00233] t-Butóxido de potássio (1,1 g, 9,8 mmols) foi transformado em pasta em 30 mL de tolueno seco. A mistura foi esfriada para 0°C em gelo e 5 g (6,6 mmols) de diéster de AD foram adicionados lentamente com agitação dentro de 20 minutos. A temperatura foi mantida abaixo de 5°C durante a adição. A agitação foi continuada por 30 minutos a 0°C e 1 mL de ácido acético glacial foi adicionado, imediatamente seguido por 4 g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ em 40 mL de água. A mistura resultante foi extraída duas vezes com 100 mL de diclorometano cada e os extratos orgânicos combinados foram lavados duas vezes com 10 mL de tampão de fosfato cada, secos e evaporados até secagem. O resíduo foi dissolvido em 60 mL de tolueno, esfriado para 0°C e extraído com três porções de 50 mL de tampão de carbonato de pH 9,5 frio. Os extratos aquosos foram ajustados para pH 3 com ácido fosfórico e extraídos com cinco porções de 40 mL de clorofórmio que foram combinadas, secas e evaporadas até secagem. O resíduo foi purificado através de cromatografia de coluna usando acetato de etila 25%/hexano para dar 1,9 g de b-cetoéster (39%).

[00234] 17-(1,5-Dimetil-hexil)-10,13-dimetil-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14, 15,16,17-tetradecaidro-1H-ciclopenta[a]fenantren-3-il éster do ácido [6-(3-hidroxi-4-hidroximetil-pirrolidin-1-il)-6-oxo-hexil]-carbâmico **AF**

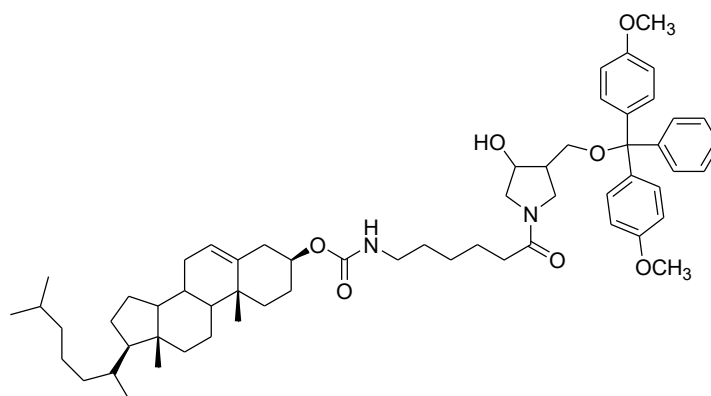


AF

[00235] Metanol (2 mL) foi adicionado em gotas durante um período de 1 hora a uma mistura em refluxo de b-cetoéster AE (1,5 g, 2,2 mmols)

e boroidreto de sódio (0,226 g, 6 mmols) em tetraidrofurano (10 mL). A agitação foi continuada em temperatura de refluxo por 1 hora. Após esfriar para temperatura ambiente, HCl 1N (12,5 mL) foi adicionado e a mistura foi extraída com acetato de etila (3 x 40 mL). A camada de acetato de etila combinada foi seca em sulfato de sódio anidro e concentrada sob vácuo para dar o produto que foi purificado através de cromatografia de coluna (MeOH 10%/CHCl₃) (89%).

[00236] 17-(1,5-Dimetil-hexil)-10,13-dimetil-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14, 15,16,17-tetradecaidro-1H-ciclopenta[a]fenantren-3-il éster do ácido (6-{3-[bis-(4-metoxi-fenil)-fenil-metoximetil]-4-hidroxi-pirrolidin-1-il}-6-oxo-hexil)-carbâmico **AG**

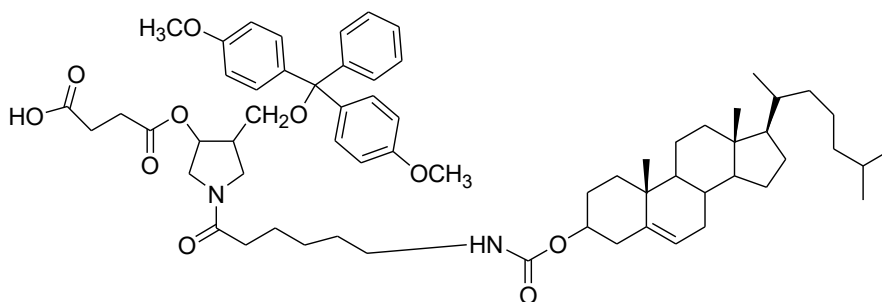


AG

[00237] Diol AF (1,25 g, 1,994 mmol) foi seco através de evaporação em piridina (2 x 5 mL) a vácuo. Piridina anidra (10 mL) e cloreto de 4,4'-dimetoxitritila (0,724 g, 2,13 mmols) foram adicionados com agitação. A reação foi realizada em temperatura ambiente da noite para o dia. A reação foi extinta através da adição de metanol. A mistura de reação foi concentrada sob vácuo e ao resíduo diclorometano (50 mL) foi adicionado. A camada orgânica foi lavada com bicarbonato de sódio aquoso 1M. A camada orgânica foi seca em sulfato de sódio anidro, filtrada e concentrada. A piridina residual foi removida através de evaporação com tolueno. O produto bruto foi purificado através de cromatografia de coluna (MeOH 2%/Clorofórmio, R_f = 0,5 em MeOH

5%/CHCl₃) (1,75 g, 95%).

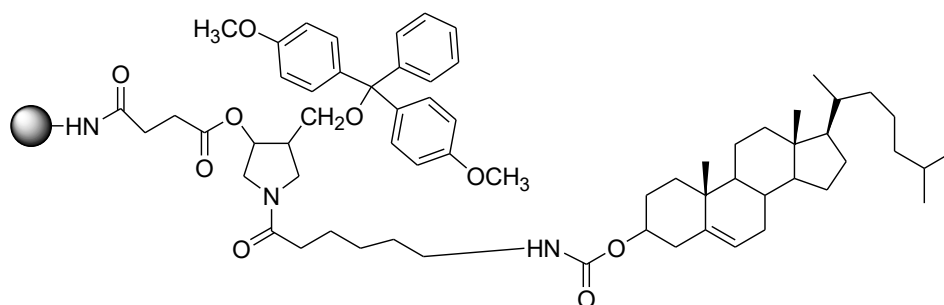
[00238] Mono-(4-[bis-(4-metoxi-fenil)-fenil-metoximetil]-1-{6-[17-(1,5-dimetil-hexil)-10,13-dimetil 2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradeca-hidro-1H ciclopenta[a]fenantren-3-iloxicarbonilamino]-hexanoil}-pirrolidin-3-il) éster do ácido succínico **AH**



AH

[00239] O Composto AG (1,0 g, 1,05 mmol) foi misturado com anidrido succínico (0,150 g, 1,5 mmol) e DMAP (0,073 g, 0,6 mmol) e seco a vácuo a 40° C da noite para o dia. A mistura foi dissolvida em dicloroetano anidro (3 mL), trietilamina (0,318 g, 0,440 mL, 3,15 mmols) foi adicionada e a solução foi agitada em temperatura ambiente sob atmosfera de argônio por 16 horas. Ela foi então diluída com diclorometano (40 mL) e lavada com ácido cítrico aquoso frio (5% em peso, 30 mL) e água (2 x 20 mL). A fase orgânica foi seca em sulfato de sódio anidro e concentrada até secagem. O resíduo foi usado desta maneira na etapa seguinte.

[00240] CPG Derivatizado de Colesterol **AI**



AI

[00241] Succinato AH (0,254 g, 0,242 mmol) foi dissolvido em uma mistura de diclorometano/acetonitrila (3:2, 3 mL). A uma solução de

DMAP (0,0296 g, 0,242 mmol) em acetonitrila (1,25 mL), 2,2'-Ditio-bis(5-nitropiridina) (0,075 g, 0,242 mmol) em acetonitrila/dicloroetano (3:1, 1,25 mL) foi adicionada sucessivamente. À solução resultante trifetilfosfina (0,064 g, 0,242 mmol) em acetonitrila (0,6 mL) foi adicionada. A mistura de reação ficou de cor laranja brilhante. A solução foi agitada rapidamente usando um agitador de ação serpenteada (5 minutos). Alquil amina de cadeia longa-CPG (LCAA-CPG) (1,5 g, 61 mM) foi adicionada. A suspensão foi agitada por 2 h. O CPG foi filtrado em um funil sinterizado e lavado com acetonitrila, diclorometano e éter sucessivamente. Grupos amino não reagidos foram mascarados usando anidrido triacético/piridina. O carregamento obtido do CPG foi medido com a medição UV (37 mM/g).

[00242] A síntese de siRNAs carregando grupo bisdecilamida do ácido 5'-12-dodecanoico (aqui referido como "5-C32-") ou grupo derivado de 5'-colesterila (aqui referido como "5'-Col-") foi realizada conforme descrito no WO 2004/065601, exceto pelo fato de que, para o derivado de colesterila, a etapa de oxidação foi realizada usando o reagente Beaucage a fim de introduzir uma ligação fosforotioato na extremidade 5' do oligômero de ácido nucleico.

[00243] Sequências de ácido nucleico são representadas abaixo usando nomenclatura padrão e especificamente as abreviações da tabela 1.

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

Abreviação	Nucleotídeo(s)
A	adenosina-3'-fosfato
C	citidina-3'-fosfato
G	guanosina-3'-fosfato

Abreviação	Nucleotídeo(s)
T	5-metiluridina-3'-fosfato
U	uridina-3'-fosfato
N	qualquer nucleotídeo (G, A, C ou T)
a	2'-O-metiladenosina-3'-fosfato
c	2'-O-metilcitidina-3'-fosfato
g	2'-O-metilguanosina-3'-fosfato
u	2'-O-metiluridina-3'-fosfato
dT	2'-deoxitimidina-3'-fosfato
sT; sdT	2'-desoxi-imidina-5'fosfato-fosforotioato

Exemplo 2A. Projeto de siRNA de TTR

Transcritos

[00244] Projeto de siRNA foi realizado para identificar siRNAs direcionando ao gene da transtirretina de humano (símbolo TTR) e rato (símbolo Ttr). O projeto usou os transcritos TTR NM_000371.2 (SEQ ID NO:1329) (humano) e NM_012681.1 (SEQ ID NO:1330) (rato) da coleção NCBI Refseq. Os dúplexes de siRNA foram projetados com identidade de 100% com seus respectivos genes de TTR.

Projeto de siRNA e Previsão de Especificidade

[00245] A especificidade prevista de todos os 19 mers possíveis foi determinada para cada sequência. Os siRNAs de TTR foram usados em uma pesquisa abrangente contra os transcriptomas humano e de rato (definidos como o conjunto de registros NM_ e XM_ dentro do conjunto NCBI Refseq) usando o algoritmo FASTA. O scripto Python 'offtargetFasta.py' foi então usado para analisar os alinhamentos e gerar um *score* com base na posição e no número de faltas de combinação entre o siRNA e qualquer transcrito 'off-target' potencial. O *score* 'off-target' é pesado para enfatizar diferenças na região 'seed' de siRNAs, nas posições 2-9 da extremidade 5' da molécula. O *score* 'off-target' é calculado como segue: faltas de combinação entre o oligo e o transcrito

recebem penalidades. Uma falta de combinação na região de semente nas posições 2-9 do oligo recebe uma penalidade de 2:8; faltas de combinação nos sítios de clivagem putativos 10 e 11 recebem uma penalidade de 1,2, e faltas de combinação nas posições 12-19 uma penalidade de 1. Faltas de combinação na posição 1 não são consideradas. O *score* 'off-target' para cada par de oligo-transcrito é então calculado somando as penalidades de falta de combinação. O menor *score* de 'off-target' de todos os pares de oligo-transcrito é então determinado e usado em subsequente classificação de oligos. Ambos as fitas de siRNA foram designados para uma categoria de especificidade de acordo com os *scores* calculados: um *score* acima de 3 qualifica como altamente específico, igual a 3 como específico e entre 2,2 e 2,8 como moderadamente específico. Ao definir quais oligos sintetizar, *scores* 'off-target' da fita antissenso foram classificados de alto a baixo, e os 144 melhores pares de oligo (*score* 'off-target' menor) de humano e os melhores 26 pares de rato foram selecionados.

Seleção de sequência de siRNA

[00246] Um total de 140 oligos de siRNA derivados de TTR humana de senso e de 140 antissenso foram sintetizados e formados em dúplex. Um total de 26 oligos de siRNA derivados de TTR de rato de senso e 26 antissenso foi sintetizado e formado em dúplex. Dúplexes incluíam os oligos que são apresentados nas tabelas 2-4 (TTR humano) e Tabelas 5-7 (TTR de rato).

Tabela 2. Números de identificação para dsRNAs de TTR humana

Vide Tabela 4 quanto a sequências e modificações de oligo.

Nº do Dúplex	Nº Oligo Senso	Nº Oligo Antissenso
AD-18243	A-32153	A-32154
AD-18244	A-32155	A-32156
AD-18245	A-32157	A-32158
AD-18246	A-32159	A-32160

N° do Dúplex	N° Oligo Senso	N° Oligo Antissenso
AD-18247	A-32163	A-32164
AD-18248	A-32165	A-32166
AD-18249	A-32167	A-32168
AD-18250	A-32169	A-32170
AD-18251	A-32171	A-32172
AD-18252	A-32175	A-32176
AD-18253	A-32177	A-32178
AD-18254	A-32179	A-32180
AD-18255	A-32181	A-32182
AD-18256	A-32183	A-32184
AD-18257	A-32187	A-32188
AD-18258	A-32189	A-32190
AD-18259	A-32191	A-32192
AD-18260	A-32193	A-32194
AD-18261	A-32195	A-32196
AD-18262	A-32199	A-32200
AD-18263	A-32201	A-32202
AD-18264	A-32203	A-32204
AD-18265	A-32205	A-32206
AD-18266	A-32207	A-32208
AD-18267	A-32211	A-32212
AD-18268	A-32213	A-32214
AD-18269	A-32215	A-32216
AD-18270	A-32217	A-32218
AD-18271	A-32219	A-32220
AD-18272	A-32221	A-32222
AD-18273	A-32223	A-32224
AD-18274	A-32225	A-32226

N° do Dúplex	N° Oligo Senso	N° Oligo Antissenso
AD-18275	A-32227	A-32228
AD-18276	A-32229	A-32230
AD-18277	A-32231	A-32232
AD-18278	A-32233	A-32234
AD-18279	A-32235	A-32236
AD-18280	A-32237	A-32238
AD-18281	A-32239	A-32240
AD-18282	A-32241	A-32242
AD-18283	A-32243	A-32244
AD-18284	A-32247	A-32248
AD-18285	A-32249	A-32250
AD-18286	A-32251	A-32252
AD-18287	A-32253	A-32254
AD-18288	A-32255	A-32256
AD-18289	A-32259	A-32260
AD-18290	A-32261	A-32262
AD-18291	A-32263	A-32264
AD-18292	A-32265	A-32266
AD-18293	A-32267	A-32268
AD-18294	A-32269	A-32270
AD-18295	A-32271	A-32272
AD-18296	A-32273	A-32274
AD-18297	A-32275	A-32276
AD-18298	A-32277	A-32278
AD-18299	A-32279	A-32280
AD-18300	A-32281	A-32282
AD-18301	A-32283	A-32284
AD-18302	A-32285	A-32286

N° do Dúplex	N° Oligo Senso	N° Oligo Antissenso
AD-18303	A-32287	A-32288
AD-18304	A-32289	A-32290
AD-18305	A-32291	A-32292
AD-18306	A-32295	A-32296
AD-18307	A-32297	A-32298
AD-18308	A-32299	A-32300
AD-18309	A-32301	A-32302
AD-18310	A-32303	A-32304
AD-18311	A-32307	A-32308
AD-18312	A-32309	A-32310
AD-18313	A-32311	A-32312
AD-18314	A-32313	A-32314
AD-18315	A-32315	A-32316
AD-18316	A-32319	A-32320
AD-18317	A-32321	A-32322
AD-18318	A-32323	A-32324
AD-18319	A-32325	A-32326
AD-18320	A-32327	A-32328
AD-18321	A-32331	A-32332
AD-18322	A-32333	A-32334
AD-18323	A-32335	A-32336
AD-18324	A-32337	A-32338
AD-18325	A-32339	A-32340
AD-18326	A-32341	A-32342
AD-18327	A-32343	A-32344
AD-18328	A-32345	A-32346
AD-18329	A-32347	A-32348
AD-18330	A-32349	A-32350

N° do Dúplex	N° Oligo Senso	N° Oligo Antissenso
AD-18331	A-32351	A-32352
AD-18332	A-32353	A-32354
AD-18333	A-32355	A-32356
AD-18334	A-32357	A-32358
AD-18335	A-32359	A-32360
AD-18336	A-32363	A-32364
AD-18337	A-32367	A-32368
AD-18338	A-32369	A-32370
AD-18339	A-32371	A-32372
AD-18340	A-32373	A-32374
AD-18341	A-32375	A-32376
AD-18342	A-32379	A-32380
AD-18343	A-32381	A-32382
AD-18344	A-32383	A-32384
AD-18345	A-32385	A-32386
AD-18346	A-32387	A-32388
AD-18347	A-32391	A-32392
AD-18348	A-32393	A-32394
AD-18349	A-32395	A-32396
AD-18350	A-32397	A-32398
AD-18351	A-32399	A-32400
AD-18352	A-32401	A-32402
AD-18353	A-32403	A-32404
AD-18354	A-32405	A-32406
AD-18355	A-32407	A-32408
AD-18356	A-32409	A-32410
AD-18357	A-32411	A-32412
AD-18358	A-32415	A-32416

N° do Dúplex	N° Oligo Senso	N° Oligo Antissenso
AD-18359	A-32417	A-32418
AD-18360	A-32419	A-32420
AD-18361	A-32421	A-32422
AD-18362	A-32423	A-32424
AD-18363	A-32427	A-32428
AD-18364	A-32429	A-32430
AD-18446	A-32161	A-32162
AD-18447	A-32173	A-32174
AD-18448	A-32185	A-32186
AD-18449	A-32197	A-32198
AD-18450	A-32209	A-32210
AD-18451	A-32245	A-32246
AD-18452	A-32257	A-32258
AD-18453	A-32293	A-32294
AD-18454	A-32305	A-32306
AD-18455	A-32317	A-32318
AD-18456	A-32329	A-32330
AD-18457	A-32361	A-32362
AD-18458	A-32365	A-32366
AD-18459	A-32377	A-32378
AD-18460	A-32389	A-32390
AD-18461	A-32401	A-32402
AD-18462	A-32413	A-32414
AD-18463	A-32425	A-32426

Tabela 3A. Sequências de fita de senso e antissenso de dsRNAs de TTR humana

Fita: s=senso; as = antissenso; Posição: posição de base 5' no transcrito (NM_00371.2, SEQ ID NO:1329)

Fita	Posição	Sequência (5' a 3')	SEQ ID NO:	Sequência com sobreposição de dinucleotídeo 3' (5' a 3')	SEQ ID NO:
S	100	CCGGUGAAUCCAAGUGUCC	1	CCGGUGAAUCCAAGUGUCCNN	281
as	118	GGACACUUGGAUUCACCGG	2	GGACACUUGGAUUCACCGGNN	282
S	11	ACUCAUUCUUGGCA GGAUG	3	ACUCAUUCUUGGCA GGAUGNN	283
as	29	CAUCCUGCCAAGAAUGAGU	4	CAUCCUGCCAAGAAUGAGUNN	284
S	111	AAGUGUCCUCUGAUGGUCA	5	AAGUGUCCUCUGAUGGUCA NN	285
as	129	UGACCAUCAGAGGACACUU	6	UGACCAUCAGAGGACACUUNN	286
S	13	UCAUUCUUGGCAGGAUGGC	7	UCAUUCUUGGCAGGAUGGC CNN	287
as	31	GCCAUCCUGCCAAGAAUGA	8	GCCAUCCUGCCAAGAAUGA NN	288
s	130	AAGUUCUAGAUGCUGUCCG	9	AAGUUCUAGAUGCUGUCCG NN	289
as	148	CGGACAGCAUCUAGAACUU	10	CGGACAGCAUCUAGAACUUNN	290
s	132	GUUCUAGAUGCUGUCCGAG	11	GUUCUAGAUGCUGUCCGAG GNN	291
as	150	CUCGGACAGCAUCUAGAAC	12	CUCGGACAGCAUCUAGAAC NN	292
s	135	CUAGAUGCUGUCCGAGGCA	13	CUAGAUGCUGUCCGAGGCA ANN	293
as	153	UGCCUCGGACAGCAUCUAG	14	UGCCUCGGACAGCAUCUAG NN	294
s	138	GAUGCUGUCCGAGGCAGUC	15	GAUGCUGUCCGAGGCAGUC CNN	295

Fita	Posição	Sequência (5' a 3')	SEQ ID NO:	Sequência com sobreposição de dinucleotídeo 3' (5' a 3')	SEQ ID NO:
as	156	GACUGCCUCGGACA GCAUC	16	GACUGCCUCGGACAGCAUC NN	296
s	14	CAUUCUUGGCAGGA UGGCU	17	CAUUCUUGGCAGGAUGGC UNN	297
as	32	AGCCAUCCUGCCAA GAAUG	18	AGCCAUCCUGCCAAGAAUG NN	298
s	140	UGCUGUCCGAGGCA GUCCU	19	UGCUGUCCGAGGCAGUCC UNN	299
as	158	AGGACUGCCUCGGA CAGCA	20	AGGACUGCCUCGGACAGCA NN	300
s	146	CCGAGGCAGUCCUG CCAUC	21	CCGAGGCAGUCCUGCCAU CNN	301
as	164	GAUGGCAGGACUGC CUCGG	22	GAUGGCAGGACUGCCUCG GNN	302
s	152	CAGUCCUGCCAUCA AUGUG	23	CAGUCCUGCCAUAUGUG NN	303
as	170	CACAUUGAUGGCAG GACUG	24	CACAUUGAUGGCAGGACUG NN	304
s	164	CAAUGUGGCCGUGC AUGUG	25	CAAUGUGGCCGUGCAUGU GNN	305
as	182	CACAUGCACGGCCA CAUUG	26	CACAUGCACGGCCACAUUG NN	306
s	178	AUGUGUUCAGAAAG GCUGC	27	AUGUGUUCAGAAAGGCUGC NN	307
as	196	GCAGCCUUUCUGAA CACAU	28	GCAGCCUUUCUGAACACAU NN	308
s	2	CAGAAGUCCACUCAU UCUU	29	CAGAAGUCCACUCAUUCUU NN	309
as	20	AAGAAUGAGUGGAC UUCUG	30	AAGAAUGAGUGGACUUCUG NN	310
s	21	GGCAGGAUGGCUUC UCAUC	31	GGCAGGAUGGCUUCUCAU CNN	311
as	39	GAUGAGAAGCCAUC CUGCC	32	GAUGAGAAGCCAUCCUGCC NN	312

Fita	Posição	Sequência (5' a 3')	SEQ ID NO:	Sequência com sobreposição de dinucleotídeo 3' (5' a 3')	SEQ ID NO:
s	210	GAGCCAUUUGCCUC UGGGA	33	GAGCCAUUUGCCUCUGGG ANN	313
as	228	UCCCAGAGGCAAAU GGCUC	34	UCCCAGAGGCAAAUGGCUC NN	314
s	23	CAGGAUGGCUUCUC AUCGU	35	CAGGAUGGCUUCUCAUCG UNN	315
as	41	ACGAUGAGAAGCCA UCCUG	36	ACGAUGAGAAGCCAUCCUG NN	316
s	24	AGGAUGGCUUCUCA UCGUC	37	AGGAUGGCUUCUCAUCGU CNN	317
as	42	GACGAUGAGAAGCC AUCCU	38	GACGAUGAGAAGCCAUCCU NN	318
s	245	AGAGCUGCAUGGGC UCACA	39	AGAGCUGCAUGGGCUCACA NN	319
as	263	UGUGAGCCCAUGCA GCUCU	40	UGUGAGCCCAUGCAGCUC UNN	320
s	248	GCUGCAUGGGCUCA CAACU	41	GCUGCAUGGGCUCACAACU NN	321
as	266	AGUUGUGAGCCCAU GCAGC	42	AGUUGUGAGCCCAUGCAG CNN	322
s	25	GGAUGGCUUCUCAU CGUCU	43	GGAUGGCUUCUCAUCGUC UNN	323
as	43	AGACGAUGAGAAGC CAUCC	44	AGACGAUGAGAAGCCAUCC NN	324
s	251	GCAUGGGCUCACAA CUGAG	45	GCAUGGGCUCACAACUGAG NN	325
as	269	CUCAGUUGUGAGCC CAUGC	46	CUCAGUUGUGAGCCCAUG CNN	326
s	253	AUGGGCUCACAACU GAGGA	47	AUGGGCUCACAACUGAGGA NN	327
as	271	UCCUCAGUUGUGAG CCCAU	48	UCCUCAGUUGUGAGCCCAU NN	328
s	254	UGGGCUCACAACUG AGGAG	49	UGGGCUCACAACUGAGGA GNN	329

Fita	Posição	Sequência (5' a 3')	SEQ ID NO:	Sequência com sobreposição de dinucleotídeo 3' (5' a 3')	SEQ ID NO:
as	272	CUCCUCAGUUGUGA GCCCA	50	CUCCUCAGUUGUGAGCCCA NN	330
s	270	GAGGAAUUUGUAGA AGGGA	51	GAGGAAUUUGUAGAAGGGA NN	331
as	288	UCCCUUCUACAAAUU CCUC	52	UCCCUUCUACAAAUUCCUC NN	332
s	276	UUUGUAGAAGGGAU AUACA	53	UUUGUAGAAGGGAUUAUACA NN	333
as	294	UGUAUAUCCCUUCU ACAAA	54	UGUAUAUCCCUUCUACAAA NN	334
s	277	UUGUAGAAGGGUAU UACAA	55	UUGUAGAAGGGUAUACAA NN	335
as	295	UUGUAUAUCCCUUC UACAA	56	UUGUAUAUCCCUUCUACAA NN	336
s	278	UGUAGAAGGGUAU ACAAA	57	UGUAGAAGGGUAUACAAA NN	337
as	296	UUUGUAUAUCCCUU CUACA	58	UUUGUAUAUCCCUUCUACA NN	338
s	281	AGAAGGGUAUACAA AGUG	59	AGAAGGGUAUACAAAGUG NN	339
as	299	CACUUUGUAUAUCC CUUCU	60	CACUUUGUAUAUCCCUUCU NN	340
s	295	AAGUGGAAAUAGACA CCAA	61	AAGUGGAAAUAGACACCAA NN	341
as	313	UUGGUGUCUAUUUC CACUU	62	UUGGUGUCUAUUUCCACUU NN	342
s	299	GGAAAUAGACACCAA AUCU	63	GGAAAUAGACACCAAUCU NN	343
as	317	AGAUUUGGUGUCUA UUUCC	64	AGAUUUGGUGUCUAUUUCC NN	344
s	300	GAAAUAGACACCAAA UCUU	65	GAAAUAGACACCAAAUCUU NN	345
as	318	AAGAUUUGGUGUCU AUUUC	66	AAGAUUUGGUGUCUAUUUC NN	346

Fita	Posição	Sequência (5' a 3')	SEQ ID NO:	Sequência com sobreposição de dinucleotídeo 3' (5' a 3')	SEQ ID NO:
s	303	AUAGACACCAAUCU UACU	67	AUAGACACCAAUCU NN	347
as	321	ÁGUAAGAUUUGGUG UCUAU	68	ÁGUAAGAUUUGGUG NN	348
s	304	UAGACACCAAUCU ACUG	69	UAGACACCAAUCU NN	349
as	322	CÁGUAAGAUUUGGU GUCUA	70	CÁGUAAGAUUUGGU NN	350
s	305	AGACACCAAUCU CUGG	71	AGACACCAAUCU NN	351
as	323	CCÁGUAAGAUUUGG UGUCU	72	CCÁGUAAGAUUUGG NN	352
s	317	UUACUGGAAGGCAC UUGGC	73	UUACUGGAAGGCAC CNN	353
as	335	GCCAAGUGCCUCC ÁGUAA	74	GCCAAGUGCCUCC NN	354
s	32	UUCUCAUCGUCUGC UCCUC	75	UUCUCAUCGUCUGC NN	355
as	50	GAGGAGCAGACGAU GAGAA	76	GAGGAGCAGACGAU NN	356
s	322	GGAAGGCACUUGGC AUCUC	77	GGAAGGCACUUGGC CNN	357
as	340	GAGAUGCCAAGUGC CUUCC	78	GAGAUGCCAAGUGC NN	358
s	326	GGCACUUGGCAUCU CCCCA	79	GGCACUUGGCAUCU NN	359
as	344	UGGGGAGAUGCCAA GUGCC	80	UGGGGAGAUGCCAA CNN	360
s	333	GGCAUCUCCCCAUU CCAUG	81	GGCAUCUCCCCAUU NN	361
as	351	AUGGAAUGGGGAGA UGCCTT	82	AUGGAAUGGGGAGA TNN	362
s	334	GCAUCUCCCCAUUC CAUGA	83	GCAUCUCCCCAUUC NN	363

Fita	Posição	Sequência (5' a 3')	SEQ ID NO:	Sequência com sobreposição de dinucleotídeo 3' (5' a 3')	SEQ ID NO:
as	352	UCAUGGAAUGGGGA GAUGC	84	UCAUGGAAUGGGGAGAUG CNN	364
s	335	CAUCUCCCCAUUCCA UGAG	85	CAUCUCCCCAUUCCAUGAG NN	365
as	353	CUCAUGGAAUGGGG AGAUG	86	CUCAUGGAAUGGGGAGAU GNN	366
s	336	AUCUCCCCAUUCCA GAGC	87	AUCUCCCCAUUCCAUGAGC NN	367
as	354	GCUCAUGGAAUGGG GAGAU	88	GCUCAUGGAAUGGGGAGA UNN	368
s	338	CUCCCCAUUCCAUG AGCAU	89	CUCCCCAUUCCAUGAGCAU NN	369
as	356	AUGCUC AUGGAAUG GGGAG	90	AUGCUC AUGGAAUGGGGA GNN	370
s	341	CCCAU UCCAUGAGC AUGCA	91	CCCAU UCCAUGAGCAUGCA NN	371
as	359	UGCAUGCUC AUGGA AUGGG	92	UGCAUGCUC AUGGAAUGG GNN	372
s	347	CCAUGAGCAUGCAG AGGUG	93	CCAUGAGCAUGCAGAGGU GNN	373
as	365	CACCUCUGCAUGCU CAUGG	94	CACCUCUGCAUGCUAUGG NN	374
s	352	AGCAUGCAGAGGUG GUAUU	95	AGCAUGCAGAGGUGGUAU UNN	375
as	370	AAUACCACCUCUGCA UGCU	96	AAUACCACCUCUGCAUGCU NN	376
s	354	CAUGCAGAGGUGGU AUUCA	97	CAUGCAGAGGUGGUAUUCA NN	377
as	372	UGAAUACCACCUCU GCAUG	98	UGAAUACCACCUCUGCAUG NN	378
s	355	AUGCAGAGGUGGUA UUCAC	99	AUGCAGAGGUGGUAUUCAC NN	379
as	373	GUGAAUACCACCUC UGCAU	100	GUGAAUACCACCUCUGCAU NN	380

Fita	Posição	Sequência (5' a 3')	SEQ ID NO:	Sequência com sobreposição de dinucleotídeo 3' (5' a 3')	SEQ ID NO:
s	362	GGUGGUAUUCACAG CCAAC	101	GGUGGUAUUCACAGCCAAC NN	381
as	380	GUUGGCUGUGAAUA CCACC	102	GUUGGCUGUGAAUACCACC NN	382
s	363	GUGGUAUUCACAGC CAACG	103	GUGGUAUUCACAGCCAACG NN	383
as	381	CGUUGGCUGUGAAU ACCAC	104	CGUUGGCUGUGAAUACCAC NN	384
s	364	UGGUAUUCACAGCC AACGA	105	UGGUAUUCACAGCCAACGA NN	385
as	382	UCGUUGGCUGUGAA UACCA	106	UCGUUGGCUGUGAAUACCA NN	386
s	365	GGUAUUCACAGCCA ACGAC	107	GGUAUUCACAGCCAACGAC NN	387
as	383	GUCGUUGGCUGUGA AUACC	108	GUCGUUGGCUGUGAAUAC CNN	388
s	366	GUAUUCACAGCCAAC GACU	109	GUAUUCACAGCCAACGACU NN	389
as	384	AGUCGUUGGCUGUG AAUAC	110	AGUCGUUGGCUGUGAAUA CNN	390
s	367	UAUUCACAGCCAACG ACUC	111	UAUUCACAGCCAACGACUC NN	391
as	385	GAGUCGUUGGCUGU GAAUA	112	GAGUCGUUGGCUGUGAAU ANN	392
s	370	UCACAGCCAACGACU CCGG	113	UCACAGCCAACGACUCCGG NN	393
as	388	CCGGAGUCGUUGGC UGUGA	114	CCGGAGUCGUUGGCUGUG ANN	394
s	390	CCCCGCCGCUACAC CAUUG	115	CCCCGCCGCUACACCAUUG NN	395
as	408	CAAUGGUGUAGCGG CGGGG	116	CAAUGGUGUAGCGGCGGG GNN	396
s	4	GAAGUCCACUCAUU CUUGG	117	GAAGUCCACUCAUUCUUGG NN	397

Fita	Posição	Sequência (5' a 3')	SEQ ID NO:	Sequência com sobreposição de dinucleotídeo 3' (5' a 3')	SEQ ID NO:
as	22	CCAAGAAUGAGUGG ACUUC	118	CCAAGAAUGAGUGGACUUC NN	398
s	412	CCCUGCUGAGCCCC UACUC	119	CCCUGCUGAGCCCCUACUC NN	399
as	430	GÁGUAGGGGCUCAG CAGGG	120	GÁGUAGGGGCUCAGCAGG GNN	400
s	417	CUGAGCCCCUACUC CUAUU	121	CUGAGCCCCUACUCCUAUU NN	401
as	435	AAUAGGÁGUAGGG CUCAG	122	AAUAGGÁGUAGGGGCUCA GNN	402
s	418	UGAGCCCCUACUCC UAUUC	123	UGAGCCCCUACUCCUAUUC NN	403
as	436	GAAUAGGÁGUAGGG GCUCA	124	GAAUAGGÁGUAGGGGCUC ANN	404
s	422	CCCCUACUCCUAUU CCACC	125	CCCCUACUCCUAUUCCACC NN	405
as	440	GGUGGAAUAGGÁGU AGGGG	126	GGUGGAAUAGGÁGUAGGG GNN	406
s	425	CUACUCCUAUUCCAC CACG	127	CUACUCCUAUUCCACCACG NN	407
as	443	CGUGGUGGAAUAGG ÁGUAG	128	CGUGGUGGAAUAGGÁGUA GNN	408
s	426	UACUCCUAUUCCACC ACGG	129	UACUCCUAUUCCACCACGG NN	409
as	444	CCGUGGUGGAAUAG GÁGUA	130	CCGUGGUGGAAUAGGÁGU ANN	410
s	427	ACUCCUAUUCCACCA CGGC	131	ACUCCUAUUCCACCACGGC NN	411
as	445	GCCGUGGUGGAAUA GGAGU	132	GCCGUGGUGGAAUAGGAG UNN	412
s	429	UCCUAUUCCACCAC GGCUG	133	UCCUAUUCCACCACGGCUG NN	413
as	447	CAGCCGUGGUGGAA UAGGA	134	CAGCCGUGGUGGAAUAGG ANN	414

Fita	Posição	Sequência (5' a 3')	SEQ ID NO:	Sequência com sobreposição de dinucleotídeo 3' (5' a 3')	SEQ ID NO:
s	432	UAUUCCACCACGGC UGUCG	135	UAUUCCACCACGGCUGUCG NN	415
as	450	CGACAGCCGUGGUG GAAUA	136	CGACAGCCGUGGUGGAAU ANN	416
s	433	AUUCCACCACGGCU GUCGU	137	AUUCCACCACGGCUGUCGU NN	417
as	451	ACGACAGCCGUGGU GGAU	138	ACGACAGCCGUGGUGGAA UNN	418
s	437	CACCACGGCUGUCG UCACC	139	CACCACGGCUGUCGUCACC NN	419
as	455	GGUGACGACAGCCG UGGUG	140	GGUGACGACAGCCGUGGU GNN	420
s	438	ACCACGGCUGUCGU CACCA	141	ACCACGGCUGUCGUCACCA NN	421
as	456	UGGUGACGACAGCC GUGGU	142	UGGUGACGACAGCCGUGG UNN	422
s	439	CCACGGCUGUCGUC ACCAA	143	CCACGGCUGUCGUCACCAA NN	423
as	457	UUGGUGACGACAGC CGUGG	144	UUGGUGACGACAGCCGUG GNN	424
s	441	ACGGCUGUCGUCAC CAAUC	145	ACGGCUGUCGUCACCAAUC NN	425
as	459	GAUUGGUGACGACA GCCGU	146	GAUUGGUGACGACAGCCG UNN	426
s	442	CGGCUGUCGUCACC AAUCC	147	CGGCUGUCGUCACCAAUCC NN	427
as	460	GGAUUGGUGACGAC AGCCG	148	GGAUUGGUGACGACAGCC GNN	428
s	449	CGUCACCAAUCCCAA GGAA	149	CGUCACCAAUCCCAAGGAA NN	429
as	467	UUCCUUGGGAUUGG UGACG	150	UUCCUUGGGAUUGGUGAC GNN	430
s	455	CAAUCCCAAGGAAUG AGGG	151	CAAUCCCAAGGAAUGAGGG NN	431

Fita	Posição	Sequência (5' a 3')	SEQ ID NO:	Sequência com sobreposição de dinucleotídeo 3' (5' a 3')	SEQ ID NO:
as	473	CCCUCAUUCCUUGG GAUUG	152	CCCUCAUUCCUUGGGAUU GNN	432
s	491	CCUGAAGGACGAGG GAUGG	153	CCUGAAGGACGAGGGAUG GNN	433
as	509	CCAUCCCUCGUCCU UCAGG	154	CCAUCCCUCGUCCUUCAGG NN	434
s	497	GGACGAGGGAUGGG AUUUC	155	GGACGAGGGAUGGGAUUU CNN	435
as	515	GAAAUCCCAUCCCUC GUCC	156	GAAAUCCCAUCCCUCGUCC NN	436
s	5	AAGUCCACUCAUUCU UGGC	157	AAGUCCACUCAUUCUUGGC NN	437
as	23	GCCAAGAAUGAGUG GACUU	158	GCCAAGAAUGAGUGGACUU NN	438
s	508	GGGAUUUCAUGUAA CCAAG	159	GGGAUUUCAUGUAACCAAG NN	439
as	526	CUUGGUUACAUGAA AUCCC	160	CUUGGUUACAUGAAAUCCC NN	440
s	509	GGAUUUCAUGUAAC CAAGA	161	GGAUUUCAUGUAACCAAGA NN	441
as	527	UCUUGGUUACAUGA AAUCC	162	UCUUGGUUACAUGAAAUCC NN	442
s	514	UCAUGUAACCAAGÁG UAUU	163	UCAUGUAACCAAGÁGUAUU NN	443
as	532	AAUACUCUUGGUUA CAUGA	164	AAUACUCUUGGUUACAUGA NN	444
s	516	AUGUAACCAAGÁGUA UUCC	165	AUGUAACCAAGÁGUAUUCC NN	445
as	534	GGAAUACUCUUGGU UACAU	166	GGAAUACUCUUGGUUACAU NN	446
s	517	UGUAACCAAGÁGUAU UCCA	167	UGUAACCAAGÁGUAUCCA NN	447
as	535	UGGAAUACUCUUGG UUACA	168	UGGAAUACUCUUGGUUACA NN	448

Fita	Posição	Sequência (5' a 3')	SEQ ID NO:	Sequência com sobreposição de dinucleotídeo 3' (5' a 3')	SEQ ID NO:
s	518	GUAACCAAGÁGUAUU CCAU	169	GUAACCAAGÁGUAUUCCA NN	449
as	536	AUGGAAUACUCUUG GUUAC	170	AUGGAAUACUCUUGGUU NN	450
s	54	UGCCUUGCUGGACU GGUAU	171	UGCCUUGCUGGACUGGUA UNN	451
as	72	AUACCAGUCCAGCAA GGCA	172	AUACCAGUCCAGCAAGGCA NN	452
s	543	UAAAGCAGUGUUUU CACCU	173	UAAAGCAGUGUUUUCACCU NN	453
as	561	AGGUGAAAACACUG CUUUA	174	AGGUGAAAACACUGCUUUA NN	454
s	55	GCCUUGCUGGACUG GUAUU	175	GCCUUGCUGGACUGGUUA UNN	455
as	73	AAUACCAGUCCAGCA AGGC	176	AAUACCAGUCCAGCAAGGC NN	456
s	551	UGUUUUCACCUCAU AUGCU	177	UGUUUUCACCUCAUAUGCU NN	457
as	569	AGCAUAUGAGGUGA AAACA	178	AGCAUAUGAGGUGAAAACA NN	458
s	552	GUUUUCACCUCAUA UGCUA	179	GUUUUCACCUCAUAUGCUA NN	459
as	570	UAGCAUAUGAGGUG AAAAC	180	UAGCAUAUGAGGUGAAAAC NN	460
s	553	UUUUCACCUCAUAU GCUAU	181	UUUUCACCUCAUAUGCUAU NN	461
as	571	AUAGCAUAUGAGGU GAAAA	182	AUAGCAUAUGAGGUGAAAA NN	462
s	555	UUCACCUCAUAUGC UAUGU	183	UUCACCUCAUAUGCUAUGU NN	463
as	573	ACAUAGCAUAUGAG GUGAA	184	ACAUAGCAUAUGAGGUGAA NN	464
s	557	CACCUCAUAUGCUAU GUUA	185	CACCUCAUAUGCUAUGUUA NN	465

Fita	Posição	Sequência (5' a 3')	SEQ ID NO:	Sequência com sobreposição de dinucleotídeo 3' (5' a 3')	SEQ ID NO:
as	575	UAACAUAGCAUAUGAGGUG	186	UAACAUAGCAUAUGAGGUG NN	466
s	56	CCUUGCUGGACUGGUAUUU	187	CCUUGCUGGACUGGUAUU UNN	467
as	74	AAAUACCAGUCCAGCAAGG	188	AAAUACCAGUCCAGCAAGG NN	468
s	563	AUAUGCUAUGUUAGAAGUC	189	AUAUGCUAUGUUAGAAGUC NN	469
as	581	GACUUCUAACAUAGCAUAU	190	GACUUCUAACAUAGCAUAU NN	470
s	564	UAUGCUAUGUUAGAAGUCC	191	UAUGCUAUGUUAGAAGUCC NN	471
as	582	GGACUUCUAACAUAGCAUA	192	GGACUUCUAACAUAGCAUA NN	472
s	566	UGCUAUGUUAGAAGUCCAG	193	UGCUAUGUUAGAAGUCCAG NN	473
as	584	CUGGACUUCUAACAUAGCA	194	CUGGACUUCUAACAUAGCA NN	474
s	57	CUUGCUGGACUGGUUUUG	195	CUUGCUGGACUGGUUUU GNN	475
as	75	CAAAUACCAGUCCAGCAAG	196	CAAAUACCAGUCCAGCAAG NN	476
s	578	AGUCCAGGCAGAGACAAUA	197	AGUCCAGGCAGAGACAAUA NN	477
as	596	AUUGUCUCUGCCUGGACUTT	198	AUUGUCUCUGCCUGGACUT TNN	478
s	580	UCCAGGCAGAGACAAUAAA	199	UCCAGGCAGAGACAAUAAA NN	479
as	598	UUUAUUGUCUCUGCCUGG	200	UUUAUUGUCUCUGCCUGG ANN	480
s	607	GUGAAAGGCACUUUUCAUU	201	GUGAAAGGCACUUUUCAUU NN	481
as	625	AAUGAAAAGUGCCUUUCAC	202	AAUGAAAAGUGCCUUUCAC NN	482

Fita	Posição	Sequência (5' a 3')	SEQ ID NO:	Sequência com sobreposição de dinucleotídeo 3' (5' a 3')	SEQ ID NO:
s	62	UGGACUGGUUUUG UGUCU	203	UGGACUGGUUUUGUGUC UNN	483
as	80	AGACACAAAUACCAG UCCA	204	AGACACAAAUACCAGUCCA NN	484
s	77	GUCUGAGGCUGGCC CUACG	205	GUCUGAGGCUGGCCCUAC GNN	485
as	95	CGUAGGGCCAGCCU CAGAC	206	CGUAGGGCCAGCCUCAGA CNN	486
s	79	CUGAGGCUGGCCCU ACGGG	207	CUGAGGCUGGCCCUACGG GNN	487
as	97	CCCGUAGGGCCAGC CUCAG	208	CCCGUAGGGCCAGCCUCA GNN	488
s	81	GAGGCUGGCCCUAC GGGCA	209	GAGGCUGGCCCUACGGGC ANN	489
as	99	UGCCCGUAGGGCCA GCCUC	210	UGCCCGUAGGGCCAGCCU CNN	490
s	82	AGGCUGGCCCUACG GGCAC	211	AGGCUGGCCCUACGGGCA CNN	491
as	100	GUGCCCGUAGGGCC AGCCU	212	GUGCCCGUAGGGCCAGCC UNN	492
s	84	GCUGGCCCUACGGG CACCG	213	GCUGGCCCUACGGGCACC GNN	493
as	102	CGGUGCCCGUAGGG CCAGC	214	CGGUGCCCGUAGGGCCAG CNN	494
s	85	CUGGCCCUACGGGC ACCGG	215	CUGGCCCUACGGGCACCG GNN	495
as	103	CCGGUGCCCGUAGG GCCAG	216	CCGGUGCCCGUAGGGCCA GNN	496
s	87	GGCCCUACGGGCAC CGGUG	217	GGCCCUACGGGCACCGGU GNN	497
as	105	CACCGGUGCCCGUA GGGCC	218	CACCGGUGCCCGUAGGGC CNN	498
s	9	CCACUCAUUCUUGG CAGGA	219	CCACUCAUUCUUGGCAGGA NN	499

Fita	Posição	Sequência (5' a 3')	SEQ ID NO:	Sequência com sobreposição de dinucleotídeo 3' (5' a 3')	SEQ ID NO:
as	27	UCCUGCCAAGAAUG AGUGG	220	UCCUGCCAAGAAUGAGUGG NN	500
s	90	CCUACGGGCACCGG UGAAU	221	CCUACGGGCACCGGUGAA UNN	501
as	108	AUUCACCGGUGCCC GUAGG	222	AUUCACCGGUGCCCGUAG GNN	502
s	91	CUACGGGCACCGGU GAAUC	223	CUACGGGCACCGGUGAAU CNN	503
as	109	GAUUCACCGGUGCC CGUAG	224	GAUUCACCGGUGCCCGUA GNN	504
s	92	UACGGGCACCGGUG AAUCC	225	UACGGGCACCGGUGAAUC CNN	505
as	110	GGAUUCACCGGUGC CCGUA	226	GGAUUCACCGGUGCCCGU ANN	506
s	93	ACGGGCACCGGUGA AUCCA	227	ACGGGCACCGGUGAAUCCA NN	507
as	111	UGGAUUCACCGGUG CCCGU	228	UGGAUUCACCGGUGCCCG UNN	508
s	97	GCACCGGUGAAUCC AAGUG	229	GCACCGGUGAAUCCAAGUG NN	509
as	115	CACUUGGAUUCACC GGUGC	230	CACUUGGAUUCACCGGUG CNN	510
s	98	CACCGGUGAAUCCA AGUGU	231	CACCGGUGAAUCCAAGUGU NN	511
as	116	ACACUUGGAUUCAC CGGUG	232	ACACUUGGAUUCACCGGUG NN	512
s	167	UGUGGCCAUGCAUG UGUUC	233	UGUGGCCAUGCAUGUGUU CNN	513
as	185	GAACACAUGCAUGG CCACA	234	GAACACAUGCAUGGCCACA NN	514
s	168	GUGGCCAUGCAUGU GUUCA	235	GUGGCCAUGCAUGUGUUC ANN	515
as	186	UGAACACAUGCAUG GCCAC	236	UGAACACAUGCAUGGCCAC NN	516

Fita	Posição	Sequência (5' a 3')	SEQ ID NO:	Sequência com sobreposição de dinucleotídeo 3' (5' a 3')	SEQ ID NO:
s	171	GCCAUGCAUGUGUU CAGAA	237	GCCAUGCAUGUGUUCAGAA NN	517
as	189	UUCUGAACACAUGCA UGGC	238	UUCUGAACACAUGCAUGGC NN	518
s	432	UAUUCCACCACGGC UGUCA	239	UAUUCCACCACGGCUGUCA NN	519
as	449	UGACAGCCGUGGUG GAAUA	240	UGACAGCCGUGGUGGAAU ANN	520
s	447	GUCAUCACCAAUCCC AAGG	241	GUCAUCACCAAUCCCAAGG NN	521
as	465	CCUUGGGAUUGGUG AUGAC	242	CCUUGGGAUUGGUGAUGA CNN	522
s	115	GUCCUCUGAUGGUC AAAGU	243	GUCCUCUGAUGGUCAAAGU NN	523
as	133	ACUUUGACCAUCAGA GGAC	244	ACUUUGACCAUCAGAGGAC NN	524
s	122	GAUGGUCAAAGUUC UAGAU	245	GAUGGUCAAAGUUCUAGAU NN	525
as	140	AUCUAGAACUUUGAC CAUC	246	AUCUAGAACUUUGACCAUC NN	526
s	139	AUGCUGUCCGAGGC AGUCC	247	AUGCUGUCCGAGGCAGUC CNN	527
as	157	GGACUGCCUCGGAC AGCAU	248	GGACUGCCUCGGACAGCA UNN	528
s	172	CCGUGCAUGUGUUC AGAAA	249	CCGUGCAUGUGUUCAGAAA NN	529
as	190	UUUCUGAACACAUG CACGG	250	UUUCUGAACACAUGCACGG NN	530
s	238	AGUCUGGAGAGCUG CAUGG	251	AGUCUGGAGAGCUGCAUG GNN	531
as	256	CCAUGCAGCUCUCC AGACU	252	CCAUGCAGCUCUCCAGACU NN	532
s	252	CAUGGGCUCACAAC UGAGG	253	CAUGGGCUCACAACUGAGG NN	533

Fita	Posição	Sequência (5' a 3')	SEQ ID NO:	Sequência com sobreposição de dinucleotídeo 3' (5' a 3')	SEQ ID NO:
as	270	CCUCAGUUGUGAGC CCAUG	254	CCUCAGUUGUGAGCCCAU GNN	534
s	33	UCUCAUCGUCUGCU CCUCC	255	UCUCAUCGUCUGCUCCUCC NN	535
as	51	GGAGGAGCAGACGA UGAGA	256	GGAGGAGCAGACGAUGAG ANN	536
s	340	CCCCAUUCCAUGAG CAUGC	257	CCCCAUUCCAUGAGCAUGC NN	537
as	358	GCAUGCUCUAUGGAA UGGGG	258	GCAUGCUCUAUGGAAUGGG GNN	538
s	421	GCCCCUACUCCUAU UCCAC	259	GCCCCUACUCCUAUCCAC NN	539
as	439	GUGGAAUAGGÁGUA GGGGC	260	GUGGAAUAGGÁGUAGGGG CNN	540
s	431	CUAUUCCACCACGG CUGUC	261	CUAUUCCACCACGGCUGUC NN	541
as	449	GACAGCCGUGGUGG AAUAG	262	GACAGCCGUGGUGGAAUA GNN	542
s	440	CACGGCUGUCGUCA CCAAU	263	CACGGCUGUCGUCACCAAU NN	543
as	458	AUUGGUGACGACAG CCGUG	264	AUUGGUGACGACAGCCGU GNN	544
s	496	AGGACGAGGGAUGG GAUUU	265	AGGACGAGGGAUGGGAUU UNN	545
as	514	AAAUCCCAUCCCUCG UCCU	266	AAAUCCCAUCCCUCGUCCU NN	546
s	556	UCACCUCAUAUGCUA UGUU	267	UCACCUCAUAUGCUAUGUU NN	547
as	574	AACAUAGCAUAUGAG GUGA	268	AACAUAGCAUAUGAGGUGA NN	548
s	559	CCUCAUAUGCUAUG UUAGA	269	CCUCAUAUGCUAUGUUAGA NN	549
as	577	UCUAACAUAGCAUAU GAGG	270	UCUAACAUAGCAUAUGAGG NN	550

Fita	Posição	Sequência (5' a 3')	SEQ ID NO:	Sequência com sobreposição de dinucleotídeo 3' (5' a 3')	SEQ ID NO:
s	570	AUGUUAGAAGUCCA GGCAG	271	AUGUUAGAAGUCCAGGCAG NN	551
as	588	CUGCCUGGACUUCU AACAU	272	CUGCCUGGACUUCUAACAU NN	552
s	78	UCUGAGGCUGGCCC UACGG	273	UCUGAGGCUGGCCCACG GNN	553
as	96	CCGUAGGGCCAGCC UCAGA	274	CCGUAGGGCCAGCCUCAG ANN	554
s	87	GGCCCUACGGGCAC CGGUG	275	GGCCCUACGGGCACCGGU GNN	555
as	105	CACCGGUGCCCGUA GGGCC	276	CACCGGUGCCCGUAGGGC CNN	556
s	95	GGGCACCGGUGAAU CCAAG	277	GGGCACCGGUGAAUCCAA GNN	557
as	113	CUUGGAUUCACCGG UGCCC	278	CUUGGAUUCACCGGUGCC CNN	558
s	167	CCAUGCAUGUGUUC AGAAA	279	CCAUGCAUGUGUUCAGAAA NN	559
as	185	UUUCUGAACACAUG CAUGG	280	UUUCUGAACACAUGCAUGG NN	560

Tabela 3B. Sequências de fita de senso e antissenso de dsRNAs de TTR humana

Fita: s=senso; as = antissenso; Posição: posição de base 5' no transcrito (NM_00371.2, SEQ ID NO:1329)

Fita	Posição	Sequência com sobreposição de 3'desoxitimidina (5' a 3')	SEQ ID NO:
s	100	CCGGUGAAUCCAAGUGUCCdTdT	561
as	118	GGACACUUGGAUUCACCGGdTdT	562
s	11	ACUCAUUCUUGGCAGGAUGdTdT	563
as	29	CAUCCUGCCAAGAAUGAGUdTdT	564
s	111	AAGUGUCCUCUGAUGGUCAdTdT	565
as	129	UGACCAUCAGAGGACACUdTdT	566

Fita	Posição	Sequência com sobreposição de 3'desoxitimidina (5' a 3')	SEQ ID NO:
s	13	UCAUUCUUGGCAGGAUGGCdTdT	567
as	31	GCCAUCCUGCCAAGAAUGAdTdT	568
s	130	AAGUUCUAGAUGCUGUCCGdTdT	569
as	148	CGGACAGCAUCUAGAACUdTdT	570
s	132	GUUCUAGAUGCUGUCCGAGdTdT	571
as	150	CUCGGACAGCAUCUAGAACdTdT	572
s	135	CUAGAUGCUGUCCGAGGCAdTdT	573
as	153	UGCCUCGGACAGCAUCUAGdTdT	574
s	138	GAUGCUGUCCGAGGCAGUCdTdT	575
as	156	GACUGCCUCGGACAGCAUCdTdT	576
s	14	CAUUCUUGGCAGGAUGGCUdTdT	577
as	32	AGCCAUCCUGCCAAGAAUGdTdT	578
s	140	UGCUGUCCGAGGCAGUCCUdTdT	579
as	158	AGGACUGCCUCGGACAGCAdTdT	580
s	146	CCGAGGCAGUCCUGCCAUCdTdT	581
as	164	GAUGGCAGGACUGCCUCGGdTdT	582
s	152	CAGUCCUGCCAUCAAAUGUGdTdT	583
as	170	CACAUUGAUGGCAGGACUGdTdT	584
s	164	CAAUGUGGCCGUGCAUGUGdTdT	585
as	182	CACAUGCACGGCCACAUUGdTdT	586
s	178	AUGUGUUCAGAAAGGCUGCdTdT	587
as	196	GCAGCCUUUCUGAACACAUDdTdT	588
s	2	CAGAAGUCCACUCAUUCUdTdT	589
as	20	AAGAAUGAGUGGACUUCUGdTdT	590
s	21	GGCAGGAUGGCUUCUCAUCdTdT	591
as	39	GAUGAGAAGCCAUCCUGCCdTdT	592
s	210	GAGCCAUUUGCCUCUGGGAdTdT	593
as	228	UCCCAGAGGCCAAAUGGCUCdTdT	594
s	23	CAGGAUGGCUUCUCAUCGUdTdT	595

Fita	Posição	Sequência com sobreposição de 3'desoxitimidina (5' a 3')	SEQ ID NO:
as	41	ACGAUGAGAAGCCAUCCUGdTdT	596
s	24	AGGAUGGCUUCUCAUCGUCdTdT	597
as	42	GACGAUGAGAAGCCAUCCUdTdT	598
s	245	AGAGCUGCAUGGGCUCACAdTdT	599
as	263	UGUGAGCCCAUGCAGCUCUdTdT	600
s	248	GCUGCAUGGGCUCACAACUdTdT	601
as	266	AGUUGUGAGCCCAUGCAGCdTdT	602
s	25	GGAUGGCUUCUCAUCGUCUdTdT	603
as	43	AGACGAUGAGAAGCCAUCCdTdT	604
s	251	GCAUGGGCUCACAACUGAGdTdT	605
as	269	CUCAGUUGUGAGCCCAUGCdTdT	606
s	253	AUGGGCUCACAACUGAGGAdTdT	607
as	271	UCCUCAGUUGUGAGCCCAUdTdT	608
s	254	UGGGCUCACAACUGAGGAGdTdT	609
as	272	CUCCUCAGUUGUGAGCCCAdTdT	610
s	270	GAGGAAUUUGUAGAAGGGAdTdT	611
as	288	UCCCUUCUACAAAUUCCUCdTdT	612
s	276	UUUGUAGAAGGGAUUAUACAdTdT	613
as	294	UGUAUAUCCCUUCUACAAAdTdT	614
s	277	UUGUAGAAGGGAUUAUACAAdTdT	615
as	295	UUGUAUAUCCCUUCUACAAdTdT	616
s	278	UGUAGAAGGGAUUAUACAAdTdT	617
as	296	UUUGUAUAUCCCUUCUACAdTdT	618
s	281	AGAAGGGAUUAUACAAAGUGdTdT	619
as	299	CACUUUGUAUAUCCCUUCUdTdT	620
s	295	AAGUGGAAAUAGACACCAAdTdT	621
as	313	UUGGUGUCUAUUUCCACUdTdT	622
s	299	GGAAAUAGACACCAAAUCUdTdT	623
as	317	AGAUUUGGUGUCUAUUUCCdTdT	624

Fita	Posição	Sequência com sobreposição de 3'desoxitimidina (5' a 3')	SEQ ID NO:
s	300	GAAAUAGACACCAAUCUdTdT	625
as	318	AAGAUUUGGUGUCUAUUUCdTdT	626
s	303	AUAGACACCAAUCUUACUdTdT	627
as	321	ÁGUAAGAUUUGGUGUCUAUdTdT	628
s	304	UAGACACCAAUCUUACUGdTdT	629
as	322	CÁGUAAGAUUUGGUGUCUAdTdT	630
s	305	AGACACCAAUCUUACUGGdTdT	631
as	323	CCÁGUAAGAUUUGGUGUCUdTdT	632
s	317	UUACUGGAAGGCACUUGGCdTdT	633
as	335	GCCAAGUGCCUUCÁGUAdTdT	634
s	32	UUCUCAUCGUCUGCUCCUCdTdT	635
as	50	GAGGAGCAGACGAUGAGAAdTdT	636
s	322	GGAAGGCACUUGGCAUCUCdTdT	637
as	340	GAGAUGCCAAGUGCCUUCdTdT	638
s	326	GGCACUUGGCAUCUCCCCAdTdT	639
as	344	UGGGGAGAUGCCAAGUGCCdTdT	640
s	333	GGCAUCUCCCCAUUCCAUGdTdT	641
as	351	AUGGAAUGGGGAGAUGCCTTdTdT	642
s	334	GCAUCUCCCCAUUCCAUGAdTdT	643
as	352	UCAUGGAAUGGGGAGAUGCdTdT	644
s	335	CAUCUCCCCAUUCCAUGAGdTdT	645
as	353	CUCAUGGAAUGGGGAGAUGdTdT	646
s	336	AUCUCCCCAUUCCAUGAGCdTdT	647
as	354	GCUCAUGGAAUGGGGAGAUdTdT	648
s	338	CUCCCCAUUCCAUGAGCAUdTdT	649
as	356	AUGCUC AUGGAAUGGGGAGdTdT	650
s	341	CCCAUCCAUGAGCAUGCAdTdT	651
as	359	UGCAUGCUC AUGGAAUGGGdTdT	652
s	347	CCAUGAGCAUGCAGAGGUGdTdT	653

Fita	Posição	Sequência com sobreposição de 3'desoxitimidina (5' a 3')	SEQ ID NO:
as	365	CACCUCUGCAUGCUCAUGGdTdT	654
s	352	AGCAUGCAGAGGUGGUAAUdTdT	655
as	370	AAUACCACCUCUGCAUGCUdTdT	656
s	354	CAUGCAGAGGUGGUAAUUCAdTdT	657
as	372	UGAAUACCACCUCUGCAUGdTdT	658
s	355	AUGCAGAGGUGGUAAUUCACdTdT	659
as	373	GUGAAUACCACCUCUGCAUdTdT	660
s	362	GGUGGUAAUUCACAGCCAACdTdT	661
as	380	GUUGGCUGUGAAUACCACCdTdT	662
s	363	GUGGUAAUUCACAGCCAACGdTdT	663
as	381	CGUUGGCUGUGAAUACCACdTdT	664
s	364	UGGUAAUUCACAGCCAACGAdTdT	665
as	382	UCGUUGGCUGUGAAUACCAdTdT	666
s	365	GGUAAUUCACAGCCAACGACdTdT	667
as	383	GUCGUUGGCUGUGAAUACCdTdT	668
s	366	GUAUUCACAGCCAACGACUdTdT	669
as	384	AGUCGUUGGCUGUGAAUACdTdT	670
s	367	UAUUCACAGCCAACGACUCdTdT	671
as	385	GAGUCGUUGGCUGUGAAUAdTdT	672
s	370	UCACAGCCAACGACUCCGGdTdT	673
as	388	CCGGAGUCGUUGGCUGUGAdTdT	674
s	390	CCCCGCCGCUACACCAUUGdTdT	675
as	408	CAAUGGUGUAGCGGCGGGdTdT	676
s	4	GAAGUCCACUCAUUCUUGGdTdT	677
as	22	CCAAGAAUGAGUGGACUUCdTdT	678
s	412	CCCUGCUGAGCCCCUACUCdTdT	679
as	430	GÁGUAGGGGCUCAGCAGGGdTdT	680
s	417	CUGAGCCCCUACUCCUAUdTdT	681
as	435	AAUAGGÁGUAGGGGCUCAGdTdT	682

Fita	Posição	Sequência com sobreposição de 3'desoxitimidina (5' a 3')	SEQ ID NO:
s	418	UGAGCCCCUACUCCUAUUCdTdT	683
as	436	GAAUAGGÁGUAGGGGCUCAdTdT	684
s	422	CCCCUACUCCUAUUCCACCdTdT	685
as	440	GGUGGAAUAGGÁGUAGGGGdTdT	686
s	425	CUACUCCUAUUCCACCACGdTdT	687
as	443	CGUGGUGGAAUAGGÁGUAGdTdT	688
s	426	UACUCCUAUUCCACCACGGdTdT	689
as	444	CCGUGGUGGAAUAGGÁGUAdTdT	690
s	427	ACUCCUAUUCCACCACGGCdTdT	691
as	445	GCCGUGGUGGAAUAGGAGUdTdT	692
s	429	UCCUAUUCCACCACGGCUGdTdT	693
as	447	CAGCCGUGGUGGAAUAGGAdTdT	694
s	432	UAUUCCACCACGGCUGUCGdTdT	695
as	450	CGACAGCCGUGGUGGAAUAdTdT	696
s	433	AUUCCACCACGGCUGUCGUdTdT	697
as	451	ACGACAGCCGUGGUGGAAUdTdT	698
s	437	CACCACGGCUGUCGUCACCdTdT	699
as	455	GGUGACGACAGCCGUGGUGdTdT	700
s	438	ACCACGGCUGUCGUCACCAAdTdT	701
as	456	UGGUGACGACAGCCGUGGUdTdT	702
s	439	CCACGGCUGUCGUCACCAAdTdT	703
as	457	UUGGUGACGACAGCCGUGGdTdT	704
s	441	ACGGCUGUCGUCACCAAUCdTdT	705
as	459	GAUUGGUGACGACAGCCGUdTdT	706
s	442	CGGCUGUCGUCACCAAUCCdTdT	707
as	460	GGAUUGGUGACGACAGCCGdTdT	708
s	449	CGUCACCAAUCCCAAGGAAdTdT	709
as	467	UUCCUUGGGAUUGGUGACGdTdT	710
s	455	CAAUCCCAAGGAAUGAGGGdTdT	711

Fita	Posição	Sequência com sobreposição de 3'desoxitimidina (5' a 3')	SEQ ID NO:
as	473	CCCUCAUUCCUUGGGAUUGdTdT	712
s	491	CCUGAAGGACGAGGGAUGGdTdT	713
as	509	CCAUCCCUCGUCCUUCAGGdTdT	714
s	497	GGACGAGGGAUGGGAUUUCdTdT	715
as	515	GAAAUCCCAUCCCUCGUCCdTdT	716
s	5	AAGUCCACUCAUUCUUGGCdTdT	717
as	23	GCCAAGAAUGAGUGGACUUDdTdT	718
s	508	GGGAUUUCAUGUAACCAAGdTdT	719
as	526	CUUGGUUACAUGAAAUCCdTdT	720
s	509	GGAUUUUCAUGUAACCAAGAdTdT	721
as	527	UCUUGGUUACAUGAAAUCCdTdT	722
s	514	UCAUGUAACCAAGÁGUAAUUDdTdT	723
as	532	AAUACUCUUGGUUACAUGAdTdT	724
s	516	AUGUAACCAAGÁGUAAUUCCdTdT	725
as	534	GGAAUACUCUUGGUUACAUDdTdT	726
s	517	UGUAACCAAGÁGUAAUCCAdTdT	727
as	535	UGGAAUACUCUUGGUUACAdTdT	728
s	518	GUAACCAAGÁGUAAUCCAUdTdT	729
as	536	AUGGAAUACUCUUGGUUACdTdT	730
s	54	UGCCUUGCUGGACUGGUAAUDdTdT	731
as	72	AUACCAGUCCAGCAAGGCAdTdT	732
s	543	UAAAGCAGUGUUUUCACCUdTdT	733
as	561	AGGUGAAAACACUGCUUUAdTdT	734
s	55	GCCUUGCUGGACUGGUAAUUDdTdT	735
as	73	AAUACCAGUCCAGCAAGGCdTdT	736
s	551	UGUUUUCACCUCAUAUGCUdTdT	737
as	569	AGCAUAUGAGGUGAAAACAdTdT	738
s	552	GUUUUUCACCUCAUAUGCUAdTdT	739
as	570	UAGCAUAUGAGGUGAAAACdTdT	740

Fita	Posição	Sequência com sobreposição de 3'desoxitimidina (5' a 3')	SEQ ID NO:
s	553	UUUUCACCUCAUAUGCUAUdTdT	741
as	571	AUAGCAUAUGAGGUGAAAAdTdT	742
s	555	UUCACCUCAUAUGCUAUGUdTdT	743
as	573	ACAUAGCAUAUGAGGUGAAAdTdT	744
s	557	CACCUCAUAUGCUAUGUUAdTdT	745
as	575	UAACAUAGCAUAUGAGGUGdTdT	746
s	56	CCUUGCUGGACUGGUUUUdTdT	747
as	74	AAAUACCAGUCCAGCAAGGdTdT	748
s	563	AUAUGCUAUGUUAGAAGUCdTdT	749
as	581	GACUUCUAACAUAGCAUAdTdT	750
s	564	UAUGCUAUGUUAGAAGUCCdTdT	751
as	582	GGACUUCUAACAUAGCAUAdTdT	752
s	566	UGCUAUGUUAGAAGUCCAGdTdT	753
as	584	CUGGACUUCUAACAUAGCAdTdT	754
s	57	CUUGCUGGACUGGUUUUGdTdT	755
as	75	CAAAUACCAGUCCAGCAAGdTdT	756
s	578	AGUCCAGGCAGAGACAAUAdTdT	757
as	596	AUUGUCUCUGCCUGGACUTTdTdT	758
s	580	UCCAGGCAGAGACAAUAAAAdTdT	759
as	598	UUUAUUUGUCUCUGCCUGGAdTdT	760
s	607	GUGAAAGGCACUUUUCAUAdTdT	761
as	625	AAUGAAAAGUGCCUUUCACdTdT	762
s	62	UGGACUGGUUUUUGUGUCUdTdT	763
as	80	AGACACAAAUACCAGUCCAdTdT	764
s	77	GUCUGAGGCUGGCCCACGdTdT	765
as	95	CGUAGGGCCAGCCUCAGACdTdT	766
s	79	CUGAGGCUGGCCCACGGGdTdT	767
as	97	CCCGUAGGGCCAGCCUCAGdTdT	768
s	81	GAGGCUGGCCCACGGGCAdTdT	769

Fita	Posição	Sequência com sobreposição de 3'desoxitimidina (5' a 3')	SEQ ID NO:
as	99	UGCCCGUAGGGCCAGCCUCdTdT	770
s	82	AGGCUGGCCCACGGGCACdTdT	771
as	100	GUGCCCGUAGGGCCAGCCUdTdT	772
s	84	GCUGGCCCACGGGCACCGdTdT	773
as	102	CGGUGCCCGUAGGGCCAGCdTdT	774
s	85	CUGGCCCACGGGCACCGdTdT	775
as	103	CCGGUGCCCGUAGGGCCAGdTdT	776
s	87	GGCCCUACGGGCACCGGUGdTdT	777
as	105	CACCGGUGCCCGUAGGGCCdTdT	778
s	9	CCACUCAUUCUUGGCAGGAdTdT	779
as	27	UCCUGCCAAGAAUGAGUGGdTdT	780
s	90	CCUACGGGCACCGGUGAAUdTdT	781
as	108	AUUCACCGGUGCCCGUAGGdTdT	782
s	91	CUACGGGCACCGGUGAAUCdTdT	783
as	109	GAUUCACCGGUGCCCGUAGdTdT	784
s	92	UACGGGCACCGGUGAAUCCdTdT	785
as	110	GGAUUCACCGGUGCCCGUAdTdT	786
s	93	ACGGGCACCGGUGAAUCCAdTdT	787
as	111	UGGAUUCACCGGUGCCCGUdTdT	788
s	97	GCACCGGUGAAUCCAAGUGdTdT	789
as	115	CACUUGGAUUCACCGGUGCdTdT	790
s	98	CACCGGUGAAUCCAAGUGUdTdT	791
as	116	ACACUUGGAUUCACCGGUGdTdT	792
s	167	UGUGGCCAUGCAUGUGUUCdTdT	793
as	185	GAACACAUGCAUGGCCACAdTdT	794
s	168	GUGGCCAUGCAUGUGUUCAdTdT	795
as	186	UGAACACAUGCAUGGCCACdTdT	796
s	171	GCCAUGCAUGUGUUCAGAAdTdT	797
as	189	UUCUGAACACAUGCAUGGCdTdT	798

Fita	Posição	Sequência com sobreposição de 3'desoxitimidina (5' a 3')	SEQ ID NO:
s	432	UAUUCCACCACGGCUGUCAdTdT	799
as	449	UGACAGCCGUGGUGGAAUAdTdT	800
s	447	GUCAUCACCAAUCCCAAGGdTdT	801
as	465	CCUUGGGAUUGGUGAUGACdTdT	802
s	115	GUCCUCUGAUGGUCAAAGUdTdT	803
as	133	ACUUUGACCAUCAGAGGACdTdT	804
s	122	GAUGGUCAAAGUUCUAGAAdTdT	805
as	140	AUCUAGAACUUUGACCAUCdTdT	806
s	139	AUGCUGUCCGAGGCAGUCCdTdT	807
as	157	GGACUGCCUCGGACAGCAUdTdT	808
s	172	CCGUGCAUGUGUUCAGAAAdTdT	809
as	190	UUUCUGAACACAUGCACGGdTdT	810
s	238	AGUCUGGAGAGCUGCAUGGdTdT	811
as	256	CCAUGCAGCUCUCCAGACUdTdT	812
s	252	CAUGGGCUCACAACUGAGGdTdT	813
as	270	CCUCAGUUGUGAGCCCAUGdTdT	814
s	33	UCUCAUCGUCUGCUCCUCCdTdT	815
as	51	GGAGGAGCAGACGAUGAGAdTdT	816
s	340	CCCCAUUCCAUGAGCAUGCdTdT	817
as	358	GCAUGCUC AUGGAAUGGGGdTdT	818
s	421	GCCCCUACUCCUAUUCCACdTdT	819
as	439	GUGGAAUAGGÁGUAGGGGCdTdT	820
s	431	CUAUUCCACCACGGCUGUCdTdT	821
as	449	GACAGCCGUGGUGGAAUAGdTdT	822
s	440	CACGGCUGUCGUCACCAAUdTdT	823
as	458	AUUGGUGACGACAGCCGUGdTdT	824
s	496	AGGACGAGGGAUGGGAUUUdTdT	825
as	514	AAAUCCCAUCCCUCCUCCUdTdT	826
s	556	UCACCUCAUAUGCUAUGUUdTdT	827

Fita	Posição	Sequência com sobreposição de 3'desoxitimidina (5' a 3')	SEQ ID NO:
as	574	AACAUAGCAUAUGAGGUGAdTdT	828
s	559	CCUCAUAUGCUAUGUUAGAdTdT	829
as	577	UCUAACAUAGCAUAUGAGGdTdT	830
s	570	AUGUUAGAAGUCCAGGCAGdTdT	831
as	588	CUGCCUGGACUUCUAACAUDTdT	832
s	78	UCUGAGGCUGGCCCACGGdTdT	833
as	96	CCGUAGGGCCAGCCUCAGAdTdT	834
s	87	GGCCCUACGGGCACCGGUGdTdT	835
as	105	CACCGGUGCCCGUAGGGCCdTdT	836
s	95	GGGCACCGGUGAAUCCAAGdTdT	837
as	113	CUUGGAUUCACCGGUGCCCdTdT	838
s	167	CCAUGCAUGUGUUCAGAAAdTdT	839
as	185	UUUCUGAACACAUGCAUGGdTdT	840

Tabela 4. Sequências de fita de senso e antissenso quimicamente modificadas de dsRNAs de TTR Humana

Vide tabela 2 quanto ao número do dúplice. Fita: s=senso; as = antissenso; Posição: posição de base 5' no transcrito (NM_00371.2, SEQ ID NO:1329)

Fita	Oligo No.	Posição	Sequência(5' a 3')	SEQ ID NO:
s	A-32153	100	ccGGuGA AUccAAGuGuccdTdT	841
as	A-32154	118	GGAcACUUGGAUUCACCGGdTdT	842
s	A-32155	11	AcucAuucuuGGcAGGAuGdTdT	843
as	A-32156	29	cAUCCUGCcAAGAAUGAGUdTdT	844
s	A-32157	111	AAGuGuccucuGAuGGucAdTdT	845
as	A-32158	129	UGACcAUcAGAGGAcACUUDTdT	846
s	A-32163	13	ucAuucuuGGcAGGAuGGcdTdT	847
as	A-32164	31	GCcAUCCUGCcAAGAAUGAdTdT	848
s	A-32165	130	AAGuucuAGAuGcuGuccGdTdT	849

Fita	Oligo No.	Posição	Sequência(5' a 3')	SEQ ID NO:
as	A-32166	148	CGGAcAGcAUCuAGAACUdTdT	850
s	A-32167	132	GuucuAGAuGcuGuccGAGdTdT	851
as	A-32168	150	CUCGGAcAGcAUCuAGAACdTdT	852
s	A-32169	135	cuAGAuGcuGuccGAGGcAdTdT	853
as	A-32170	153	UGCCUCGGAcAGcAUCuAGdTdT	854
s	A-32171	138	GAuGcuGuccGAGGcAGucdTdT	855
as	A-32172	156	GACUGCCUCGGAcAGcAUCdTdT	856
s	A-32175	14	cAuucuuGGcAGGAuGGcudTdT	857
as	A-32176	32	AGCcAUCCUGCcAAGAAUGdTdT	858
s	A-32177	140	uGcuGuccGAGGcAGuccudTdT	859
as	A-32178	158	AGGACUGCCUCGGAcAGcAdTdT	860
s	A-32179	146	ccGAGGcAGuccuGccAucdTdT	861
as	A-32180	164	GAUGGcAGGACUGCCUCGGdTdT	862
s	A-32181	152	cAGuccuGccAucAAuGuGdTdT	863
as	A-32182	170	cAcAUUGAUGGcAGGACUGdTdT	864
s	A-32183	164	cAAuGuGGccGuGcAuGuGdTdT	865
as	A-32184	182	cAcAUGcACGGCcAcAUUGdTdT	866
s	A-32187	178	AuGuGuucAGAAAGGcuGcdTdT	867
as	A-32188	196	GcAGCCUUUCUGAAcAcAUdTdT	868
s	A-32189	2	cAGAAGuccAcucAuucudTdT	869
as	A-32190	20	AAGAAUGAGUGGACUUCUGdTdT	870
s	A-32191	21	GGcAGGAuGGcuucucAucdTdT	871
as	A-32192	39	GAUGAGAAGCcAUCCUGCCdTdT	872
s	A-32193	210	GAGccAuuuGccucuGGGAdTdT	873
as	A-32194	228	UCCcAGAGGcAAAUGGCUCdTdT	874
s	A-32195	23	cAGGAuGGcuucucAucGudTdT	875
as	A-32196	41	ACGAUGAGAAGCcAUCCUGdTdT	876
s	A-32199	24	AGGAuGGcuucucAucGucdTdT	877
as	A-32200	42	GACGAUGAGAAGCcAUCCUdTdT	878

Fita	Oligo No.	Posição	Sequência(5' a 3')	SEQ ID NO:
s	A-32201	245	AGAGGcuGcAuGGGcucAcAdTdT	879
as	A-32202	263	UGUGAGCCcAUGcAGCUCUdTdT	880
s	A-32203	248	GcuGcAuGGGcucAcAAcudTdT	881
as	A-32204	266	AGUUGUGAGCCcAUGcAGCdTdT	882
s	A-32205	25	GGAuGGcuucucAucGucudTdT	883
as	A-32206	43	AGACGAUGAGAAGCcAUCCdTdT	884
s	A-32207	251	GcAuGGGcucAcAAcuGAGdTdT	885
as	A-32208	269	CUcAGUUGUGAGCCcAUGCdTdT	886
s	A-32211	253	AuGGGcucAcAAcuGAGGAdTdT	887
as	A-32212	271	UCCUcAGUUGUGAGCCcAUdTdT	888
s	A-32213	254	uGGGcucAcAAcuGAGGAGdTdT	889
as	A-32214	272	CUCCUcAGUUGUGAGCCcAdTdT	890
s	A-32215	270	GAGGAAuuuGuAGAAGGGAdTdT	891
as	A-32216	288	UCCCUUCuAcAAAUUCCUCdTdT	892
s	A-32217	276	uuuGuAGAAGGGAuAuAcAdTdT	893
as	A-32218	294	UGuAuAUCCCUUCuAcAAAdTdT	894
s	A-32219	277	uuGuAGAAGGGAuAuAcAAAdTdT	895
as	A-32220	295	UUGuAuAUCCCUUCuAcAAAdTdT	896
s	A-32221	278	uGuAGAAGGGAuAuAcAAAdTdT	897
as	A-32222	296	UUUGuAuAUCCCUUCuAcAdTdT	898
s	A-32223	281	AGAAGGGAuAuAcAAAGuGdTdT	899
as	A-32224	299	cACUUUGuAuAUCCCUUCUdTdT	900
s	A-32225	295	AAGuGGAAAuAGAcAccAAAdTdT	901
as	A-32226	313	UUGGUGUCuAUUUCcACUdTdT	902
s	A-32227	299	GGAAuAGAcAccAAAucudTdT	903
as	A-32228	317	AGAUUUGGUGUCuAUUUCdTdT	904
s	A-32229	300	GAAuAGAcAccAAAucudTdT	905
as	A-32230	318	AAGAUUUGGUGUCuAUUUCdTdT	906
s	A-32231	303	AuAGAcAccAAAucuuAcudTdT	907

Fita	Oligo No.	Posição	Sequência(5' a 3')	SEQ ID NO:
as	A-32232	321	ÁguaAGAUUUGGUGUCuAUdTdT	908
s	A-32233	304	uAGAcAccAAAUcucuAcuGdTdT	909
as	A-32234	322	cÁguaAGAUUUGGUGUCuAdTdT	910
s	A-32235	305	AGAcAccAAAUcucuAcuGGdTdT	911
as	A-32236	323	CcÁguaAGAUUUGGUGUCUdTdT	912
s	A-32237	317	uuAcuGGAAGGcAcuuGGcdTdT	913
as	A-32238	335	GCcAAGUGCCUUCcÁguaAdTdT	914
s	A-32239	32	uucucAucGucuGcuccucdTdT	915
as	A-32240	50	GAGGAGcAGACGAUGAGAAdTdT	916
s	A-32241	322	GGAAGGcAcuuGGcAucucdTdT	917
as	A-32242	340	GAGAUGCcAAGUGCCUUCcTdTdT	918
s	A-32243	326	GGcAcuuGGcAucucucccAdTdT	919
as	A-32244	344	UGGGGAGAUGCcAAGUGCCdTdT	920
s	A-32247	333	GGcAucucucccAuuccAuGdTdT	921
as	A-32248	351	cAUGGAAUGGGGAGAUGCCdTdT	922
s	A-32249	334	GcAucucucccAuuccAuGAdTdT	923
as	A-32250	352	UcAUGGAAUGGGGAGAUGCdTdT	924
s	A-32251	335	cAucucucccAuuccAuGAGdTdT	925
as	A-32252	353	CUcAUGGAAUGGGGAGAUGdTdT	926
s	A-32253	336	AucucucccAuuccAuGAGcdTdT	927
as	A-32254	354	GCUcAUGGAAUGGGGAGAUdTdT	928
s	A-32255	338	cuccccAuuccAuGAGcAudTdT	929
as	A-32256	356	AUGCUcAUGGAAUGGGGAGdTdT	930
s	A-32259	341	cccAuuccAuGAGcAuGcAdTdT	931
as	A-32260	359	UGcAUGCUcAUGGAAUGGGdTdT	932
s	A-32261	347	ccAuGAGcAuGcAGAGGuGdTdT	933
as	A-32262	365	cACCUCUGcAUGCUcAUGGdTdT	934
s	A-32263	352	AGcAuGcAGAGGuGGuAuudTdT	935
as	A-32264	370	AAuACcACCUCUGcAUGCUdTdT	936

Fita	Oligo No.	Posição	Sequência(5' a 3')	SEQ ID NO:
s	A-32265	354	cAuGcAGAGGuGGuAuucAdTdT	937
as	A-32266	372	UGAAuACcACCUCUGcAUGdTdT	938
s	A-32267	355	AuGcAGAGGuGGuAuucAcdTdT	939
as	A-32268	373	GUGAAuACcACCUCUGcAUdTdT	940
s	A-32269	362	GGuGGuAuucAcAGccAAcAcdTdT	941
as	A-32270	380	GUUGGCUGUGAAuACcACCdTdT	942
s	A-32271	363	GuGGuAuucAcAGccAAcGdTdT	943
as	A-32272	381	CGUUGGCUGUGAAuACcACdTdT	944
s	A-32273	364	uGGuAuucAcAGccAAcGAdTdT	945
as	A-32274	382	UCGUUGGCUGUGAAuACcAdTdT	946
s	A-32275	365	GGuAuucAcAGccAAcGAcdTdT	947
as	A-32276	383	GUCGUUGGCUGUGAAuACCdTdT	948
s	A-32277	366	GuAuucAcAGccAAcGAcudTdT	949
as	A-32278	384	AGUCGUUGGCUGUGAAuACdTdT	950
s	A-32279	367	uAuucAcAGccAAcGAcucdTdT	951
as	A-32280	385	GAGUCGUUGGCUGUGAAuAdTdT	952
s	A-32281	370	ucAcAGccAAcGAcuccGGdTdT	953
as	A-32282	388	CCGGAGUCGUUGGCUGUGAdTdT	954
s	A-32283	390	ccccGccGcuAcAccAuuGdTdT	955
as	A-32284	408	cAAUGGUGuAGCGGCGGGGdTdT	956
s	A-32285	4	GAAGuccAcucAuucuuGGdTdT	957
as	A-32286	22	CcAAGAAUGAGUGGACUUCdTdT	958
s	A-32287	412	cccuGcuGAGcccccAcucdTdT	959
as	A-32288	430	GÁguaGGGGCUcAGcAGGGdTdT	960
s	A-32289	417	cuGAGcccccAcuccuAuudTdT	961
as	A-32290	435	AAuAGGÁguaGGGGCUcAGdTdT	962
s	A-32291	418	uGAGcccccAcuccuAuucdTdT	963
as	A-32292	436	GAAuAGGÁguaGGGGCUcAdTdT	964
s	A-32295	422	cccuAcuccuAuuccAccdTdT	965

Fita	Oligo No.	Posição	Sequência(5' a 3')	SEQ ID NO:
as	A-32296	440	GGUGGAAuAGGÁguaGGGGdTdT	966
s	A-32297	425	cuAcuccuAuuccAccAcGdTdT	967
as	A-32298	443	CGUGGUGGAAuAGGÁguaGdTdT	968
s	A-32299	426	uAcuccuAuuccAccAcGGdTdT	969
as	A-32300	444	CCGUGGUGGAAuAGGÁguadTdT	970
s	A-32301	427	AcuccuAuuccAccAcGGcdTdT	971
as	A-32302	445	GCCGUGGUGGAAuAGGAGUdTdT	972
s	A-32303	429	uccuAuuccAccAcGGcuGdTdT	973
as	A-32304	447	cAGCCGUGGUGGAAuAGGAdTdT	974
s	A-32307	432	uAuuccAccAcGGcuGucGdTdT	975
as	A-32308	450	CGAcAGCCGUGGUGGAAuAdTdT	976
s	A-32309	433	AuuccAccAcGGcuGucGudTdT	977
as	A-32310	451	ACGAcAGCCGUGGUGGAAUdTdT	978
s	A-32311	437	cAccAcGGcuGucGucAccdTdT	979
as	A-32312	455	GGUGACGAcAGCCGUGGUGdTdT	980
s	A-32313	438	AccAcGGcuGucGucAccAdTdT	981
as	A-32314	456	UGGUGACGAcAGCCGUGGUdTdT	982
s	A-32315	439	ccAcGGcuGucGucAccAAdTdT	983
as	A-32316	457	UUGGUGACGAcAGCCGUGGdTdT	984
s	A-32319	441	AcGGcuGucGucAccAAucdTdT	985
as	A-32320	459	GAUUGGUGACGAcAGCCGUdTdT	986
s	A-32321	442	cGGcuGucGucAccAAuccdTdT	987
as	A-32322	460	GGAUUGGUGACGAcAGCCGdTdT	988
s	A-32323	449	cGucAccAAucccAAGGAAdTdT	989
as	A-32324	467	UUCUUGGGAUUGGUGACGdTdT	990
s	A-32325	455	cAAucccAAGGAAuGAGGGdTdT	991
as	A-32326	473	CCCUcAUUCUUGGGAUUGdTdT	992
s	A-32327	491	ccuGAAGGAcGAGGGAuGGdTdT	993
as	A-32328	509	CcAUCCCUCGUCCUUCAGGdTdT	994

Fita	Oligo No.	Posição	Sequência(5' a 3')	SEQ ID NO:
s	A-32331	497	GGAcGAGGGAuGGGAuuucdTdT	995
as	A-32332	515	GAAAUCCcAUCCCUCGUCCdTdT	996
s	A-32333	5	AAGuccAcucAuucuuGGcdTdT	997
as	A-32334	23	GCcAAGAAUGAGUGGACUuDdT	998
s	A-32335	508	GGGAuuucAuGuAAccAAGdTdT	999
as	A-32336	526	CUUGGUuAcAUGAAAUCCcdTdT	1000
s	A-32337	509	GGAuuuucAuGuAAccAAGAdTdT	1001
as	A-32338	527	UCUUGGUuAcAUGAAAUCCdTdT	1002
s	A-32339	514	ucAuGuAAccAAGÁguauudTdT	1003
as	A-32340	532	AAuACUCUUGGUuAcAUGAdTdT	1004
s	A-32341	516	AuGuAAccAAGÁguauuccdTdT	1005
as	A-32342	534	GGAAuACUCUUGGUuAcAUdTdT	1006
s	A-32343	517	uGuAAccAAGÁguauuccAdTdT	1007
as	A-32344	535	UGGAAuACUCUUGGUuAcAdTdT	1008
s	A-32345	518	GuAAccAAGÁguauuccAudTdT	1009
as	A-32346	536	AUGGAAuACUCUUGGUuACdTdT	1010
s	A-32347	54	uGccuuGcuGGAcuGGuAudTdT	1011
as	A-32348	72	AuACcAGUCcAGcAAGGcAdTdT	1012
s	A-32349	543	uAAAGcAGuGuuuucAccudTdT	1013
as	A-32350	561	AGGUGAAAACUGCUUuAdTdT	1014
s	A-32351	55	GccuuGcuGGAcuGGuAuudTdT	1015
as	A-32352	73	AAuACcAGUCcAGcAAGGCdTdT	1016
s	A-32353	551	uGuuuucAccucAuAuGcudTdT	1017
as	A-32354	569	AGcAuAUGAGGUGAAAACdTdT	1018
s	A-32355	552	GuuuucAccucAuAuGcuAdTdT	1019
as	A-32356	570	uAGcAuAUGAGGUGAAAACdTdT	1020
s	A-32357	553	uuuucAccucAuAuGcuAudTdT	1021
as	A-32358	571	AuAGcAuAUGAGGUGAAAAdTdT	1022
s	A-32359	555	uucAccucAuAuGcuAuGudTdT	1023

Fita	Oligo No.	Posição	Sequência(5' a 3')	SEQ ID NO:
as	A-32360	573	AcAuAGcAuAUGAGGUGAAAdTdT	1024
s	A-32363	557	cAccucAuAuGcuAuGuuAdTdT	1025
as	A-32364	575	uAAcAuAGcAuAUGAGGUGdTdT	1026
s	A-32367	56	ccuuGcuGGAcuGGuAuuudTdT	1027
as	A-32368	74	AAAuACcAGUCcAGcAAGGdTdT	1028
s	A-32369	563	AuAuGcuAuGuuAGAAGucdTdT	1029
as	A-32370	581	GACUUCuAAcAuAGcAuAUdTdT	1030
s	A-32371	564	uAuGcuAuGuuAGAAGuccdTdT	1031
as	A-32372	582	GGACUUCuAAcAuAGcAuAdTdT	1032
s	A-32373	566	uGcuAuGuuAGAAGuccAGdTdT	1033
as	A-32374	584	CUGGACUUCuAAcAuAGcAdTdT	1034
s	A-32375	57	cuuGcuGGAcuGGuAuuuGdTdT	1035
as	A-32376	75	cAAAuACcAGUCcAGcAAGdTdT	1036
s	A-32379	578	AGuccAGGcAGAGAcAAuAdTdT	1037
as	A-32380	596	uAUUGUCUCUGCCUGGACUdTdT	1038
s	A-32381	580	uccAGGcAGAGAcAAuAAAdTdT	1039
as	A-32382	598	UUuAUUGUCUCUGCCUGGAdTdT	1040
s	A-32383	607	GuGAAAGGcAcuuuucAuudTdT	1041
as	A-32384	625	AAUGAAAAGUGCCUUUcACdTdT	1042
s	A-32385	62	uGGAcuGGuAuuuGuGucudTdT	1043
as	A-32386	80	AGAcAcAAAuACcAGUCcAdTdT	1044
s	A-32387	77	GucuGAGGcuGGcccuAcGdTdT	1045
as	A-32388	95	CGuAGGGCcAGCCUcAGACdTdT	1046
s	A-32391	79	cuGAGGcuGGcccuAcGGGdTdT	1047
as	A-32392	97	CCCGuAGGGCcAGCCUcAGdTdT	1048
s	A-32393	81	GAGGcuGGcccuAcGGGcAdTdT	1049
as	A-32394	99	UGCCCGuAGGGCcAGCCUCdTdT	1050
s	A-32395	82	AGGcuGGcccuAcGGGcAcTdTdT	1051
as	A-32396	100	GUGCCCGuAGGGCcAGCCUdTdT	1052

Fita	Oligo No.	Posição	Sequência(5' a 3')	SEQ ID NO:
s	A-32397	84	GcuGGcccuAcGGGcAccGdTdT	1053
as	A-32398	102	CGGUGCCCGuAGGGCcAGCdTdT	1054
s	A-32399	85	cuGGcccuAcGGGcAccGGdTdT	1055
as	A-32400	103	CCGGUGCCCGuAGGGCcAGdTdT	1056
s	A-32401	87	GGcccuAcGGGcAccGGuGdTdT	1057
as	A-32402	105	cACCGGUGCCCGuAGGGCCdTdT	1058
s	A-32403	9	ccAcucAuucuuGGcAGGAdTdT	1059
as	A-32404	27	UCCUGCcAAGAAUGAGUGGdTdT	1060
s	A-32405	90	ccuAcGGGcAccGGuGAAudTdT	1061
as	A-32406	108	AUUcACCGGUGCCCGuAGGdTdT	1062
s	A-32407	91	cuAcGGGcAccGGuGAAucdTdT	1063
as	A-32408	109	GAUUcACCGGUGCCCGuAGdTdT	1064
s	A-32409	92	uAcGGGcAccGGuGAAuccdTdT	1065
as	A-32410	110	GGAUUcACCGGUGCCCGuAdTdT	1066
s	A-32411	93	AcGGGcAccGGuGAAuccAdTdT	1067
as	A-32412	111	UGGAUUcACCGGUGCCCGUdTdT	1068
s	A-32415	97	GcAccGGuGAAuccAAGuGdTdT	1069
as	A-32416	115	cACUUGGAUUcACCGGUGCdTdT	1070
s	A-32417	98	cAccGGuGAAuccAAGuGudTdT	1071
as	A-32418	116	AcACUUGGAUUcACCGGUGdTdT	1072
s	A-32419	167	uGuGGccAuGcAuGuGuucdTdT	1073
as	A-32420	185	GAAcAcAUGcAUGGCcAcAdTdT	1074
s	A-32421	168	GuGGccAuGcAuGuGuucAdTdT	1075
as	A-32422	186	UGAAcAcAUGcAUGGCcACdTdT	1076
s	A-32423	171	GccAuGcAuGuGuucAGAAdTdT	1077
as	A-32424	189	UUCUGAAcAcAUGcAUGGCdTdT	1078
s	A-32427	432	uAuuccAccAcGGcuGucAdTdT	1079
as	A-32428	449	UGAcAGCCGUGGUGGAuAdTdT	1080
s	A-32429	447	GucAucAccAAucccAAGGdTdT	1081

Fita	Oligo No.	Posição	Sequência(5' a 3')	SEQ ID NO:
as	A-32430	465	CCUUGGGAUUGGUGAUGACdTdT	1082
s	A-32159	115	GuccucuGAuGGucAAAGudTdT	1083
as	A-32160	133	ACUUUGACcAUcAGAGGACdTdT	1084
s	A-32161	122	GAuGGucAAAGuucuAGAudTdT	1085
as	A-32162	140	AUCuAGAACUUUGACcAUCdTdT	1086
s	A-32173	139	AuGcuGuccGAGGcAGuccdTdT	1087
as	A-32174	157	GGACUGCCUCGGAcAGcAUdTdT	1088
s	A-32185	172	ccGuGcAuGuGuucAGAAAdTdT	1089
as	A-32186	190	UUUCUGAAcAcAUGcACGGdTdT	1090
s	A-32197	238	AGucuGGAGAGcuGcAuGGdTdT	1091
as	A-32198	256	CcAUGcAGCUCUCcAGACUdTdT	1092
s	A-32209	252	cAuGGGcucAcAAcuGAGGdTdT	1093
as	A-32210	270	CCUcAGUUGUGAGCCcAUGdTdT	1094
s	A-32245	33	ucucAucGucuGcuccuccdTdT	1095
as	A-32246	51	GGAGGAGcAGACGAUGAGAdTdT	1096
s	A-32257	340	ccccAuuccAuGAGcAuGcdTdT	1097
as	A-32258	358	GcAUGCUCaUGGAAUGGGGdTdT	1098
s	A-32293	421	GccccuAcuccuAuuccAcdTdT	1099
as	A-32294	439	GUGGAAuAGGÁguaGGGGCdTdT	1100
s	A-32305	431	cuAuuccAccAcGGcuGucdTdT	1101
as	A-32306	449	GAcAGCCGUGGUGGAAuAGdTdT	1102
s	A-32317	440	cAcGGcuGucGucAccAAudTdT	1103
as	A-32318	458	AUUGGUGACGAcAGCCGUGdTdT	1104
s	A-32329	496	AGGAcGAGGGAuGGGAuuudTdT	1105
as	A-32330	514	AAAUCCcAUCCCUCGUCCUdTdT	1106
s	A-32361	556	ucAccucAuAuGcuAuGuudTdT	1107
as	A-32362	574	AAcAuAGcAuAUGAGGUGAdTdT	1108
s	A-32365	559	ccucAuAuGcuAuGuuAGAdTdT	1109
as	A-32366	577	UCuAAcAuAGcAuAUGAGGdTdT	1110

Fita	Oligo No.	Posição	Sequência(5' a 3')	SEQ ID NO:
s	A-32377	570	AuGuuAGAAGuccAGGcAGdTdT	1111
as	A-32378	588	CUGCCUGGACUUCuAAcAUdTdT	1112
s	A-32389	78	ucuGAGGcuGGcccuAcGGdTdT	1113
as	A-32390	96	CCGuAGGGCcAGCCUcAGAdTdT	1114
s	A-32401	87	GGcccuAcGGGcAccGGuGdTdT	1115
as	A-32402	105	cACCGGUGCCCGuAGGGCCdTdT	1116
s	A-32413	95	GGGcAccGGuGAAuccAAGdTdT	1117
as	A-32414	113	CUUGGAUUCACCGGUGCCCDdTdT	1118
s	A-32425	167	ccAuGcAuGuGuucAGAAAdTdT	1119
as	A-32426	185	UUUCUGAAcAcAUGcAUGGdTdT	1120

Tabela 5: Números de identificação para dsRNAs de TTR de rato

Vide tabela 7 quanto a sequências.

Dúplex No.	Oligo N° Senso	Oligo N° Antisso
AD-18529	A-32745	A-32746
AD-18530	A-32747	A-32748
AD-18531	A-32749	A-32750
AD-18532	A-32751	A-32752
AD-18533	A-32753	A-32754
AD-18534	A-32755	A-32756
AD-18535	A-32757	A-32758
AD-18536	A-32759	A-32760
AD-18537	A-32761	A-32762
AD-18538	A-32763	A-32764
AD-18539	A-32159	A-32160
AD-18540	A-32765	A-32766
AD-18541	A-32767	A-32768
AD-18542	A-32769	A-32770
AD-18543	A-32771	A-32772

Dúplex No.	Oligo N° Senso	Oligo N° Antisso
AD-18544	A-32773	A-32774
AD-18545	A-32775	A-32776
AD-18546	A-32777	A-32778
AD-18547	A-32779	A-32780
AD-18548	A-32781	A-32782
AD-18549	A-32783	A-32784
AD-18550	A-32785	A-32786
AD-18551	A-32787	A-32788
AD-18552	A-32791	A-32792
AD-18553	A-32793	A-32794
AD-18554	A-32795	A-32796

Tabela 6A. Sequências de fita de senso e antissenso de dsRNAs de TTR de rato

Fita: s=senso; as = antissenso; Posição: posição de base 5' no transcrito (NM_012681.1 SEQ ID NO:1330)

Fita	Posição	Sequência (5' a 3')	SEQ ID NO:	Sequência com sobreposição de dinucleotídeo 3' (5' a 3')	SEQ ID NO:
s	115	GUCCUCUGAUG GUCAAAGU	1121	GUCCUCUGAUGGU CAAAGUNN	1173
as	133	ACUUUGACCAU CAGAGGAC	1122	ACUUUGACCAUCAG AGGACNN	1174
s	537	UUCUUGCUCUA UAAACCGU	1123	UUCUUGCUCUAUAA ACCGUNN	1175
as	555	ACGGUUUAUAG AGCAAGAA	1124	ACGGUUUAUAGAGC AAGAANN	1176
s	543	CUCUAUAAACC GUGUUAGC	1125	CUCUAUAAACCGUG UUAGCNN	1177
as	561	GCUAACACGGU UUAUAGAG	1126	GCUAACACGGUUUA UAGAGNN	1178

Fita	Posição	Sequência (5' a 3')	SEQ ID NO:	Sequência com sobreposição de dinucleotídeo 3' (5' a 3')	SEQ ID NO:
s	392	UCGCCACUACA CCAUCGCA	1127	UCGCCACUACACCA UCGCANN	1179
as	410	UGCGAUGGUGU AGUGGCGA	1128	UGCGAUGGUGUAG UGGCGANN	1180
s	538	UCUUGCUCUAU AAACCGUG	1129	UCUUGCUCUAUAAA CCGUGNN	1181
as	556	CACGGUUUAUA GAGCAAGA	1130	CACGGUUUAUAGAG CAAGANN	1182
s	541	UGCUCUAUAAA CCGUGUUA	1131	UGCUCUAUAAACCG UGUUANN	1183
as	559	UAACACGGUUU AUAGAGCA	1132	UAACACGGUUUAUA GAGCANN	1184
s	532	CAGUGUUCUUG CUCUAUAA	1133	CAGUGUUCUUGCUC UAUAANN	1185
as	550	UUAUAGAGCAA GAACACUG	1134	UUAUAGAGCAAGAA CACUGNN	1186
s	542	GCUCUAUAAAC CGUGUUAG	1135	GCUCUAUAAACCGU GUUAGNN	1187
as	560	CUAACACGGUU UAUAGAGC	1136	CUAACACGGUUUAU AGAGCNN	1188
s	134	CCUGGAUGCUG UCCGAGGC	1137	CCUGGAUGCUGUC CGAGGCNN	1189
as	152	GCCUCGGACAG CAUCCAGG	1138	GCCUCGGACAGCAU CCAGGNN	1190
s	119	UCUGAUGGUCA AAGUCCUG	1139	UCUGAUGGUCAAAG UCCUGNN	1191
as	137	CAGGACUUUGA CCAUCAGA	1140	CAGGACUUUGACCA UCAGANN	1192
s	241	CUGGAGAGCUG CACGGGCU	1141	CUGGAGAGCUGCAC GGGCUNN	1193
as	259	AGCCCGUGCAG CUCUCCAG	1142	AGCCCGUGCAGCUC UCCAGNN	1194

Fita	Posição	Sequência (5' a 3')	SEQ ID NO:	Sequência com sobreposição de dinucleotídeo 3' (5' a 3')	SEQ ID NO:
s	544	UCUAUAAACCG UGUUAGCA	1143	UCUAUAAACCGUGU UAGCANN	1195
as	562	UGCUAACACGG UUUAUAGA	1144	UGCUAACACGGUUU AUAGANN	1196
s	530	AACAGUGUUCU UGCUCUAU	1145	AACAGUGUUCUUGC UCUAUNN	1197
as	548	AUAGAGCAAGA ACACUGUU	1146	AUAGAGCAAGAACA CUGUUNN	1198
s	118	CUCUGAUGGUC AAAGUCCU	1147	CUCUGAUGGUCAAA GUCCUNN	1199
as	136	AGGACUUUGAC CAUCAGAG	1148	AGGACUUUGACCAU CAGAGNN	1200
s	140	UGCUGUCCGAG GCAGCCCU	1149	UGCUGUCCGAGGC AGCCUNN	1201
as	158	AGGGCUGCCUC GGACAGCA	1150	AGGGCUGCCUCGG ACAGCANN	1202
s	239	GUCUGGAGAGC UGCACGGG	1151	GUCUGGAGAGCUG CACGGGNN	1203
as	257	CCCGUGCAGCU CUCCAGAC	1152	CCCGUGCAGCUCUC CAGACNN	1204
s	531	ACAGUGUUCUU GCUCUAUA	1153	ACAGUGUUCUUGCU CUAUANN	1205
as	549	UAUAGAGCAAG AACACUGU	1154	UAUAGAGCAAGAAC ACUGUNN	1206
s	117	CCUCUGAUGGU CAAAGUCC	1155	CCUCUGAUGGUCAA AGUCCNN	1207
as	135	GGACUUUGACC AUCAGAGG	1156	GGACUUUGACCAUC AGAGGNN	1208
s	131	AGUCCUGGAUG CUGUCCGA	1157	AGUCCUGGAUGCU GUCCGANN	1209
as	149	UCGGACAGCAU CCAGGACU	1158	UCGGACAGCAUCCA GGACUNN	1210

Fita	Posição	Sequência (5' a 3')	SEQ ID NO:	Sequência com sobreposição de dinucleotídeo 3' (5' a 3')	SEQ ID NO:
s	217	UUGCCUCUGGG AAGACCGC	1159	UUGCCUCUGGGAA GACCGCNN	1211
as	235	GCGGUCUUCCC AGAGGCAA	1160	GCGGUCUUCCCAGA GGCAANN	1212
s	242	UGGAGAGCUGC ACGGGCUC	1161	UGGAGAGCUGCAC GGGCUCNN	1213
as	260	GAGCCCGUGCA GCUCUCCA	1162	GAGCCCGUGCAGC UCUCCANN	1214
s	244	GAGAGCUGCAC GGGCUCAC	1163	GAGAGCUGCACGG GCUCACNN	1215
as	262	GUGAGCCCGUG CAGCUCUC	1164	GUGAGCCCGUGCA GCUCUCNN	1216
s	246	GAGCUGCACGG GCUCACCA	1165	GAGCUGCACGGGC UCACCANN	1217
as	264	UGGUGAGCCCG UGCAGCUC	1166	UGGUGAGCCCGUG CAGCUCNN	1218
s	399	UACACCAUCGC AGCCUCGC	1167	UACACCAUCGCAGC CCUGCNN	1219
as	417	GCAGGGCUGCG AUGGUGUA	1168	GCAGGGCUGCGAU GGUGUANN	1220
s	132	GUCCUGGAUGC UGUCCGAG	1169	GUCCUGGAUGCUG UCCGAGNN	1221
as	150	CUCGGACAGCA UCCAGGAC	1170	CUCGGACAGCAUCC AGGACNN	1222
s	245	AGAGCUGCACG GGCUCACC	1171	AGAGCUGCACGGG CUCACNN	1223
as	263	GGUGAGCCCGU GCAGCUCU	1172	GGUGAGCCCGUGC AGCUCUNN	1224

Tabela 6B. Sequências de fita de senso e antissenso para dsRNAs de TTR de rato

Fita: s=senso; as = antissenso; Posição: posição de base 5' no transcrito (NM_012681.1 SEQ ID NO:1330)

Fita	Posição	Sequência com sobreposição de 3'desoxitimidina (5' a 3')	SEQ ID NO:
s	115	GUCCUCUGAUGGUCAAAGUdTdT	1225
as	133	ACUUUGACCAUCAGAGGACdTdT	1226
s	537	UUCUUGCUCUAUAAACCGUdTdT	1227
as	555	ACGGUUUAUAGAGCAAGAAdTdT	1228
s	543	CUCUAUAAACCGUGUUAGCdTdT	1229
as	561	GCUAACACGGUUUAUAGAGdTdT	1230
s	392	UCGCCACUACACCAUCGCAdTdT	1231
as	410	UGCGAUGGUGUAGUGGCGAdTdT	1232
s	538	UCUUGCUCUAUAAACCGUGdTdT	1233
as	556	CACGGUUUAUAGAGCAAGAdTdT	1234
s	541	UGCUCUAUAAACCGUGUUAdTdT	1235
as	559	UAACACGGUUUAUAGAGCAdTdT	1236
s	532	CAGUGUUCUUGCUCUAUAAdTdT	1237
as	550	UUAUAGAGCAAGAACACUGdTdT	1238
s	542	GCUCUAUAAACCGUGUUAGdTdT	1239
as	560	CUAACACGGUUUAUAGAGCdTdT	1240
s	134	CCUGGAUGCUGUCCGAGGCdTdT	1241
as	152	GCCUCGGACAGCAUCCAGGdTdT	1242
s	119	UCUGAUGGUCAAAGUCCUGdTdT	1243
as	137	CAGGACUUUGACCAUCAGAdTdT	1244
s	241	CUGGAGAGCUGCACGGGCUdTdT	1245
as	259	AGCCCGUGCAGCUCUCCAGdTdT	1246
s	544	UCUAUAAACCGUGUUAGCAdTdT	1247

Fita	Posição	Sequência com sobreposição de 3'desoxitimidina (5' a 3')	SEQ ID NO:
as	562	UGCUAACACGGUUUAUAGAdTdT	1248
s	530	AACAGUGUUCUUGCUCUAUdTdT	1249
as	548	AUAGAGCAAGAACACUGUUDdTdT	1250
s	118	CUCUGAUGGUCAAAGUCCUdTdT	1251
as	136	AGGACUUUGACCAUCAGAGdTdT	1252
s	140	UGCUGUCCGAGGCAGCCCUdTdT	1253
as	158	AGGGCUGCCUCGGACAGCAdTdT	1254
s	239	GUCUGGAGAGCUGCACGGGdTdT	1255
as	257	CCCGUGCAGCUCUCCAGACdTdT	1256
s	531	ACAGUGUUCUUGCUCUAUAdTdT	1257
as	549	UAUAGAGCAAGAACACUGUdTdT	1258
s	117	CCUCUGAUGGUCAAAGUCCdTdT	1259
as	135	GGACUUUGACCAUCAGAGGdTdT	1260
s	131	AGUCCUGGAUGCUGUCCGAdTdT	1261
as	149	UCGGACAGCAUCCAGGACUdTdT	1262
s	217	UUGCCUCUGGGAAGACCGCdTdT	1263
as	235	GCGGUCUUCCCAGAGGCAAdTdT	1264
s	242	UGGAGAGCUGCACGGGCUCdTdT	1265
as	260	GAGCCCGUGCAGCUCUCCAdTdT	1266
s	244	GAGAGCUGCACGGGCUCACdTdT	1267
as	262	GUGAGCCCGUGCAGCUCUCdTdT	1268
s	246	GAGCUGCACGGGCUCACCAAdTdT	1269
as	264	UGGUGAGCCCGUGCAGCUCdTdT	1270
s	399	UACACCAUCGCAGCCCUGCdTdT	1271
as	417	GCAGGGCUGCGAUGGUGUAdTdT	1272
s	132	GUCCUGGAUGCUGUCCGAGdTdT	1273
as	150	CUCGGACAGCAUCCAGGACdTdT	1274

Fita	Posição	Sequência com sobreposição de 3'desoxitimidina (5' a 3')	SEQ ID NO:
s	245	AGAGCUGCACGGGCUCACcdTdT	1275
as	263	GGUGAGCCCGUGCAGCUCUdTdT	1276

Tabela 7. Sequências de fita de senso e antissenso quimicamente modificadas para dsRNAs de TTR de rato

Vide tabela 5 quanto ao N° do dúplex (nome do dsRNA). Fita: s=senso; as = antissenso; Posição: posição de base 5' no transcrito (NM_012681.1 SEQ ID NO:1330)

Fita	Oligo No.	Posição	Sequência (5' a 3')	SEQ ID NO:
s	A-32159	115	GuccucuGAuGGucAAAGudTdT	1277
as	A-32160	133	ACUUUGACcAUcAGAGGACdTdT	1278
s	A-32745	537	uucuuGcucuAuAAAccGudTdT	1279
as	A-32746	555	ACGGUUuAuAGAGcAAGAAdTdT	1280
s	A-32747	543	cucuAuAAAccGuGuuAGcdTdT	1281
as	A-32748	561	GCuAAcACGGUUuAuAGAGdTdT	1282
s	A-32749	392	ucGccAcuAcAccAucGcAdTdT	1283
as	A-32750	410	UGCGAUGGUGuAGUGGCGAdTdT	1284
s	A-32751	538	ucuuGcucuAuAAAccGuGdTdT	1285
as	A-32752	556	cACGGUUuAuAGAGcAAGAdTdT	1286
s	A-32753	541	uGcucuAuAAAccGuGuuAdTdT	1287
as	A-32754	559	uAAcACGGUUuAuAGAGcAdTdT	1288
s	A-32755	532	cAGuGuucuuGcucuAuAAdTdT	1289
as	A-32756	550	UuAuAGAGcAAGAAcACUGdTdT	1290
s	A-32757	542	GcucuAuAAAccGuGuuAGdTdT	1291
as	A-32758	560	CuAAcACGGUUuAuAGAGCdTdT	1292
s	A-32759	134	ccuGGAuGcuGuccGAGGcdTdT	1293
as	A-32760	152	GCCUCGGAcAGcAUCcAGGdTdT	1294
s	A-32761	119	ucuGAuGGucAAAGuccuGdTdT	1295

Fita	Oligo No.	Posição	Sequência (5' a 3')	SEQ ID NO:
as	A-32762	137	cAGGACUUUGACcAUcAGAdTdT	1296
s	A-32763	241	cuGGAGAGcuGcAcGGGcudTdT	1297
as	A-32764	259	AGCCCGUGcAGCUCUCcAGdTdT	1298
s	A-32765	544	ucuAuAAAccGuGuuAGcAdTdT	1299
as	A-32766	562	UGCuAAcACGGUuAuAGAdTdT	1300
s	A-32767	530	AAcAGuGuucuuGcucuAudTdT	1301
as	A-32768	548	AuAGAGcAAGAAcACUGUuTdTdT	1302
s	A-32769	118	cucuGAuGGucAAAGuccudTdT	1303
as	A-32770	136	AGGACUUUGACcAUcAGAGdTdT	1304
s	A-32771	140	uGcuGuccGAGGcAGcccudTdT	1305
as	A-32772	158	AGGGCUGCCUCGGAcAGcAdTdT	1306
s	A-32773	239	GucuGGAGAGcuGcAcGGGdTdT	1307
as	A-32774	257	CCCGUGcAGCUCUCcAGACdTdT	1308
s	A-32775	531	AcAGuGuucuuGcucuAuAdTdT	1309
as	A-32776	549	uAuAGAGcAAGAAcACUGUdTdT	1310
s	A-32777	117	ccucuGAuGGucAAAGuccdTdT	1311
as	A-32778	135	GGACUUUGACcAUcAGAGGdTdT	1312
s	A-32779	131	AGuccuGGAuGcuGuccGAdTdT	1313
as	A-32780	149	UCGGAcAGcAUCcAGGACUdTdT	1314
s	A-32781	217	uuGccucuGGGAAGAccGcdTdT	1315
as	A-32782	235	GCGGUCUUCCcAGAGGcAAdTdT	1316
s	A-32783	242	uGGAGAGcuGcAcGGGcucdTdT	1317
as	A-32784	260	GAGCCCGUGcAGCUCUCcAdTdT	1318
s	A-32785	244	GAGAGcuGcAcGGGcucAcdTdT	1319
as	A-32786	262	GUGAGCCCGUGcAGCUCUCdTdT	1320
s	A-32787	246	GAGcuGcAcGGGcucAccAdTdT	1321
as	A-32788	264	UGGUGAGCCCGUGcAGCUCdTdT	1322
s	A-32791	399	uAcAccAucGcAGcccuGcdTdT	1323
as	A-32792	417	GcAGGGCUGCGAUGGUGuAdTdT	1324

Fita	Oligo No.	Posição	Sequência (5' a 3')	SEQ ID NO:
s	A-32793	132	GuccuGGAuGcuGuccGAGdTdT	1325
as	A-32794	150	CUCGGAcAGcAUCcAGGACdTdT	1326
s	A-32795	245	AGAGcuGcAcGGGcucAccdTdT	1327
as	A-32796	263	GGUGAGCCCGUGcAGCUCUdTdT	1328

Síntese de Sequências de TTR

[00247] Sequências de TTR foram sintetizadas em sintetizador MerMade 192 em escala de 1 µmol. Para todas as sequências na lista, química 'endolight' foi aplicada conforme detalhado abaixo.

- Todas as pirimidinas (citosina e uridina) na fita de senso foram substituídas com bases 2'-O-Metila correspondentes (2'-O-Metila C e 2'-O-Metila U)

- Na fita antissenso, pirimidinas adjacentes a ribo A nucleosídeo (em direção à posição 5') foram substituídas com seus nucleosídeos de 2-O-Metila correspondentes

- Uma extensão dTdT de duas bases na extremidade 3' de ambas as sequências de senso e antissenso foi introduzida

- O arquivo de sequência foi convertido em um arquivo de texto para torná-lo compatível para carregamento no *software* de síntese MerMade 192

[00248] A síntese que sequências de TTR usaram síntese de oligonucleotídeo apoiada em sólido usando química de fosoramidita. A síntese das sequências acima foi realizada em escala de 1 µm em placas de 96 cavidades. As soluções de amidita foram preparadas em concentração de 0,1M e etil tio tetrazol (0,6M em Acetonitrila) foi usado como ativador.

[00249] As sequências sintetizadas foram clivadas e desprotegidas em placas de 96 cavidades usando metilamina na primeira etapa e trietilamina.3HF na segunda etapa. As sequências brutas então obtidas foram precipitadas usando mistura de acetona: etanol e o pélete foi

ressuspensão em tampão de acetato de sódio 0,5M. Amostras de cada sequência foram analisadas através de LC-MS e os dados de massa resultantes confirmaram a identidade da sequência. Um conjunto selecionado de amostras foi também analisado através de cromatografia IEX.

[00250] A etapa seguinte no processo foi purificação. Todas as sequências foram purificadas em um sistema de purificação explorador AKTA usando coluna Source 15Q. Um pico simples correspondendo à sequência de comprimento integral foi coletado no eluente e foi subsequentemente analisado quanto à pureza através de cromatografia de troca de íon.

[00251] As sequências purificadas foram dessalinizadas em uma coluna Sephadex G25 usando purificador AKTA. As sequências de TTR dessalinizadas foram analisadas quanto à concentração e pureza. As fitas simples foram então aneladas para formar TTR-dsRNA.

Exemplo 2B: Avaliação *in vitro* de siRNAs de TTR para supressão de mRNA

[00252] dsRNAs direcionando a TTR de humano (Tabela 2) foram ensaiados quanto à inibição de expressão de TTR endógena em células HepG2 e Hep3B, usando testes de qPCR (PCR de tempo real) e bDNA (DNA ramificado) para quantificar mRNA de TTR. dsRNA direcionando a TTR de roedor (Tabela 5) foi sintetizado e ensaiado quanto à inibição de expressão de TTR endógena usando ensaios de bDNA em células H.4.II.E. Resultados de ensaios de dose simples foram usados para selecionar um subconjunto de dúplexes de dsRNA de TTR para experimentos de resposta de dose para calcular IC₅₀s. Os resultados de IC₅₀ foram usados para selecionar dsRNAs de TTR para teste adicional.

Cultura e transfecções celulares:

[00253] Células HepG2, HepG3 e H.4.II.E de linhagens de célula de hepatócito (ATCC, Manassas, VA) foram cultivadas para próximo da

confluência a 37° C em uma atmosfera de CO₂ 5% em meio da Eagle Modificado com da Dulbecco (ATCC) suplementado com FBS 10%, estreptomicina e glutamina (ATCC) antes de serem liberadas da placa através de tripsinização. Células H.4.II.E foram também cultivadas em meio essencial mínimo da Earle. Transfecção reversa foi realizada adicionando 5 µL de Opti-MEM a 5 µL de dúplexes de siRNA por cavidade em uma placa de 96 cavidades junto com 10 µL de Opti-MEM mais 0,2 µL de Lipofectamina RNAiMax por cavidade (Invitrogen, Carlsbad N° Cat. 13778-150) e incubados em temperatura ambiente por 15 minutos. 80 µL de meio de crescimento completo sem antibióticos contendo células 4x10⁴ (HepG2), 2x10⁴ (Hep3B) ou 2x10⁴ (H.4.II.E) foram então adicionados. As células foram incubadas por 24 horas antes da purificação de RNA. Experimentos de dose simples foram realizados em concentração de dúplex final de 10 nM e experimentos de dose resposta foram feitos com 10, 1, 0,5 0,1, 0,05, 0,01, 0,005, 0,001, 0,0005, 0,0001, 0,00005, 0,00001 nM.

Isolamento de RNA total usando MagMAX-96 Total RNA Isolation Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, part. N°.: AM1830):

[00254] As células foram coletadas e lisadas em 140 µL de Solução de Lise/Ligação, então misturadas por 1 minuto a 850 rpm usando um Eppendorf Thermomixer (a velocidade de mistura foi a mesma em todo o processo). Vinte microlitros de contas de magnésio foram adicionados em lisado de célula e misturados por 5 minutos. Contas magnéticas foram capturadas usando descanso magnético e o sobrenadante foi removido sem perturbar as contas. Após remoção de sobrenadante, contas magnéticas foram lavadas com Solução de Lavagem 1 (isopropanol adicionado) e misturadas por 1 minuto. As contas foram capturadas novamente e o sobrenadante removido. As contas foram então lavadas com 150 µL de Solução de Lavagem 2 (Etanol adicionado), capturadas e o sobrenadante foi removido. 50 µL de

mistura de Dnase (MagMax turbo DNase Buffer e Turbo DNase) foram então adicionados às contas e elas foram misturadas por 10 a 15 minutos. Após mistura, 100 µL de Solução de Religação de RNA foram adicionados e misturados por 3 minutos. Os sobrenadantes foram removidos e contas magnéticas foram lavadas novamente com 150 µL de Solução de Lavagem 2 e misturadas por 1 minutos e o sobrenadante foi removido completamente. As contas magnéticas foram misturadas por 2 minutos para secar antes de RNA ser eluído com 50 µL de água.

Síntese de cDNA usando ABI High capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, N°Cat. 4368813):

[00255] Uma mistura máster de 2 µL de Tampão 10X, 0,8 µL de dNTPS 25X, 2 µL de iniciadores aleatórios, 1 µL de Transcriptase, 1 µL de inibidor de Rnase e 3,2 µL de H₂O por reação foram adicionados em 10 µL de RNA total. cDNA foi gerado usando um termociclador Bio-Rad c-1000 ou S-1000 (Hercules, CA) através das etapas que seguem: 25°C 10 minutos, 37°C 120 minutos, 85°C 5 segundos, 4°C manter.

PCR de tempo real:

[00256] 2 µL de cDNA foram adicionados a uma mistura máster de 1 µL de TaqMan Probe (Applied Biosystems N° Cat. 4319413E), 1 µL de sonda TaqMan de TTR (Applied Biosystems N° cat. HS00174914 M1) e 10 µL de TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems No. Cat. 4324018) por cavidade em uma placa de 96 cavidades MicroAmp Optical (Applied Biosystems N° Cat. 4326659). PCR de tempo real foi feita em um sistema ABI 7000 Prism ou um ABI 7900HT Real Time PCR (Applied Biosystems) usado o ensaio $\Delta\Delta$ Ct(RQ). Todas as reações foram feitas em triplicata.

[00257] Dados de tempo real foram analisados usando o método $\Delta\Delta$ Ct e normalizados para ensaios realizados a partir de células transfectadas com Oligo fluorescente BlockIT 10 nM (N° Cat. Invitrogen 2013) ou AD-1955 10 nM (um dúplex controle que se direciona ao gene

da luciferase de não mamífero) para calcular mudança de dobra.

Ensaio de DNA ramificado - QuantiGene 1.0 (Panomics, Fremont, No. CA.: QG0004) - Usados para avaliar dúplexes específicos de roedor

[00258] Células H.4.II.E (ATCC) foram transfectadas com siRNA 10 nM. Após remoção do meio, H.4.II.E foram lisadas em 100 µL de Mistura de Lise Diluída (uma mistura de 1 volume de mistura de lise, 2 volumes de água livre de nuclease e 10 µL de Proteinase-K para a concentração final de 20 mg/ml), então incubadas a 65° C por 35 minutos. Então, 80 µL de Working Probe Set (uma mistura de sonda de TTR e GAPDH) e 20 µL de lisado de célula foram adicionados à Placa de Captura. Placas de Captura foram incubadas a 53°C ± 1°C da noite para o dia (aproximadamente 16-20 horas). Placas de Captura foram lavadas 3 vezes com Tampão de Lavagem 1X (uma mistura de água livre de nuclease, Componente do Tampão 1 e Componente do Tampão de Lavagem 2), então secas através de centrifugação por 1 minuto a 1000 rpm. 100 µL de Amplifier Working Reagent foram adicionados à Placa de Captura, que foi então vedada e incubada por 1 hora a 46°C ± 1°C. Etapas de lavagem e secagem foram repetidas após 1 hora de incubação e 100 µL de Label Solution Reagent foram adicionados. A placa foi então lavada, seca e 100 µL de substrato (uma mistura de Lauril Sulfato de Lítio e Solução de substrato) foram adicionados. Placas de captura foram postas na incubadora por 30 minutos a 46° C ± 1°C. As Placas de Captura foram então removidas da incubadora e incubadas em temperatura ambiente por 30 minutos. Finalmente, as Placas de Captura foram lidas usando o Victor Luminometer (Perkin Elmer, Waltham, MA).

Ensaio de DNA ramificado - QuantiGene 2.0 (N° Cat. Panomics: QS0011): Usados para avaliar todos os outros dúplexes

[00259] Após incubação de 24 horas na dose ou doses reveladas, meio foi removido e as células foram lisadas em 100 µL de Mistura de

Lise (1 volume de mistura de lise, 2 volumes de água livre de nucleasse e 10 µL de Proteinase-K/ml para uma concentração final de 20 mg/ml) então incubadas a 65°C por 35 minutos. 20 µL de Working Probe Set (sonda de TTR para direcionamento de gene e GAPDH para controle endógeno) e 80 µL de lisado de célula foram adicionados às Placas de Captura. As Placas de Captura foram incubadas a 55°C ± 1°C (aproximadamente 16-20 horas). No dia seguinte, as Placas de Captura foram lavadas 3 vezes com Tampão de Lavagem 1X (água livre de nucleasse, Componente de Tampão 1 e Componente de Tampão de Lavagem 2), então secas através de centrifugação por 1 minuto a 240 g. 100 µL de pre-Amplifier Working Reagent foram adicionados às Placas de Captura, que foram vedadas com folha de alumínio e incubadas por 1 hora a 55°C ± 1°C. Seguindo incubação de 1 hora, a etapa de lavagem foi repetida, então 100 µL de Amplifier Working Reagent foram adicionados. Após 1 hora, as etapas de lavagem e secagem foram repetidas, e 100 µL de Sonda de Marcação foram adicionados. As placas de captura foram incubadas 50° C ± 1° C por 1 hora. As placas foram então lavadas com Tampão de Lavagem 1X e então 100 µL de substrato foram adicionados às Placas de Captura. As Placas de Captura foram lidas usando o Luminômetro SpectraMax (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) seguindo incubação por 5 a 15 minutos.

Análise de dados de bDNA:

[00260] Dados de bDNA foram analisados através de (i) subtração da base média de cada amostra de triplicata, (ii) média do GAPDH em triplicata resultante (sonda controle) e valores de TTR (sonda experimental) e então (iii) obtendo a razão: (sonda experimental-base)/(sonda controle-base).

Resultados

[00261] Um sumário de resultados de dose única e IC₅₀ para TTR-

dsRNAs (siRNAs de TTR) é apresentado abaixo na Tabela 8. Resultados de dose única são expressos como % de mRNA de TTR com relação ao controle, ensaiada em células HepG2. IC₅₀s foram determinadas em células HepG2. IC₅₀s foram determinadas em células HepG2 e/ou Hep3B, conforme indicado.

Tabela 8. Resultados de dose única e IC₅₀ de avaliações *in vitro* de siRNAs de TTR

ND: nenhum dado; * indica o resultado que representa média de dois experimentos.

Dúplex Nº	Dose Única a 10nM% com relação ao controle		IC ₅₀ (nM)			
	HepG2		HepG2		Hep3B	
	qPCR	bDNA	qPCR	bDN A	qPC R	bDN A
AD-18243	50,35	141,53	ND	ND	ND	ND
AD-18244	64,26	158,55	ND	ND	ND	ND
AD-18245	56,89	107,22	ND	ND	ND	ND
AD-18246	10,53	32,51*	0,265	0,086	ND	ND
AD-18247	125,56	69,57	ND	ND	ND	ND
AD-18248	127,78	66,97	ND	ND	ND	ND
AD-18249	48,77	48,76	ND	ND	ND	ND
AD-18250	96,94	86,42	ND	ND	ND	ND
AD-18251	170,41	129,15	ND	ND	ND	ND
AD-18252	73,52	81,90	ND	ND	ND	ND

Dúplex N°	Dose Única a 10nM% com relação ao controle		IC50 (nM)			
	HepG2		HepG2		Hep3B	
	qPCR	bDNA	qPCR	bDNA	qPCR	bDNA
AD-18253	25,25	61,25	ND	ND	ND	ND
AD-18254	95,13	103,96	ND	ND	ND	ND
AD-18255	119,46	ND	ND	ND	ND	ND
AD-18256	42,64	95,67	ND	ND	ND	ND
AD-18257	146,25	141,75	ND	ND	ND	ND
AD-18258	10,20	13,41*	0,007	0,005	0,004	0,005
AD-18259	9,30	20,91*	0,102	0,005	ND	ND
AD-18260	125,37	81,36	ND	ND	ND	ND
AD-18261	14,27	19,40*	0,210	ND	ND	ND
AD-18262	84,95	104,05	ND	ND	ND	ND
AD-18263	16,32	23,25*	0,110	ND	ND	ND
AD-18264	104,18	83,69	ND	ND	ND	ND
AD-18265	41,62	64,87	ND	ND	ND	ND
AD-18266	39,98	110,53	ND	ND	ND	ND
AD-18267	149,64	ND	ND	ND	ND	ND

Dúplex N°	Dose Única a 10nM% com relação ao controle		IC50 (nM)			
	HepG2		HepG2		Hep3B	
	qPCR	bDNA	qPCR	bDNA	qPCR	bDNA
AD-18268	152,93	174,04	ND	ND	ND	ND
AD-18269	37,27	92,28	ND	ND	ND	ND
AD-18270	99,44	164,75	ND	ND	ND	ND
AD-18271	18,89	28,33*	0,503	0,004	ND	ND
AD-18272	128,32	132,58	ND	ND	ND	ND
AD-18273	115,78	201,95	ND	ND	ND	ND
AD-18274	8,97	20,04*	0,009	0,176	0,036	0,012
AD-18275	4,09	22,25*	0,026	0,118	ND	ND
AD-18276	19,73	45,22*	0,198	0,677	ND	ND
AD-18277	10,55	26,31*	0,121	0,426	ND	ND
AD-18278	108,86	116,26	ND	ND	ND	ND
AD-18279	66,59	ND	ND	ND	ND	ND
AD-18280	103,26	170,52	ND	ND	ND	ND
AD-18281	87,98	123,88	ND	ND	ND	ND
AD-18282	82,47	140,32	ND	ND	ND	ND

Dúplex N°	Dose Única a 10nM% com relação ao controle		IC50 (nM)			
	HepG2		HepG2		Hep3B	
	qPCR	bDNA	qPCR	bDNA	qPCR	bDNA
AD-18283	106,54	182,78	ND	ND	ND	ND
AD-18284	106,93	151,78	ND	ND	ND	ND
AD-18285	26,58	60,05*	ND	0,089	ND	ND
AD-18286	109,95	173,66	ND	ND	ND	ND
AD-18287	54,23	155,45	ND	ND	ND	ND
AD-18288	73,52	174,09	ND	ND	ND	ND
AD-18289	103,36	174,76	ND	ND	ND	ND
AD-18290	17,06	52,04*	1,253	0,181	ND	ND
AD-18291	7,71	169,29*	1,304	0,019	ND	ND
AD-18292	7,51	210,03*	0,604	0,005	ND	ND
AD-18293	3,61	62,53*	0,078	0,003	ND	ND
AD-18294	111,53	107,56	ND	ND	ND	ND
AD-18295	115,88	105,37	ND	ND	ND	ND
AD-18296	57,03	38,03	ND	ND	ND	ND
AD-18297	87,69	73,87	ND	ND	ND	ND

Dúplex N°	Dose Única a 10nM% com relação ao controle		IC50 (nM)			
	HepG2		HepG2		Hep3B	
	qPCR	bDNA	qPCR	bDNA	qPCR	bDNA
AD-18298	10,39	7,25*	0,455	0,008	ND	ND
AD-18299	18,79	18,06*	0,895	0,014	ND	ND
AD-18300	108,70	ND	ND	ND	ND	ND
AD-18301	114,22	70,50	ND	ND	ND	ND
AD-18302	116,19	122,40	ND	ND	ND	ND
AD-18303	124,89	ND	ND	ND	ND	ND
AD-18304	132,99	89,54	ND	ND	ND	ND
AD-18305	153,10	ND	ND	ND	ND	ND
AD-18306	159,22	ND	ND	ND	ND	ND
AD-18307	116,83	84,57	ND	ND	ND	ND
AD-18308	156,72	87,80	ND	ND	ND	ND
AD-18309	113,22	101,97	ND	ND	ND	ND
AD-18310	132,33	ND	ND	ND	ND	ND
AD-18311	161,68	92,92	ND	ND	ND	ND
AD-18312	103,01	71,17	ND	ND	ND	ND

Dúplex N°	Dose Única a 10nM% com relação ao controle		IC50 (nM)			
	HepG2		HepG2		Hep3B	
	qPCR	bDNA	qPCR	bDN A	qPC R	bDN A
AD-18313	120,65	53,26	ND	ND	ND	ND
AD-18314	116,33	ND	ND	ND	ND	ND
AD-18315	115,13	ND	ND	ND	ND	ND
AD-18316	118,73	122,34	ND	ND	ND	ND
AD-18317	114,03	121,10	ND	ND	ND	ND
AD-18318	80,85	122,57	ND	ND	ND	ND
AD-18319	119,14	148,87	ND	ND	ND	ND
AD-18320	22,86	55,43*	ND	0,023	0,403	ND
AD-18321	6,44	31,56*	0,001	0,033	ND	ND
AD-18322	54,21	100,46	ND	ND	ND	ND
AD-18323	6,37	28,71*	0,005	0,023	ND	ND
AD-18324	2,53	15,98*	0,002	0,006	0,005	0,014
AD-18325	2,52	11,96*	0,001	0,016	ND	ND
AD-18326	18,34	43,16*	0,025	0,186	ND	ND
AD-18327	18,28	13,90*	0,044	0,215	ND	ND

Dúplex N°	Dose Única a 10nM% com relação ao controle		IC50 (nM)			
	HepG2		HepG2		Hep3B	
	qPCR	bDNA	qPCR	bDN A	qPC R	bDN A
AD-18328	4,53	26,04*	0,003	0,004	0,006	0,006
AD-18329	96,93	131,54	ND	ND	ND	ND
AD-18330	11,80	45,18*	0,0004	0,010	0,020	ND
AD-18331	117,77	163,07	ND	ND	ND	ND
AD-18332	11,53	35,09*	0,001	0,076	0,065	ND
AD-18333	12,24	46,94*	0,001	0,115	0,075	ND
AD-18334	16,27	55,28*	0,0004	0,181	1,071	ND
AD-18335	53,52	112,80	ND	ND	ND	ND
AD-18336	6,39	33,00*	0,001	0,112	0,081	ND
AD-18337	51,77	105,33	ND	ND	ND	ND
AD-18338	48,21	102,86	ND	ND	ND	ND
AD-18339	6,48	26,56*	0,004	0,002	0,018	0,029
AD-18340	4,53	30,76*	0,002	0,002	ND	ND
AD-18341	31,27	100,41	ND	ND	ND	ND
AD-18342	7,60	42,89*	ND	0,016	0,076	ND

Dúplex N°	Dose Única a 10nM% com relação ao controle		IC50 (nM)			
	HepG2		HepG2		Hep3B	
	qPCR	bDNA	qPCR	bDNA	qPCR	bDNA
AD-18343	3,42	17,45*	ND	0,001	ND	ND
AD-18344	75,08	134,31	ND	ND	ND	ND
AD-18345	13,62	42,75*	0,002	0,013	ND	ND
AD-18346	59,25	121,10	ND	ND	ND	ND
AD-18347	91,23	139,54	ND	ND	ND	ND
AD-18348	89,95	159,29	ND	ND	ND	ND
AD-18349	108,01	144,96	ND	ND	ND	ND
AD-18350	123,65	125,87	ND	ND	ND	ND
AD-18351	108,36	104,02	ND	ND	ND	ND
AD-18352	87,82	128,72	ND	ND	ND	ND
AD-18353	14,40	65,77	0,012	0,027	ND	ND
AD-18354	99,27	123,53	ND	ND	ND	ND
AD-18355	135,04	150,88	ND	ND	ND	ND
AD-18356	100,76	178,96	ND	ND	ND	ND
AD-18357	125,30	162,85	ND	ND	ND	ND

Dúplex N°	Dose Única a 10nM% com relação ao controle		IC50 (nM)			
	HepG2		HepG2		Hep3B	
	qPCR	bDNA	qPCR	bDN A	qPC R	bDN A
AD-18358	103,15	136,01	ND	ND	ND	ND
AD-18359	34,74	140,48	ND	ND	ND	ND
AD-18360	103,86	146,86	ND	ND	ND	ND
AD-18361	105,74	152,74	ND	ND	ND	ND
AD-18362	106,96	188,22	ND	ND	ND	ND
AD-18363	124,22	58,46	ND	ND	ND	ND
AD-18364	113,75	66,87	ND	ND	ND	ND
AD-18446	29,73	13,30	ND	ND	ND	ND
AD-18447	109,74	53,63	ND	ND	ND	ND
AD-18448	22,96	8,81	ND	ND	ND	ND
AD-18449	112,59	50,11	ND	ND	ND	ND
AD-18450	89,41	34,89	ND	ND	ND	ND
AD-18451	74,35	23,88	ND	ND	ND	ND
AD-18452	125,25	54,86	ND	ND	ND	ND
AD-18453	126,98	56,31	ND	ND	ND	ND

Dúplex N°	Dose Única a 10nM% com relação ao controle		IC50 (nM)			
	HepG2		HepG2		Hep3B	
	qPCR	bDNA	qPCR	bDN A	qPC R	bDN A
AD-18454	113,88	52,48	ND	ND	ND	ND
AD-18455	163,00	48,89	ND	ND	ND	ND
AD-18456	15,70	10,52	ND	ND	ND	ND
AD-18457	12,86	8,22	ND	ND	ND	ND
AD-18458	13,00	7,00	ND	ND	ND	ND
AD-18459	14,41	10,72	ND	ND	ND	ND
AD-18460	121,16	74,87	ND	ND	ND	ND
AD-18461	100,53	71,87	ND	ND	ND	ND
AD-18462	47,75	29,35	ND	ND	ND	ND
AD-18463	58,98	44,79	ND	ND	ND	ND

[00262] Os dados de dose resposta usados para identificar a IC₅₀ para 5 TTR-dsRNAs (AD-18258, AD-18274, AD-18324, AD-18328 e AD-18339) são apresentados em detalhes abaixo na tabela 9. Todos os 5 siRNAs foram determinados ter IC₅₀s pM. Os dados de IC₅₀ para dsRNAs na tabela 8 é um sumário dos dados apresentados na tabela 9 abaixo.

Tabela 9. Dados de dose resposta para 5 TTR-dsRNAs

		% de inibição com relação a AD-1955 controle												
Dúplex AD-18258		Dose de dúplex (nM)												
Tipo de Célula	Método de detecção	10	1	0,5	0,1	0,05	0,01	0,005	0,001	0,0005	0,0001	0,00005	0,00001	IC50 (nM)
HepG2	qPCR	14,4	14,1	16,2	23,9	27,26	40,19	68,46	78,1	74,48	104,37	98,28	113,68	0,007
HepG2	bDNA	14,3	14,5	11,1	12,8	18,82	19,77	51,21	56,03	63,63	58,35	43,64	51,05	0,005
Hep3B	qPCR	11,9	8,62	12,4	16,4	28,35	30,49	58,36	54,57	81,26	89,43	81,85	101,87	0,004
Hep3B	bDNA	7,65	7,5	11,3	12,6	28,85	27,89	64,57	73,48	72,03	91,44	86,71	89,31	0,005

		% de inibição com relação a AD-1955 controle												
Dúplex AD-18274		Dose de dúplex (nM)												
Tipo de Célula	Método de detecção	10	1	0,5	0,1	0,05	0,01	0,005	0,001	0,0005	0,0001	0,00005	0,00001	IC50 (nM)
HepG2	qPCR	6,68	8,45	11,7	24,2	42,08	49,89	56,95	62,99	64,47	54,92	67,39	72,67	0,009
HepG2	bDNA	27,5	69	25,2	34,2	73,03	103,4	121,57	97,31	154,93	156,7	Nd	152,25	0,176
Hep3B	qPCR	7,58	17	15,6	43,9	42,22	60,55	78,8	77,81	79,97	85,84	86,13	83,99	0,036
Hep3B	bDNA	3,77	4,92	7,51	15	35,21	51,66	72,45	70,12	78,31	77,52	90,72	83,01	0,012

		% de inibição com relação a AD-1955 controle												
Dúplex AD-18324		Dose de dúplex (nM)												
Tipo de Célula	Método de detecção	10	1	0,5	0,1	0,05	0,01	0,005	0,001	0,0005	0,0001	0,00005	0,00001	IC50 (nM)
HepG2	qPCR	2,07	2,27	2,74	6,36	8,18	15,23	28,82	52,79	90,86	94,72	116,07	98,97	0,002
HepG2	bDNA	14,5	7,88	11,8	15,9	17,2	46,44	40,4	91,86	0	95,57	0	52,15	0,006
Hep3B	qPCR	2,07	3,48	5,76	16,2	18,73	44,54	49,77	68,88	63,48	76,61	74,7	77,83	0,005
Hep3B	bDNA	3,48	3,8	5,15	15,2	30,84	55,36	74,75	99,39	88,89	110,83	96,55	110,26	0,014

		% de inibição com relação a AD-1955 controle												
Dúplex AD-18328		Dose de dúplex (nM)												
Tipo de célula	Método de detecção	10	1	0,5	0,1	0,05	0,01	0,005	0,001	0,0005	0,0001	0,00005	0,00001	IC50 (nM)
HepG2	qPCR	5,85	3,97	3,32	5,62	8	16,75	55,01	39,76	122,41	102,37	114,02	124,09	0,003
HepG2	bDNA	12,3	10,7	10,7	11,9	20,06	25	69,52	57,29	112,28	98,14	142,26	148,92	0,004
Hep3B	qPCR	3,17	5,52	11,7	13,8	27,68	39,58	61,21	61,87	90,51	87,56	106,03	108,72	0,006
Hep3B	bDNA	3,08	3,66	4,19	7,25	21,05	22,1	73,74	63,19	105,55	96,27	105,97	96,46	0,006

		% de inibição com relação a AD-1955 controle												
Dúplex AD-18339		Dose de dúplex (nM)												
Tipo de célula	Método de detecção	10	1	0,5	0,1	0,05	0,01	0,005	0,001	0,0005	0,0001	0,00005	0,00001	IC50 (nM)
HepG2	qPCR	6,27	7,28	Nd	11	15,25	38,69	38,78	71,7	84,09	62,2	75,61	85,46	0,004
HepG2	bDNA	15,1	8,14	5,13	6,89	12,17	32,14	42,98	64,01	60,76	79,95	81,97	95,43	0,002
Hep3B	qPCR	8,3	9,47	13,2	34,5	44,54	77,38	81,04	81,41	93,95	81,04	75,61	78,28	0,018
Hep3B	bDNA	10,5	9,43	11,7	27,1	44,88	72,32	79,88	79,6	87,46	96,53	95,13	89,88	0,029

[00263] Um sumário dos resultados de dose única para TTR-dsRNAs específicos de roedor (siRNAs de TTR) com relação ao controle, ensaiados em células H.4.II.E de rato, após transfecção de siRNAs de TTR específicos a 10 nM. Esses resultados mostram que alguns siRNAs de TTR específicos de roedor são eficazes na supressão de mRNA de TTR de rato endógeno *in vitro*.

Tabela 10. Resultados de dose única de avaliação *in vivo* de TTR-dsRNAs específicos de roedor (siRNAs de TTR)

Dúplex N°	% com relação ao controle a 10 nM	Dúplex No.	% com relação ao controle a nM
AD-18529	19,83	AD-18542	6,3
AD-18530	44,49	AD-18543	16,46
AD-18531	6,01	AD-18544	17,55
AD-18532	24,06	AD-18545	3,53
AD-18533	37,78	AD-18546	2,75
AD-18534	8,19	AD-18547	7,01
AD-18535	10,18	AD-18548	5,02
AD-18536	16,13	AD-18549	1,61
AD-18537	15,88	AD-18550	9,58
AD-18538	19,93	AD-18551	7,74
AD-18539	49,24	AD-18552	3,74
AD-18540	2,99	AD-18553	50,39
AD-18541	1,32	AD-18554	111,06

Exemplo 3. Ensaio *in vitro* de siRNAs de TTR para indução de secreção de TNF- α e IFN- α

[00264] Para avaliar o potencial para imunoestimulação, siRNAs de TTR foram ensaiados *in vitro* para indução de secreção de TNF- α e IFN- α .

[00265] PBMC humana foram isoladas de camadas de células brancas recém-coletadas obtidas de doadores saudáveis (Research Blood Components, Inc., Boston, MA) através de uma centrifugação de densidade Ficoll-Hypaque padrão. Células recém isoladas (1×10^5 /cavidade/100 μ L) foram semeadas em placas de 96 cavidades e

cultivadas em meio RPMI 1640 GlutaMax (Invitrogen) suplementado com soro bovino fetal inativado com calor 10% e antibiótico/antimitótico 1% (Invitrogen).

[00266] siRNAs foram transfectados em PBMC usando reagente de transfecção DOTAP (Roche Applied Science). O DOTAP foi primeiro diluído em Opti-MEM (Invitrogen) por 5 minutos antes da mistura com um volume igual de Opti-MEM contendo o siRNA. Complexos de siRNA/DOTPA foram incubados conforme especificado pelas instruções do fabricante e subsequentemente adicionados à PBMC (50 µL/cavidade) que foram então cultivadas por 24 horas. siRNAs controle positivos e negativos foram incluídos em todos os ensaios. AD-5048 foi usado como um siRNA controle positivo. AD-5048 corresponde a uma sequência que se direciona à Apolipoproteína B humana (Soutschek e outros, 2004) e desencadeia secreção de ambos o IFN- α e TNF- α neste ensaio. AD-1955, que não desencadeia secreção de IFN- α e TNF- α neste ensaio, foi usado como um siRNA controle negativo. Todos os siRNAs foram usados em uma concentração final de 133 nM. A razão de RNA para reagente de transfecção foi 16,5 pmoles por µg de DOTAP.

[00267] Citocinas foram detectadas e quantificadas em sobrenadantes de cultura com um ELISA kit comercialmente disponível para IFN- α (BMS216INST) e TNF- α (BMS223INST), ambos da Bender MedSystems (Vienna, Áustria). Indução de citocina de siRNA de TTR é expressa como IFN- α ou TNF- α percentual produzida com relação ao siRNA controle positivo AD-5048.

[00268] Os resultados de estimulação de IFN- α e TNF- α para vários siRNAs de TTR são apresentados na Figura 1 (média de cavidades em quadruplicata $\pm$ SD) e abaixo na Tabela 11 (porcentagem comparado com AD-5048). Nenhum dos siRNAs de TTR avaliados induziu secreção de IFN- α ou TNF- α significativa através de PBMCs humanas.

Tabela 11. Resultados de estimulação de IFN- α e TNF- α para siRNAs

de TTR

Dúplex N°	IFN- α (% de AD-5048)	TNF- α (% de AD-5048)
AD-18246	0	4
AD-18258	0	0
AD-18259	0	0
AD-18261	0	0
AD-18263	0	0
AD-18271	0	0
AD-18274	2	1
AD-18275	0	0
AD-18276	0	0
AD-18277	0	0
AD-18285	0	0
AD-18290	0	0
AD-18291	0	0
AD-18292	0	0
AD-18293	0	0
AD-18298	0	0
AD-18299	0	0
AD-18320	0	0
AD-18321	0	0
AD-18323	0	0
AD-18324	0	0
AD-18325	0	0
AD-18326	0	0
AD-18327	0	0
AD-18328	0	0
AD-18330	0	0
AD-18332	1	0
AD-18333	0	1
AD-18334	0	1
AD-18336	1	0
AD-18339	0	0
AD-18340	0	0
AD-18342	0	0
AD-18343	0	0
AD-18345	0	0
AD-18353	0	0
AD-18448	0	0
AD-18456	0	0
AD-18457	0	0
AD-18458	0	0
AD-18459	0	0

[00269] Os cinco principais dsRNAs de direcionamento a TTR (siRNAs de TTR) foram selecionados com base em IC₅₀s na faixa pM

nas linhagens de célula de hepatócito humana HepG2 e Hep3B e na ausência de atividade imunoestimuladora. Dúplexes sem quaisquer faltas de combinação são mais prováveis de obter inativação significativa do transcrito alvo do que os dúplexes com faltas de combinação entre o oligo e o mRNA. Para permitir melhor interpretação de dados de toxicologia de espécies cruzadas e ter a aplicabilidade mais ampla a pacientes humanos, dúplexes que têm 100% de identidade em genes ortólogos de rato, macaco cinomólogo e humano e que não se direcionam a regiões alvo com polimorfismos conhecidos são geralmente preferidos. Os cinco principais compostos foram selecionados com base em IC_{50} em linhagens de célula de hepatócito na faixa pM, na ausência de atividade imunoestimuladora, especificidade para transcritos de TTR humano e ausência de polimorfismos conhecidos (mutações) na região do mRNA direcionada pelo dúplex. No caso de TTR, quaisquer 19 oligos de base foram encontrados com identidade completa em humano, rato e macaco cinomólogo. Um sumário desses dados é apresentado na tabela 12, que também inclui informação de mutações de TTR conhecidas na região direcionada pelo dúplex e reatividade da espécie cruzada.

Tabela 12. Sumário de dados para os cinco dsRNAs de TTR mais potentes

Dúplex No.	IC50 (qPCR): nM HepG2	IC50 (bDNA): nM HepG2	IFNa/ TNFa	Mutações não recuperadas	Reatividade de espécie cruzada
AD-18258	0,007	0,005	Negativo	Nenhuma (região de não codificação)	Cino: 1 falta de combinação posição @ \ 14 A a G Rato: nenhuma homologia em nenhuma posição
AD-18274	0,009	0,176	Negativo	Lys70Asn; Val71 Ala; Ile73 Val; Asp74His	Cino: nenhuma falta de combinação Rato: nenhuma homologia em nenhuma posição
AD-18324	0,002	0,006	Negativo	Nenhuma (região de não codificação)	Cino: nenhuma falta de combinação Rat: nenhuma homologia em nenhuma posição
AD-18328	0,003	0,004	Negativo	Nenhuma (região de não codificação)	Cino: nenhuma falta de combinação Rat: 7 faltas de combinação
AD-18339	0,004	0,002	Negativo	Nenhuma (região de não codificação)	Nenhuma

Exemplo 4. Redução *in vivo* de mRNA de TTR de fígado e proteína TTR de plasma por LNP01-18324, LNP01-18328 e LNP01-18246 em camundongos transgênicos

[00270] Dois siRNAs de TTR, AD-18324 e AD-18328, foram escolhidos para avaliação *in vivo*. Esses dúplexes exibiram silenciamento dependente da dose *in vitro* em linhagens de célula de hepatócito (por exemplo, HepG2). A figura 2A e a figura 2B mostram as respostas de dose em células HepG2 após transfecção com AD-18324 (figura 2A) ou AD-18328 (figura 2B) onde as doses são expressas em

nM no eixo X e as respostas são expressas como fração de mRNA de TTR restante com relação a controle, no eixo y. Em células HepG2, as IC₅₀s de AD-18324 e AD-18328 foram determinadas ser 2 pM e 3 pM, respectivamente. Os sítios-alvos de TTR para ambos os principais candidatos de dsRNA estão na região não traduzida 3' do mRNA de TTR, em uma região onde não há quaisquer mutações descritas na literatura.

[00271] As sequências de cada fitados dois principais candidatos são reproduzidas abaixo a partir das tabelas. Fita: s = senso; as = antissenso; Posição = posição de base 5' no transcrito NM_000371.2.

Dúplex No.	Fita	Oligo No.	Posição*	Sequências 5' a 3'	SEQ ID NO:
AD-18324	s	A-32337	509	GGAuucAuGuAAccAAGAdTdT	1001
AD-18324	as	A-32338	527	UCUUGGUuAcAUGAAAUCCdTdT	1002
AD-18328	s	A-32345	518	GuAAccAAGÁguauuccAudTdT	1009
AD-18328	as	A-32346	536	AUGGAAuACUCUUGGUuACdTdT	1010

[00272] Ainda, dsRNA de TTR de reatividade cruzada de roedor, AD-18246, foi escolhido para avaliação adicional *in vivo*. AD-18246 se direciona a uma sequência começando na posição 88 da estrutura de leitura aberta, onde há três mutações relatadas na literatura. Uma curva de dose-resposta para AD-18246 em células HepG2 é mostrada na figura 3. AD-18246 é substancialmente menos potente do que AD-18324 e AD-18328; a IC₅₀ de AD-18246 foi determinada ser 265 pM.

[00273] AD-18324, AD-18328 e AD-18246 foram administrados a camundongos transgênicos após formulação em LNP01. Camundongos transgênicos H129-mTTR-KO/iNOS-KO/hTTR de 3-5 meses de vida (inativação de transtirretina de camundongo/inativação de óxido nítrico sintase induzível/transtirretina humana transgênica) foram

intravenosamente (IV) administrados com 200 µL de siRNA específico de transtirretina formulado com LNP01 (AD-18324, AD-18328 ou AD-18246), siRNA controle formulado com LNP01 se direcionando ao gene da luciferase de não mamífero (Ad-1955) ou PBS através da veia da cauda em concentrações de 1,0 mg/kg, 3,0 mg/kg ou 6,0 mg/kg para siRNAs AD-18324 e AD-18328, 3,0 mg/kg para siRNA AD-18246 e 6,0 mg/kg para siRNA AD-1955. LNP01 é uma formulação lipídeo compreendida de ND98, Colesterol e PEG-Ceramida C16.

[00274] Após aproximadamente 48 horas, os camundongos foram anestesiados com 200 µL de cetamina e então exsanguinados cortando a artéria caudal direita. Sangue integral foi isolado e plasma foi isolado e armazenado a -80°C até o ensaio. Tecido do fígado foi coletado, rapidamente congelado e armazenado a -80°C até processamento.

[00275] A eficácia do tratamento foi avaliada através de (i) medição de mRNA de TTR em fígado a 48 horas pós-dose e (ii) medição de proteína TTR em plasma em pré-sangria e em 48 horas pós-dose. Os níveis de mRNA no fígado de TTR foram ensaiados utilizando os ensaios de DNA Ramificado QuantiGene 2.0 (No. Cat. Panomics: QS0011). Em suma, amostras de fígado de camundongo foram moídas e lisados de tecido foram preparados. 20 µL de Working Probe Set (sonda de PPR para direcionamento de gene e GAPDH para controle endógeno) e 80 µL de lisado de tecido foram então adicionados à Placa de Captura. As Placas de Captura foram incubadas a 55°C ± 1°C (aproximadamente 16-20 horas). No dia seguinte, a Placa de Captura foi lavada 3 vezes com Tampão de Lavagem 1X (água livre de nucleasse, Componente 1 de Tampão e Componente 2 de Tampão), então seca através de centrifugação por 1 minuto a 240 g. 100 µL de pré-Amplifier Working Reagent foram adicionados à Placa de Captura, que foi vedada com folha de alumínio e incubada por 1 hora a 55°C ± 1°C. Seguindo incubação por 1 hora, a etapa de lavagem foi repetida,

então 100 µL de Amplifier Working Reagent foram adicionados. Após 1 hora, as etapas de lavagem e secagem foram repetidas, e 100 µL de Sonda Marcadora foram adicionados. As placas de captura foram incubadas a $50^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 1 hora. A placa foi então lavada com Tampão de Lavagem 1X, seca e 100 µL de substrato foram adicionados na Placa de Captura. As Placas de Captura foram lidas usando o Luminômetro SpectraMax seguindo uma incubação de 5 a 15 minutos. Dados de bDNA foram analisados através de subtração da base média de cada amostra de triplicata, com média dos valores de GAPDH em triplicata resultante (sonda controle) e TTR (sonda experimental), e então computação da razão: (sonda experimental-base)/(sonda controle-base).

[00276] Os níveis de TTR no plasma foram ensaiados utilizando o estojo comercialmente disponível: "AssayMax Human Prealbumin ELISA Kit" (AssayPro, St. Charles, MO, N° de catálogo EP3010-1) de acordo com as orientações do fabricante. Sumarizando, plasma de camundongo foi diluído 1:10.000 em diluentes mistos 1X e adicionado a placas pré-revestidas junto com padrões do estojo e incubado por 2 horas em temperatura ambiente seguido por lavagens 5X com tampão de lavagem do estojo. Cinquenta microlitros de anticorpo de pré-albumina biotinilada foram adicionados a cada cavidade e incubados por 1 hora em temperatura ambiente, seguido por lavagens 5X com tampão de lavagem. Cinquenta microlitros de conjugado de estreptavidina-peroxidase foram adicionados a cada cavidade e as placas foram incubadas por 30 minutos em temperatura ambiente seguido por lavagem conforme anteriormente descrito. A reação foi desenvolvida através da adição de 50 µL/cavidade de substrato de cromogênio e incubação por 10 minutos em temperatura ambiente com parada da reação através da adição de 50 µL/cavidade de solução de parada. Absorbância a 450 nm foi lida em uma leitora de placa

Versamax (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) e os dados foram analisados utilizando o pacote de *software* Softmax 4.6 (Molecular Devices).

[00277] LNP01-18324 e LNP01-18328 foram constatados reduzir os níveis de mRNA de TTR no fígado (figura 4A) e proteína TTR no plasma (figura 4B) de uma maneira dependente da dose com administração de bolo IV. A ED₅₀ de mRNA de LNP01-18328 foi determinada ser ~ 1 mg/kg, enquanto a ED₅₀ de LNP01-18324 foi determinada ser ~2 mg/kg. Os efeitos de LNP01-18324 e LNP01-18328 eram específicos, porque o controle, LNP01-1955 a 6 mg/kg, não afetou significativamente os níveis de mRNA de TTR no fígado, comparado com o grupo de PBS. LNP01-18324 e LNP01-18328 reduziram os níveis de proteína TTR no plasma com relação ao grupo de PBS, com potências que eram similares àsquelas de níveis de mRNA de TTR. A 3 mg/kg, LNP01-18246 reduziu os níveis de mRNA de TTR no fígado para um grau menor do que 3 mg/kg de LNP01-18324 ou LNP01-18328.

[00278] Esses resultados demonstram que LNP01-18324 e LNP01-18328, administrados através de bolo IV, substancialmente reduzem mRNA de TTR humano expresso pelo fígado de camundongo transgênico, que resulta em redução de proteína TTR humana na circulação.

Exemplo 5. Redução *in vivo* de mRNA de TTR do tipo selvagem no fígado do primata não-humano por SNALP-18324 e SNALP-18328

[00279] Para avaliar a eficácia de siRNAs de TTR AD-18324 e AD-18328 em primatas não-humanos sobre níveis de mRNA de TTR do fígado, os siRNAs foram formulados em SNALPe administrados através de infusão IV 1-5 minutos. Macacos cinomólogos (*Macaca fascicularis*) (2 a 5 kg, 3 animais por grupo) foram administrados com infusões IV de 15 minutos de SNALP-18324 (0,3, 1,0 ou 3,0 mg/kg), SNALP-18328 (0,1, 1 ou 3 mg/kg) ou SNALP-1955 (3 mg/kg, com siRNA controle

negativo AD-1955, que se direciona à luciferase de gene de não mamífero). Em quarenta e oito horas pós-dosagem, os macacos foram anestesiados com pentobarbital de sódio e exsanguinados. Tecido de fígado para determinação de mRNA de TTR foi coletado, rapidamente congelado e armazenado a -80°C até processamento.

[00280] Os níveis de mRNA de TTR no fígado foram ensaiados utilizando um ensaio de DNA Ramificado projetado sob medida, utilizando a tecnologia QuantiGene 1.0. Em suma, amostras de fígado de macaco foram moídas e lisados de tecido foram preparados. Mistura de lise do fígado (1 volume de mistura de lise, 2 volumes de água livre de nucleasse e 10 μL de Proteinase-K/ml para uma concentração final de 20 mg/ml) foi incubada a 65°C por 35 minutos. 20 μL de Working Probe Set (sonda de TTR para direcionamento de gene e DAPDH para controle endógeno) e 80 μL de lisado de tecido foram então adicionados à Placa de Captura. Placas de Captura foram incubadas a $55^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ (aproximadamente 16-20 horas). No dia seguinte, as Placas de Captura foram lavadas três vezes com Tampão de Lavagem 1X (água livre de nuclease, Componente de Tampão 1 e Componente de Tampão de Lavagem 2), então secas através de centrifugação por 1 minuto a 240 g. 100 μL de pre-Amplifier Working Reagent foram adicionados à Placa de Captura, que foi vedada com folha de alumínio e incubada por 1 hora a $55^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Seguindo incubação de 1 hora, a etapa de lavagem foi repetida e então 100 μL de Amplifier Working Reagent foram adicionados. Após 1 hora, as etapas de lavagem e secagem foram repetidas, e 100 μL de Sonda de Marcação foram adicionados. Placas de Captura foram incubadas a $50^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 1 hora. As placas foram então lavadas com Tampão de Lavagem 1X e secas, e então 100 μL de Substrato foram adicionados à Placa de Captura. As Placas de Captura foram lidas usando Luminômetro SpectraMax seguindo uma incubação de 5 a 15 minutos. Dados de bDNA foram analisados através de (i)

subtração da base média de cada amostra de triplicata, (ii) média dos valores de GAPDH (sonda controle) e TTR (sonda experimental) resultantes e então (iii) obtenção da razão: (sonda experimental-base)/(sonda controle-base).

[00281] Os resultados são mostrados na figura 5. SNALP-18324 e SNALP-18328 reduziram os níveis de mRNA de TTR no fígado de uma maneira dependente da dose, comparado com o controle negativo SNALP-1955. As ED₅₀s de mRNA de SNALP-18328 e SNALP-18324 foram determinadas ser ~0,3 e ~1 mg/kg, respectivamente.

[00282] Esses resultados demonstram que SNALP-18324 e SNALP-18328 são eficazes na supressão de mRNA de TTR do tipo selvagem em fígado de primata não humano quando administrados através de infusão IV.

Exemplo 6. Redução *in vivo* de mRNA de TTR mutante (V30M) e proteína por SNALP-18328 no camundongo transgênico

[00283] Para avaliar a eficácia de siRNA de TTR AD-18328 em mRNA de TTR mutante (V30M) no fígado e proteína TTR mutante (V30M) no soro, AD-18328 foi formulado em SNALP e administrado através de bolo IV a camundongos transgênicos hTTR V30M. Camundongos transgênicos hTTR V30M de 8 a 12 semanas de vida (5 animais/grupo) foram intravenosamente administrados (IV) com 200 µL de SNALP-18328 (0,03, 0,3 ou 3 mg/kg), SNALP-1955 (3 mg/kg, com siRNA controle negativo AD-1955 que se direciona a gene da luciferase de não-mamífero) ou PBS. Os camundongos usados eram a linhagem *Mus musculus* H129-hTTR KO da Molecular and Cellular Biology, Porto, Portugal. Em suma, camundongos transgênicos hTTR H129 foram cruzados com um camundongo KO TTR endógeno H129 (camundongos nulos para gerar os camundongos transgênicos H129-hTTR, em uma base de TTR de camundongo nulo (Maeda, S. (2003). "Use of genetically altered mice to study the role of serum amyloid P

component in amyloid deposition". *Amyloid Suppl.* 1, 17-20).

[00284] Em 48 horas pós-injeção, animais em cinco grupos de tratamento receberam uma dose letal de cetamina/xilazina. Amostras de soro foram coletadas e armazenadas a -80°C até análise. Tecido de fígado foi coletado, rapidamente congelado e armazenado a -80°C até processamento.

[00285] Para quantificação de mRNA de TTR, tecido de fígado congelado foi moído em pó e lisados foram preparados. Os níveis de mRNA de TTR com relação àqueles de mRNA de GAPDH foram determinados nos lisados usando um ensaio de DNA ramificado (QuantiGene Reagent System, Panomics, Fremont, CA). Em suma, o ensaio QuantiGene (Genospectra) foi usado para quantificar níveis de mRNA em lisados de amostra de tecido de acordo com as instruções do fabricante. O nível médio de mRNA de TTR foi normalizado para o nível médio de mRNA de GAPDH para cada amostra. Médias de grupo dos valores normalizados foram então normalizadas mais para o valor médio para o grupo tratado com PBS, para obter o nível relativo de expressão de mRNA de TTR.

[00286] Para quantificação de proteína TTR, soro foi ensaiado usando o AssayPro (St. Charles, MO) Assaymax PreAlbumin ELISA Kit de acordo com o protocolo do fabricante.

[00287] Os resultados são mostrados na FIGURA 6A e na FIGURA 6B para mRNA de fígado e proteína no soro, respectivamente. Camundongos transgênicos hTTR V30M tratados com SNALP-18328 tinham uma diminuição dependente da dose e significativa em níveis de mRNA de TTR no fígado com relação ao grupo controle de PBS, atingindo uma redução máxima de 97% ($p < 0,001$) a 3 mg/kg de SNALP-18328 e uma redução de 50% (ED50) a ~0,15 mg/kg de SNALP-18328. Proteína TTR no soro foi também suprimida de uma maneira dependente da dose, com uma redução máxima de proteína TTR no soro de 99%

($p < 0,01$) (com relação a níveis de pré-dose) a 3 mg/kg de SNALP-18328, consistente com a redução em níveis de mRNA de TTR. SNALP-1955 a 3 mg/kg não tinha o efeito estatisticamente significativo nem nos níveis de mRNA de TTR nem de proteína, comparado com PBS.

[00288] Esses resultados demonstram que SNALP-18328, quando administrado IV, é ativo em supressão de mRNA de TTR V30M mutante no fígado de camundongo transgênico, que resulta em redução de proteína TTR V30M mutante na circulação.

Exemplo 7. Durabilidade de mRNA de TTR e supressão de proteína por SNALP-18328 no camundongo transgênico

[00289] Para avaliar a durabilidade de supressão de mRNA de TTR e proteína por SNALP-18328, AD-18328 foi formulado em SNALP e administrado através de bolo IV a camundongos transgênicos hTTR V30M. Em vários pontos de tempo pós-dose, os níveis de mRNA de TTR no fígado e níveis de proteína TTR no soro foram quantificados. Camundongos transgênicos hTTR V30M de 8 a 12 semanas de vida (4 animais/grupo) foram intravenosamente administrados com 200 μ L de SNALP-18328 (1 mg/kg) ou SNALP-1955 (1 mg/kg, com siRNA controle negativo AD-1955 que se direciona ao gene da luciferase de não-mamífero). Os camundongos usados foram a linhagem *Mus musculus* H129-hTTR KO do Institute of Molecular and Cellular Biology, Porto, Portugal. Em suma, camundongos transgênicos H129 hTTR foram cruzados com um camundongo TTR KO endógeno H129 (camundongos nulos para gerar os camundongos transgênicos H129-hTTR, em uma base de TTR de camundongo nulo) (Maeda, S. (2003). "Use of genetically altered mice to study the role of serum amyloid P component in amyloid deposition". Amyloid Suppl. 1, 17-20). No Dia 3, 8, 15 ou 22 pós-dose, os animais em ambos os grupos de tratamento receberam uma dose letal de cetamina/xilazina. Amostras de soro foram coletadas e armazenadas a -80°C até análise. Tecido de fígado foi

coletado, rapidamente congelado e armazenado a -80°C até processamento.

[00290] Para quantificação de mRNA de TTR, tecido de fígado congelado foi moído em pó e lisados foram preparados. Os níveis de mRNA de TTR com relação àqueles de mRNA de GAPDH foram determinados nos lisados usando um ensaio de DNA ramificado (QuantiGene Reagent System, Panomics, Fremont, CA). Em suma, o ensaio QuantiGene (Genospectra) foi usado para quantificar níveis de mRNA em lisados de amostra de tecido de acordo com as instruções do fabricante. O nível médio de mRNA de TTR foi normalizado para o nível médio de mRNA de GAPDH para cada amostra. Médias de grupo dos valores normalizados foram então normalizadas mais para o valor médio para o grupo tratado com PBS, para obter o nível relativo de expressão de mRNA de TTR.

[00291] Para quantificação de proteína TTR, soro foi ensaiado usando o AssayPro (St. Charles, MO) Assaymax PreAlbumin ELISA Kit de acordo com o protocolo do fabricante.

[00292] Os resultados são mostrados na figura 7A e na figura 7B para mRNA no fígado e proteína no soro, respectivamente. Uma administração de bolo IV única de SNALP-18328 no camundongo transgênico V30M hTTR resultou em inibição durável de níveis de mRNA de TTR no fígado e níveis de proteína TTR no soro. Comparado com o grupo controle (1 mg/ml de SNALP-1955), uma administração IV única de SNALP-18328 a 1 mg/kg reduziu significativamente os níveis de mRNA relativos nos Dias 3, 8, 15 e 22 pós-dose em 96% ($p<0,001$), 90% ($p<0,001$), 82% ($p<0,001$) e 73% ($p<0,001$), respectivamente, e não retornaram para os níveis de linha de base no término do estudo (Dia 22 pós-dose). Os níveis de proteína também diminuíram com uma redução máxima de TTR no soro de 97% ($p<0,001$) (com relação a SNALP-1955) no Dia 3 pós-dose. Nos Dias 8, 15 e 22 pós-dose, os

níveis de proteína TTR foram suprimidos em 72% ($p<0,05$), 32% ($p<0,05$) e 40% ($p<0,001$), respectivamente, com relação a SNALP-1955.

[00293] Esses resultados demonstram que uma única administração IV de SNALP-18328 produz supressão durável de níveis de mRNA no fígado alvo e proteína no soro no camundongo transgênico hTTR V30M, com reduções significantes de ambos mRNA de TTR e proteína TTR no soro em 22 dias pós-dose.

Exemplo 8. Durabilidade de supressão de proteína TTR no soro por SNALP-18328 no primata não-humano

[00294] Para avaliar a durabilidade de supressão de proteína TTR no soro por SNALP-18328, AD-18328 foi formulado em SNALP e administrado através de infusão IV a primatas não-humanos. Em vários pontos de tempo pós-dose, os níveis de proteína TTR no soro foram quantificados.

[00295] Macacos cinomólogos (*Macaca fascicularis*) (n=5 animais/grupo para grupos de SNALP-18328 e n=3 animais/grupo para grupos de SNALP-1955 e PBS) foram administrados com uma infusão IV de 15 minutos de SNALP-18328 (0,3, 1 ou 3 mg/kg), SNALP-1955 (3 mg/kg) com siRNA controle negativo AD-1955 que se direciona ao gene da luciferase de não mamífero) ou PBS. Nos Dias 0, 1, 2, 3, 4, 5, 7, 10 e 14 da fase de dosagem, amostras de soro foram coletadas e armazenadas a -80°C até análise.

[00296] Análise western blot foi usada para avaliar os níveis de proteína TTR em amostras de soro. Amostras de soro de cada grupo foram agrupadas e diluídas 1:1 com tampão de amostra Laemmli (β -mercaptoetanol foi adicionado em uma diluição 1:20). As amostras foram aquecidas a 95°C por 10 minutos. 12,5 μ L de cada amostra foram carregados em cada faixa de um gel prep Criterion 20% (Biorad, Hercules, CA) e separados através de SDS-PAGE a 120 V por 1,5 h,

então transferidos para uma membrana de microcelulose usando um sistema semi-seco a 15V por 1 hora. A membrana foi bloqueada da noite para o dia a 4°C em tampão de bloqueio LiCOR (Lincoln, NE) diluído 1:1 com PBS 1X. O blot foi testado primeiro com anticorpos primários (TTR anticabra da Santa Cruz (Santa Cruz, CA) em uma diluição de 1:1000 diluídos em tampão de bloqueio LiCOR/PBS em um rocker por 1 hora em temperatura ambiente. Os blots foram lavados 4X com PBS + Tween 20 0,2% (10 minutos por lavagem). Os anticorpos secundários marcados fluorescentes (anti-cabra 680 nm da Invitrogen (Carlsbad, CA) foram adicionados em uma diluição de 1:10.000 em tampão de bloqueio LiCOR/PBS e o blot foi incubado por 1 hora em temperatura ambiente. Após incubação, os blots foram lavados 4X com PBS + Tween 20 0,2% seguido por uma lavagem com PBS 1X. O Odyssey Infrared Imaging System da Li-COR foi usado para detectar as faixas de proteína. O monômero de TTR migra a 15 kDa.

[00297] Os resultados são mostrados na figura 8. Os níveis de proteína TTR no soro mostraram uma redução dependente da dose com 1 ou 3 mg/kg de SNALP-18328, comparado com níveis de pré-dose (Dia 0). A duração de supressão, seguindo uma administração IV única de SNALP-18328, é pelo menos 14 dias após tratamento com 1 ou 3 mg/kg de SNALP-18329.

[00298] Esses resultados demonstram que uma administração IV única de SNALP-18328 produz supressão durável de proteína TTR na circulação no primata não humano (*Macaca fascicularis*), com redução significativa de proteína TTR em 14 dias pós-dose.

Exemplo 9: Redução *in vivo* de TTR mutante (V30M) em tecido periférico por SNALP-18328 no camundongo transgênico

[00299] Para avaliar a eficácia de SNALP-18328 na redução de TTR em tecidos periféricos, camundongos inativados em hTTR V30M/HSF-1 foram avaliados com marcação imuno-histoquímico quanto à TTR.

Camundongos inativados em V30M/HSF-1 hTT de dois meses (Maeda, S., (2003), "Use of genetically altered mice to study the role of sérum amyloid P component in amyloid deposition". *Amyloid Suppl.* 1, 17-20) foram administrados com um bolo IV de 3 mg/kg de SNALP-18328 (12 animais), 3 mg/kg de SNALP-1955 (com siRNA controle negativo AD-1955 que se direciona ao gene da luciferase de não mamífero, 4 animais) ou PBS (4 animais) uma vez a cada duas semanas por um total de quatro doses nos dias 0, 14, 28 e 42. Os níveis de mRNA no fígado de TTR e imunorreatividade de TTR em tecidos periféricos múltiplos foram avaliados em 8 semanas após a primeira dose no dia 56.

[00300] Os camundongos foram anestesiados com 1 mg/kg de medetomidina e receberam uma dose letal de cetamina. Tecidos e órgãos de interesse foram coletados. Para imuno-histoquímica, esôfago (E), estômago (S), intestino (duodeno (I1) e colo (14)), nervo (N) e gânglios de raiz dorsal (D) foram fixados em formalina tamponada neutra e embebidos em parafina. Para detecção de TTR, anticorpo primário de TTR anti-humano de coelho (1:1000, DAKO, Dinamarca) e anticorpo secundário conjugado à biotina anticoelho (1:20 Sigma, USA) foram seguidos através de marcação com extravidina (1:20, Sigma, USA) a fim de tingir a proteína TTR. A reação foi desenvolvida com 3-amino-9-etil carbaxol, AEC (Sigma, USA). Análise semiquantitativa de lâminas imuno-histoquímicas foi realizada usando Scion image quant program que mede a área ocupada pela cor de reação do substrato e normaliza este valor para a área de imagem total. Valores médios de % de área ocupada são mostrados com o desvio padrão correspondente. Cada tecido animal foi avaliado em quatro áreas diferentes. A presença de TTR humano em gânglios parassimpáticos do estômago e intestino foi estudada através de marcação imunofluorescente duplo com TTR anti-humano de coelho (1:1000, DAKO, Dinamarca) e anti-PGP9.5 de camundongo (1:40, Serotec, USA) como os anticorpos primários;

anticorpos secundários foram, respectivamente, anti-coelho Alexa Fluor 488 (Molecular probes, RU) e anticumundongo de cabra Alexa Fluor 568 (Molecular probes, RU). As lâminas foram montadas com vectashield (Vector) e visualizadas em um microscópio Zeiss Cell Observer System (Carl Zeiss, Alemanha) equipado com filtros para FITC e rodamina.

[00301] Os resultados são postos em gráfico na FIGURA 9. Em contraste com animais tratados com PBS e SNALP-1955, animais tratados com SNALP-18328 tinham uma redução significativa de imunorreatividade de TTR em todos os tecidos examinados (esôfago (E), estômago (S), intestino (duodeno (I1) e colo (I4)), nervo (N) e gânglios da raiz dorsal (D)).

[00302] Esses resultados demonstram que administração de SNALP-18328 a camundongos inativados V30M/HSF-1 hTTR causa uma redução significativa de proteína TTR em tecidos e órgãos periféricos, incluindo esôfago, estômago, intestino (duodeno e colo), nervo e gânglio da raiz dorsal.

Exemplo 10. Redução *in vivo* de mRNA de TTR do tipo selvagem no fígado de primata não-humano por XTC-SNALP-18328

[00303] Para avaliar a eficácia da nova formulação em nanopartícula de lipídeo XTC-SNALP para administração de siRNA em primata não-humano, siRNA de TTR AD-18328 foi formulado em XTC-SNALP (XTC-SNALP-18328) e administrado através de infusão IV de 15 minutos e mRNA de TTR do fígado foi quantificado. Macacos cinomólogos (Macaca fascicularis) foram administrados com infusões IV de 15 minutos de XTC-SNALP-18328 (0,03, 0,1, 0,3 ou 1 mg/kg) ou XTC-SNALP-1955 (1 mg/kg, com siRNA controle negativo AD-1955 que se direciona ao gene da luciferase de não mamífero). Em quarenta e oito horas pós-dosagem, os macacos foram anestesiados com pentobarbital de sódio e exsanguinados. Tecido do fígado para determinação de mRNA de TTR foi coletado, congelado rapidamente e armazenado a -

80°C até processamento. Métodos usados para quantificação de mRNA de TTR em tecido de fígado eram similares àqueles descritos no Exemplo 5 acima.

[00304] Os resultados são mostrados na FIGURA 10. XTC-SNALP-18328 reduziu os níveis de mRNA de TTR no fígado de uma maneira dependente da dose, comparado com o controle negativo XTC-SNALP-1955. A ED50 de mRNA foi determinada ser ~0,1 mg/kg de XTC-SNALP-18328.

[00305] Esses resultados demonstram que XTC-SNALP-18328 é eficaz na supressão de mRNA de TTR do tipo selvagem em fígado de primata não humano quando administrado através de infusão IV.

Exemplo 11: Redução *in vivo* de mRNA de TTR do tipo selvagem no fígado de primata não-humano por LNP09-18328 e LNP11-18328

[00306] Para avaliar a eficácia de duas formulações em nanopartícula novas, LNP09 e LNP11, para administração de siRNA a primata não humano, siRNA de TTR AD-18328 foi formulado em LNP09 (LNP09-18328) ou LNP11 (LNP11-18328) e administrado através de infusão IV por 15 minutos e os níveis de mRNA de TTR e proteínas TTR no soro foram ensaiados. Macacos cinomólogos (*Macaca fascicularis*) foram administrados com infusões IV de 15 minutos de LNP09-18328 (0,03, 0,1 ou 0,3 mg/kg), LNP11-18328 (0,03, 0,1 ou 0,3 mg/kg) ou PBS. Amostras de biópsia do fígado foram coletadas 48 horas pós-dosagem, congeladas rapidamente e armazenadas a -80°C até processamento. Soro foi coletado antes da dosagem (pré-sangria) e nos Dias 1, 2, 4, 7, 14, 21 e 28 pós-dosagem e armazenado a -80°C até processamento. Métodos usados para quantificação de mRNA de TTR em avaliação de tecido de fígado e proteína TTR no soro eram similares àqueles descritos nos Exemplos 5 e 8 acima.

[00307] Os resultados são mostrados na FIGURA 11A para mRNA e na FIGURA 11B e na FIGURA 11C para proteína. Animais tratados com

LNP09-18328 e LNP11-18328 mostraram uma diminuição dependente da dose em níveis de mRNA de TTR no fígado, atingindo uma redução máxima a 0,3 mg/kg de ~85% (LNP09-18328) e ~90% (LNP11-18328) de mRNA com relação ao controle de PBS. A ED50 de mRNA foi determinada ser ~0,02 mg/kg para ambos o LNP09-18328 e o LNP11-18328. No Dia 7 pós-dosagem, amostras de soro também exibiram uma redução dependente da dose de proteína TTR por 0,1 e 0,3 mg/kg de LNP09-18328 e LNP11-18328, comparado com níveis de controle de PBS. A FIGURA 11C mostra uma diminuição nos níveis de proteína TTR com uma dose de 0,3 mg/kg de LNP09/18328 que persistiu durante pelo menos 28 dias pós-dosagem, comparado com o grupo controle de PBS e comparado com as amostras pré-sangria.

[00308] Esses resultados demonstram que LNP09-18328 e LNP11-18328 são eficazes na supressão de mRNA de TTR do tipo selvagem em fígado de primata não humano e proteína TTR do tipo selvagem na circulação, quando administrados através de infusão IV. Ainda, a supressão com LN09-18328 é durável, persistindo por pelo menos 28 dias seguindo a infusão IV.

Exemplo 12. Síntese de Sequências Cobertas com TTR

[00309] Um conjunto de dúplexes de TTR ("dúplexes cobertos") foi projetado, o qual se direcionava ao gene de TTR próximo à região alvo de AD-18328, que se direciona ao gene da TTR humana começando no nucleotídeo 628 de NM_000371.3.

[00310] Nos exemplos abaixo, a numeração representando a posição da base 5' de um siRNA no transcrito é baseada em NM_000371.3 (figura 12; SEQ ID NO:1331). Nos exemplos mostrados acima, a numeração para siRNA se direcionando a siRNA humano era baseada em NM_000371.2 (figura 13A). NM_000371.3 se estende da sequência da UTR 5' em 110 bases comparado com NM_000371.2, conforme mostrado na figura 14. Desta maneira, como um exemplo, a

posição de partida de AD-18328 é 628 em NM_000371.3 e 528 em NM_000371.2 (FIGURA 4).

[00311] Sequências cobertas com TTR foram sintetizadas em sintetizador MerMade 192 em escala de 1 umol. Para todas as sequências na lista, química 'endolight' foi aplicada conforme detalhado abaixo.

- Todas as pirimidinas (citosina e uridina) na fita de senso continham bases 2'-O-Metila (2'-O-Metila C e 2'-O-Metila U)
- Na fita antissenso, pirimidinas adjacentes a (em direção à posição 5) ribonucleosídeo A foram substituídas com seus nucleosídeos 2-O-Metila correspondentes
- Uma extensão de dTdT de duas bases na extremidade 3' de ambas as sequências de senso e antissenso foi introduzida
- O arquivo de sequência foi convertido em um arquivo de texto para torná-lo compatível para carregamento no *software* de síntese MerMade 192.

Síntese, Clivagem e Desproteção:

[00312] A síntese de sequências de TTR usou síntese de oligonucleotídeo apoiada em sólido usando química de fosforamidita. A síntese das sequências foi realizada em uma escala 1 um em placas de 96 cavidades. As soluções de amidita foram preparadas em uma concentração de 0,1M e etil tio tetrazol (0,6M em Acetonitrila) foi usado como ativador. As sequências sintetizadas foram clivadas e desprotegidas em placas de 96 cavidades, usando metilamina na primeira etapa e reagente de fluoreto na segunda etapa. As sequências brutas foram precipitadas usando mistura de acetona:etanol (80:20) e o pélete foi ressuspensão em tampão de acetato de sódio 0,2M. Amostras de cada sequência foram analisadas através de LC-MS para confirmar a identidade, UV para quantificação e um conjunto selecionado de amostras através de cromatografia IEX para determinar a pureza.

Purificação e dessalinização:

[00313] Sequências cobertas com TTR foram purificadas em sistema de purificação AKTA explorer usando coluna Source 15Q. Uma temperatura de coluna de 65°C foi mantida durante a purificação. Injeção e coleta de amostra foram realizadas em placas de 96 cavidades (cavidades de 1,8 mL de profundidade). Um pico único correspondendo à sequência de comprimento integral foi coletado no eluente. As sequências purificadas foram dessalinizadas em uma coluna Sephadex G25 usando purificador AKTA. As sequências de TTR dessalinizadas foram analisadas quanto à concentração (através de medição de UV a A260) e pureza (através de HPLC de troca de íon). As fitas simples foram então encaminhados para anelamento.

Fitas Únicos e dúplexes de TTR:

[00314] Uma lista detalhada de dúplexes cobertos com TTR e fitas únicos correspondentes (senso e antissenso) é mostrada na tabela abaixo (Tabela 13).

Tabela 13: Dúplexes cobertos com TTR e fitas simples correspondentes

Fita: s = senso; as = antissenso; Posição: posição da base 5' no transcrito (NM_000371.3, SEQ ID NO:1331).

Dúplex No.	Posição	Oligo No.	Fita	Sequência (5' a 3")	SEQ ID NO:
AD-18323	618	A-32335	S	GGGAuuucAuGuAAccAAGdTdT	1332
		A-32336	AS	CUUGGUuAcAUGAAAUC CCdTdT	1333
AD-18324	619	A-32337	S	GGAuuucAuGuAAccAAGA dTdT	1334
		A-32338	AS	UCUUGGUuAcAUGAAAU CCdTdT	1335
AD-23000	620	A-42927	S	GAuuucAuGuAAccAAGAG dTdT	1336

Dúplex No.	Posição	Oligo No.	Fita	Sequência (5' a 3'')	SEQ ID NO:
		A-42928	AS	CUCUUGGUuAcAUGAAA UCdTdT	1337
AD-23001	621	A-42929	S	AuuucAuGuAAccAAGAGu dTdT	1338
		A-42930	AS	ACUCUUGGUuAcAUGAA AUdTdT	1339
AD-23002	622	A-42931	S	uuucAuGuAAccAAGÁguad TdT	1340
		A-42932	AS	uACUCUUGGUuAcAUGAA AdTdT	1341
AD-23003	623	A-42933	S	uucAuGuAAccAAGÁguaud TdT	1342
		A-42934	AS	AuACUCUUGGUuAcAUGA AdTdT	1343
AD-18325	624	A-32339	S	ucAuGuAAccAAGÁguauud TdT	1344
		A-32340	AS	AAuACUCUUGGUuAcAUG AdTdT	1345
AD-23004	625	A-42935	S	cAuGuAAccAAGÁguauucd TdT	1346
		A-42936	AS	GAAuACUCUUGGUuAcAU GdTdT	1347
AD-18326	626	A-32341	S	AuGuAAccAAGÁguauuccd TdT	1348
		A-32342	AS	GGAAuACUCUUGGUuAc AUdTdT	1349
AD-18327	627	A-32343	S	uGuAAccAAGÁguauuccAd TdT	1350
		A-32344	AS	UGGAAuACUCUUGGUuA cAdTdT	1351

Dúplex No.	Posição	Oligo No.	Fita	Sequência (5' a 3')	SEQ ID NO:
AD-23005	628	A-42937	S	uAAccAAGÁguauuccAuudTdT	1352
		A-42938	AS	AAUGGAAuACUCUUGGUuAdTdT	1353
AD-23006	629	A-42939	S	AAccAAGÁguauuccAuuudTdT	1354
		A-42940	AS	AAAUGGAAuACUCUUGGUUdTdT	1355
AD-23007	631	A-42941	S	AccAAGÁguauuccAuuuudTd	1356
		A-42942	AS	AAAAUGGAAuACUCUUGGUdTdT	1357
AD-23008	632	A-42943	S	ccAAGÁguauuccAuuuuudTd	1358
		A-42944	AS	AAAAAUGGAAuACUCUUGGdTdT	1359
AD-23009	633	A-42945	S	cAAGÁguauuccAuuuuuAdTd	1360
		A-42946	AS	uAAAAAUGGAAuACUCUUGdTdT	1361
AD-23010	634	A-42947	S	AAGÁguauuccAuuuuuAcdTd	1362
		A-42948	AS	GuAAAAAUGGAAuACUCUUdTdT	1363
AD-23011	635	A-42949	S	AGÁguauuccAuuuuuAcudTd	1364
		A-42950	AS	ÁguaAAAAAUGGAAuACUCUdTdT	1365
AD-23012	636	A-42951	S	GÁguauuccAuuuuuAcuAdTd	1366

Dúplex No.	Posição	Oligo No.	Fita	Sequência (5' a 3'')	SEQ ID NO:
		A-42952	AS	uÁguaAAAAUGGAAuACU CdTdT	1367
AD-23013	637	A-42953	S	ÁguauuccAuuuuuAcuAAdT dT	1368
		A-42954	AS	UuÁguaAAAAUGGAAuAC UdTdT	1369
AD-23014	638	A-42955	S	GuAuuccAuuuuuAcuAAAd TdT	1370
		A-42956	AS	UUuÁguaAAAAUGGAAuA CdTdT	1371
AD-23015	639	A-42957	S	uAuuccAuuuuuAcuAAAGd TdT	1372
		A-42958	AS	CUUuÁguaAAAAUGGAAu AdTdT	1373
AD-23016	640	A-42959	S	AuuccAuuuuuAcuAAAGcd TdT	1374
		A-42960	AS	GCUUuÁguaAAAAUGGAA UdTdT	1375
AD-23017	641	A-42961	S	uuccAuuuuuAcuAAAGcAd TdT	1376
		A-42962	AS	UGCUUuÁguaAAAAUGGA AdTdT	1377
AD-23018	642	A-42963	S	uccAuuuuuAcuAAAGcAGd TdT	1378
		A-42964	AS	CUGCUUuÁguaAAAAUGG AdTdT	1379
AD-23019	643	A-42965	S	ccAuuuuuAcuAAAGcAGud TdT	1380
		A-42966	AS	ACUGCUUuÁguaAAAAUG GdTdT	1381

Dúplex No.	Posição	Oligo No.	Fita	Sequência (5' a 3')	SEQ ID NO:
AD-23020	644	A-42967	S	cAuuuuuuAcuAAAGcAGuGdTdT	1382
		A-42968	AS	cACUGCUUuÁguaAAAAUGdTdT	1383
AD-23021	645	A-42969	S	AuuuuuuAcuAAAGcAGuGdTdT	1384
		A-42970	AS	AcACUGCUUuÁguaAAAAUdTdT	1385
AD-23022	646	A-42971	S	uuuuuuAcuAAAGcAGuGuuTdT	1386
		A-42972	AS	AAcACUGCUUuÁguaAAAAdTdT	1387
AD-23023	647	A-42973	S	uuuuuAcuAAAGcAGuGuuTdT	1388
		A-42974	AS	AAAcACUGCUUuÁguaAAAAdTdT	1389
AD-23024	648	A-42975	S	uuuAcuAAAGcAGuGuuuTdT	1390
		A-42976	AS	AAAAcACUGCUUuÁguaAAAAdTdT	1391
AD-23025	649	A-42977	S	uuAcuAAAGcAGuGuuuuTdT	1392
		A-42978	AS	GAAAAcACUGCUUuÁguaAAAAdTdT	1393
AD-23026	650	A-42979	S	uAcuAAAGcAGuGuuuuAdTdT	1394
		A-42980	AS	UGAAAAcACUGCUUuÁguaAAAAdTdT	1395
AD-23027	651	A-42981	S	AcuAAAGcAGuGuuuuAcTdT	1396

Dúplex No.	Posição	Oligo No.	Fita	Sequência (5' a 3'')	SEQ ID NO:
		A-42982	AS	GUGAAAACACUGCUUuA GUdTdT	1397
AD-23028	652	A-42983	S	cuAAAGcAGuGuuuucAccdTdT	1398
		A-42984	AS	GGUGAAAACACUGCUUu AGdTdT	1399
AD-18330	653	A-32349	S	uAAAGcAGuGuuuucAccdTdT	1400
		A-32350	AS	AGGUGAAAACACUGCUU uAdTdT	1401
AD-23029	654	A-42985	S	AAAGcAGuGuuuucAccdTdT	1402
		A-42986	AS	GAGGUGAAAACACUGCU UUdTdT	1403
AD-23030	655	A-42987	S	AAGcAGuGuuuucAcccAdTdT	1404
		A-42988	AS	UGAGGUGAAAACACUGC UUdTdT	1405
AD-23031	656	A-42989	S	AGcAGuGuuuucAcccAudTdT	1406
		A-42990	AS	AUGAGGUGAAAACACUG CUdTdT	1407
AD-18328	628	A-32345	S	GuAAccAAGÁguauuccAudTdT	1408
		A-32346	AS	AUGGAUuACUCUUGGUu ACdTdT	1409

Exemplo 13: Avaliação *in vitro* de siRNAs cobertos com TTR

[00315] Dúplexes de TTR cobertos foram ensaiados em células Hep3B quanto à inibição de expressão de TTR endógena usando ensaios de PCR de tempo real.

[00316] Cultura e transfecção de célula: Células Hep3B (ATCC, Manassas, VA) foram cultivadas para próximo da confluência a 37°C em uma atmosfera de CO₂ 5% em Meio Essencial Mínimo da Eagle (EMEM, ATCC) suplementado com FBS 10%, estreptomicina e glutamina (ATCC) antes de ser liberado da placa através de tripsinização. Transfecção reversa foi realizada através da adição de 5 µL de Opti-MEM a 5 µL de cada siRNA em cavidades individuais de uma placa de 96 cavidades. A isto, 10 µL de Opti-MEM mais 0,2 µL de Lipofectamina RNAiMax foram adicionados por cavidade (Invitrogen, Carlsbad, CA. No. Cat. 13778-150) e a mistura foi incubada em temperatura ambiente por 15 minutos. 80 µL de meio de crescimento completo descrito acima, mas sem antibiótico contendo $2,0 \times 10^4$ células Hep3B foram então adicionados. As células foram incubadas por 24 horas antes da purificação de RNA. Os experimentos foram realizados a 0,1 ou 10 nM de concentração de dúplex final.

[00317] Isolamento de RNA total usando MagMAX-96 Total RNA Isolation Kit (Applied Biosystems, Foster City CA, Parte No.: AM1830): As células foram coletadas e lisadas em 140 µL de Solução de Lise/Ligação, então misturadas por 1 minuto a 850 rpm usando um Eppendorf Thermomixer (a velocidade de mistura era a mesma durante todo o processo). Vinte microlitros de contas magnéticas e mistura Aumentadora de Lise/Ligação foram adicionados ao lisado de célula e misturados por 5 minutos. Contas magnéticas foram capturadas usando descanso magnético e o sobrenadante foi removido sem perturbar as contas. Após remoção do sobrenadante, as contas magnéticas foram lavadas com Solução de Lavagem 1 (isopropanol adicionado) e misturadas por 1 minuto. As contas foram capturadas novamente e o sobrenadante removido. As contas foram então lavadas com 150 µL de Solução de Lavagem 2 (Etanol adicionado), capturadas e o sobrenadante foi removido. 50 µL de mistura de Dnase (MagMax turbo

Dnase Buffer e Turbo Dnase) foram então adicionados às contas e elas foram misturadas por 10 a 15 minutos. Após mistura, 100 µL de Solução de Religação de RNA foram adicionados e misturados por 3 minutos. O sobrenadante foi removido e contas magnéticas foram lavadas novamente com 150 µL de Solução de Lavagem 2 e misturadas por 1 minuto e o sobrenadante foi removido completamente. As contas magnéticas foram misturadas por 2 minutos para secar antes de RNA ser eluído com 50 µL de água.

[00318] Síntese de cDNA usando ABI High Capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, No. Cat. 4368813): Uma mistura máster de 2 µL de Tampão 10X, 0,8 µL de dNTPS 25X, 2 µL de iniciadores aleatórios, 1 µL de Transcriptase Reversa, 1 µL de Inibidor de Rnase e 3,2 µL de H₂O por reação foram adicionados a 10 µL de RNA total. cDNA foi gerado usando um termociclador Bio-Rad C-1000 ou S-1000 (Hercules, CA) através das etapas que seguem: 25°C 10 minutos, 37°C 120 minutos, 85°C 5 s, manter a 4°C.

[00319] PCR de tempo real: 2 µL de cDNA foram adicionados a um misturador máster contendo 0,5 µL de GAPDH TaqMan Probe (Applied Biosystems N° Cat. 4326317E), 0,5 µL de sonda TaqMan (Applied Biosystems N° Cat. HS00174914 M1) e 10 µL de Roche Probes Master Mix (N° Cat. Roche 04887301001) por cavidade em ma placa de 384 cavidades LightCycler 480 (N° Cat. Roche 0472974001). PCR de tempo real foi feita em uma máquina de PCR de Tempo Real LightCycler 480 (Roche). Cada dúplex foi testado em duas transfecções independentes e cada transfecção foi ensaiada em duplicata.

[00320] Dados de tempo real foram analisados usando o método $\Delta\Delta C_t$. Cada amostra foi normalizada para expressão de GAPDH e inativação foi avaliada com relação a células transfectadas com o dúplex de não direcionamento AD-1955. A tabela 14 mostra a inativação de TTR usando

os siRNAs. Os dados são expressos como porcentagem de *mensagem* restante com relação a células direcionadas com AD-1955.

[00321] Muitos, mas não todos, dos dsRNAs de TTR cobertos, se direcionando a TTR próximo ao alvo de AD-18328, reduziram o mRNA de TTR em pelo menos 70% quando transfectados em células Hep3B a 0,1 nM.

Tabela 14: Inibição de TTR por dsRNA coberto se direcionando à TTR próxima ao AD-18328

Dúplex N°	% de mensagem restante 0,1nM	% SD 0,1nM	% de mensagem restante 10nM	% SD 10nM
AD-18323	6,7	1,90	1,7	0,02
AD-18324	1,8	0,58	0,9	0,10
AD-23000	5,5	0,93	2,1	0,87
AD-23001	15,2	4,89	4,9	1,74
AD-23002	3,1	1,12	1,4	0,55
AD-23003	17,3	3,13	1,7	0,06
AD-18325	1,5	0,27	1,4	0,66
AD-23004	9,0	0,15	10,5	0,96
AD-18326	22,0	1,85	7,6	0,78
AD-18327	11,6	2,64	9,6	1,67
AD-18328	1,1	0,70	0,6	0,16
AD-23005	0,8	0,31	0,6	0,21
AD-23006	1,5	0,46	1,2	0,43
AD-23007	2,4	0,91	1,9	0,46
AD-23008	0,6	0,10	0,8	0,26
AD-23009	1,0	0,13	0,9	0,22
AD-23010	60,1	15,66	66,2	22,71
AD-23011	56,5	16,99	53,6	4,70
AD-23012	7,7	2,36	7,7	3,25

Dúplex N°	% de mensagem restante 0,1nM	% SD 0,1nM	% de mensagem restante 10nM	% SD 10nM
AD-23013	7,0	0,64	8,0	1,06
AD-23014	0,7	0,01	0,6	0,10
AD-23015	15,4	0,25	16,5	7,07
AD-23016	27,1	0,37	6,7	1,80
AD-23017	4,5	1,26	1,4	0,40
AD-23018	44,6	9,45	7,5	1,09
AD-23019	2,2	0,68	0,8	0,10
AD-23020	52,7	6,45	29,7	1,17
AD-23021	95,4	16,16	45,0	3,00
AD-23022	70,1	3,01	60,8	12,11
AD-23023	2,7	1,12	1,8	0,07
AD-23024	1,7	0,30	1,8	0,33
AD-23025	64,2	13,21	10,5	1,34
AD-23026	1,9	0,15	1,9	0,78
AD-23027	2,5	0,21	1,6	0,49
AD-23028	6,7	4,41	1,2	0,50
AD-18330	6,0	0,56	5,7	1,15
AD-23029	4,5	0,47	1,6	0,10
AD-23030	3,9	0,25	3,3	0,84
AD-23031	3,4	0,78	1,7	0,02

Exemplo 14. Avaliação de Duração de Infusão na Eficácia de uma Administração Intravenosa Única de SNALP-18534 em ratos Sprague-Dawley

Objetivos

[00322] Determinar o efeito de duração de infusão na eficácia de uma infusão IV única de SNALP-18534 sobre níveis de mRNA no fígado em

ratos Sprague-Dawley.

Tabela 15: Abreviações e definições usadas

SNALP-18534	siRNA específico da transtirretina de roedor formulado em SNALP
SNALP-1955	siRNA específico da luciferase de não mamífero formulado em SNALP

[00323] As sequências das filas de senso e antissenso de Ad-18534 são produzidas abaixo a partir das tabelas acima:

Fita	Oligo No.	Posição	Sequência 5' a 3'	SEQ ID NO:
s	A-32755	532	cAGuGuucuuGcucuAuAAdTdT	1289
as	A-32756	550	UuAuAGAGcAAGAAcACUGdTdT	1290

Materiais de Estudo

Artigo(s) de Teste

[00324] SNALP-18534 é compreendido de um mRNA de TTR de roedor se direcionando a siRNA (AD-18534), formulado em partículas de lipídeo de ácido nucleico estáveis (SNALP) para administração a tecidos-alvos. A formulação SNALP (partícula de lipídeo) consiste em um aminolipídeo novo (DLinDMA), um lipídeo PEGuilado (mPEG2000-C-DMA), um lipídeo neutro (DPPC) e colesterol. A razão de lipídeo:ácido nucleico na formulação de SNALP é aproximadamente 5,8:1 (p:p). SNALP-1955 contém um siRNA se direcionando ao mRNA de luciferase de não mamífero, é formulado com a partícula de lipídeo idêntica a SNALP-18534 e serve como um controle não farmacologicamente ativo. Níveis de dose são expressos como mg/kg com base no peso do teor de siRNA.

Projeto & Procedimentos de Estudo

Animais e administração do artigo de teste

[00325] O estudo era compreendido de 9 grupos de ratos Sprague-Dawley (4 machos/grupo). Os animais foram deixados ter um período de pelo menos 2 dias de aclimação antes do estudo e todos os

animais tinham 7 semanas de vida no início da dosagem. A dose administrada foi calculada com base nos dados de peso do corpo coletados antes da dosagem no dia 1. Os artigos de teste e controle foram administrados como uma infusão IV única de 15 minutos, 1 hora, 2 horas ou 3 horas através da veia da cauda usando uma cânula de 24G $\frac{3}{4}$ " vedada com um septo Baxter Injection Site conectado através de uma agulha borboleta Terumo 27G a uma Baxter AS40A Syringe Pump. O volume de dose era 3 ml/kg, a taxa de infusão era 12 ml/h e os animais tinham movimento livre nas gaiolas durante a dosagem. Os ratos foram divididos em nove grupos de tratamento e administrados em uma infusão IV única de SNALP-18534, SNALP-1955 ou PBS conforme mostrado na tabela 16:

Tabela 16: Grupos de Dosagem de Animal de Teste

Grupo	N	Artigo de Teste	Duração da Infusão	Dose
A	4	PBS	15 minutos	---
B	4	PBS	3 horas	---
C	4	SNALP -1955	1 horas	1 mg/kg
D	4	SNALP -1955	2 horas	1 mg/kg
E	4	SNALP -1955	3 horas	1 mg/kg
F	4	SNALP-18534	15 minutos	1 mg/kg
G	4	SNALP-18534	1 horas	1 mg/kg
H	4	SNALP-18534	2 horas	1 mg/kg
I	4	SNALP-18534	3 horas	1 mg/kg

Coleta de tecido e isolamento de RNA:

[00326] No dia 0, os animais foram anestesiados através de inalação de isoflurano e amostras de sangue de pré-dosagem foram coletadas em tubos separadores de soro através de sangria retro-orbital. As amostras de sangue foram deixadas coagular em temperatura ambiente por aproximadamente 30 minutos antes da centrifugação a 4°C.

Amostras de soro foram então armazenadas a -80°C até análise ser realizada. No dia 3, os animais em todos os nove grupos de tratamento receberam uma dose letal de cetamina/xilazina. Sangue foi coletado através da veia cava caudal em tubos de separação de soro e então deixado coagular em temperatura ambiente por aproximadamente 30 minutos antes da centrifugação a 4°C. Amostras de soro foram armazenadas a -80°C até análise ser realizada. Tecido de fígado foi coletado e congelado rapidamente em gelo seco. Tecido de fígado congelado foi moído e lisados de tecido foram preparados para quantificação de mRNA de fígado.

Quantificação de mRNA de TTR:

[00327] Os níveis de mRNA de TTR com relação àqueles de mRNA de GAPDH foram determinados nos lisados através do uso de ensaio de DNA ramificado (QuantiGene Reagent System, Panomics, Fremont, CA). Em suma, o ensaio QuantiGene (Genospectra) foi usado para quantificar os níveis de mRNA em lisados de amostra de tecido de acordo com as instruções do fabricante. O nível médio de mRNA de TTR foi normalizado para o nível médio de mRNA de GAPDH para cada amostra.

[00328] Para obter o nível relativo de expressão de mRNA de TTR, valores médios de grupo para grupos tratados com SNALP-1955 e SNALP-18534 com durações de infusão de 15 minutos, 1 hora e 2 horas foram então normalizados para o valor médio para o grupo tratado com PBS com infusão de 15 minutos enquanto valores médios de grupo para grupos tratados com SNALP-1955 e SNALP-18534 com duração de infusão de 3 h foram então normalizados para o valor médio para o grupo tratado com PBS com duração de infusão de 3 h.

Resultados

[00329] Conforme mostrado na figura 16, uma infusão IV única de 1 mg/kg de SNALP-18534 com durações de infusão diferentes de 15

minutos a 3 horas resulta em inibição comparável de níveis de mRNA de TTR do fígado medidos dois dias após dosagem. Uma infusão IV única de 1 mg/kg de SNALP-18534 também mostrou subregulação de TTR durável durante 29 dias seguindo uma infusão IV de 15 minutos única, conforme comparado com controle SNALP-1955 (dados não mostrados). Comparado com o grupo tratado com PBS, uma infusão IV de 15 minutos, 1 hora, 2 horas ou 3 horas de SNALP-18534 a 1 mg/kg reduziu significativamente os níveis de expressão de mRNA de TTR relativo em 94% ($p<0,001$), 94% ($p<0,001$), 92% ($p<0,001$) e 93% ($p<0,001$), respectivamente. Especificidade de atividade de SNALP-18534 é demonstrada por falta de inibição direcionada significativa através da administração de SNALP-1955 através de infusão IV de 1 hora, 2 horas ou 3 horas no mesmo nível de dosagem.

Conclusões

[00330] Este estudo demonstra que variação na duração de infusão de 15 minutos até 3 horas não afeta a eficácia de uma administração IV única de 1 mg/kg de SNALP-18534 em ratos, conforme avaliado através da redução dos níveis de mRNA de TTR no fígado.

Exemplo 15. Redução *in vitro* de mRNA de TTR do tipo selvagem no fígado de rato por LNP07-18534 e LNP08-18534

[00331] Para avaliar a eficácia de 2 novas formulações em nanopartícula de lipídeo, LNP07 e LNP08, para administração de siRNA no rato, o siRNA de TTR específico de roedor, AD-18534, foi formulado em LNP07 (LNP07-18534) ou LNP08 (LNP08-18534) e administrado através de infusão IV de 15 minutos e mRNA de TTR do fígado foi quantificado. Ratos Sprague-Dawley (4 animais por grupo) foram administrados com infusão IV de 15 minutos de LNP07-18534 (0,03, 0,1, 0,3 ou 1 mg/kg), LNP08-18534 (0,01, 0,03 ou 0,1 mg/kg) ou LNP07-1955 (1 mg/kg) ou LNP08-1955 (0,1 mg/kg) contendo o siRNA controle negativo AD-1955 que se direciona ao gene da luciferase de não

mamífero. Quarenta e oito horas depois, os animais foram eutanasiados e tecido do fígado foi coletado, congelado rapidamente e armazenado a -80°C até processamento.

[00332] Para quantificação de mRNA de TTR, tecido de fígado congelado foi moído para pó e os lisados foram preparados. Níveis de mRNA de TTR com relação àqueles de mRNA de GAPDH foram determinados nos lisados usando um ensaio de DNA ramificado (QuantiGene Reagen System, Panomics, Fremont, CA). Em suma, o ensaio QuantiGene (Genospectra) foi usado para quantificar os níveis de mRNA em lisados de amostra de tecido de acordo com as instruções do fabricante. O nível médio de mRNA de TTR foi normalizado para o nível médio de mRNA de GAPDH para cada amostra. Médias de grupo dos valores normalizados foram então normalizadas adicionalmente para o valor médio para o grupo tratado com PBS, para obter o nível relativo de expressão de mRNA de TTR.

[00333] Os resultados são mostrados na figura 17. LNP07-18534 reduziu os níveis de mRNA de TTR no fígado de uma maneira dependente da dose, com supressão de 94% de mRNA de TTR a 1 mg/kg. O efeito foi específico, uma vez que o controle negativo LNP07-1955 a 1 mg/kg não afetou significativamente os níveis de mRNA de TTR comparado com o controle de PBS. A ED_{50} de mRNA foi determinada ser $\sim 0,05$ mg/kg de LNP07-18534. LNP08-18534 reduziu os níveis de mRNA de TTR no fígado de uma maneira dependente da dose, com supressão de 86% de mRNA de TTR a 0,1 mg/kg. O efeito era específico, uma vez que o controle negativo LNP08-1955 a 0,1 mg/kg não afetou significativamente os níveis de mRNA de TTR comparado com o controle de PBS. A ED_{50} de mRNA foi determinada ser $\sim 0,02$ mg/kg de LNP08-18534.

[00334] Esses resultados demonstram que LNP07-18534 e LNP08-18534 são eficazes na supressão de mRNA de TTR do tipo selvagem

no fígado de rato quando administrados através de infusão IV, e que LNP07 e LNP08 são formulações eficazes para administração de siRNA ao fígado.

Exemplo 16: Redução de mRNA do fígado de TTR através de uma administração intravenosa única de LNP09-18534 ou LNP11-18534 em Ratos Sprague-Dawley

Objetivo:

[00335] Avaliar a eficácia de duas novas formulações em nanopartícula (LNP) para administração do siRNA específico de TTR de roedor, AD-18534 no rato Sprague-Dawley para redução dos níveis de mRNA de TTR do fígado endógeno (tipo selvagem). Os ratos foram intravenosamente dosados através de uma infusão de 15 minutos ou com 0,01, 0,03 ou 0,1 ou 0,3 mg/kg de LNP09-18534, LNP11-18534 ou solução salina tamponada com fosfato (PBS) e níveis de mRNA do fígado de TTR foram ensaiados em 48 horas pós-tratamento.

Materiais e Métodos:

[00336] Formulação LNP09: (XTC/DSPC/Chol/PEG₂₀₀₀-C14) = 50/10/38,5/ 1,5% em mol; Lipídeo:siRNA ~ 11:1. Formulação LNP11: (MC3/DSPC/ Chol/PEG₂₀₀₀-C14) = 50/10/38,5/1,5% em mol; Lipídeo:siRNA ~ 11,1.

[00337] Coleta de tecido e isolamento de RNA: No dia 3, os animais em todos os grupos de tratamento receberam uma dose letal de cetamina/xilazina. Sangue foi coletado através da veia cava caudal em tubos de separação de soro e então deixado coagular em temperatura ambiente por aproximadamente 30 minutos antes da centrifugação a 4°C. Amostras de soro foram armazenadas a -80°C até análise futura. Tecidos do fígado foram coletados e congelados rapidamente em gelo seco. Tecido do fígado congelado foi moído e os lisados de tecido foram preparados para quantificação de mRNA do fígado.

[00338] Quantificação de mRNA de TTR: Os níveis de mRNA de TTR

com relação àqueles de mRNA de GAPDH foram determinados nos lisados usando um ensaio de DNA ramificado (QuantiGene Reagent System, Panomics, Fremont, CA). Em suma, o ensaio QuantiGene (Genospectra) foi usado para quantificar os níveis de mRNA em lisados de amostra de tecido de acordo com as instruções do fabricante. O nível médio de mRNA de TTR foi normalizado para o nível médio de mRNA de GAPDH para cada amostra. Valores médios de grupo foram então normalizados para o valor médio para o grupo tratado com PBS, para obter o nível relativo de expressão de mRNA de TTR.

Resultados:

[00339] Conforme mostrado na figura 18, em contraste com animais tratados com PBS, animais tratados com LNP09-18534 e LNP11-18534 tiveram uma diminuição dependente da dose significativa em níveis de mRNA de TTR no fígado, atingindo redução máxima de 90% de redução de mRNA para ambos os grupos formulados com LNP09 e LNP11, com relação ao grupo controle de PBS a 0,3 mg/kg e uma dose atingido redução de 50% (EC_{50}) de <0,03 mg/kg para LNP11-18534 e <0,1 mg/kg para LNP09-18534.

Conclusões

[00340] Este estudo demonstra que uma infusão IV de 15 minutos única de LNP09-18534 ou LNP11-18534 em ratos Sprague-Dawley resultou em uma redução dependente da dose de mRNA de TTR no fígado. Esses dados demonstram a eficácia de LN09-18328 e LNP11-18328 na redução de mRNA de TTR endogenamente expressa (tipo selvagem) com níveis de ED_{50} de < 0,03 e < 0,1 mg/kg para LNP11-18534 e LNP09-18534, respectivamente.

Exemplo 17: Inibição de TTR em humanos

[00341] Um indivíduo humano é tratado com um dsRNA direcionado a um gene de TTR para inibir expressão de um gene de TTR para tratar uma condição.

[00342] Um indivíduo com necessidade de tratamento é selecionado ou identificado. O indivíduo pode ter um distúrbio de fígado, amiloidose de transtirretina e/ou fígado transplantado.

[00343] A identificação do indivíduo pode ocorrer em um ambiente clínico, ou em outro local, por exemplo, na casa do indivíduo através do uso pelo próprio indivíduo de um estojo de autoteste.

[00344] No momento zero, uma primeira dose adequada de siRNA anti-TTR é administrada ao indivíduo. O dsRNA é formulado conforme aqui descrito. Após um período de tempo seguindo a primeira dose, por exemplo, 7 dias, 14 dias e 21 dias, a condição do indivíduo é avaliada, por exemplo, medindo a função do fígado. Esta medição pode ser acompanhada por uma medição de expressão de TTR no dito indivíduo e/ou nos produtos do direcionamento de siRNA bem-sucedido de mRNA de TTR. Outros critérios relevantes podem ser também medidos. O número e a resistência de doses são ajustados de acordo com as necessidades do indivíduo.

[00345] Após tratamento, a taxa de crescimento de tumor do indivíduo é diminuída com relação à taxa existente antes do tratamento ou com relação à taxa medida em um indivíduo similarmente afligido, mas sem tratamento.

REIVINDICAÇÕES

1. Ácido ribonucleico de fita dupla (dsRNA) para inibição da expressão de transtirretina (TTR), caracterizado pelo fato de que compreende uma fita senso e uma fita antissenso formando uma região de dupla fita,

em que a fita senso consiste na sequência de nucleotídeo 5' – GuAAccAAGAGuAuuccAudTdT – 3' (SEQ ID NO: 1009) e a fita antissenso consiste na sequência de nucleotídeo 5'- AUGGAAuACUCUUGGUuACdTdT – 3' (SEQ ID NO:1010),

em que A é adenina, C é citosina, G é guanina e U é uracila; em que u e c são 2'-O-metila U e 2'-O-metila C, respectivamente, e em que dT é 2'-doexitimidina.

2. dsRNA de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o dsRNA é formulado em uma formulação de lipídeo.

3. dsRNA, de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que a formulação de lipídeo compreende um lipídeo catiônico, um lipídio não catiônico e um lipídio que impede a agregação de partículas.

4. dsRNA, de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que o lipídeo catiônico é (6Z,9Z,28Z,31Z)-heptatriaconta-6,9,28,31-tetraen-19-il 4-(dimetilamino)butanoato.

5. dsRNA, de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que o lipídeo não catiônico é a diestearoilfosfatidilcolina (DSPC).

6. dsRNA de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que o lipídeo que impede a agregação de partículas é um lipídeo de polietilenoglicol (PEG).

7. dsRNA, de acordo com qualquer uma das reivindicações 2 a 6, caracterizado pelo fato de que a formulação lipídica compreende ainda colesterol.

8. Composição farmacêutica para inibição da expressão de um gene de transtirretina (TTR), caracterizada pelo fato de que compreende o dsRNA como definido em qualquer uma das reivindicações 1 ou 2 e um veículo farmacêuticamente aceitável, em que o veículo farmacêuticamente aceitável é uma formulação de lipídeo compreendendo um lipídeo catiônico e um lipídeo não-catiônico.

9. Uso de dsRNA, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 7, caracterizado pelo fato de que é para a preparação de uma composição farmacêutica para o tratamento de um indivíduo humano apresentando um distúrbio mediado por expressão de transtirretina (TTR), em que

- (a) o indivíduo humano tem amiloidose de transtirretina; e/ou
- (b) o humano tem um distúrbio de fígado.

10. Uso de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato de que a composição farmacêutica apresenta um rótulo indicando que a dosagem do dsRNA é de 0,01, 0,1, 0,3, 0,5, 1,0, 2,5 ou 5,0 mg/kg.

11. Uso de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato de que o indivíduo humano é ainda provido com um transplante de fígado.

12. Uso de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato de que o dito distúrbio mediado pela expressão de transtirretina (TTR) é selecionado a partir de polineuropatia amiloidótica familiar (FAP), cardiomiopatia amiloidótica familiar (FAC), amiloidose leptomeníngea/SNC, amiloidose sistêmica senil (SSA) e amiloidose cardíaca senil (SCA).